

NHÂN GIỐNG LOÀI LAN KIM TUYẾN (*Anoetochilus setaceus* Blume) CẦN BẢO TỒN TẠI THÁI NGUYÊN BẰNG CÔNG NGHỆ *IN VITRO*

Trần Thị Thu Hà^{1*}, Dương Thị Nhung¹, Cao Thị Mai Phương¹

TÓM TẮT

Nguồn gen lan Kim tuyến (*Anoetochilus setaceus* Blume) thu thập từ rừng tự nhiên thuộc xã Quân Chu (Thái Nguyên) được tiến hành thử nghiệm nhân giống bằng phương pháp *in vitro*. Kết quả thí nghiệm vào mẫu từ đoạn thân khí sinh khử trùng bằng dung dịch 0,1% HgCl₂ trong thời gian 3 phút kết hợp 7 phút Javen 15%, ngâm 30 phút trong Cefotaxim 10% và nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy khởi đầu MS cho tỷ lệ mẫu sạch bột chồi 83,33% sau 4 tuần. Hệ số nhân chồi trung bình đạt 9,8 lần sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/LBAP, 100 ml/L nước dừa, 70 g/L dịch chiết chuối và 30 g/L sucrose. Tỷ lệ chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đạt 93,33% và trung bình 3,35 rễ/chồi sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường 1/2MS bổ sung 1,5 mg/L NAA, 20 g/L sucrose và 0,5 g/L than hoạt tính. Cây mầm mô được nuôi trồng ở nhà kính với công thức giá thể: Xơ dừa + trấu hun + đá perlite (7 : 2 : 1) có tỷ lệ sống rất cao chiếm 97%. Kết quả mở ra triển vọng bảo tồn và phát triển loài này ở Thái Nguyên.

Từ khoá: Lan Kim tuyến, *in vitro*, nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Kim tuyến (*Anoetochilus setaceus* Blume) là cây dược liệu, có thành phần hóa học đa dạng bao gồm các chất như: quercetin, isoharmnetin - 3 - O - beta - D - glucopyranosid, kaempferol - 3 - O - betaDglucopyranosi, 5 - hydroxy - 3' - 4' - 7' - trimethoxyflavonol - 3 - O - beta - D - rutinosid và isorhamnetin - 3 - O - beta - D - rutinosid,.. [1]. Lan Kim tuyến nói chung là một loại thảo dược có giá trị, hỗ trợ điều trị các bệnh, như: Ung thư, tăng huyết áp, dạ dày, lao phổi,... [2]. Trong tự nhiên, khả năng tái sinh chồi của lan Kim tuyến từ thân, rễ và từ hạt kém, cây sinh trưởng rất chậm. Loài này đang bị đe dọa nghiêm trọng, rất có thể sẽ bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên và đang được xếp trong nhóm IA của Nghị định 84/2021/NĐ - CP [3] và nhóm thực vật đang nguy cấp EN A1a, c, d. trong Sách Đỏ Việt Nam, cần bảo tồn các quần thể nhỏ còn sót lại cũng như cần nghiên cứu nhân giống để bảo tồn nguồn gen [4].

Loài lan Kim tuyến được tìm thấy ở khu vực núi Tam Đảo, thuộc xã Quân Chu, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên với số cá thể còn lại rất ít. Vì vậy,

nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô là rất cần thiết nhằm phục vụ cho chương trình bảo tồn và phát triển loài cây này của tỉnh Thái Nguyên nói riêng và khu vực nói chung.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Đoạn thân loài lan Kim tuyến mọc ở rừng tự nhiên xã Quân Chu (thuộc khu vực núi Tam Đảo, thuộc xã Quân Chu, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên) được thu thập về phòng thí nghiệm của Viện Lâm nghiệp và Phát triển bền vững - Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Có 45 công thức thí nghiệm (CTTN) được bố trí trong việc hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* loài lan Kim tuyến tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học (Bảng 1), gồm:

Thí nghiệm 1 (CT1 - CT8): Nghiên cứu chất khử trùng và thời gian khử trùng tạo nguồn mẫu *in vitro*. Chỉ tiêu theo dõi: Số mẫu sạch, tỷ lệ mẫu sạch, số mẫu mẫu sạch bột chồi, tỷ lệ mẫu bột chồi. Thời gian theo dõi 2 tuần.

Thí nghiệm 2 (CT9 - CT13): Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BAP đến khả năng nhân nhanh chồi. Chỉ tiêu theo dõi sau 4 tuần nuôi cấy: Tổng số chồi mới, hệ số nhân chồi trung bình.

¹Viện Lâm nghiệp và Phát triển bền vững - Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên

*Email: tranthithuhaptln@tuaf.edu.vn

Thí nghiệm 3 (CT14 - CT29): Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết chuối và nước dừa đến khả năng nhân nhanh, kích thích tăng trưởng chồi. Chỉ tiêu theo dõi: Tổng số chồi mới, hệ số nhân chồi trung bình, chất lượng chồi. Thời gian theo dõi 4 tuần.

Thí nghiệm 4 (CT30 - CT40): Nghiên cứu chất kích thích sinh trưởng NAA, IBA đến khả năng tạo rễ lan Kim tuyến. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ chồi tạo rễ, số lượng rễ/cây và chiều dài rễ sau 3-5 tuần.

Thí nghiệm 5 (CT41 - CT45): Huấn luyện và ra ngôi cây ngoài nhà lưới. Chỉ tiêu theo dõi: Số lượng cây sống và chất lượng cây trồng sau 8 tuần theo dõi.

Thí nghiệm 1, 2, 3, 4 được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu. Điều kiện nuôi cấy: Ánh sáng: mẫu được nuôi cấy dưới ánh đèn neon với cường độ ánh sáng từ

2.000 - 2.500 lux, thời gian chiếu sáng 8 - 10 h/ngày. Nhiệt độ: nhiệt độ trong phòng duy trì $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Thí nghiệm 5: Được thực hiện trong nhà lưới có độ ẩm 70%, che tối 65%, duy trì nhiệt độ 20 - 25°C.

Sử dụng excel phân tích phương sai để xử lý số liệu. Phân tích phương sai một nhân tố: FBAP (F thực nghiệm) > FCrit (F tra bảng) các công thức có sự khác nhau, có ý nghĩa thống kê, BAP có ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi và ngược lại. Phân tích phương sai hai nhân tố: Fchuối (F thực nghiệm) > FCrit1 (F tra bảng), Fnước dừa (F thực nghiệm) > FCrit2 (F tra bảng), các công thức có sự khác nhau, có ý nghĩa thống kê, hàm lượng chuối, nước dừa có ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi, chất lượng chồi và ngược lại. FChuối - Nước dừa (tương quan giữa 2 nhân tố thực nghiệm) > FCrit3 2 nhân tố thực nghiệm có tương quan và ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi và ngược lại.

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy

Môi trường	Thành phần môi trường
Nuôi cấy khởi đầu	Môi trường MS (Murashige and Skoog medium) + 30 g/l Lsucose + 6 g/L agar. pH 5,8
Nhân nhanh chồi	MS (Murashige and Skoog medium) + 30 g/L sucrose + 6 g/L agar + (0 - 2,0 mg/L) BAP. pH 5,8
Nhân nhanh, kích thích tăng trưởng chồi	MS + (0,1 - 2,0 mg/L) BAP + 30 g/l sucrose + 6 g/L agar + (0 - 70g/L dịch chiết chuối + (50 - 100 ml/L) nước dừa. pH 5,8
Tạo rễ	$\frac{1}{2}$ MS + (0,5 - 2,5) NAA/IBA + 20 g sucrose + 0,5 g AC + 6 g/L agar. pH 5,8

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tạo nguồn mẫu *in vitro*

Kết quả theo dõi 8 công thức thí nghiệm khử trùng với cùng loại hóa chất và thời gian khác nhau cho mẫu lan Kim tuyến cho thấy, công thức sử dụng kết hợp ba loại hóa chất khử trùng cho hiệu quả tạo mẫu sạch cao hơn rất nhiều so với công thức chỉ

dùng hai loại hóa chất. Khử trùng đoạn thân bằng Javen 15% trong 7 phút, HgCl_2 0,1% trong 3 phút và ngâm Cefotaxim 10% trong 30 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 90%, tỷ lệ mẫu bật chồi mới cao nhất (83,33%) (Bảng 2). Sau khi được khử trùng, mẫu được nuôi trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng trong 3 - 4 tuần.

Bảng 2. Kết quả tạo mẫu sạch từ đoạn thân lan Kim tuyến

CTTN	Thời gian khử trùng (phút)			Chỉ tiêu đánh giá				
	Javen (15%)	HgCl_2 0,1%	Cefotaxim 10%	Tổng số mẫu cấy	Số mẫu sạch	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Số mẫu sạch bật chồi	Tỷ lệ mẫu bật chồi mới (%)
CT1	5	0	30	30	5	16,67	4	13,33
CT2	7	0	30	30	6	20,00	5	16,67
CT3	0	3	30	30	10	33,33	9	30,00
CT4	0	5	30	30	16	53,33	12	40,00
CT5	5	3	30	30	20	66,67	20	66,67
CT6	5	5	30	30	18	60,00	16	53,33
CT7	7	3	30	30	27	90,00	25	83,33
CT8	7	5	30	30	26	86,67	22	73,33

Kết quả này có tính tương đồng với nghiên cứu của Trương Thị Bích Phượng và Phan Ngọc Khoa (2013) [5] khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan Kim tuyến kết luận: Vật liệu nghiên cứu sử dụng là đỉnh sinh trưởng và đoạn thân mang chồi nách (2,0 - 3,0 cm). Khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút là thích hợp nhất tỷ lệ mẫu sống 86,1% đối với đỉnh sinh trưởng và 84,77% với đoạn thân mang chồi nách. Kết quả nghiên cứu này cao hơn rất nhiều so với nghiên cứu của Nguyễn Trọng Quyền và cs (2020) [6] nhân giống loài *Anoectochilus formosanus* Hayata, khử trùng đoạn thân bằng $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 7 phút và nuôi cấy trên môi trường MS bổ

sung 0,5 mg/L BAP, 30 g/L sucrose cho tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi chỉ đạt 46,67% sau 4 tuần nuôi cấy.

3.2. Nhân nhanh chồi

Mẫu chồi *in vitro* có kích thước khoảng 0,5 cm được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu trong thí nghiệm này. Kết quả thí nghiệm được tiến hành với 5 công thức về ảnh hưởng của BAP (0 - 2,0 mg/L) đến hệ số nhân chồi cho thấy: F_{BAP} : 20,18 > F_{crit} : 3,11, hiệu quả nhân nhanh chồi ở các nồng độ BAP khác nhau là khác nhau và có ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi loài này, sử dụng BAP 1,5 mg/L cho hệ số nhân nhanh chồi cao nhất (5,37 lần/4 tuần) (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BAP đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	BAP (mg/L)	Tổng số mẫu cấy	Tổng số chồi tái sinh	Hệ số nhân chồi trung bình (lần)
CT9	0	30	60	$2,0 \pm 0,12$
CT10	0,5	30	145	$4,83 \pm 0,26$
CT11	1,0	30	135	$4,5 \pm 0,23$
CT12	1,5	30	161	$5,37 \pm 0,19$
CT13	2,0	30	115	$3,83 \pm 0,35$
F_{BAP} : 20,18 F_{crit} : 3,11				

Một số nghiên cứu sử dụng BAP trước đây đã chỉ ra kết quả tạo chồi tối ưu khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng này. Nguyễn Thanh Mai và Mai Trường (2019) [7] nghiên cứu nuôi cấy lỏng lác thu sinh khối lan Kim tuyến bản địa *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. sử dụng 1,5 mg/L BAP kết hợp 0,2 mg/L NAA cho kết quả tạo chồi tốt đạt 4,13 chồi/mẫu. Nhưng từ kết quả của thí nghiệm này cho thấy, nồng độ 1,5 mg/l BAP lại cho kết quả tạo chồi đạt 4,83 chồi/mẫu, hệ số nhân chồi tốt hơn đạt 5,37 lần/4 tuần.

3.3. Nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi

Sau giai đoạn nhân nhanh, tiếp tục chồi Lan kim tuyến thí nghiệm trên được cấy chuyển sang môi trường kích thích tăng trưởng chồi, thúc đẩy chiều cao và chất lượng chồi nhằm đạt đủ tiêu chuẩn tạo rễ.

Nước dừa được sử dụng rộng rãi như một thành phần thúc đẩy tăng trưởng trong môi trường nuôi cấy mô, một số loài thực vật, quá trình tái sinh được gia tăng bằng cách bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, nước dừa là có khả năng làm tăng

quá trình sinh trưởng và phát triển của hoa lan trong ống nghiệm do có sự liên quan đến sự hiện diện của một loại cytokinin.

Bột chuối có hàm lượng fructose, glucose và nitrat cao, khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy làm tăng hàm lượng đường cũng như hàm lượng khoáng của môi trường. Tác dụng kích thích của bột chuối hiệu quả do khả năng ổn định pH của môi trường nuôi cấy. Bổ sung bột chuối vào môi trường đóng vai trò như một chất kháng axit và trung hòa nồng độ axit. Ngoài ra, bột chuối có chứa một hàm lượng lớn như sắt, kali, vitamin B6, B12 và tryptophan thúc đẩy PLBs tăng trưởng.

Kết quả thí nghiệm được tiến hành với 16 công thức về ảnh hưởng của (1,5 mg/l) BA kết hợp với tổ hợp nước dừa (50 - 200 ml/L) và dịch chiết chuối (30 - 100 g/l) cho thấy: $F_{Chuối}$ = 19,66 > F_{crit} : 2,90; $F_{Nước dừa}$ = 266,42 > F_{crit} : 2,90; $F_{Nước dừa - Chuối}$ = 36,80 > F_{crit} = 2,18, hàm lượng chuối, nước dừa có tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi, chất lượng của chồi nuôi cấy. Hiệu quả nhân nhanh chồi ở các môi trường khác nhau là khác nhau, khi sử dụng (1,5 mg/l) BA kết hợp với 100

ml/L nước dừa và 70 g/L dịch chiết chuối cho hệ số chất lượng chồi tốt, lá xanh phát triển đều. nhân nhanh cao nhất đạt 9,8 lần/ 4 tuần nuôi cấy,

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch chiết chuối và nước dừa đến khả năng nhân nhanh, kích thích tăng trưởng chồi lan Kim tuyến

CTTN	Chất điều hoà sinh trưởng			Tổng số mẫu cấy	Tổng số chồi tái sinh	Hệ số nhân chồi trung bình (lần)	Chất lượng chồi
	BAP (mg/L)	Nước dừa (ml/l)	Chuối (g/l)				
CT14	1,5	50	30	30	194	5,37 ± 0,09	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT15		50	50	30	198	5,57 ± 0,20	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT16		50	70	30	201	6,1 ± 0,12	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT17		50	100	30	206	6,43 ± 0,15	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT18		100	30	30	215	7 ± 0,15	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT19		100	50	30	229	7,73 ± 0,12	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT20		100	70	30	264	9,8 ± 0,06	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT21		100	100	30	260	8,33 ± 0,09	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT22		150	30	30	255	8,2 ± 0,12	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT23		150	50	30	264	7,9 ± 0,11	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT24		150	70	30	248	7,37 ± 0,12	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT25		150	100	30	243	6,57 ± 0,18	Chồi mập, lá xanh, phát triển đều
CT26		200	30	30	236	6,53 ± 0,10	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt, thân mỏng nước
CT27		200	50	30	228	6,5 ± 0,12	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt, thân mỏng nước
CT28		200	70	30	225	6,43 ± 0,15	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt, thân mỏng nước
CT29		200	100	30	219	6,27 ± 0,12	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt, thân mỏng nước
		F _{Nước dừa} : 266,42 ; F _{crit} : 2,90					
		F _{Chuối} : 19,66, F _{crit} : 2,90					
		F _{Nước dừa – Chuối} : 36,80; F _{crit} : 2,19					

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với một số nghiên cứu khác như: Nguyễn Thị Hồng Gấm và cs (2012) [8] kết luận nhân giống loài *Anoectochilus setaceus* sử dụng 100 ml/l nước dừa kết hợp 100 g/L dịch chiết khoai tây cho kết quả nhân chồi và chất lượng chồi tốt nhất. Phan Xuân Huyền và Nguyễn Thị Phượng Hoàng (2017) [9] nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* và nuôi trồng cây lan Gấm (*Anoectochilus formosanus hayata*) đưa ra môi trường MS bổ sung 1 mg/1 BA, 50 g/1 chuối, 1 g/1 than hoạt tính, 30 g/1 sucrose, 9 g/1 agar là tốt nhất cho tái sinh chồi *in vitro*, với 5,2 chồi/mẫu. Nguyễn Thanh Mai và Mai Trường (2019) [7] tiến hành thí nghiệm nuôi cấy nhân nhanh chồi *in vitro* *Anoectochilus roxburghii* đã sử dụng môi trường bổ sung 1,5 mg/1 BAP, 0,2 mg/1 NAA và 150 ml/L nước

dừa cho kết quả nhân chồi tốt. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu ở đây có tính vượt trội và khác biệt khi sử dụng hàm lượng nước dừa thấp hơn (100 ml/L) kết hợp 70 g/l dịch chiết chuối cho hệ số nhân chồi cao hơn (8,8 lần/ 4 tuần nuôi cấy), chất lượng chồi tốt, lá xanh phát triển đều.

3.4. Tạo rễ

Các mẫu chồi đạt tiêu chuẩn về chiều cao và số lá sẽ được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường ra rễ là môi trường cơ bản MS có bổ sung 20 g/L sucrose, 6 g/L agar và chất kích thích ra rễ (NAA, IBA) ở các nồng độ khác nhau. Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả thu được rất cao (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng ra rễ của cây lan Kim tuyến *in vitro*

Công thức	Hóa chất	Nồng độ (mg/L)	Tổng số mẫu cấy	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình /chồi	Chiều dài rễ trung bình (cm)
CT30	IBA	0,5	30	33,33 ± 3,33	1,19 ± 0,10	1,55 ± 0,01
CT31		1,0	30	56,67 ± 3,33	1,30 ± 0,07	1,34 ± 0,00
CT32		1,5	30	70,00 ± 0,00	2,10 ± 0,13	1,28 ± 0,01
CT33		2,0	30	83,33 ± 3,33	2,72 ± 0,05	1,11 ± 0,07
CT34		2,5	30	63,33 ± 3,33	2,58 ± 0,05	1,33 ± 0,00
	F			115,31	6,53	1,70
	F crit			3,11		
CT35	NAA	0,5	30	43,33 ± 3,33	2,23 ± 0,02	0,52 ± 0,04
CT36		1,0	30	53,33 ± 3,33	2,44 ± 0,08	1,04 ± 0,01
CT37		1,5	30	93,33 ± 3,33	3,35 ± 0,08	1,21 ± 0,08
CT38		2,0	30	76,67 ± 3,33	3,17 ± 0,04	1,15 ± 0,05
CT39		2,5	30	50,00 ± 5,77	2,63 ± 0,19	0,97 ± 0,03
	F			75,13	4,38	4,07
	F crit			3,11		
CT40	ĐC	0	30	26,67	1,63	0,56

Với giá trị $F > F_{crit}$ do vậy ở các nồng độ IBA và NAA khác nhau cho kết quả tạo rễ khác nhau. Khi bổ sung chất điều hoà sinh trưởng IBA vào môi trường

ra rễ đều cho tỷ lệ ra rễ của các chồi với tỷ lệ biến động từ 33,3% đến 83,3% cao hơn công thức đối chứng không bổ sung chất kích thích ra rễ. Với IBA

khi tăng nồng độ từ 0,5 đến 2,0 mg/L thì tỷ lệ ra rễ tăng từ $33,33\% \pm 3,33$ lên $83,33\% \pm 3,33$; tương tự số rễ/chồi cũng tăng lên từ $1,19 \pm 0,1$ rễ lên $2,72 \pm 0,05$ rễ. Nhưng khi nồng độ IBA tăng lên 2,5 mg/l thì tỷ lệ ra rễ, số rễ/chồi và chiều dài trung bình rễ đều giảm xuống tương ứng là $63,33 \pm 3,33\%$; $2,58 \pm 0,05$ rễ.

Với chất ĐHST NAA khi tăng nồng độ từ 0,5 đến 1,5 mg/L thì tỷ lệ ra rễ tăng từ $43,33\% \pm 3,33$ lên $93,33\% \pm 3,33$; tương tự số rễ/chồi cũng tăng lên từ $2,23 \pm 0,02$ rễ lên $3,35 \pm 0,08$ rễ và chiều dài trung bình của rễ cũng tăng từ $0,52 \text{ cm} \pm 0,04$ lên $1,21 \text{ cm} \pm 0,08$. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA tăng lên 2 mg/l và 2,5 mg/l thì tỷ lệ ra rễ, số rễ/chồi và chiều dài trung bình rễ đều giảm xuống.

Giữa hai chất ĐHST IBA và NAA ở các mức nồng độ nghiên cứu cho thấy bổ sung NAA 1,5 mg/L vào môi trường cho kết quả ra rễ tốt nhất với tỷ lệ ra

rễ đạt 93,33%, số rễ/chồi là 3,35 rễ và chiều dài trung bình rễ là 1,59 cm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Trọng Quyền và cs (2020) về nhân giống loài *Anoectochilus formosanus* hayata có tỷ lệ chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đạt 100% và 3,64 rễ/chồi, chiều dài rễ trung bình 2,07 cm sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA, 20 g/L sucrose và 2 g/L than hoạt tính [6].

3.5. Huấn luyện và trồng cây ở nhà lưới

Các thí nghiệm về giá thể đối với cây mầm với 5 công thức cho thấy: Thành phần giá thể khác nhau có ảnh hưởng tới tỷ lệ cây sống sau khi đưa ra nhà lưới (Bảng 6). Tỷ lệ cây sống đạt cao nhất sau 8 tuần trồng (97%); rễ dài có rất nhiều lông hút, rễ trắng, mập; cây cao 10 - 12 cm thân mập; lá dày, xanh đậm.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể trồng lan Kim tuyến đến tỷ lệ cây sống ở nhà lưới

CT	Thành phần giá thể	Số cây thí nghiệm	Tỷ lệ cây sống sau 8 tuần trồng (%)	Hình thái, chất lượng cây trồng
CT41	Rêu	100	86	Rễ trắng; cây cao 9 - 10 cm; lá dày, xanh non
CT42	Xơ dừa + trấu hun + đá perlite (7 : 2 : 1)	100	97	Rễ dài có rất nhiều lông hút, rễ trắng, mập; cây cao 10 - 12 cm thân mập; lá dày, xanh đậm
CT43	Xơ dừa + trấu hun + rêu (7 : 2 : 1)	100	92	Rễ dài, trắng, mập; cây cao 10 - 11 cm, mập; lá dày, xanh non
CT44	Xơ dừa + rêu (7 : 3)	100	90	Rễ trắng; cây cao 9 - 10 cm; lá xanh nhạt
CT45	Xơ dừa	100	70	Rễ đen; cây cao 9 - 10 cm; lá xanh nhạt

Cây mầm *in vitro* sau khi huấn luyện, đủ tiêu chuẩn đem trồng, được rửa sạch thạch và trồng trên giá thể là xơ dừa + trấu hun + đá perlite (7 : 2 : 1), khi áp dụng chế độ chăm sóc tưới 2 lần/ngày với lượng nước tưới 1 L/m²/lần, đảm bảo độ ẩm 70% + che tối

65% ánh sáng, giúp cây trồng có khả năng sinh trưởng tốt nhất, sau 8 tuần trồng: Chiều cao cây tăng thêm 1 - 1,5 cm, hệ rễ phát triển; cây sinh trưởng tốt, thân cứng cáp, lá màu xanh tía.



A



B



C



D



E



F

Hình 1. Ảnh các giai đoạn chính trong quy trình nhân giống lan Kim tuyến *in vitro*

A: Cây lan Kim tuyến nguồn gốc từ Thái Nguyên; B: Đoạn thân khử trùng vào mẫu; C: Cụm chồi tái sinh trên môi trường 1,5 mg/L BAP + 100 ml/l nước dừa + 70 g/L dịch chiết chuối giai đoạn cây non; D: Cụm chồi tái sinh trên môi trường 1,5 mg/L BAP + 100 ml/l nước dừa + 70 g/L dịch chiết chuối giai đoạn cây trưởng thành đủ điều kiện cấy chuyển sang môi trường tạo rễ; E: Tái sinh rễ trên môi trường 1,5 mg/L NAA; F: Cây *in vitro* trồng tại nhà kính huấn luyện trước khi chuyển vào rừng.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình nhân *in vitro* loài lan Kim tuyến được từ đoạn chồi thu thập từ rừng tự nhiên của tỉnh Thái Nguyên. Giai đoạn nuôi nhân nhanh chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/L BAP và sau đó nuôi tăng trưởng chồi trên MS bổ sung 1,5 mg/LBAP, 70 g/L dịch chiết chuối, 100 mL/L nước dừa. Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường MS½ bổ sung 1,5 mg/L NAA. Giá thể phù hợp để nuôi trồng loài lan Kim tuyến từ nhân giống *in vitro* là xơ dừa + trấu hun + đá perlite (7 : 2 : 1).

Kết quả nghiên cứu này tạo tiền đề cho nhân giống quy mô lớn. Đồng thời, kết quả có khả năng ứng dụng thực tiễn theo hướng bảo tồn ngoại vi nguồn gen lan Kim tuyến này và phục vụ cho tái tạo, phục hồi quần thể lan trong điều kiện tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cheng S. F.& Chang D. C. N. (2009). Growth responses and changes of active components as influenced by elevations and orchid mycorrhizae on *Anoectochilus formosanus* Hayata. Botanical Studies 50, 459-466.
2. Võ Văn Chi (1999). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. NXB Y học.
3. Chính phủ (2021). *Nghị định số 84/2021/NĐ-CP ngày 22/9/2021 sửa đổi, bổ sung một số điều của Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22/01/2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn*

bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp.

4. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). *Sách Đỏ Việt Nam* (phần II. Thực vật). NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

5. Trương Thị Bích Phượng, Phan Ngọc Khoa (2013). Nhân giống *in vitro* lan Kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume (Wall.) Lindl. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*- Vol. 79, No. 1.

6. Nguyễn Trọng Quyền, Nguyễn Thị Thơ, Khuất Thị Hải Ninh, Bùi Văn Thắng, Hoàng Văn Sâm (2020). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài lan Kim tuyến (*Anoectochilus formosanus* Hayata). *Tạp chí Nông nghiệp & PTNT*, số 17, tr: 39-47.

7. Nguyễn Thanh Mai, Mai Trường (2019). Nghiên cứu nuôi cấy lỏng lắc thu sinh khối lan Kim tuyến bản địa *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*, 14(1), 97-107.

8. Nguyễn Thị Hồng Gấm, Phùng Văn Phê, Hà Văn Huân, Bùi Văn Thắng (2012). Nhân giống lan Kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*- Chuyên san Giống số tháng 6/2012.

9. Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Phượng Hoàng, 2017. Nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* và nuôi trồng cây lan Gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata). *Tạp chí Công nghệ sinh học* 15 (3): 515-524.

**PROPAGATION OF *Anoectochilus setaceus* Blume NEED TO CONSERVATION IN THAI NGUYEN WITH
IN VITRO TECHNOLOGY****Tran Thi Thu Ha, Duong Thi Nhung, Cao Thi Mai Phuong****Summary**

The gene source of *Anoectochilus setaceus* Blume collected in the natural forest of Quan Chu (Thai Nguyen province), was carried out experimentally propagated by in vitro culture method. The results indicated stem segment aerosols and rhizomes bearing dormant or apical shoots were sterilized with HgCl_2 0.1% solution for 3 minutes, combined with 7 minutes of Javen 15%, soaked for 30 minutes in Cefotaxime 10% and cultured on MS starter culture for a high percentage of clean samples shoots (83.33%) after 4 weeks. Shoot multiplication factor reached 9.8 shoots/explant after 4 weeks for culturing on MS medium supplemented with 1.5 mg/l BAP, 100 mL/L coconut water, 70 g/l banana extract and 30 g/l sucrose. The rate of shoots rooting reached 93.33% (average 3.35 roots/bud) after 4 weeks of culture on 1/2MS medium supplemented with 1.5 mg/L NAA, 20 g/L sucrose and 0.5 g/L activated carbon. Tissue sprouts were grown in greenhouses with the medium formula: coir + rice husk + perlite (7: 2: 1) with a very high survival rate (97%). The results open up the prospect of conservation and development of this species in Thai Nguyen.

Key words: *Anoectochilus setaceus* Blume, in vitro, propagation.

Người phản biện: PGS.TS. Bùi Văn Thắng

Ngày nhận bài: 5/10/2022

Ngày thông qua phản biện: 5/11/2022

Ngày duyệt đăng: 28/11/2022