

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY LAN GẤM (*Anoectochilus setaceus* Blume) NUÔI CẤY *IN VITRO*

**Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Việt Cường,
Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Hồng Hoàng, Hồ Thanh Tâm,
Nguyễn Xuân Tuấn, Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng,
Nguyễn Thị Kim Loan, Dương Tấn Nhựt***

*Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Email : duongtannhuth@gmail.com*

Ngày gửi bài: 07.08.2014

Ngày chấp nhận: 21.04.2015

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan Gấm (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro* đã được khảo sát nhằm tìm ra phương pháp thích hợp để nhân giống loài cây này phục vụ cho nghiên cứu và sản xuất. Sau 2 tháng nuôi cấy, kết quả cho thấy, trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l BA có sự khác biệt đáng kể về chiều cao chồi, khối lượng tươi và khối lượng khô (6,70cm; 1,41g và 0,1751g; tương ứng), đặc biệt số đốt (6,33 đốt/mẫu) đạt cao nhất so với các nghiệm thức khác. Sau đó, các đốt thân tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l BA kết hợp αNAA ở các nồng độ khác nhau nhằm tìm ra môi trường thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi cây lan Gấm. Sau 2 tháng nuôi cấy, trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/l BA kết hợp 1,0 mg/l αNAA các chồi có sự sinh trưởng và phát triển tốt (chiều cao chồi: 9,03cm; số đốt: 9,33 đốt/mẫu; khối lượng tươi: 2,63g và khối lượng khô: 0,2187g), hệ rễ phát triển mạnh (số rễ: 7,33 rễ/mẫu; chiều dài rễ: 1,36cm). Tuy nhiên, mẫu bị nâu hóa do lượng phenol trong mẫu tiết ra nhiều. Để tối ưu hóa môi trường, các điều kiện nuôi cấy: lỏng tĩnh, lỏng lắc, agar, bông gòn đã được khảo sát. Kết quả cho thấy, các chồi trên môi trường lỏng có bông gòn sinh trưởng tốt, to khỏe, hệ rễ phát triển mạnh và đặc biệt không còn hiện tượng nâu hóa.

Từ khóa: Cây lan Gấm, đốt thân, nuôi cấy *in vitro*, phát triển, sinh trưởng.

Effects of Plant Growth Regulators and Culture Conditions on Shoot Induction and Shoot Growth of *Anoectochilus setaceus* Blume *In Vitro* Culture

ABSTRACT

The effects of plant growth regulators on *in vitro* shoot formation and shoot growth of *Anoectochilus setaceus* Blume were investigated. After 2 months of culture, shoots cultured on SH media containing 1.0 mg/l BA gave the highest shoot height, fresh and dry weight and number of stem nodes. SH media supplemented with 1.0 mg/l BA and 1.0 mg/l αNAA appeared to be the best medium for stem-node culture in terms of shoot and root growth. However, the shoots turned brown due to secretion of phenolic compounds. Liquid culture medium combined with and cotton wool plug were able to reduce the harmful effect of phenolic compound during shoot culture.

Keywords: *Anoectochilus setaceus* Blume, *in vitro* culture, SH medium, BA, αNAA, cotton plug.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Anoectochilus* (*Orchidaceae*), trong đó bao gồm hơn 40 loài, phân bố rộng khắp các vùng nhiệt đới (Teuscher, 1978). Tại Việt Nam, lan Gấm hiện thống kê được 12 loài, chúng được phân bố rộng ở hầu hết các tỉnh từ Bắc tới Nam (Phạm Hoàng Hộ, 2000). Qua các nghiên cứu, người ta thấy rằng lan Gấm có chứa hợp chất chuyển hoá arachidonic acid; liên quan đến chức năng của hệ tim mạch, kháng virus, kháng sưng viêm và các chất bảo vệ gan, chống tăng lipase máu (Mak et al., 1990; Huang et al., 1991; Lin et al., 1993; Du et al., 2001). Sự phát triển của ngành công nghiệp được kết hợp với sự bùng nổ các loại thuốc có nguồn gốc thực vật dẫn đến việc khai thác quá mức, đe dọa sự sống còn của nhiều loài cây quý, trong đó có lan Gấm. Cho đến nay, đã có một số công trình nghiên cứu về nhân giống *in vitro* trong và ngoài nước trên đối tượng lan này như Shiau et al., (2002); Ket et al., (2003, 2004); Nhut et al., (2006); Phùng Văn Phê và cộng sự (2010); Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện, 2012; Nguyễn Tuấn Anh và cộng sự (2013). Tuy nhiên, hiệu quả nhân nhanh nguồn được liệu này vẫn còn hạn chế, chưa thể áp dụng trên quy mô thương mại. Vì vậy, đề tài nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của cytokinin (BA, KIN, TDZ) kết hợp với NAA lên quá trình khởi tạo chồi cũng như sinh trưởng và phát triển chồi dưới các điều kiện nuôi cấy khác nhau (lỏng tĩnh, lỏng lắc, agar và bông gòn) của cây lan Gấm *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là những đốt thân mang chồi ngủ của cây lan Gấm *in vitro* có chiều dài chồi 1cm hiện có tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

2.2. Phương pháp

- Khử trùng mẫu

Chồi đỉnh cây khỏe được lấy từ cây mẹ sạch bệnh, đang sinh trưởng và phát triển tốt, sau đó tách bỏ hết lá để lấy phần chồi đỉnh sinh trưởng.

Chồi được ngâm trong xà phòng 20 phút, sau đó rửa lại bằng nước sạch dưới vòi nước và đưa vào buồng cấy vô trùng. Mẫu cấy tiếp tục được ngâm trong cồn 70° trong 30 giây, sau đó tiến hành khử trùng với HgCl₂ 0,1% có nhỏ thêm 3 giọt Tween 20 trong 20 phút, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 5 lần rồi đưa vào môi trường nuôi cấy.

- Khởi tạo chồi

Các đốt thân lan Gấm có mang chồi ngủ được nuôi cấy trên môi trường SH bổ sung các nồng độ khác nhau của BA, KIN (0,0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l) hoặc TDZ (0,00; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50 và 1,00 mg/l) để tạo chồi, cụm chồi.

- Sinh trưởng và phát triển của chồi

Các đốt thân lan Gấm có mang chồi ngủ được nuôi cấy trên môi trường SH bổ sung 1 mg/l BA kết hợp αNAA ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l).

- Môi trường nuôi cấy

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu là môi trường SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) bổ sung 8,0 g/l agar (trừ thí nghiệm khảo sát điều kiện nuôi cấy), 30 g/l sucrose, 1,0 g/l than hoạt tính và điều chỉnh pH về 5,8. Tùy mục đích từng thí nghiệm mà bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C, 1atm trong 30 phút.

- Điều kiện nuôi cấy

Các đốt thân lan Gấm có mang chồi ngủ được nuôi cấy trên môi trường SH ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau (lỏng tĩnh, lỏng lắc, agar, bông gòn). Điều kiện nuôi cấy lỏng lắc được thực hiện trên máy lắc (Hermle, Đức), 100 vòng/phút. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có độ ẩm 50 - 60%, nhiệt độ 25 ± 2°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng từ 40 - 45 μmol.m⁻².s⁻¹.

- Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố, 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại cấy 10 bình/nghiem thức, mỗi bình cấy 3 mẫu. Số liệu thu nhận được xử lý bằng phần mềm MicroSoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê theo phương pháp Duncan test với α = 0,05 (Duncan, 1995).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khởi tạo chồi

Sau 2 tháng nuôi cấy các đốt thân lan Gấm trên môi trường có bổ sung các loại cytokinin (BA, KIN và TDZ), kết quả cho thấy số lượng chồi tạo ra không đáng kể. Tuy nhiên, sự khác biệt về chiều cao chồi, số đốt, khối lượng tươi và khối lượng khô là đáng ghi nhận.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, BA có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng của cây lan Gấm. Khi tăng nồng độ BA trong môi trường nuôi cấy (từ 0,1 - 2,0 mg/l), sự sinh trưởng của cây lan Gấm tăng dần và đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l BA với các chỉ tiêu như chiều cao cây, số đốt, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây (6,70cm; 6,33; 1,41g; 0,17g; tương ứng) gấp hơn 2 lần so với các nghiệm thức bổ sung KIN, TDZ và nghiệm thức đối chứng (Bảng 1). Các chồi này to, khỏe, nhiều đốt và khoảng cách giữa các đốt đều nhau (Hình 1a). Khi tăng nồng độ BA lên 2,0 mg/l sự sinh trưởng phát triển của cây lan Gấm thấp hơn so với nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l BA, cây còi cọc và

có hiện tượng già hóa. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận có sự xuất hiện rễ khi bổ sung BA (từ 0,1 - 2,0 mg/l) trong môi trường nuôi cấy nhưng hệ rễ hình thành không đồng đều và yếu.

Các nghiệm thức có bổ sung KIN vào môi trường nuôi cấy đều cho thấy sự sinh trưởng và phát triển của chồi là đáng ghi nhận (Bảng 1, Hình 1b). Ở môi trường có bổ sung 0,5 mg/l KIN, các chỉ tiêu: chiều cao cây (4,36cm); số đốt (4,66); khối lượng tươi (0,70g) và khối lượng khô (0,06g) là cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, nhưng thấp hơn so với môi trường có bổ sung 1,0 mg/l BA. Trong thí nghiệm này, các chồi lan Gấm cũng xuất hiện rễ tương tự như môi trường nuôi cấy có bổ sung BA. Khi tăng nồng độ KIN vượt quá 0,5 mg/l thì không nhận thấy sự xuất hiện rễ và các chồi sinh trưởng chậm lại. Kết quả khi bổ sung 1,0 mg/l BA hay 0,5 mg/l KIN cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012) trên giống lan Gấm *Anoectochilus setaceus* và khi tăng nồng độ BA lên 2,0 mg/l cũng kìm hãm quá trình kéo dài chồi cũng như giảm số đốt/chồi.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA, KIN và TDZ lên quá trình khởi tạo chồi lan Gấm

Nồng độ (mg/l)			Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/mẫu	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
BA	KIN	TDZ				
0,00	0,00	0,00	3,26 ^g	3,00 ^d	0,37 ^{de}	0,0403 ^e
0,10	-	-	3,83 ^{defg}	3,33 ^{cd}	0,40 ^{cde}	0,0439 ^{de}
0,20	-	-	3,56 ^{fg}	3,66 ^{bcd}	0,54 ^c	0,0522 ^{de}
0,50	-	-	4,43 ^{bc}	4,66 ^b	0,70 ^b	0,0698 ^b
1,00	-	-	6,70 ^a	6,33 ^a	1,41 ^a	0,1751 ^a
2,00	-	-	3,96 ^{cdef}	4,33 ^{bc}	0,73 ^b	0,0713 ^b
-	0,10	-	4,06 ^{cdef}	3,66 ^{bcd}	0,46 ^{cde}	0,0489 ^{de}
-	0,20	-	4,16 ^{cde}	4,00 ^{bcd}	0,54 ^c	0,0570 ^{bcd}
-	0,50	-	4,36 ^{bcd}	4,66 ^b	0,70 ^b	0,0682 ^{bc}
-	1,00	-	4,16 ^{cde}	3,66 ^{bcd}	0,46 ^{cde}	0,0499 ^{de}
-	2,00	-	3,83 ^{defg}	3,33 ^{cd}	0,33 ^e	0,0410 ^{de}
-	-	0,05	3,63 ^{efg}	3,00 ^d	0,41 ^{cde}	0,0420 ^{de}
-	-	0,10	3,83 ^{defg}	3,00 ^d	0,43 ^{cde}	0,0410 ^{de}
-	-	0,20	3,90 ^{cdef}	3,33 ^{cd}	0,52 ^{cd}	0,0495 ^{de}
-	-	0,50	4,83 ^b	4,66 ^b	0,70 ^b	0,0701 ^b
-	-	1,00	3,63 ^{efg}	3,33 ^{cd}	0,50 ^c	0,0535 ^{cde}

Ghi chú: Các chữ cái a,b,c... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.

Trong nhóm chất cytokinin, TDZ được xem là loại cytokinin mạnh, là dẫn xuất của urea thường được sử dụng trong nhân giống cây thân gỗ (Huetteman and Prece, 1993). Tuy nhiên, việc bổ sung TDZ với nồng độ cao gây ra một số bất lợi như: sự tiếp xúc của mẫu cấy với TDZ trong môi trường nuôi cấy trong thời gian dài có thể gây nên hiện tượng thủy tinh thể, sự phát triển bất thường của chồi và khó hình thành rễ sau này (Lu, 1993). Để giảm thiểu các tác động không mong muốn của TDZ, trong thí nghiệm này TDZ được bổ sung ở các nồng độ từ 0,05 - 1,0 mg/l, nồng độ thấp hơn so với các cytokinin khác. Khả năng sinh trưởng của chồi lan Gấm sau 2 tháng nuôi cấy cho thấy sự khác biệt rõ rệt ở các nghiệm thức (Bảng 1, Hình 1c). Sự sinh trưởng của chồi lan Gấm đạt cao nhất khi bổ sung 0,5 mg/l TDZ so với các nghiệm thức bổ sung TDZ ở các nồng độ. Kết quả này tương ứng với môi trường có bổ sung KIN nhưng thấp hơn rất nhiều so với môi trường có bổ sung BA. Bên cạnh đó, chồi lan Gấm ở các nghiệm thức này không có sự hình thành rễ, có hiện tượng thủy tinh thể, chồi phát triển bất thường và bị già hóa (Hình 1c). Khi tăng nồng độ TDZ lên đến 1,0 mg/l thì các chỉ tiêu sinh trưởng đều giảm xuống, không có sự khác biệt so với đối chứng ở các chỉ tiêu chiều cao cây, số đốt, và khối lượng tươi và khối lượng khô của cây. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Ket et al., (2004) trên giống lan Gấm *Anoectochilus formosanus* khi tăng nồng độ lên 2 mg/l BA, KIN và 1,0 mg/l TDZ đã kìm hãm sự phát triển của chiều cao chồi. Khi bổ sung nồng độ BA,

KIN, TDZ từ thấp đến cao trong nghiên cứu này hầu như không nhận thấy sự hình thành cụm chồi từ gốc như nghiên cứu của Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012) mà chủ yếu là sự phát triển của chồi chính và có sự hình thành rễ trong môi trường có bổ sung cytokinin, điều này là do trong môi trường nuôi cấy của chúng tôi có bổ sung 1,0 mg/l than hoạt tính. Than hoạt tính đã ức chế quá trình hình thành chồi bên và kích thích quá trình hình thành rễ trong quá trình nuôi cấy. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Ket et al., (2004) khi bổ sung 2,0 mg/l TDZ và bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy đã ức chế quá trình hình thành chồi bên và vẫn có sự hình thành rễ khi nồng độ TDZ trong môi trường cao.

Đối với cây lan Gấm phương pháp cắt đốt cho mục đích nhân giống tỏ ra rất hiệu quả (Lê Thị Minh Nguyệt, 2005). Do đó, trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy bổ sung 1,0 mg/l BA là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng cũng như quá trình nhân nhanh đốt cây lan Gấm *in vitro*.

3.2. Sinh trưởng và phát triển của chồi lan Gấm

Sự hình thành rễ từ các chồi nuôi cấy là một quá trình quan trọng giúp đánh giá khả năng sinh trưởng của cây trong điều kiện *in vitro*. Sau 2 tháng nuôi cấy, ảnh hưởng của môi trường có bổ sung BA tốt nhất ở thí nghiệm trên kết hợp α NAA với các nồng độ từ 0,5 - 2,0 mg/l được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA kết hợp với α NAA lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Gấm

Nồng độ (mg/l)		Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/mẫu	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
BA	α NAA						
1,0	0,0	6,60 ^c	6,33 ^b	5,33 ^{bc}	1,16 ^a	1,41 ^b	0,1751 ^b
	0,5	7,67 ^b	6,66 ^b	6,33 ^{ab}	1,30 ^a	1,44 ^b	0,1365 ^{bc}
	1,0	9,03 ^a	9,33 ^a	7,33 ^a	1,36 ^a	2,63 ^a	0,2187 ^a
	1,5	7,43 ^b	4,66 ^c	5,33 ^{bc}	0,90 ^b	1,39 ^b	0,1365 ^c
	2,0	6,03 ^d	6,33 ^b	4,33 ^c	0,66 ^c	1,28 ^b	0,1493 ^{bc}

Ghi chú: Các chữ cái a,b,c... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.

Ở thí nghiệm trước cho thấy, môi trường có bổ sung BA đã có sự xuất hiện rễ nhưng không rõ ràng, rễ yếu. Quá trình hình thành rễ ở cây thường chịu tác động bởi 2 yếu tố (nội sinh và ngoại sinh) và quan trọng nhất của 2 yếu tố này là auxin. Auxin cũng có vai trò trong điều khiển sự tăng trưởng và phát triển của thực vật, tính hướng tối và tùy thuộc vào việc bổ sung auxin ngoại sinh thì rễ có sự cảm ứng hình thành rễ chính và rễ phụ khác nhau. Khi kết hợp 1,0 mg/l BA với 1,0 mg/l α NAA thì khả năng sinh trưởng của chồi là tốt hơn so với khi sử dụng độc lập BA (9,03cm so với 6,70cm); số đốt tạo ra nhiều hơn (9,33 đốt/mẫu so với 6,33 đốt/mẫu), khối lượng tươi và khối lượng khô cao hơn (đạt 2,63g và 0,21g tương ứng) và các chồi này có sự hình thành rễ rõ ràng (số rễ và chiều dài rễ đạt 7,33 rễ/mẫu và 1,36cm; tương ứng). Sự tổng hợp các diệp lục tố giúp sự quang hợp tốt hơn, chồi phát triển nhanh hơn, tăng kích thước và tạo nhiều rễ. Các chồi trong nghiệm thức này có bộ lá to và xanh (Hình 1d). Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Gấm cũng được Shiau et al., (2002) nghiên cứu và cho biết sự phát triển của chồi lan Gấm tốt hơn trên môi trường bổ sung 2 mg/l BA và 0,5 mg/l α NAA.

Tuy nhiên, khi tăng nồng độ α NAA lên càng cao thì chất lượng chồi càng thấp, hệ rễ hình thành yếu đi, cây còi cọc, chậm lớn và có dấu hiệu già hóa. Auxin chỉ cần thiết để phân biệt hóa tế bào và xuất hiện mầm rễ trong giai đoạn đầu của sự hình thành rễ, cơ quan và phân bố tính. Sự hiện diện của auxin ở nồng độ cao sẽ ức chế quá trình kéo dài rễ diễn ra sau đó. Điều này giải thích tại sao khi bổ sung α NAA với nồng độ 1,0 mg/l lại cho hiệu quả hơn so với việc bổ sung α NAA ở nồng độ thấp hay cao hơn.

Qua thí nghiệm này, nồng độ 1,0 mg/l BA kết hợp 1,0 mg/l α NAA là thích hợp cho sự sinh trưởng của chồi lan Gấm sau 2 tháng với kết quả 9,33 đốt/mẫu.

3.3. Điều kiện nuôi cấy

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, điều kiện nuôi cấy đóng một vai trò hết sức quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Trong thí nghiệm này, các đốt thân cây lan Gấm được cấy trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l BA và 1,0 mg/l α NAA ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau (lồng tĩnh, lồng lắc, agar, bông gòn) nhằm tìm ra được điều kiện nuôi cấy tối ưu nhất. Sau 2 tháng nuôi cấy, môi trường lồng có bông gòn là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của chồi cây lan Gấm (Bảng 3, Hình 1e).

Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Tsay (2002) trên môi trường lồng có bổ sung 2 mg/l BA và 0,5 mg/l α NAA trong bình tam giác 500ml ở giống lan Gấm A. formosanus. Khi các chồi lan Gấm được nuôi cấy trong môi trường lồng chúng tôi nhận thấy, ở môi trường lồng tĩnh, mẫu ngập trong môi trường dẫn đến việc thiếu O_2 làm cho mẫu chết hàng loạt. Trong môi trường lồng lắc có quá trình trao đổi O_2 nhưng mẫu vẫn chậm phát triển (Hình 1e). Ngoài ra, trong môi trường lồng kích thước của các chồi không đều nhau, phần lớn chồi rất nhỏ. Trong môi trường có agar mẫu phát triển bình thường. Agar tạo giá đỡ cây nhưng có thể làm giảm sự tiếp xúc của mẫu cấy để hấp thu dinh dưỡng (Dương Công Kiên, 2003). Hơn nữa, lực khuếch tán của cation trong môi trường có agar thấp nên mẫu cấy chỉ có thể sử dụng một phần chất dinh dưỡng đưa vào môi trường.

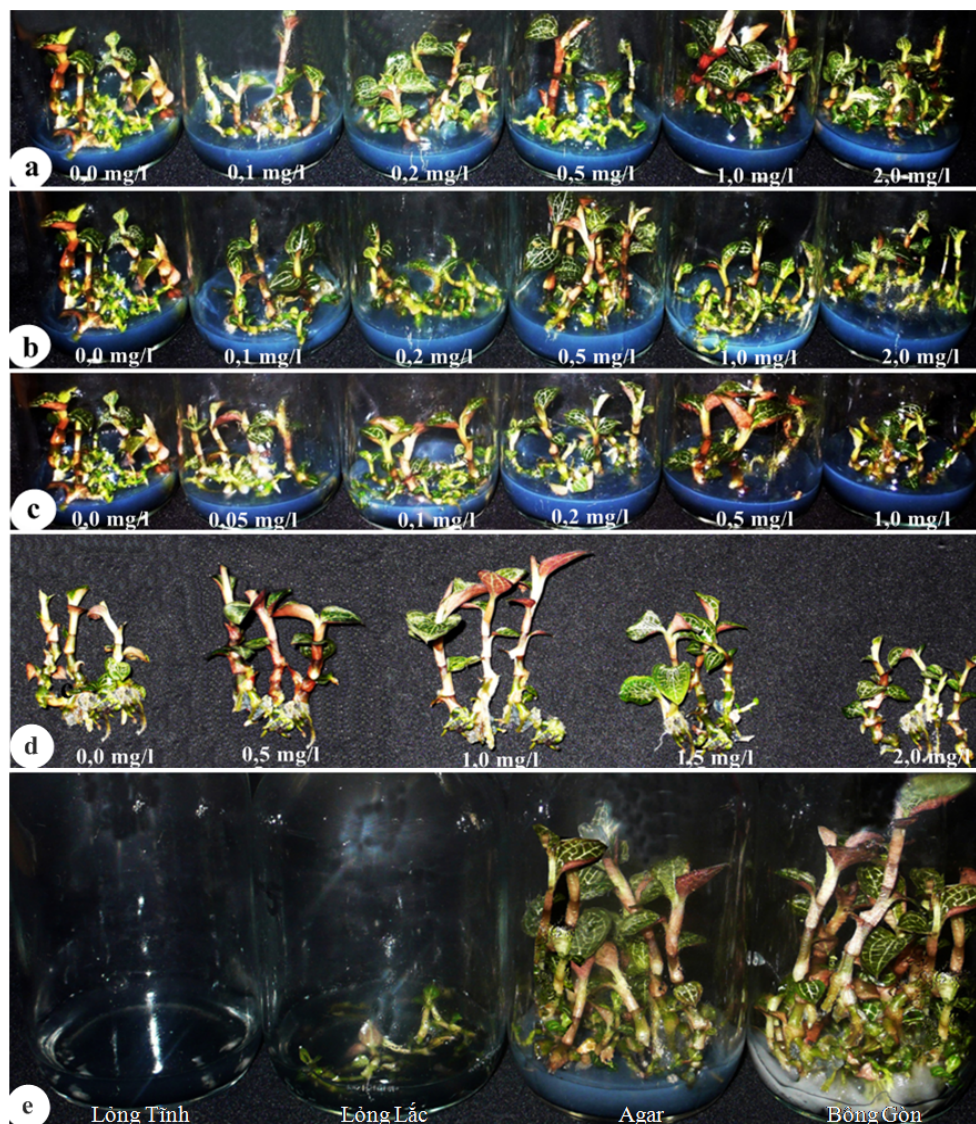
Bảng 3. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng của cây lan Gấm

Điều kiện nuôi cấy	Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/ mẫu	Số rễ/ mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
Lồng tĩnh	-	-	-	-	-	-
Lồng lắc	3,10 ^c	4,33 ^b	1,00 ^b	0,33 ^c	0,135 ^c	0,0165 ^c
Agar	8,83 ^b	8,66 ^a	6,66 ^b	1,36 ^b	2,53 ^b	0,2187 ^b
Bông gòn	11,10 ^a	9,66 ^a	8,33 ^a	2,16 ^a	3,67 ^a	0,3819 ^a

Ghi chú: -: Mẫu chết, Các chữ cái a,b,c... trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan

Trong môi trường lỏng có bông gòn giúp duy trì cân bằng O_2/CO_2 tối ưu và điều hoà khả năng hấp thu chất dinh dưỡng và hormone hiệu quả hơn (Biondi and Thorpe, 1981). Mẫu phát triển mạnh nhất, hệ rễ phát triển đều, xuất hiện nhiều lông rễ so với các nghiệm thức khác (Hình 1e). Chiều cao chồi đạt 11,10cm, mỗi chồi trung bình có 9,66 đốt, số rễ và chiều dài rễ tăng (8,33 rễ/mẫu và 2,16cm), khối lượng tươi và khối

lượng khô cao (đạt 0,38g và 3,67g). Đặc biệt, trong môi trường lỏng có bông gòn có sự phát triển đa chồi, đỉnh và gốc chồi phình to, mang nhiều chồi bé, các chồi này phát triển rất rõ ràng, có thể tách riêng rẽ để nuôi cấy độc lập. Số lá, chiều dài lá và chiều rộng lá đạt cao nhất (9,00 lá/mẫu; 3,93cm và 3,60cm), đây cũng là yếu tố rất cần thiết cho việc đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển chồi lan Gấm.



Hình 1. Chồi lan Gấm sinh trưởng trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau sau 2 tháng

a. Chồi sinh trưởng trong môi trường có chứa BA ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l) (từ trái qua phải); **b.** Chồi sinh trưởng trong môi trường có chứa KIN ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l) (từ trái qua phải); **c.** Chồi sinh trưởng trong môi trường có chứa TDZ ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l) (từ trái qua phải); **d.** Ảnh hưởng của BA kết hợp với αNAA (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l) (từ trái sang phải) lên quá trình sinh trưởng của chồi lan Gấm; **e.** Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy khác nhau (lông tĩnh, lông lắc, agar và bông gòn) (từ trái sang phải) lên khả năng sinh trưởng và tạo rễ của chồi lan Gấm

Một vấn đề thường xuyên gặp phải trong suốt các giai đoạn khởi đầu nuôi cấy là mẫu thực vật sau khi cấy vào môi trường sẽ kích thích gia tăng đáng kể hàm lượng phenol (có thể là do các phản ứng tự vệ) làm hóa nâu mẫu cấy và môi trường gây chết mẫu. Qua thí nghiệm chúng tôi nhận thấy, nghiệm thức sử dụng bông gòn mẫu cấy và môi trường không còn hiện tượng hóa nâu (Hình 1e). Điều này có thể giải thích, bông gòn đã hấp thu các hợp chất phenol do mẫu tiết ra. Vì vậy, môi trường lỏng có bông gòn là thích hợp nhất cho nuôi cấy chồi cây lan Gấm.

4. KẾT LUẬN

Quá trình sinh trưởng và phát triển của các đốt thân mang chồi ngủ của cây lan Gấm tốt nhất trên môi trường SH lỏng có bông gòn bổ sung 1,0 mg/l BA và 1,0 mg/l α NAA. Các chồi lan Gấm khỏe, có hệ rễ phát triển mạnh và không còn bị hiện tượng hóa nâu, đây là những yếu tố quan trọng trong việc hoàn thiện quy trình nhân giống cây lan Gấm.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Tuấn Anh, Phan Ngọc Khoa và Trương Thị Bích Phượng (2013). Nghiên cứu nuôi cấy lớp mỏng trong nhân nhanh *in vitro* cây lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.). Kỷ yếu Hội nghị Khoa Học Công nghệ Sinh học toàn quốc, tr. 690-694.
- Biondi S. and Thorpe T.A. (1981). Requirements for a tissue culture facility. In: Plant tissue culture: Method and applications in agriculture, Thorpe T.A. (Ed.). Academic Press, New York, p. 1-20.
- Du X.M., Yoshizawa T., Tamura T., Mohri A., Sugiura M., Yoshizawa T., Irino N., Hayashi J. and Shoyama Y. (2001). Higher yielding isolation of kinsenoside in *Anoectochilus* and its anti-hyperliposis effect. Biol. Pharm. Bull., 24: 65-69.
- Duncan D.B. (1995). Multiple range and multiple F test. Biometrics, 11: 1-42.
- Phạm Hoàng Hộ (2000). Cây cỏ Việt Nam III, Nhà xuất bản Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Huang D.D., Law R.C.S. and Mak O.T. (1991). Effects of tissue cultured *A. formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism. Bot. Bull. Acad. Sin., 32: 113-119.
- Huetteman C.A. and Prece J.E. (1993). Thidiazuron a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 33: 05-119.
- Ket N.V., Chakrabarty D., Hahn E.J. and Paek K.Y. (2003). Micropropagation of an endangered jewel orchid (*Anoectochilus formosanus*) using bioreactor system (communicated).
- Ket N.V., Hahn E.J., Park S.Y., Chakrabarty D. and Paek K.Y. (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. Biol. Plant., 48(3): 339-344.
- Dương Công Kiên (2003). Nuôi cấy mô thực vật II. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Lin J.M., Lin C.C., Chiu H.F., Yang J.J. and Lee S.G. (1993). Evaluation of the anti-inflammatory and liver protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. Amer. J. Chin. Med., 21: 59-69.
- Lu C.Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. In *Vitro* Cell Dev. Biol., 29: 92-96.
- Mak O.T., Huang D.D. and Law R.C.S. (1990). *A. formosanus* Hay. contains substances that affect arachidonic acid metabolism. Phyt. Res., 4: 45-48.
- Lê Thị Minh Nguyệt (2005). Nhân giống cây lan Gấm (*Anoectochilus formosanus*), một loài dược liệu quý. Khóa luận tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Như D.T., Don N.T., Vu N.H., Thiên N.Q., Thụy D.T.T., Duy N. and Teixeira da Silva J.A. (2006). Advance technology in micropropagation of some important plants. In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology, Volume II, Teixeira da Silva J.A. (Ed.). Global Science Books, UK., p. 325-335.
- Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm và Nguyễn Trung Thành (2010). Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* loài lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.). Tạp chí Khoa học, 26: 248-253.
- Schenk R.U. and Hildebrandt A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50: 199-204.

Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan gấm (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro*

- Shiau Y.J., Abhay P.S., Chen U.C., Yang S.R. and Tsay H.S. (2002). Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. Bot. Bull. Acad. Sin., 43: 123-130.
- Teuscher H. (1978). Erythroides, Goodyera, Haemaria and Macodes, with Noectochilus. Am. Orchid Soc. Bull., 47: 121-129.
- Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miên (2012). Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* bảo tồn nguồn dược liệu quý. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 10(4): 597-603.
- Tsay H.S. (2002). Use of tissue culture for the mass propagation of pathogen-free plants. J. Agric. Food Chem., 50: 1859-1865.