

Nghiên cứu nuôi cấy lỏng lắc thu sinh khối lan kim tuyến bản địa *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *In vitro*

In vitro liquid shake culture technique for biomass production of a native medicinal orchid *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

Nguyễn Thanh Mai^{1*}, Mai Trường²

¹Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: mai.nt@ou.edu.vn

THÔNG TIN	TÓM TẮT
DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.14.1.440.2019	Nội dung nghiên cứu này trình bày hệ thống nhân nhanh lan kim tuyến (<i>Anoectochilus roxburghii</i> (Wall.) Lindl. <i>in vitro</i> và kỹ thuật nuôi cấy lỏng lắc thu sinh khối cây lan có khả năng sử dụng làm nguồn nguyên liệu dược.
Ngày nhận: 30/07/2019	Mẫu đoạn thân ($\approx 1,5\text{-}2\text{cm}$) được khử trùng tạo nguồn mẫu <i>in vitro</i> bằng thủy ngân II Clorua ở nồng độ 0,1% trong 5 phút và nuôi cấy tạo chồi trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) không chất điều hòa sinh trưởng trong 60 ngày. Giai đoạn nhân nhanh chồi trên môi trường MS có bổ sung $1,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP; $0,2\text{mg.L}^{-1}$ NAA trong 90 ngày và sau đó nuôi chồi tăng trưởng trên $\text{MS}\frac{1}{2}$. Tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường $\text{MS}\frac{1}{2}$ bổ sung $0,5\text{mg.L}^{-1}$ NAA trong thời gian 60 ngày.
Ngày nhận lại: 14/09/2019	Nhân nuôi sinh khối cây lan kim tuyến được nuôi trong môi trường lỏng $\text{MS}\frac{1}{2}$ (giảm $\frac{1}{2}$ khoáng đa lượng) có bổ sung 30g/L đường và 10% nước dừa và bổ sung nguồn polyamine riêng rẽ ($1,5\text{g.L}^{-1}$ casein; 1g.L^{-1} dịch chiết nấm men) cho hiệu quả gia tăng sinh khối tươi tốt nhất trong nuôi cấy bằng máy lắc ôn nhiệt (Brunswick Innova 4230) ở tốc độ lắc 80rpm.
Duyệt đăng: 17/09/2019	
Từ khóa: <i>Anoectochilus roxburghii</i> (Wall.) Lindl, lan kim tuyến bản địa, nhân giống <i>in vitro</i> , nuôi cấy lỏng lắc <i>in vitro</i>	ABSTRACT This study presented the rapid multiplication system of <i>Anoectochilus roxburghii</i> (Wall.) Lindl. <i>in vitro</i> and the liquid shake culture technique for biomass production capable of being used as a source of pharmaceutical materials. Stem segments (1.5-2cm in length with a single node) were dipped in 70% (v/v) ethanol for 1 min and then rinsed in 0.1% (v/v) mercury chloride for 5 min, washed thoroughly in sterile distilled water under the aseptic condition in the laminar airflow

Keywords:

Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl, *in vitro* propagation, *in vitro* liquid shake culture technique, native medicinal orchid

hood. The aseptic culture was initiated by culturing stem nodal segments on hormone-free MS medium (Murashige & Skoog, 1962) for axillary bud formation in 60 days. For rapid shoot proliferation stage and elongation, axillary buds were cultured on MS medium supplemented with 1.5mg.L⁻¹ 6-benzyl adenine (BAP) and 0.2mg.L⁻¹ alpha-naphthaleneacetic acid (NAA) and shoot elongation on half-strength MS medium (MS½) in 90 days. Rooting induction on MS½ medium with 0.5mg.L⁻¹ NAA in 60 days of culture.

Rapid and efficient multiplication of plant biomass production was successful established by culturing shoots (approximately 3.5 to 4cm in height with 4 leaves) semi-submerged on 250mL conical flask contain hormone-free MS½ liquid medium (30g.L⁻¹ sucrose, 10% coconut water) supplemented with separate polyamine sources (1.5g.L⁻¹ casein or 1g.L⁻¹ yeast extract) in a refrigerated incubator shaker (New Brunswick Innova 4230) at 80rpm.

1. Mở đầu

Chi lan kim tuyến (*Anoectochilus*) có vùng phân bố rộng từ dãy Himalaya cho tới vùng Đông Nam Á và một số đảo thuộc khu vực Thái Bình dương. Trong dược điển Trung Hoa, lan kim tuyến là cây thuốc quý và được sử dụng để điều trị ung thư, tăng huyết áp, đái tháo đường và viêm thận (Liang et al., 1990). Tác dụng dược lý đa dạng của lan kim tuyến đã được chứng minh bao gồm chống viêm và hoạt tính bảo vệ tế bào (J. M. Lin, Lin, Chiu, Yang, & Lee, 1993), hoạt tính chống oxy hóa (C. C. Lin, Huang, & Lin, 2000) khả năng chống khối u và kích thích miễn dịch (Tseng et al., 2006). Các thành phần có hoạt sinh học quan trọng nhất chiết xuất từ lan kim tuyến đã được công bố gồm gastrodin, gasterodigenin và kinsenoside (Du, Sub, Irino, & Shoyama, 2000; Hsieh, Wu, & Chen, 1997; Ito, Kasai, Yamasake, & Sugimoto, 1993; Tseng et al., 2006).

Ở nước ta, loài lan kim tuyến bản địa *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. đã bị khai thác tận diệt trong tự nhiên để sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền và xuất khẩu ồ ạt sang Trung Quốc, Đài Loan. Loài này hiện đang nằm trong nhóm lan bị nghiêm cấm, hạn chế khai thác vì mục đích thương mại (nhóm IA, Nghị định 32/2006/NĐ-CP) (Chính phủ, 2006), đồng thời cũng là loài thực vật đang nguy cấp (EN) (Bộ Khoa học và Công Nghệ & Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007). Do đó, việc nghiên cứu xây dựng hệ thống nuôi cấy thu sinh khối tươi lan kim tuyến *in vitro* phục vụ cho công tác bảo tồn và sử dụng làm nguồn nguyên liệu được góp phần thay thế nguồn khai thác bất hợp pháp trong tự nhiên.

2. Vật liệu và phương pháp

Giống lan

Loài lan kim tuyến bản địa *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. tiếp nhận từ Vườn thực vật M.M Gryshko, Ucraina.

Tạo nguồn mẫu *in vitro*

Khúc cắt thân (kích thước 1,5-2cm) của lan kim tuyến được rửa sạch bằng xà phòng, ngâm cồn 70⁰ trong 1 phút. Sau đó, ngâm mẫu trong thủy ngân (II) clorua 0,1% trong 5 phút. Cấy 5 mẫu vào petri Ø11cm chứa 20mL môi trường thạch MS gồm khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin MS (Murashige & Skoog, 1962), 30g.L⁻¹ đường saccharose, pH 5,8. Tổng cộng 200 mẫu cho 1 lần khử trùng và không lặp lại. Mẫu được nuôi trên môi trường MS không chất điều hoà sinh trưởng trong 60 ngày.

Nuôi cấy nhân nhanh chồi

Chồi thu được sau khử trùng (≈0,5cm) được nuôi cấy nhân nhanh trên môi trường thạch MS gồm khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin MS (Murashige & Skoog, 1962), bổ sung 150mL.L⁻¹ nước dừa, 30g.L⁻¹ đường saccharose, pH 5,8, bổ sung chất điều hoà sinh trưởng BAP ở các nồng độ 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5mg.L⁻¹ và nồng độ NAA cố định ở 0,2mg.L⁻¹. Cấy 6 chồi trên petri Ø11cm chứa 20mL môi trường. Thí nghiệm có 6 nghiệm thức bao gồm đối chứng (không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng) và lặp lại 3 lần.

Nuôi cấy tăng trưởng chồi được thực hiện với 4 loại môi trường khác nhau gồm MS, MS½ (giảm ½ khoáng đa lượng), Knudson C (Morel, 1965) và VW (Vacin & Went, 1949). Tất cả các môi trường đều có bổ sung 150mL nước dừa, 30g.L⁻¹ đường saccharose, 0,3g.L⁻¹ than hoạt tính, 8g.L⁻¹ agar, pH 5,8. Tiến hành cắt chồi có kích thước khoảng 1,5cm và cấy 10 chồi vào chai nước biển thể tích 500mL chứa 50mL của từng loại môi trường nghiên cứu. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức và lặp lại 3 lần.

Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh

Chồi mới (≈3,0cm) mang 3 đốt thân, được nuôi cấy tạo rễ trên môi trường thạch MS½ (gồm 1/2 khoáng đa lượng MS, vi lượng và vitamin không thay đổi) 10g.L⁻¹ đường saccharose, 0,3g.L⁻¹ than hoạt tính, pH 5,8) bổ sung NAA ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7 và 1,0mg.L⁻¹. Cấy 10 chồi vào chai nước biển 500mL chứa 50mL môi trường. Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức, đối chứng không bổ sung NAA và lặp lại 3 lần.

Nuôi cấy lỏng lắc thu sinh khối

Mẫu chồi (chiều cao từ 3,5-4cm) cắt từ cây hoàn chỉnh *in vitro* và nuôi cấy trong môi trường lỏng MS½ (giảm ½ khoáng đa lượng) có 30g.L⁻¹ đường saccharose, 100mL.L⁻¹ nước dừa và bổ sung nguồn polyamine riêng rẽ (1,5g.L⁻¹ casein; 1g.L⁻¹ dịch chiết nấm men). Nuôi lắc ở tốc độ 80rpm, nhiệt độ 28⁰C bằng máy lắc ổn nhiệt (Brunswick Innova 4230).

Điều kiện nuôi cấy

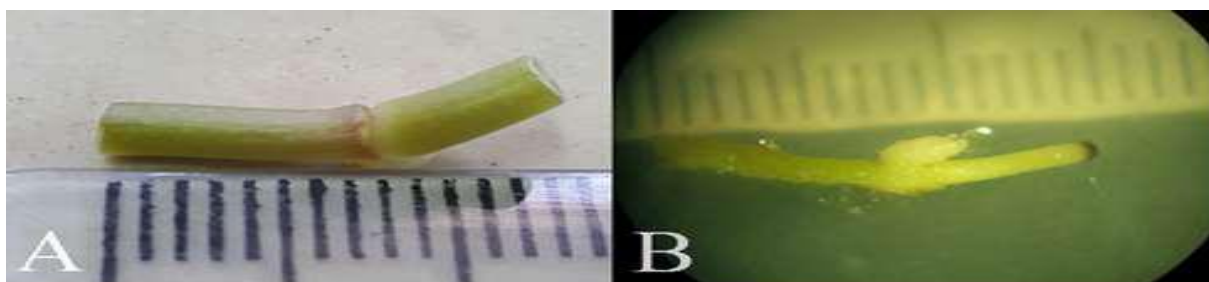
Nhiệt độ phòng nuôi cấy dao động từ 25-28⁰C, cường độ ánh sáng đèn neon khoảng 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

Nuôi lắc ở cường độ ánh sáng khoảng 1.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

3. Kết quả và thảo luận

Tạo nguồn mẫu *in vitro*

Tỉ lệ mẫu sống của của lan kim tuyến sau xử lý với dung dịch HgCl_2 0,1% trong 5 phút đạt 86,66% và tỉ lệ mẫu tạo chồi mới đạt 66,66% ở 60 ngày sau cấy (NSC). Phần trăm tạo chồi (từ chồi ngủ) trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng của mẫu bị hạn chế có thể là mẫu bị tổn thương do thao tác trong quá trình khử trùng cùng với tác động bề mặt của HgCl_2 dẫn tới xáo trộn ít nhiều về mặt sinh lý và gây ức chế nảy chồi.



Chồi hình thành từ khúc cắt thân ở 60 NSC được minh họa ở Hình 1.

Hình 1. Chồi mới hình thành từ khúc cắt thân sau khử trùng trên MS không chất điều hòa sinh trưởng

Nuôi cấy nhân nhanh chồi

Mẫu chồi có kích thước khoảng 0,5cm được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu trong thí nghiệm này. Kết quả thống kê ở Bảng 1 cho thấy các nghiệm thức có BAP/NAA cho thấy khác biệt rất có ý nghĩa so với đối chứng. BAP ở nồng độ 0,5; 1,0 và 1,5mg.L⁻¹ chứng tỏ có hoạt tính sinh học mạnh trong cảm ứng tạo chồi, tỉ lệ tạo chồi cao nhất đạt 94,44% khi bổ sung nồng độ 1,5mg.L⁻¹ BAP, số chồi trung bình cao nhất là 3,49 chồi/mẫu tại thời điểm 60 NSC và tăng lên 4,13 chồi ở 90 NSC (Hình 3). Chồi mới hình thành từ vị trí gốc chồi nuôi cấy, quan sát hình thái chồi bằng mắt thường ở 3 nghiệm thức trên có thể thấy một số chồi có khả năng kéo dài lóng thân và xuất hiện rễ khí sinh ngắn với lông hút đặc trưng trên môi trường có BAP nồng độ thấp, khi nồng độ BAP tăng lên thì khuynh hướng tạo cụm chồi rõ nét. Khả năng tạo chồi giảm rõ rệt khi nồng độ BAP tăng lên 2,0 và 2,5mg.L⁻¹. Dù không có sự khác biệt có ý nghĩa về phần trăm tạo chồi, số chồi trung bình ở tất cả các nghiệm thức xét về mặt thống kê tại 2 mốc thời gian trong nuôi cấy nhưng có sự gia tăng số lượng chồi đáng kể với 4,13 chồi/mẫu trên môi trường có 1,5mg.L⁻¹ BAP; 0,2mg/L NAA ở 90 NSC.

Bảng 1

Ảnh hưởng của BAP/NAA lên khả năng nhân chồi *A. roxburghii*

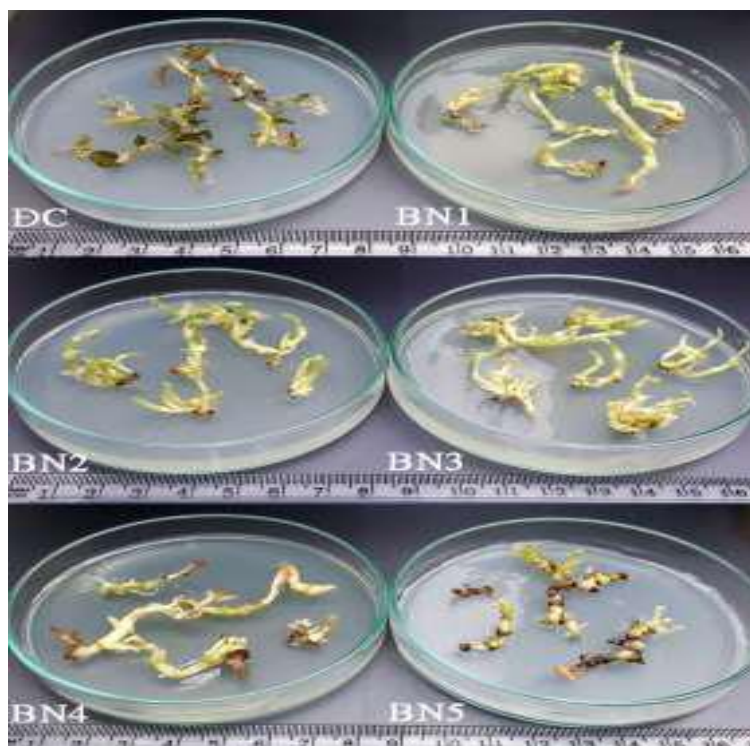
NT	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Phần trăm mẫu tạo chồi		Số chồi TB/mẫu	
			60 NSC	90 NSC	60 NSC	90 NSC
ĐC	0,0	0,0	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a

NT	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Phần trăm mẫu tạo chồi		Số chồi TB/mẫu	
			60 NSC	90 NSC	60 NSC	90 NSC
BN1	0,5	0,2	83,33±9,62 d	83,33±9,62 d	2,40±0,20 c	2,40±0,20 c
BN2	1,0	0,2	88,88±9,62 d	88,88±9,62 d	2,81±0,20 d	3,07±0,12 d
BN3	1,5	0,2	94,44±9,62 e	94,44±9,62 e	3,49±0,16 e	4,13±0,12 e
BN4	2,0	0,2	61,11±9,62 c	61,11±9,62 c	1,28±0,05 b	1,28±0,05 b
BN5	2,5	0,2	44,44±9,62 b	44,44±9,62 b	1,22±0,19 b	1,25±0,19 b
ANOVA			**	**	**	**

*NT: nghiệm thức; ^z: Các số có chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,01$ theo phân hạng của Holm-Sidak's test (phần mềm SigmaPlot ver.11, Systat software, Inc., California, USA). Số liệu phần trăm chuyển đổi sang dạng $\sqrt{x+0,5}$, số chồi $\log(x+1)$.

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Trong các nghiên cứu sử dụng BAP/NAA trước đây, tác giả (Huang, Law, & Mak, 1991) đã công bố mẫu đoạn thân loài lan kim tuyến khác (*A. formosanus*) cho kết quả tạo chồi tối ưu khi bổ sung hai chất điều hòa tăng trưởng này theo nồng độ kết hợp 3mg/L BAP; 0,3mg.L⁻¹ NAA. Nhưng từ kết quả của thí nghiệm này cho thấy tỉ lệ BAP/NAA thấp hơn lại cho kết quả tạo chồi cao đối với loài *A. roxburghi*, điều này có thể là do sự khác nhau về loài dẫn tới khả năng đáp ứng tạo chồi đối với nồng độ chất ĐHST thay đổi theo chiều hướng tích cực.



Hình 2. Kết quả tạo chồi *A. roxburghi* trên môi trường MS có bổ sung BAP/NAA ở 90NSC

Nuôi cấy tăng trưởng chồi (với mẫu chồi có kích thước khoảng 1,5cm) được thực hiện trên 4 loại môi trường có hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng khác nhau cho thấy có sự gia tăng chiều cao chồi, số lá so với mẫu cấy ban đầu ở tất cả các loại môi trường trong thí nghiệm (Bảng 2).

Bảng 2

Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên khả năng tăng trưởng chiều cao chồi *A. roxburghii*

Môi trường	Chỉ tiêu theo dõi ở 60 NSC	
	Chiều cao chồi TB (cm)	Số lá TB/mẫu
MS	2,87 ± 0,07 ab	3,71 ± 0,10 b
MS ½	3,41 ± 0,23 c	4,72 ± 0,10 c
KD	2,70 ± 0,08 ab	4,72 ± 0,10 c
VW	2,58 ± 0,08 a	3,45 ± 0,05 a
ANOVA	**	**

^z: Các số có chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,01$ theo phân hạng của Holm-Sidak's test (phần mềm SigmaPlot ver.11, Systat software, Inc., California, USA).

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Trong các môi trường đều có bổ sung cùng một lượng nước dừa ở 150mg.L^{-1} và 30g.L^{-1} đường saccharose nhưng có sự khác nhau về tổng lượng khoáng đa lượng, vi lượng. Môi trường VW có tổng lượng khoáng thấp (tổng lượng khoáng bằng $1.625,81\text{mg.L}^{-1}$) cho kết quả thấp nhất về kích thước chồi và số lá trung bình. Trong khi đó, chồi nuôi cấy ở môi trường giàu dinh dưỡng MS ($4.302,09\text{mg.L}^{-1}$) và dinh dưỡng trung bình KD ($1.894,13\text{mg.L}^{-1}$) có gia tăng kích thước, số lá, bản lá mở rộng chứa nhiều sắc tố xanh tím và thấy rõ vân trắng hơi hồng đặc trưng của loài. Trong thí nghiệm này, chồi ở MS ½ ($2.183,39\text{mg.L}^{-1}$) cho thấy khả năng tăng trưởng chiều cao tốt nhất đạt 3,41cm, lá mở rộng với số lá trung bình là 4,72lá/mẫu khi quan sát bằng mắt thường ở 60 NSC (Hình 3). Ghi nhận thấy hiện tượng một số ít chồi ở cả 4 loại môi trường xuất hiện nhiều lông hút ở vị trí rễ khí sinh sơ khởi.

Do vậy, kết quả tốt nhất trong thí nghiệm này cho thấy sử dụng môi trường khoáng MS½ ($2.183,39\text{mg.L}^{-1}$) có bổ sung 150ml.L^{-1} nước dừa, 30g.L^{-1} đường saccharose và không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng là phù hợp cho tăng trưởng chồi lan *A. roxburghii* ở 60NSC (K. V. Nguyen & Paek, 2002; Phung, Nguyen, & Nguyen, 2010).



Hình 3. Chồi *A. roxburghii* tăng trưởng chiều cao trên môi trường MS, MS½, KD và VW

Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh

Nhìn chung, khi các chồi được cắt theo kích thước đồng đều ($\approx 3,0\text{cm}$, mang 3 đốt thân) và nuôi cấy trên môi trường thạch MS ½ (không nước dừa, có 300mg L^{-1} than hoạt tính, 10g L^{-1} đường saccharose) có bổ sung NAA hay đối chứng không bổ sung NAA đều cho kết quả tạo rễ.

Kết quả phân tích thống kê các chỉ tiêu theo dõi ở 60 NSC (Bảng 3) cho thấy có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê. Mẫu cây trên môi trường có nồng độ NAA $0,1\text{mg L}^{-1}$ chưa khác biệt có ý nghĩa theo phân tích về chiều cao cây và phần trăm tạo rễ so với đối chứng. Ở nồng độ NAA $0,2$ và $0,3\text{mg L}^{-1}$, tỉ lệ tạo rễ ở mức trung bình và có khác biệt có ý nghĩa thống kê về chiều cao và chiều dài rễ so với đối chứng. Sự thay đổi rõ có ý nghĩa nhất khi tăng nồng độ NAA lên $0,5\text{mg L}^{-1}$, phần trăm tạo rễ cao, số rễ và chiều dài rễ tăng, cây phát triển vượt trội với các lá to. Các chồi ở các nghiệm thức có nồng độ NAA cao như $0,7$ và $1,0\text{mg L}^{-1}$ vẫn duy trì khả năng tạo rễ tốt nhưng dường như bắt đầu chịu tác động ức chế qua sự sụt giảm chiều cao, lượng rễ và chiều dài rễ (Hình 4).

Bảng 3

Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng tạo rễ ở *A. roxburghii*

Nồng độ NAA (mg/l)	Chỉ tiêu theo dõi ở 60 NSC			
	Chiều cao TB (cm)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ TB (cm)	Phần trăm tạo rễ
0	$3,67 \pm 0,14$ a	$2,49 \pm 0,03$ a	$0,53 \pm 0,02$ a	$56,07 \pm 5,22$ a
0.1	$3,91 \pm 0,19$ a	$3,16 \pm 0,04$ b	$0,81 \pm 0,03$ c	$57,63 \pm 2,88$ a
0.2	$4,33 \pm 0,12$ b	$3,15 \pm 0,16$ b	$1,10 \pm 0,04$ de	$60,69 \pm 1,96$ ab

Nồng độ NAA (mg/l)	Chỉ tiêu theo dõi ở 60 NSC			
	Chiều cao TB (cm)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ TB (cm)	Phần trăm tạo rễ
0.3	4,95 ± 0,12 c	3,30 ± 0,06 cd	1,30 ± 0,05 e	63,86 ± 4,27 b
0.5	5,70 ± 0,18 d	3,59 ± 0,04 e	1,45 ± 0,03 f	81,57 ± 3,39 e
0.7	5,11 ± 0,18 cd	3,39 ± 0,02 d	1,30 ± 0,01 e	77,26 ± 3,19 de
1,0	4,45 ± 0,07 bc	3,22 ± 0,04 bc	0,79 ± 0,03 bc	70,32 ± 1,99 c
ANOVA	**	**	**	**

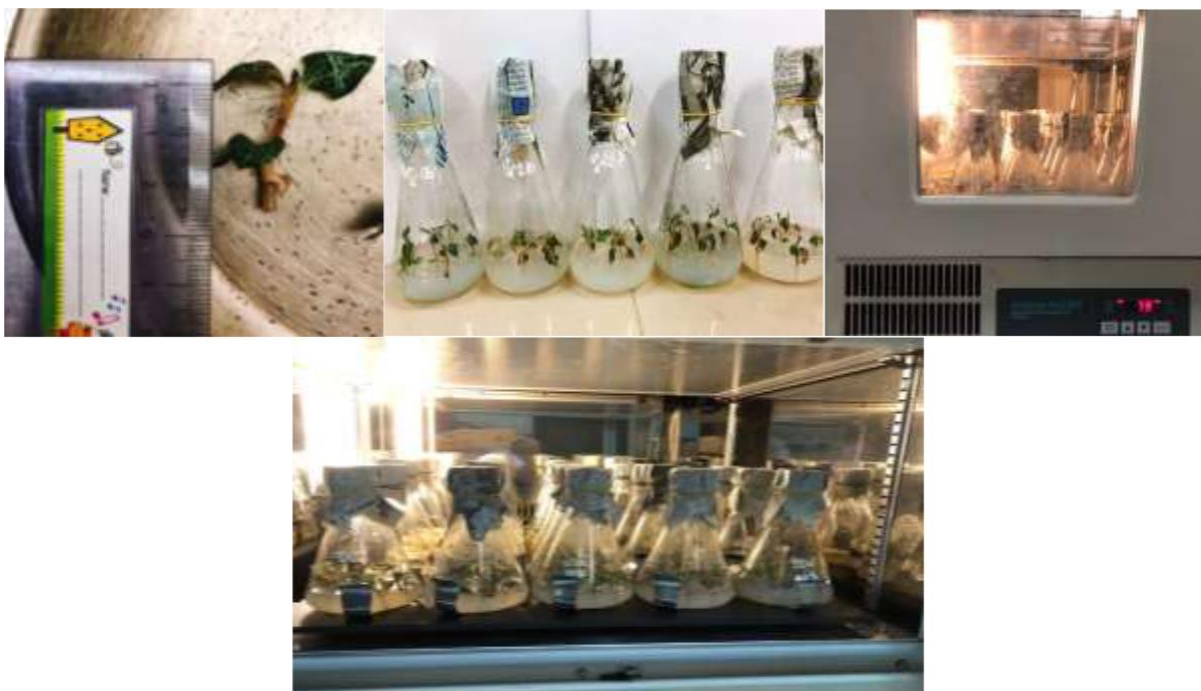
* *: Các số có chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,01$ theo phân hạng của Holm-Sidak's test (phần mềm SigmaPlot ver.11, Systat software, Inc., California, USA).

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Quan sát hình thái cây ở giai đoạn này có thể thấy được khả năng kéo dài lóng rõ rệt, hình thành rễ khí sinh mang nhiều lông hút đặt trung của loài ở đoạn thân rễ trên môi trường có nồng độ NAA từ 0,2-1,0mg L⁻¹. Do bản chất NAA là dạng auxin tổng hợp có tác động kích thích ra rễ mạnh nếu được sử dụng riêng rẽ ở 1 nồng thích hợp và hiệu ứng khác nhau của NAA đối với quá trình sinh lý khác nhau của 1 cơ quan (kéo dài và phát triển rễ) hoặc của những cơ quan khác nhau (kéo dài thân và rễ; phát triển chồi và rễ) (Bui, 2000). Kết quả cao nhất từ thí nghiệm tạo rễ cho thấy hoàn toàn phù hợp với các công bố trước đó về khả năng tạo rễ nhờ NAA của loài *A. roxburghii* (Truong & Phan, 2013).



Hình 4. Chồi *A. roxburghii* tạo rễ trên môi trường MS_{1/2} có bổ sung nồng độ NAA khác nhau



Hình 5. Nuôi cấy lỏng lác thu sinh khối cây lan kim tuyến bằng máy lắc ổn nhiệt Brunswick Innova 4230

4. Kết luận

Đã xây dựng được qui trình nhân nhanh lan kim tuyến bản địa (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) in vitro từ nguồn mẫu chồi tạo được từ khúc cắt thân. Giai đoạn nuôi nhân nhanh chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,5mg.L⁻¹ BAP; 0,2mg.L⁻¹ NAA và sau đó nuôi tăng trưởng chồi trên MS½. Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường MS½ bổ sung 0,5mg.L⁻¹ NAA.

Nuôi cấy lỏng lác thu sinh khối cây lan trong erlen 250mL chứa 50mL môi trường MS½ lỏng có bổ sung 1,5g.L⁻¹ casein hoặc 1g.L⁻¹ dịch chiết nấm men, lắc ở tốc độ 80rpm bằng máy lắc ổn nhiệt Brunswick Innova 4230 và nhiệt độ buồng lắc ổn định ở 28°C.

Kết quả nghiên cứu này tạo tiền đề cho nhân giống qui mô lớn, sản xuất thương mại sinh khối nguyên liệu dược quý. Đồng thời, kết quả có khả năng ứng dụng thực tiễn theo hướng bảo tồn ngoại vi nguồn gen lan bản địa và phục vụ cho tái tạo, phục hồi quần thể lan trong điều kiện tự nhiên.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí và trang thiết bị từ Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Khoa học và Công Nghệ., & Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. (2007). *Sách đỏ Việt Nam-Phần II: Thực vật [Vietnam red book-Part II: Plants]*. Hanoi, Vietnam: NXB Nông Nghiệp.
- Bui, V. T. (2000). *Sinh lý thực vật đại cương. Phần II: Phát triển [Vietnam red book-Part II: Plants]*. Ho Chi Minh, Vietnam: Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP.HCM.
- Cherevchenko, T. M., Lavrentyeva, A. N., & Ivannikov, R. V. (2008). Biotechnology of tropical and subtropical plants in vitro. In *Kyiv Naukova Dumka* (pp. 268-455).
- Chính phủ. (2006). *Nghị định số 32/2006/NĐ-CP về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý hiếm [Decree No. 32/2006 / ND-CP on the management of endangered and rare forest plants and animals]*. Retrieved March 30, 2019, from <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Tai-nguyen-Moi-truong/Nghi-dinh-32-2006-ND-CP-quan-ly-thuc-vat-dong-vat-rung-nguy-cap-quy-hiem-10831.aspx>
- Du, X. M., Sub, N. Y., Irino, N., & Shoyama, Y. (2000). Glycosidic constituents from in vitro *Anoectochilus formosanus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48, 1803-1804.
- Edwin, F. G., Michael, A. H., & De Klert, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Hsieh, M. T., Wu, C. R., & Chen, C. F. (1997). Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, on the passive avoidance task in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 45-54.
- Huang, D. D., Law, C. S., & Mak, O. T. (1991). Effects of tissue-cultured *Anoectochilus formosanus* Hay. Extracts on the arachidonate metabolism. *Botanical Bulletin- Academia Sinica*, 32, 113-119.
- Ito, A., Kasai, R., Yamasake, K., & Sugimoto, H. (1993) Aliphatic and aromatic glucosides from *Anoectochilus kosuensis*. *Phytochemistry*, 33, 1133-1137.
- Liang, W. L., Chen, R. C., Chiang, Y. J., Su, C. H., Yang, L. L., & Yen, K. L. (1990). Study of *Anoectochilus* species. I. Study on the physiological activities of Jin-Sian-Lian. *Formosan Science*, 43, 47-58.
- Lin, C. C., Huang, P. C., & Lin, J. M. (2000). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *The American Journal of Medicine*, 28, 87-96.
- Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J., & Lee, S. G. (1993). Evaluation of the anti-inflammatory and liverprotective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum*. *The American Journal of Medicine*, 11, 59-69.
- Morel, G. (1965). Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Society News*, 1965(20), 3-11.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.

- Nguyen, K. V., & Paek, Y. K. (2002). *Micropropagation and environment condition affecting on growth of in vitro and ex vitro of A. formosanus Hayata*. Paper presented at the 9th International Symposium. The Plant Resource Society of Korea, Korea.
- Nguyen, U. V. (1984). *Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng [Plant tissue culture for plant breeding]*. Ho Chi Minh, Vietnam: NXB TP Hồ Chí Minh.
- Phung, P. V., Nguyen, G. T. H., & Nguyen, T. T. (2010). Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi In vitro loài lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl [Study on the technique of fast multiplication of buds In vitro of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.)]. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 26, 248-253.
- Truong, P. T. B., & Phan, K. N. (2013). Nhân giống in vitro lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.)) [In vitro propagation of tinsel orchid (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.))]. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 79(1).
- Tseng, C. C., Shang, H. F., Wang, L. F., Su, B., Hsu, C. C., Kao, H. Y., & Cheng, K. T. (2006). Antitumor and immunostimulating effects of *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Phytomedicine*, 13, 366-370.
- Vacin, E., & Went, F. (1949). Some pH change in nutrient solution. *Botanic Gardens Conservation News*, 110, 605-613.