

## HIỆU QUẢ CỦA MÔI TRƯỜNG LỒNG TRONG VI NHÂN GIỐNG LOÀI KIM TUYẾN TRUNG BỘ (*ANOECTOCHILUS ANNAMENSIS* AVER.)

Phan Xuân Bình Minh<sup>1</sup>, Phạm Hương Sơn<sup>2</sup>, Trần Minh Hoi<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

<sup>2</sup>Phòng thí nghiệm Phát triển Ứng dụng y sinh Công nghệ cao,  
Viện Ứng dụng Công nghệ

<sup>3</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Kim tuyến trung bộ (*A. annamensis* Aver.) là một trong bảy loài thuộc chi *Anoectochilus* Blume, họ Lan Orchidaceae) hiện có ở Việt Nam, là loài đặc hữu mới được phát hiện và phân loại năm 2005 bởi Averyanov.L.. Cùng với các loài khác thuộc chi Kim tuyến, Kim tuyến trung bộ đang bị khai thác tận diệt để bán trái phép trên thị trường với giá từ 1,5 đến 2,5 triệu đồng/kg tươi. Theo Trần Minh Hoi và cộng sự (2016) cho biết: *A. annamensis* có chứa các flavonoids, trong đó có một flavonol mới là diglycoside (4', 5-dihydroxy-3,3', 7-trimethoxyflavone 4'-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl - (1 - >6) - $\beta$ -D-glucopyranoside) có khả năng kháng khuẩn cao (Tran Minh Hoi et al., 2016).

Trong tự nhiên loài này có vùng phân bố rộng, thường thấy trên vùng đất silicat trong những khu rừng rậm có độ ẩm cao ở độ cao từ 100-1000m thuộc miền Bắc và miền Trung như: Vườn Quốc gia Tam Đảo, Vườn Quốc gia Phong Nha-Kẻ Bàng; Hương Thủy, A Lưới (Thừa Thiên-Huế)... *A. annamensis* là loài thân thảo nhỏ đơn thân bò sát mặt đất, với 2-3 lá, là có những đường gân kim tuyến màu hồng hay vàng rất đẹp. Vì vậy ngoài giá trị làm thuốc cây còn có giá trị làm cảnh. Cây ra hoa vào tháng 3-5, quả chín vào tháng 6-8 (Averyanov L. (2008). Cây có thể tái sinh từ chồi hoặc từ hạt. Ở điều kiện tự nhiên sau 2 đến 3 năm gieo hạt mới có được cây trưởng thành. Nhưng do đặc thù cây ra hoa kết quả vào mùa xuân hè là mùa thu hái Kim tuyến nên cây bị thu hái tại thời điểm trước và đang ra hoa làm khả năng tái sinh từ hạt trong tự nhiên là rất hiếm. Thêm vào đó, khả năng nảy mầm của hạt phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện môi trường, hệ vi sinh vật của đất. Khi rừng bị tàn phá, hệ sinh thái bị thay đổi đã làm mất đi khả năng tái sinh của hạt Lan kim tuyến trong tự nhiên. Ở Việt Nam cũng đã có những kết quả nghiên cứu về nhân giống và nuôi trồng Lan kim tuyến nhưng chủ yếu tập trung vào loài Kim tuyến tơ (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) và nguyên liệu ban đầu là từ chồi nuôi cấy trên môi trường bán rắn. Nghiên cứu nhân giống *A. annamensis* bằng hạt và nhân nhanh trên môi trường lỏng là giải pháp tạo cây giống với số lượng lớn và chất lượng đồng đều.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên vật liệu

Mẫu Kim tuyến trung bộ (*A. annamensis*) được thu tại xã Mỹ Lý, huyện Kỳ Sơn, Nghệ An trong rừng thứ sinh đừa và Vườn Quốc gia Phong Nha Kẻ Bàng đưa về nuôi trồng trong vườn ươm tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm. Khi cây ra hoa tiến hành thụ phấn, quả được 8 tuần tuổi tiến hành thu hái làm nguyên liệu. Quả được rửa sạch bằng xà phòng, khử trùng bằng cồn 70% trong 30 phút và NaClO 0,5% với 2 giọt Tween 20 cho 100ml dung dịch khử trùng trong 15 phút tiến hành gieo hạt và môi trường khoáng MS có bổ sung 8 g aga, 20 g đường, 100 ml nước đừa và 1mg/l TDZ (thidiazuron). Điều kiện phòng nuôi cây có nhiệt độ trung bình 23  $\pm$  2<sup>o</sup>C và độ ẩm trung bình 75  $\pm$  5%. Thời gian nuôi cây 100 ngày.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lỏng lắc đến khả năng sinh chồi được bố trí theo kiểu ảnh hưởng của hai yếu tố với 4 mức vận tốc lắc khác nhau (Không lắc, lắc với vận tốc 60 vòng/phút, lắc với vận tốc 80 vòng/ phút và lắc với vận tốc 100 vòng/ phút) và 4 mức nồng độ TDZ (0,2; 0,5; 1,0 mg/l). Thí nghiệm gồm 16 công thức, mỗi công thức 3 bình mỗi bình có 5 chồi lặp lại 3 lần, thí nghiệm được đặt trong điều kiện phòng nuôi cấy sau 4 tuần nuôi cấy tiến hành kiểm tra các chỉ số: Số lượng chồi, chiều cao chồi, cân nặng trung bình của chồi.

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của môi trường lỏng lắc đến khả năng sinh chồi được bố trí theo kiểu ảnh hưởng của một yếu tố môi trường bán rắn, môi trường lỏng tĩnh và môi trường lỏng lắc với vận tốc cho kết quả tốt nhất ở thí nghiệm trên. Thí nghiệm có 3 công thức được tiến hành tương tự như trên.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lỏng lắc đến khả năng sinh rễ cũng được bố trí theo kiểu ảnh hưởng của hai yếu tố với 5 mức vận tốc lắc khác nhau (Không lắc, lắc với vận tốc 40 vòng/phút, lắc với vận tốc 60 vòng/phút, lắc với vận tốc 80 vòng/phút và lắc với vận tốc 100 vòng/ phút) và 3 mức nồng độ IBA (0,2; 0,5; 1mg/l). Thí nghiệm gồm 15 công thức, mỗi công thức 3 bình, mỗi bình có 7 chồi, thí nghiệm được đặt trong điều kiện phòng nuôi cấy sau 4 tuần nuôi cấy tiến hành kiểm tra các chỉ số: Số rễ trung bình/ cây, chiều dài trung bình của rễ.

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của môi trường lỏng đến khả năng sinh rễ được bố trí tương tự như đối với đánh giá hiệu quả của môi trường lỏng lắc đến khả năng sinh chồi.

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm xử lý số liệu thống kê Irristart 5.0.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Ảnh hưởng của môi trường lỏng lắc đến khả năng sinh chồi của *A. annamensis*

Sử dụng môi trường lỏng trong nhân giống in-vitro là một bước tiến quan trọng nhân giống thực vật cũng như trong quá trình làm tăng sinh khối tế bào thực vật. Phương pháp này giúp tiết kiệm nguyên liệu, nhưng quan trọng hơn là tiết kiệm nhân công. Rất nhiều các công trình nghiên cứu về nhân giống thực vật bằng môi trường lỏng đã được công bố trên thế giới cũng như trong nước như nuôi cấy *Wasabia japonica* của tác giả Cao Đình Hùng và cộng sự (Cao Đình Hùng, Krystyna Johnson, Fraser Torpy (2006); nuôi cấy giống táo của tác giả Mohina Mehta và cộng sự ... Nuôi cấy trong môi trường lỏng giúp tế bào phát triển toàn diện, nhanh, nhưng do bị ngâm chìm trong nước làm khả năng hô hấp và quang hợp bị hạn chế. Lắc là giải pháp giúp chúng hô hấp và quang hợp tốt hơn. Nhưng tùy thuộc vào từng loại cây có chế độ lắc cho phù hợp vì lắc với vận tốc cao có thể làm vỡ các màng tế bào hay mẫu bị va chạm nhiều vào thành bình gây tổn thương. Các loại cây thường thích hợp với tốc độ lắc 60- 100 vòng/phút. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ lắc và nồng độ TDZ được thể hiện ở bảng 1.

Trong những nghiên cứu trước về nồng độ và chất điều hòa sinh trưởng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi *A. annamensis* trong môi trường bán rắn thấy rằng chất TDZ ở nồng độ 0,5mg/l là thích hợp. Kết quả ở bảng 1 cho thấy đối với môi trường lỏng cũng vậy, chất TDZ ở nồng độ 0,5mg/l cho kết quả tốt nhất. Ở hai công thức còn lại khả năng sinh chồi kém hơn và chất lượng chồi cũng kém hơn. Tốc độ lắc thích hợp cho *A. annamensis* là 80 vòng/ phút đối với các công thức có tốc độ chậm hơn thì chồi cũng phát triển chậm hơn đặt biệt ở 2 công thức lỏng tĩnh và lắc với vận tốc 40 vòng/phút có hiện tượng tế bào bị trương và bị chết. Đối với công thức lắc 100 vòng/phút lại có hiện tượng tế bào bị tổn thương.

Từ kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1, tiến hành nghiên cứu so sánh giữa 3 công thức môi trường có thành phần như nhau (MS+ 100ml/l nước dừa + 20g/l đường + 0,5mg/l TDZ) khác nhau là môi trường bán rắn bổ sung 8g aga/l. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 1

**Ảnh hưởng của tốc độ lắc và nồng độ TDZ để khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi *A. annamensis* sau 4 tuần nuôi cấy**

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Nồng độ TDZ (mg/l)	Số mầm trung bình trên mẫu (mầm)	Chiều cao trung bình của mầm (mm)	Cân nặng trung bình của mầm (mg)
0 vòng /phút	0,2	4,06 e	16,62 de	81,50 de
	0,5	6,51 d	18,42 cd	94,98 d
	1,0	4,38 e	17,41 d	86,06 de
40 vòng /phút	0,2	4,13 e	19,96 c	79,39 e
	0,5	6,23 d	21,45 ab	113,41 b
	1,0	4,78 e	20,06 b	96,03 b
60 vòng /phút	0,2	6,79 d	20,67 b	108,50 bc
	0,5	9,23 b	21,31 ab	121,98 ab
	1,0	7,12 c	20,13 bc	112,24 b
80 vòng /phút	0,2	6,67 d	20,96 b	107,63 bc
	0,5	10,44 a	22,45 a	128,41 a
	1,0	8,82 b	21,46 ab	103,03 c
100 vòng /phút	0,2	5,97 d	20,36 b	107,23 bc
	0,5	7,44 c	22,25 a	116,32 bc
	1,0	6,12 d	21,06 ab	102,14c
	LSD <sub>0,5</sub>	0,42	1,72	12,17

**Chú thích:** LSD<sub>0,05</sub> là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%; Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Bảng 2

**Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi *A. annamensis* sau 4 tuần nuôi cấy**

Môi trường	Số chồi trung bình trên mẫu (mầm)	Chiều cao trung bình của mầm (mm)	Cân nặng trung bình của mầm (mg)
Môi trường bán rắn	5,76 c	25,71 a	114,67 b
Môi trường lỏng tĩnh	6,78 b	19,01 c	96,48 c
Môi trường lỏng lắc 80 vòng/phút	10,16 a	23,41 b	131,47a
LSD <sub>0,5</sub>	0,97	2,42	14,23

**Chú thích:** LSD<sub>0,05</sub> là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5% ; Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả bảng 2 cho thấy ở công thức môi trường lỏng lắc 80 vòng/phút cho số chồi trung bình trên mẫu là cao nhất 10.16 chồi/mẫu cao gần gấp 2 lần so với hai công thức còn lại. Kết quả này cho thấy có thể dùng môi trường lỏng lắc để nhân nhanh *A. annamensis*.

**2. Ảnh hưởng của môi trường lỏng lắc đến khả năng sinh rễ của *A. annamensis***

Môi trường lỏng lắc ngoài khả năng kích thích sự sinh chồi còn có khả năng kích thích sự sinh rễ, nhưng vì là cây hoàn chỉnh nên khi cấy vào môi trường lỏng lắc cần lưu ý tránh để cây bị ngập chìm trong môi trường. Tương tự như đối với giai đoạn nhân nhanh, giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

đã được nghiên cứu trên môi trường bán rắn và kết quả cho thấy thành phần môi trường thích hợp cho giai đoạn này là môi trường  $\frac{1}{2}$  MS + 0,5  $\mu$ M/l IBA. Vì vậy nghiên cứu này cũng sử dụng môi trường khoáng  $\frac{1}{2}$  MS và chất kích ra rễ IBA ở 3 nồng độ khác nhau (0,2; 0,5; 1mg/l) và 5 tốc độ lắc (0 vòng, 40 vòng, 60 vòng, 80 vòng và 100 vòng/phút) kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3

**Ảnh hưởng của tốc độ lắc và nồng độ IBA đến khả năng sinh rễ của *A.annamensis* sau 4 tuần nuôi cấy**

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Nồng độ IBA (mg/l)	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình	Chiều dài trung bình của rễ (mm)
0 vòng /phút	0,2	54,86 ef	1,82 e	11,67 cd
	0,5	68,78 d	2,04 cd	11,12 cde
	1	45,94 g	1,84 e	15,17 b
40 vòng /phút	0,2	75,89 c	1,91 de	10,29 e
	0,5	85,11 b	2,16 c	10,50 de
	1	80,00 bc	2,13 c	15,67ab
60 vòng /phút	0,2	83,33 b	2,03 cd	10,90 cde
	0,5	94,33 a	2,90 a	13,60 c
	1	81,33 bc	2,64b	15,01 b
80 vòng /phút	0,2	61,11 e	1,93 de	11,32cde
	0,5	78,89 c	1,91 de	13,82c
	1	52,22 f	1,83 e	17,69 a
100 vòng /phút	0,2	46,21g	1,79e	11,07 cde
	0,5	56,12ef	2,13 c	13,21cd
	1	91,11 a	2,16 c	15,46b
LSD <sub>0,5</sub>		5,90	0,14	0,90

**Chú thích:** LSD<sub>0,05</sub> là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%; Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả bảng 3 cho thấy cũng như đối với môi trường bán rắn, nồng độ IBA thích hợp trong môi trường lỏng là 0,5mg/l, ở nồng độ thấp hơn khả năng sinh rễ thấp và sự phát triển của rễ cũng kém hơn, nồng độ cao cũng chỉ làm cho rễ dài hơn và khả năng sinh rễ cũng kém hơn. Công thức tốt nhất là công thức bổ sung 0,5mg/l IBA nuôi cấy trong môi trường lỏng lắc với vận tốc 60 vòng /phút. Từ kết quả trên thực hiện thí nghiệm so sánh giữa ba loại môi trường : môi trường bán rắn thông thường, môi trường lỏng tĩnh và môi trường lỏng lắc với vận tốc 60 vòng /phút kết quả như sau (Bảng 4).

Bảng 4

**Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh rễ *A. Annamensis* sau 4 tuần nuôi cấy**

Môi trường	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình	Chiều dài trung bình của rễ (mm)
Môi trường bán rắn	62,26 c	1,62 bc	9,56c
Môi trường lỏng tĩnh	69,58 b	2,01 b	11,17b
Môi trường lỏng lắc 60 vòng/phút	95,06 a	2,81 a	13,14a
LSD <sub>0,5</sub>		5,97	0,61

**Chú thích:** LSD<sub>0,05</sub> là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5% ; Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả cho thấy sử dụng môi trường lỏng lắc cho tỉ lệ cây ra rễ nhiều hơn, số lượng rễ cũng nhiều và rễ phát triển tốt hơn, Thêm vào đó, khi sử dụng môi trường lỏng thì khâu đưa cây ra dễ hơn tránh được những tổn thương cho rễ, khâu làm sạch rễ cũng đơn giản hơn tránh được nấm mốc khi trồng cây ra vườn ươm.

### III. KẾT LUẬN

Môi trường lỏng lắc đã đem lại hiệu quả cao trong nhân giống in vitro (khả năng sinh chồi và sinh rễ) của loài Kim tuyến trung bộ (*Anoectochilus annamensis*).

Hạt lấy từ quả 8 tuần tuổi được cấy trên môi trường khoáng MS, 8g/l aga, 20g/l đường, 100 ml/l nước dừa, 1 mg TDZ để tạo chồi (protocorm). Khả năng phát triển của chồi (protocorm) trong môi trường lỏng (không bổ sung aga), lắc 80 vòng/phút cao gần gấp đôi so với cấy trong môi trường lỏng tĩnh và môi trường bán rắn (bổ sung 8g/l aga) với thành phần môi trường giống nhau MS 20g/l đường, 100ml/l nước dừa, 0,5ml TDZ sau 4 tuần.

Đối với quá trình sinh, khi sử dụng môi trường lỏng, lắc 60 vòng/ phút rễ phát triển nhanh, đều và chất lượng cao hơn so với môi trường bán rắn và môi trường lỏng tĩnh có thành phần giống nhau ½ môi trường MS, 20g/l đường, 100 ml/l nước dừa, 0,5 μMIBA.

Sử dụng môi trường lỏng cho giai đoạn này để hạn chế tối đa những tổn thương cho rễ khi thực hiện các hoạt động đưa cây ra trồng ex-vitro.

**Lời cảm ơn:** Tập thể tác giả xin bày tỏ lòng cảm ơn tới Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (Nafosted) đã tài trợ cho đề tài - Mã số: 106-NN.99-2013.41.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Averyanov L.**, 2008. *The Orchids of Vietnam*, Illustrated survey. Part 1.
2. **Cao Dinh Hung, Krystyna Johnson, Fraser Torpy**, 2006. Liquid culture for efficient micropropagation of *Wasabia japonica* (MIQ.) matsumura". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* November–December 2006, Volume 42, Issue 6, pp 548-552
3. **Dori C.N. Chang, L. C. Chou, G. C. Lee**, 2007. New Cultivation Methods *Anoectochilus formosanus* Hayata", *Orchid Science and Biotechnology* 2007. Global Science Books: 56-60.
4. **Ket N. V., Hahn E. J., Park S. Y., Chakrebarty D., Paek K.**, 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biological plantarum*. 48(3): 339 -344.
5. **Nguyen Trung Thanh, Pham Luong Hang, Nguyen Van Ket, Truong Thị Lan Anh, Phung Van Phe, Nguyen Thi Hong Gam, Phi Thi Cam Mien**, 2012. The role of different medium and plant hormones on multiple shoots of Jewel orchids (*Anoectochilus setaceus* Blume), *J. Science VNU*, Vietnam, Vol. 28 (1): pp 47-53
6. **Mei-Hua Han, Xiu- Wei Yang, Yean-Ping Jin**, 2008. Novel triterpenoid acyl esters and alkaloids from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.. *Phytochemical Analysis* 19(5): 438-443.
7. **Shiau, Y. J., A. P. Sagare, U. C. Chen, S. R. Yang, and H. S. Tsay**, 2002. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. *Bot. Bul. Acad. Sin.* 43: 123- 130.

8. **Tran Minh Hoi et al.** 2016. Flavonoids from *Anoectochilus annamensis* and their Anti-inflammatory Activity”. *Nat Prod Commun* 2016 May;11(5):613-4.
9. <http://vi.wikipedia.org> (2009), Chi Kim tuyến (*Anoectochilus* Blume).
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Anoectochilus>
11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

## **LIQUID MEDIUM FOR EFFICIENT MICROPROPAGATION OF *ANOECTOCHILUS ANNAMENSIS* AVER.**

**Phan Xuan Binh Minh, Pham Huong Son, Tran Minh Hoi**

### SUMMARY

*Anoectochilus annamensis* Aver. is a beautiful orchid with ornamental and medicinal use in Vietnam. Conservation and multiplication of this species requires propagation measures and tissue culture breeding.

The paper presents the results on induction and multiplication of shoot and root in *Anoectochilus annamensis* in liquid medium. Micropropagation from seeds initiated on MS medium containing 8g/l agar, 20g/l sucrose, 100ml/l coconut water, 15 $\mu$ M TDZ (thidiazuron) for induction of protocorm.

The protocorm grows well in liquid medium while shaking at 80 rpm. The growth was almost doubled than in static liquid medium and semi-solid medium for the same MS medium containing, 20g/l sucrose, 100ml/l coconut water, 10 $\mu$ M TDZ after 4 weeks. For root formation of shoots the liquid medium has also been used. By shaking at 60 rpm the root growth and quality is higher than the semi-solid medium and static liquid medium having the same media composition. Liquid medium could also be used to minimize the damage to the roots when performing the tree plantation ex - vitro.