

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG NHẪM BẢO TỒN VÀ PHÁT TRIỂN LAN SỨA (*Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downie)

PHAN XUÂN BÌNH MINH, PHẠM HƯƠNG SƠN
Viện Ứng dụng Công nghệ

TRẦN MINH HỘI
Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

NGUYỄN THỊ VĂN
Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Chi Lan kim tuyến (*Anoectochilus Blume*) có khoảng 50 loài phân bố chủ yếu ở các vùng Sri Lanka, Malaixia, Ấn Độ, Nhật Bản, Đông Nam Trung Quốc, Úc và Nam Thái Bình Dương với hầu hết các loài có giá trị làm cảnh và làm thuốc [8,9]. Các nhà khoa học Trung Quốc cho rằng Lan kim tuyến có tác dụng tăng cường sức khỏe, làm khí huyết lưu thông, có tính kháng khuẩn, chữa các bệnh viêm khí. Ở Đài Loan, Lan kim tuyến được coi là một loại “thần dược” vì có tác dụng chữa bệnh đa dạng như dùng cây này sắc uống để trị bệnh đường ruột, đau bụng, sốt cao, đắp bên ngoài để trị các chỗ sưng vết thương và chỗ rạn nứt (Sơn Điền Kim, 1932). Tại Trung Quốc, các loài Lan kim tuyến như: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl., *Anoectochilus formosanus*... đã được đưa vào chương trình bảo tồn dược liệu của chính phủ. Còn ở Đài Loan *Anoectochilus formosanus* đã được nhân giống và nuôi trồng để xuất khẩu làm nguyên liệu cho ngành dược với giá khoảng 3.000USD/kg khô [2,7]. Lan sứa (*A. lylei*) là một trong bảy loài hiện có ở Việt Nam. Hiện tại bảy loài này đang bị khai thác tận diệt để bán trái phép trên thị trường với giá từ 1,5 đến 2,5 triệu đồng/1kg tươi.

Lan sứa, còn được gọi là Giải thủy lyle (*A. lylei*) có vùng phân bố ở Thái Lan, Việt Nam. Ở Việt Nam *A. lylei* thường thấy trên vùng đất silicat trong những khu rừng rậm, ẩm ở độ cao từ 600-2.000m thuộc các tỉnh: Quảng Trị, Khánh Hòa, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm Đồng. Đây là loài cây có vùng phân bố sâu nhất về phía nam Việt Nam của chi Lan kim tuyến. Đây cũng là loài đặc trưng của vùng Tây Nguyên. *A. lylei* là loài thảo bô sát dài với 2-4 lá, lá hình trứng rộng, dài 2-6cm, màu xanh đen hay màu xanh nâu, đường vân lá thưa màu vàng đến màu hồng kim tuyến, thường có 1-3 đường vân dọc. Cây có 1 phát hoa cao 7-14 cm với 1-8 hoa, hoa màu xanh trắng, cánh môi dưới chia hai thùy xẻ sâu hình bầu dục, phần cuống của cánh môi có tua ngắn không rõ ràng. Cây ra hoa tháng 11-1 quả chín vào tháng 3 đến tháng năm [1]. Cây tái sinh bằng chồi và hạt nhưng do bị khai thác đến cạn kiệt tại thời điểm trước và đang ra hoa và môi trường sinh thái bị thay đổi làm cho *A. lylei* nói riêng và các loài thuộc chi *Anoectochilus* nói chung mất đi khả năng tái sinh trong tự nhiên đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng.

I. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên vật liệu

Mẫu *A. lylei* là những cây trưởng thành có 2-4 lá, cao 5-8 cm được thu ở các điểm thôn 2 Tak Ngo, xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam (15°00'829"N, 108°01'180"E, độ cao 1.483 m) và huyện KBang, tỉnh Gia Lai. Cây mọc trên đất hoặc thảm lá mục dưới tán rừng rộng thường xanh mưa mùa nhiệt đới trên nền đất ẩm hoặc cạnh các khe suối. Mẫu được thu về sau khi định danh loài bằng phương pháp hình thái học, được trồng tại vườn ươm Trung tâm Sinh học Thực nghiệm trên giá thể mùn hữu cơ tơi xốp giữ ẩm tốt, ở điều kiện nhiệt độ 18-28°C, độ ẩm 60-90%, chế độ chiếu sáng 3.000-5.000 lux. Cây phát triển ổn định cắt lấy đỉnh sinh

trường khử trùng sạch bằng cồn 70% trong 1 phút sau đó dùng NaOCl 1% trong 10 phút. Mẫu sau khi khử trùng cây trong ống nghiệm có chứa môi trường MS, 10 g đường, 8 g aga.

2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo vật liệu khởi đầu: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng BAP; TDZ ở các nồng độ (1; 5; 10; 15; 20 $\mu M/l$) tới khả năng sinh trưởng và phát triển của *A. lylei* trong giai đoạn tạo mầm. Thí nghiệm gồm 11 công thức mỗi công thức 15 ống, mỗi ống có 1 mẫu 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 mầm, chiều cao trung bình của mầm.

Nhân nhanh: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng BAP; TDZ ở các nồng độ (1; 5; 10; 15; 20 $\mu M/l$) tới khả năng phát triển hệ số nhân chồi. Thí nghiệm gồm 11 công thức, mỗi công thức 5 bình, mỗi bình cấy 5 chồi lặp lại 3 lần, thí nghiệm được đặt trong điều kiện phòng nuôi cấy, sau 8 tuần nuôi cấy tiến hành kiểm tra các chỉ số: Số mầm trung bình, chiều cao trung bình của mầm.

Tạo cây hoàn chỉnh: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích ra rễ NAA; IBA (0,1; 0,5; 1; 1,5; 2,0 $\mu M/l$) lên khả năng sinh và phát triển rễ của *A. lylei*. Thí nghiệm gồm 11 công thức, mỗi công thức 5 bình, mỗi bình cấy 5 chồi lặp lại 3 lần, thí nghiệm được đặt trong điều kiện phòng nuôi cấy, sau 8 tuần nuôi cấy tiến hành kiểm tra các chỉ số: Số rễ trung bình trên mầm, chiều dài trung bình của rễ.

Phương pháp đặt thí nghiệm và số liệu được xử lý bằng phần mềm Irristat 5.0.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tạo vật liệu khởi đầu

Bảng 1

Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu *A. lylei* sau 4 tuần nuôi cấy

Chất kích thích sinh trưởng	Nồng độ ($\mu M/l$)	Số mầm trung bình trên mẫu (mầm)	Chiều cao trung bình của mầm (mm)
BAP	0	0,12e	16,93b
	1	0,12e	17,12b
	5	0,27d	16,93b
	10	0,58c	18,86ab
	15	0,92a	20,47a
TDZ	20	0,48c	19,52a
	1	0,09 d	13,72 c
	5	0,22 d	19,21 ab
	10	0,56 c	19,35 a
	15	0,82 b	19,50 a
	20	0,52 c	16,68 b
	LSD _{0,05}	0,06	3,92

Chú thích: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%; *Giá trị trung bình được đánh dấu bằng các chữ giống nhau không có sự sai khác ở mức LSD.

Ở giai đoạn đầu, các chồi phần lớn đang ở trong giai đoạn ngủ nghỉ, lại bị tổn thương nhiều do khử trùng. Thêm vào đó, nguyên liệu được sử dụng để nuôi cấy là các đoạn thân có chứa chồi ngủ, nhưng do đặc thù của các loài thuộc chi Lan kim tuyến là thân mềm chứa hàm lượng

nước cao hơn, loài *A. lylei* lại có đường kính thân thường to hơn các loài khác và bề mặt đất rất dễ tổn thương, vùng tổn thương rộng khi khur trùng vì vậy khâu tạo vật liệu khởi đầu gặp nhiều khó khăn. Cytokinin đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn này đánh thức chồi ngủ, thúc đẩy khả năng sinh trưởng và phát triển của mầm. Khả năng sinh trưởng và phát triển của mầm sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả cho thấy ở nồng độ $15 \mu\text{M/l}$ cả hai loại kích thích sinh trưởng đều cho kết quả tốt hơn so với các nồng độ khác. Đối với công thức có bổ sung $15 \mu\text{M/l}$ TDZ sau 4 tuần nuôi cấy cho kết quả là 0,87 mầm trên mẫu, chiều cao trung bình là 19,50 mm, công thức $15 \mu\text{M/l}$ BAP cho kết quả tốt nhất sau 4 tuần nuôi cấy là 0,92 mầm trên một mẫu và chiều cao trung bình là 20,47 mm. Môi trường thích hợp cho giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu của *A. lylei* là môi trường MS có bổ sung $15 \mu\text{M/l}$ BAP.

2. Nhân nhanh

Giai đoạn tăng sinh khối, tăng cả về số lượng và chất lượng mầm, tăng nhiều về số lượng mầm nhưng không làm ảnh hưởng đến chất lượng mầm, mầm phải giữ được hình thái ban đầu. Cytokinin ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của mầm trong giai đoạn này. Cao Đình Hùng và cộng sự (2006) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP và TDZ lên sự sinh trưởng và phát triển của mầm *Wasabia japonica*. Ảnh hưởng của nồng độ chất cytokinin sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2

Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến giai đoạn nhân nhanh *A. lylei* sau 8 tuần nuôi cấy

Tên Cytokinin	Nồng độ ($\mu\text{M/l}$)	Số mầm trung bình trên mẫu (mầm)	Chiều cao trung bình của mầm (mm)	Cân nặng trung bình của mầm (mg)
BAP	0	2,1f	28,25a	181,64cd
	1	4,23 f	26,34 b	177,89 d
	5	6,79 d	22,67 cd	181,50 cd
	10	7,93 b	23,31 c	221,98 c
	15	9,12 a	25,73 b	272,24 b
	20	6,97 d	23,34 c	167,42de
TDZ	1	4,78 f	22,39 d	196,17 cd
	5	6,67 e	25,96 b	247,63 bc
	10	8,44 b	27,45a	278,41 b
	15	8,12 c	21,06 de	303,03 ab
	20	6,25 d	20,38 e	321,12 a
	LSD _{0,5}	0,42	1,72	32,17

Chú thích: LSD_{0,5} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%; *Giá trị trung bình được đánh dấu bằng các chữ giống nhau không có sự sai khác ở mức LSD.

Kết quả bảng 2 cho thấy các công thức có bổ sung TDZ khả năng phân chồi kém hơn, mầm phát triển không đồng đều, khi tăng nồng độ thì mầm có xu hướng phát triển to ra không cân đối với chiều cao. Các công thức có bổ sung BAP cho kết quả tốt hơn, mầm phát triển đồng đều, tốt nhất là ở nồng độ $15 \mu\text{M/l}$ BAP cho hệ số nhân chồi là 9,12, chiều cao trung bình của chồi là

25,73 mm, cân nặng trung bình của chồi là 272,24 mg các chỉ số này đều vượt trội so với các công thức khác.

3. Tạo cây hoàn chỉnh.

Các auxin thường được dùng làm chất kích thích ra rễ là NAA; IBA và IAA. Đối với *A. formosanus*, tác giả Yih-Juh Shiau và cộng sự (2002) sử dụng NAA cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh. Nguyễn Trung Thành và cộng sự (2012) nghiên cứu nhân giống *A. roxburghii* đã chỉ ra rằng IBA đem lại hiệu quả ra rễ cao hơn so với NAA. Vì vậy trong nghiên cứu đối *A. lylei* nhóm nghiên cứu lựa chọn hai loại auxin là NAA và IBA ở các nồng độ (0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 μM). Kết quả nuôi cấy *A. lylei* trên môi trường MS sau 6 tuần được trình bày trên bảng 3.

Bảng 3

Ảnh hưởng của NAA; IBA đến *A. lylei* ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh sau 6 tuần nuôi cấy

Tên auxin	Nồng độ (μM)	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình	Chiều dài trung bình của rễ (mm)
NAA	0	76,67 c	2,07 de	10,79 e
	0,1	79,83 bc	2,16 c	11,17 cde
	0,5	89,72 a	2,78a	10,76 de
	1,0	72,16 d	2,02 cd	11,21 cde
	1,5	57,62 ef	1,86 c	12,43 cd
	2,0	47,16 g	1,47 f	14,23 b
IBA	0,1	81,13 b	2,13 cd	11,02 cde
	0,5	86,33 a	2,42 b	11,57 cd
	1,0	84,68 b	2,49 a	11,38 cde
	1,5	63,71 e	1,97 de	15,42 b
	2,0	51,12 f	1,76 c	16,43 a
LSD _{0,5}		6,20	0,18	0,80

Chú thích: LSD_{0,5} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%; *Giá trị trung bình được đánh dấu bằng các chữ giống nhau không có sự sai khác ở mức LSD.

Kết quả bảng 3 cho thấy nồng độ thích hợp nhất cho *A. lylei* là NAA ở nồng độ 0,5 $\mu\text{M/l}$ với tỉ lệ cây ra rễ là 89,72%, số rễ trung bình trên mỗi mẫu là 2,78, chiều dài trung bình của rễ là 10,76mm. Vậy công thức môi trường thích hợp cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh *A. lylei* là: MS + 0,5 $\mu\text{M/l}$ NAA.

III. KẾT LUẬN

Đã tìm được môi trường thích hợp cho từng giai đoạn trong nhân giống Lan sứa (*A. lylei*) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*.

Môi trường thích hợp cho giai đoạn tạo vật liệu và giai đoạn nhân nhanh là MS + 10 g đường + 8 g aga + 15 $\mu\text{M/l}$ BAP, môi trường thích hợp cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh là MS + 10 g đường + 8 g aga + 0,5 $\mu\text{M/l}$ NAA. Sau 16 tuần nuôi cấy sẽ có được cây giống đạt tiêu chuẩn ra vườn ươm.

Giải pháp nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* là lựa chọn hàng đầu trong nhân giống nhằm bảo tồn và phát triển loài lan có giá trị kinh tế cao đang bị khai thác tận diệt.

Lời cảm ơn: Kết quả của bài báo là một phần của đề tài cơ sở được hỗ trợ nguồn kinh phí từ Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học Công nghệ. Chủ nhiệm đề tài xin chân thành cảm ơn cơ quan đã hỗ trợ và các thành viên tham gia thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Averyanov, L., 2008. The Orchids of Vietnam, Illustrated survey. Part 1.
2. Chang, D. C. N., L. C. Chou, G. C. Lee, 2007. Orchid Science and Biotechnology, 1: 56- 60.
3. Han, M. H., X. W. Yang, Y. P. Jin, 2008. Phytochemical Analysis 19(5): 438-443.
4. Cao Dinh Hung, Krystyna Johnson, Fraser Torpy, 2006. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant , 42 (6): 548-552.
5. Ket, N. V., E. J. Hahn, S. Y. Park, D. Chakrebarty, K. Y. Paek, 2004. Biological plantarum. 48(3): 339 -344.
6. Nguyen Trung Thanh, Pham Luong Hang, Nguyen Van Ket, Trương Thị Lan Anh, Phung Van Phe, Nguyen Thi Hong Gam, Phi Thi Cam Mien, 2012. J. Science VNU, Vietnam, Vol. 28 (1): 47-53
7. Shiau, Y. J., A. P. Sagare, U.C. Chen, S .R. Yang, H. S. Tsay, 2002. Bot. Bul. Acad. Sin. 43: 123- 130.
8. <http://vi.wikipedia.org> (2009), Chi Kim tuyến (*Anoectochilus* Blume).
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/Anoectochilus>
10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

PROPAGATION SOLUTIONS FOR CONSERVATION AND DEVELOPMENT OF *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downie

PHAN XUAN BINH MINH, PHAM HUONG SON,
TRAN MINH HOI, NGUYEN THI VAN

SUMMARY

Anoectochilus lylei Rolfe ex Downie is an orchid of high ornamental value. The plant species is on the verge of extinction due to excess exploitation. Propagation and cultivation is the best solution for the conservation and development. In the present research, in vitro propagation method was used. We used somatone as the materials for *in vitro* in MS medium supplemented with 8g/L agar, 10/l sucrose and 15 μ M BAP. After 4 weeks mean number of shoots per explant was 0.92 and mean height of shoots was 20.47mm. Protocorm grown best in MS medium supplemented with 8g/L agar, 10g/l sucrose and 15 μ M BAP. After 8 weeks mean number of shoots per explant was 9.12, mean height of shoots was 25.73mm, and mean weight of explants was 272.24mg. Root formation of shoots were best carried out on MS medium supplemented with 8g/L agar and 0.5mM IBA. After 6 weeks it gave rise to the frequency of shoots forming roots of 89.72%, mean number of roots per shoot was 2.78, and mean length was 10.76mm.