

NHÂN GIỐNG CÂY LAN ĐUÔI CHỖN [*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume] BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ

Bùi Văn Thắng¹, Nguyễn Thị Hồng Gấm¹

TÓM TẮT

Một quy trình nhân nhanh giống Lan đuôi chồn bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được nghiên cứu thành công, với hệ số nhân giống cao: Hạt non từ quả lan chín sinh lý được nuôi trên môi trường Knops + 100 ml/l dịch chiết khoai tây (PH), 100 ml/l nước dừa (CW) và 20 g/l sucrose, cho tỷ lệ hạt nảy mầm 95% sau 6 tuần nuôi cấy. Nhân nhanh protocorm trên môi trường Knops + 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 0,3 mg/l Kinetin, 100 ml/l PH, 100 ml/l CW và 30 g/l sucrose, cho hệ số nhân 16,09 lần/chu kỳ nhân sau 5 tuần nuôi cấy. Môi trường Knops + 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA, 0,3 mg/l GA3, 100 ml/l PH, 100 ml/l CW và 30 g/l sucrose, cho tỷ lệ protocorm tái sinh chồi 97,55% và 8,82 chồi/cụm sau 6 tuần nuôi cấy. Nuôi cấy chồi trên môi trường Knops + 0,3 mg/l IBA, 100 ml/l PH và 20 g/l sucrose, cho tỷ lệ chồi ra rễ 100% và 6,5 rễ/chồi sau 4 tuần nuôi cấy. Cây con hoàn chỉnh được trồng trên giá thể dớn khô và xơ dừa (1:1), cho tỷ lệ sống 90% sau 8 tuần ra ngôi. Quy trình này có thể áp dụng để sản xuất một lượng lớn cây giống chất lượng tốt đáp ứng nhu cầu thương mại.

Từ khóa: Lan đuôi chồn, nhân giống, nuôi cấy *in vitro*, thể chồi

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan đuôi chồn [*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume] là loài lan rừng, có hoa rất đẹp và hương thơm được thị trường trong nước, cũng như quốc tế ưa chuộng nên có giá trị kinh tế cao. Rất nhiều loài lan thuộc chi *Rhynchostylis* có giá trị thương mại quan trọng trong ngành công nghiệp hoa trồng chậu. Lan *R. retusa* thường được tìm thấy trong các khu rừng có độ cao 1200 m so với mực nước biển, phân bố chủ yếu ở Việt Nam, Lào, Campuchia, Indonesia, Malaysia, Thái Lan, Nepal, Philipin, Singapore, Sri Lanka, Bangladesh, Benin, Miến Điện, Trung Quốc và Ấn Độ (Chowdhury *et al.*, 2014). Ngoài giá trị làm cảnh, loài lan *R. retusa* còn có giá trị dược liệu rất lớn; toàn bộ các bộ phận của cây được sử dụng để làm thuốc điều trị bệnh thấp khớp, lao phổi, động kinh, rối loạn kinh, bệnh gút, hen và bệnh ngoài da (Shanavaskhan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2012). Rễ được sử dụng để chữa bệnh sốt rét (Tiwari *et al.*, 2012, Radhika *et al.*, 2013). Hoa khô được sử dụng làm thuốc chống côn trùng và để gây nôn (Subedi *et al.*, 2013). Dịch chiết từ các bộ phận của loài lan này cho thấy có tính kháng khuẩn mạnh đối với *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli* (Hossain, 2011).

Do có giá trị lớn nên loài lan rừng *R. retusa* ở Việt Nam đang bị khai thác một cách quá mức, có nguy cơ cạn kiệt trong rừng tự nhiên. Vì vậy, việc nghiên cứu một quy trình nhân nhanh giống, có khả năng đáp ứng nguồn cấy giống cho mục đích thương mại hiện nay là cần thiết. Phương pháp nhân giống *in vitro* không những góp phần bảo tồn hữu hiệu nguồn gen, mà còn góp phần phát triển thương mại loài hoa lan quý này hiệu quả. Nghiên cứu nhân giống loài lan *R. retusa* từ vật liệu là phơi hạt non, đoạn

nốt đỉnh thân thông qua tạo mô sẹo, protocorm, tái sinh chồi cũng đã được một vài công trình báo cáo (Pinaki and Miskat, 2012; Parab and Krishnan, 2012; Bakul and Shahinul, 2015). Tuy nhiên, các báo cáo cho thấy nhân giống của loài lan *R. retusa* có xuất xứ từ các quốc gia khác nhau (kiểu gen khác nhau) thì hiệu suất nhân giống khác nhau. Do đó, đối với mỗi giống cần xác định được quy trình nhân giống phù hợp mới đem lại hiệu quả. Trong công trình này, thông báo kết quả nghiên cứu nhân nhanh giống thành công cho loài Lan đuôi chồn Việt Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, đạt hiệu suất cao.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là hạt non từ quả chín sinh lý của cây lan rừng (cây không bị sâu bệnh, kiểu dáng hoa đẹp, có hương thơm) thuộc loài Lan đuôi chồn (*R. retusa*) trồng tại Vườn lan rừng của Trung tâm Phát triển Lâm nghiệp Hà Nội.

Môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản Knops, (Knops, 1865).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tạo mẫu sạch *in vitro*: Quả lan được rửa sạch bằng nước máy, ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng 10 phút và rửa sạch xà phòng. Sau đó, mẫu được cho vào các bình nút vụn và đưa vào tủ cấy vô trùng; khử trùng bề mặt bằng dung dịch cồn 70% trong 1 phút; tiếp theo khử trùng mẫu bằng dung dịch 0,1% HgCl₂ trong 8 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng (3 lần) và thấm khô bằng giấy thấm. Quả lan sau khi khử trùng được cắt dọc quả bằng lưỡi dao, tách lấy hạt non và cấy lên môi trường

¹ Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp

khoáng Knops + 100 ml/l (tương ứng 100 g/l) dịch chiết khoai tây (PH) + 100 ml/l nước dừa (CW) + 20 g/l sucrose, nuôi trong 6 tuần để phôi hạt nảy mầm tạo thể chồi (protocorm).

- Nhân nhanh protocorm: Cụm protocorm được cấy lên môi trường khoáng cơ bản Knops + (0,2 - 1,0 mg/l) BAP + (0,2 - 0,5 mg/l) NAA + (0,2 - 0,5 mg/l) Kinetin + 100 ml/l PH + 100 ml/l CW + 30 g/l sucrose (Bảng 1); nuôi trong 5 tuần dưới ánh sáng gián đoạn để khảo sát khả năng nhân nhanh protocorm. Thí nghiệm: 2 g protocorm/bình tam giác 250 ml.

- Tái sinh chồi từ protocorm: Các cụm protocorm cấy lên môi trường tái sinh chồi, môi trường Knops + (0,3 - 1,0 mg/l) BAP + (0,3 - 0,5 mg/l) NAA + (0,1 - 0,5 mg/l) GA3 + 100 ml/l PH + 100 ml/l CW + 30 g/l sucrose (bảng 2); nuôi trong 6 tuần dưới ánh sáng gián đoạn để protocorm tái sinh chồi. Thí nghiệm: 5 cụm protocorm/bình tam giác 250 ml.

- Tạo cây hoàn chỉnh: Dùng mũi dao tách các chồi hữu hiệu có chiều cao $\geq 2,0$ cm và cấy chuyển lên môi trường kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, môi trường Knops + (0,1 - 0,3 mg/l) IBA và (0,1 và 0,2 mg/l) NAA + 100 ml/l PH + 20 g/l sucrose (bảng 3). Các bình chồi được nuôi 4 tuần dưới ánh sáng gián đoạn, chồi ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh.

- Huấn luyện và ra ngôi: Các bình cây con ra rễ *in vitro* được đưa ra nhà huấn luyện cây mô trong thời gian 5 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Sau thời gian huấn luyện cây con cứng cáp lấy ra khỏi bình và rửa bộ rễ loại bỏ thạch bằng nước máy (rửa nhẹ nhàng tránh làm gãy rễ, dập thân). Sau đó, cây con được cấy vào giá thể dớn khô và xơ dừa (tỷ lệ 1 : 1), cây được che chắn ánh sáng chiếu trực xạ bằng lưới đen, ngày tưới nước bằng cách phun sương 2 - 4 lần, đảm bảo độ ẩm $\geq 95\%$.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm 7 g/l agar chuẩn độ đến pH = 5,8; khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ phòng nuôi 25 \pm 2°C, cường độ ánh sáng dần dần 35 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 14 h/ngày.

- Phương pháp thu thập và xử lý số liệu: Mỗi thí nghiệm trên thực hiện ít nhất với 30 mẫu và 3 lần lặp lại; số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS (version 16.0) và phương pháp Duncan's test (Duncan, 1995) với mức sai khác có ý nghĩa P = 0,05.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu từ tháng 6 năm 2015 đến 6 năm 2017.

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm Công nghệ nuôi cây mô tế bào và khu nhà lưới ra cây mô của Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hạt nảy mầm và nhân nhanh thể chồi (protocorm)

Hạt của các loài hoa lan không có nội nhũ chứa chất dinh dưỡng cho quá trình nảy mầm nên ở ngoài môi trường tự nhiên, hầu hết hạt không thể nảy mầm thành cây. Nhu cầu dinh dưỡng cho hạt lan nảy mầm được cho là rất cụ thể với từng loài (Arditti and Ernst, 1984; Kauth *et al.*, 2008). Nitơ là nguồn dinh dưỡng rất cần thiết cho sự nảy mầm các loài lan khác nhau (Stewart *et al.*, 2006). Bakul and Shahinul (2015), đánh giá khả năng nảy mầm của hạt lan *R. retusa* trên 4 loại môi trường khoáng khác nhau, MS (Murashige and Skoog, 1962), 1/2MS, B5 (Gamborg *et al.* 1968) và PM (PhytamaxTM), cho thấy môi trường MS cho tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất (72,6%). Trong nghiên cứu này, hạt non từ quả lan *R. retusa* chín sinh lý được cho nảy mầm trên môi trường Knops (1965) bổ sung thêm 100 ml/l PH + 100 ml/l CW + 20 g/l sucrose, cho tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 95% sau 6 tuần nuôi cấy (Hình 1A).

Sau khi hạt nảy mầm tạo protocorm, các cụm protocorm (hình 1B) được cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh protocorm, môi trường Knops bổ sung chất ĐHST với hàm lượng khác nhau để đánh giá khả năng nhân nhanh. Kết quả thu được cho thấy, trên công thức môi trường có hoặc không có chất ĐHST, thể hiện sự khác biệt rõ rệt về hệ số nhân; môi trường không có chất ĐHST thì hệ số nhân protocorm đạt rất thấp (2,66 lần), ngược lại trên các môi trường bổ sung chất ĐHST hệ số nhân protocorm đạt được cao, dao động từ 6,05 đến 16,09 lần sau 5 tuần nuôi cấy (Bảng 1). Khi thay đổi hàm lượng BAP và giữ nguyên hàm lượng NAA, cho thấy hàm lượng BAP bổ sung vào môi trường ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả nhân protocorm. Sử dụng hàm lượng 0,5 mg/l BAP kết hợp với (0,2 và 0,3 mg/l) NAA cho hệ số nhân protocorm khá cao (tương ứng 12,74 và 13,86 lần). Kết quả này tương tự với báo cáo của Bakul and Shahinul (2015), khi nghiên cứu nhân nhanh protocorm thứ cấp của loài lan *R. retusa* cũng cho thấy hàm lượng BAP ảnh hưởng mạnh đến hệ số nhân protocorm; nồng độ (0,5 - 1,0 mg/l) BAP kết hợp với (0,5 - 1,0 mg/l) NAA cho hệ số nhân cao nhất (tương ứng 12,86 và 16 lần). Cũng theo báo cáo của Parab and Krishnan (2012), tái sinh protocorm của loài lan này từ vật liệu mô sẹo phát triển từ hạt non trên môi trường khoáng bổ sung thêm 1,0 mg/l BAP và 1,0 mg/l NAA cho hiệu quả mô sẹo tạo protocorm cao nhất (13,93 protocorm/mô sẹo).

Trong nghiên cứu này, khi môi trường bổ sung thêm tổ hợp chất ĐHST gồm BAP, NAA và Kinetin đã tăng hiệu quả nhân protocorm lên rõ rệt. Ở công thức môi trường bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA + 0,3 mg/l Kinetin cho hệ số nhân đạt cao nhất trong các công thức thí nghiệm (16,09 lần/chu kỳ nhân, 5 tuần nuôi cấy). Ngược lại, theo nghiên cứu của Bakul and Shahinul (2015) và Parab and Krishnan (2012), khi môi trường chỉ bổ sung BAP và Kinetin thì cho hiệu quả nhân protocorm không cao. Nhận thấy, môi trường chỉ có chất ĐHST nhóm cytokinin (BAP, Kinetin) thì hiệu suất nhân protocorm thấp hơn nhiều so với môi trường bổ sung cytokinin (BAP, Kinetin) và auxin (NAA) ở hàm lượng phù hợp.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến nhân nhanh protocorm

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Sinh khối protocorm/ bình (g)	Hệ số nhân protocorm (lần)
BAP	NAA	Kinetin		
-	-	-	5,32 ± 0,97 e	2,66
0,2	0,2	-	12,10 ± 2,19 d	6,05
0,3	0,2	-	18,53 ± 2,39 c	9,27
0,5	0,2	-	25,47 ± 2,19 b	12,74
0,2	0,3	-	11,55 ± 1,78 d	5,78
0,3	0,3	-	20,30 ± 0,86 c	10,15
0,5	0,3	-	27,72 ± 1,60 b	13,86
0,3	0,5	0,2	28,84 ± 1,81 b	14,42
0,5	0,5	0,3	32,19 ± 2,16 a	16,09
1,0	0,5	0,5	26,05 ± 2,14 b	13,02

Ghi chú: Bảng 1, 2, 3: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P = 0,05$.

3.2. Tái sinh chồi từ protocorm

Trong nghiên cứu này, sử dụng 6 công thức môi trường có sự kết hợp các loại chất ĐHST thuộc nhóm cytokinin, gibberellin và auxin với hàm lượng khác nhau và công thức đối chứng không bổ sung chất ĐHST, môi trường dinh dưỡng sử dụng đồng nhất gồm: Knops + 100 ml/l PH + 100 ml/l CW + 30 g/l sucrose + chất ĐHST; Sau thời gian theo dõi 6 tuần, kết quả tổng hợp trong bảng 2. Kết quả thu được cho thấy rằng: trên môi trường bổ sung loại và hàm lượng chất ĐHST khác nhau ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh chồi của protocorm, tỷ lệ tái sinh chồi dao động từ 64,27 - 97,55% và số chồi/cụm dao động từ 4,14 - 8,82 chồi sau 6 tuần nuôi cấy. Ngược lại, ở công thức không bổ sung chất ĐHST

cho tỷ lệ tái sinh chồi rất thấp (13,85%) và số chồi/cụm chỉ đạt trung bình 1,68 chồi. Từ kết quả nghiên cứu này cho thấy môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản Knops bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA và 0,3 mg/l GA3 cho tỷ lệ protocorm tái sinh chồi và số chồi/cụm đạt cao nhất trong các công thức thí nghiệm (97,55% và 8,82 chồi/cụm) (Hình 1D,E,F). Pinaki and Miskat (2012) khi nghiên cứu tái sinh chồi từ đoạn đốt thân của loài lan *R. retusa* cho tỷ lệ tạo cụm chồi và số chồi/mẫu cấy đạt cao nhất là 89,5% và 8,0 chồi/mẫu cấy sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 10% (v/v) CW, 2 g/l peptone và 20 g/l sucrose. Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi tái sinh có thể phụ thuộc vào nhiều nguyên nhân, một trong nguyên nhân chính là khác biệt về kiểu gen giữa các giống nghiên cứu, loại vật liệu sử dụng và thành phần môi trường nuôi cấy.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến tái sinh chồi từ protocorm

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/cụm
BAP	NAA	GA3		
-	-	-	13,85 ± 1,82 e	1,68 ± 0,21 e
0,3	0,3	0,3	83,93 ± 1,56 b	6,70 ± 0,22 c
0,3	0,3	0,5	95,16 ± 4,78 a	7,92 ± 0,42 b
0,5	0,3	0,3	97,55 ± 2,70 a	8,82 ± 0,24 a
0,5	0,5	0,5	78,72 ± 2,21 bc	4,14 ± 0,28 d
1,0	0,5	0,3	76,13 ± 2,34 c	4,33 ± 0,19 d
1,0	0,5	0,5	64,27 ± 7,12 d	4,51 ± 0,25 d

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh và ra ngoài

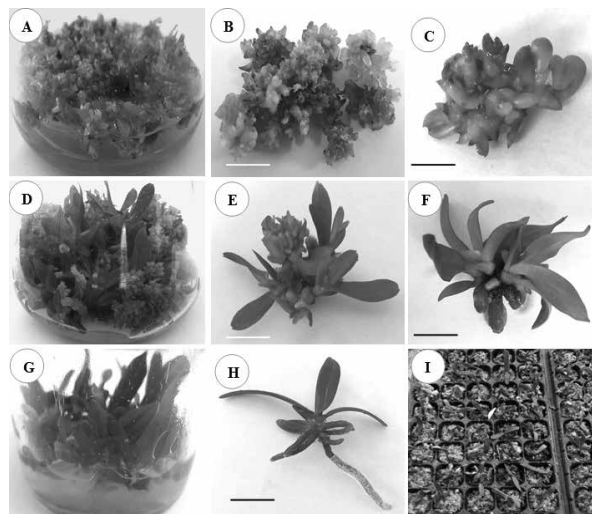
Các chồi lan hữu hiệu *in vitro* (chiều cao $\geq 2,0$ cm) tạo ra ở bước tái sinh chồi được tách ra thành các chồi đơn và cấy lên môi trường ra rễ bổ sung chất ĐHST NAA và IBA với các hàm lượng khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy rằng, môi trường khoáng Knops không bổ chất ĐHST có tỷ lệ chồi ra rễ rất thấp (35,37%), số rễ trung bình/chồi chỉ đạt 2,61 rễ và rễ có kích thước ngắn và mảnh; ngược lại, trên các công thức môi trường bổ sung chỉ IBA (0,1 - 0,3 mg/l) hoặc tổ hợp BAP kết hợp với NAA thì tỷ lệ chồi ra rễ tăng cao, dao động từ 75,29% đến 100% và số rễ trung bình/chồi đạt từ 3,97 - 6,5 rễ, rễ dài và mập (Bảng 3, Hình 1G,H). Tỷ lệ chồi ra rễ đạt cao nhất ở công thức môi trường bổ sung 0,3 mg/l IBA, 100% chồi ra rễ và 6,5 rễ/chồi. Theo báo cáo của Bakul and Shahinul (2015), chất điều hòa

sinh trưởng IAA cho hiệu quả chồi ra rễ tốt hơn chất NAA; số rễ trên chồi đạt cao nhất là 7 rễ khi nuôi chồi trên môi trường ½ MS + 1,0 mg/l IAA và 6,4 rễ khi nuôi chồi trên môi trường ½ MS + 1,0 mg/l NAA. Ngược lại, Parab and Krishnan (2012) ra rễ chồi trên môi trường ½ MS không bổ sung chất ĐHST, chỉ bổ sung 5 g/l bột chuối, 10% (v/v) nước dừa, 2% pepton,

0,5% than hoạt tính và 20 g/l sucrose, cho chồi ra rễ nhiều nhất 5 rễ/chồi. Trong nghiên cứu này nhận thấy, hầu hết các chồi lan tách ra từ cụm chồi đã có dấu hiệu ra rễ nên trong giai đoạn ra rễ tạo cây hoàn chỉnh chỉ cần cung cấp một lượng nhỏ chất ĐHST là đủ, nếu hàm lượng cao rễ thường bị mô sẹo hóa, ảnh hưởng đến tỷ lệ sống khi ra cây.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng ra rễ *in vitro* của chồi

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ trung bình/chồi	Đặc điểm của rễ
IBA	NAA			
-	-	35,37 ± 4,18 e	2,61 ± 0,21 d	Rễ ngắn và mảnh
0,1	-	75,29 ± 2,82 d	3,97 ± 0,47 c	Rễ dài và mập
0,2	-	87,84 ± 4,00 c	5,42 ± 0,33 b	Rễ dài và mập
0,3	-	100,00 ± 0,00 a	6,50 ± 0,47 a	Rễ dài và mập
0,1	0,2	91,85 ± 3,47 bc	5,82 ± 0,23 b	Rễ dài và mảnh
0,2	0,1	95,26 ± 4,36 ab	6,00 ± 0,26 ab	Rễ dài và mập



Hình 1. Nhân giống *in vitro* Lan đuôi chồn (*Rhynchostylis retusa*).

A - Phôi hạt nảy mầm thành protocorm; B - cụm protocorm (thước 0,5 cm); C - Protocorm nảy chồi sau 2 tuần nuôi cấy (thước 0,5 cm); D,E - Protocorm nảy chồi sau 5 tuần nuôi cấy (thước 1 cm); F - Cụm chồi (thước 01 cm); G,H - Chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh (thước 2 cm); I - Cây con trồng trên giá thể dớn sau 8 tuần tuổi (thước 1,0 cm).

Huấn luyện và ra ngoài: Giai đoạn chuyển cây *in vitro* từ trong bình nuôi ra trồng ở nhà lưới là giai đoạn có ý nghĩa quan trọng, quyết định khả năng ứng dụng của toàn bộ quy trình nhân giống *in vitro* vào trong thực tiễn sản xuất. Giai đoạn này thường gặp nhiều khó khăn do cây *in vitro* đang trong điều kiện ổn định về mặt dinh dưỡng, nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng khi tiến hành chuyển cây ra

ngoài sẽ làm cây dễ bị “sốc” về điều kiện sống dẫn tới cây có thể bị chết. Trong nghiên cứu này, các bình cây lan ra rễ được huấn luyện trong nhà lưới 5 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên trước khi lấy ra khỏi bình. Sau thời gian huấn luyện, cây được rửa sạch loại bỏ thạch dưới vòi nước chảy và được cấy vào chậu đã chuẩn bị giá thể cây dớn khô và xơ dừa. Đặt chậu cây trong nhà lưới có mái che bằng lưới đen tránh ánh sáng mặt trời chiếu trực xạ, tưới nước đảm bảo độ ẩm ≥ 95%. Kết quả cho tỷ lệ cây sống 90% sau 8 tuần trồng (Hình 11).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Xây dựng thành công quy trình vi nhân giống Lan đuôi chồn, loài lan rừng bản địa của Việt Nam, đạt hệ số nhân giống cao: Tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 95% sau 6 tuần nuôi cấy; hệ số nhân protocorm đạt 16,09 lần/chu kỳ nhân sau 5 tuần nuôi cấy; tỷ lệ protocorm tái sinh chồi đạt 97,55% và trung bình 8,82 chồi/cụm sau 6 tuần nuôi cấy; tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100% và trung bình 6,5 rễ/chồi, rễ dài và mập sau 4 tuần nuôi cấy. Cây hoàn chỉnh được huấn luyện 5 ngày trong nhà lưới cho thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, cây được trồng trên giá thể dớn khô và xơ dừa (1: 1), cho tỷ lệ cây sống đạt 90% sau 8 tuần ra ngoài.

4.2. Đề nghị

Đề nghị áp dụng quy trình nhân giống Lan đuôi chồn bằng kỹ thuật nuôi cấy mô này để sản xuất một lượng lớn cây giống có chất lượng tốt cung cấp cho thị trường.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của ThS. Nguyễn Thị Thu Hằng, Giám đốc Trung tâm Phát triển Lâm nghiệp Hà Nội, đã cung cấp quả Lan đười chồn để làm vật liệu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arditti, J. and R Ernst**, 1984. *Physiology of germinating orchid seeds*. In: Arditti J, ed. *Orchid Biology: Reviews and perspectives III*. New York: Cornell University Press, 177-222.
- Bakul, B. and S.M.I. Shahinul**, 2015. The effect of PGRs on *in vitro* development of protocorms, regeneration and mass multiplication derived from immature seeds of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology*, 4(1): 121-127.
- Chowdhury, A.**, 2014. *Pharmacological screening of four medicinally important plants: Curcuma zedoaria, Nymphoides indica, Drynaria quercifolia and Rhynchostylis retusa*, A dissertation for Bachelor of Pharmacy, Department of Pharmacy, East West University. Dhaka, Bangladesh.
- Das, P.R., M.J. Islam, A.S.M. Salehtim, B.M.H. Kabir, M.E. Hasa, Z. Khatun, M.M. Rahman, M. Nurunnab, K. Zehedina, Y.K. Lee, R. Jahan, and M. Rahmatullah**, 2012. An ethnomedicinal survey conducted among the folk medicinal practitioners of three villages in Kurigram district, Bangladesh. *American-Eurasian J. Sustain. Agri.*, 6(2): 85-96.
- Hossain M.M.**, 2011. Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances- an overview. *Fitoterapia*, 82(2): 102-140.
- Kauth P.J, D. Dutra, T.R. Johnson, S.L. Stewart, M.E. Kane, and W. Vendrame**, 2008. *Techniques and applications of in vitro orchid seed germination*. In: *Teixeira da Silva JA, ed. Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. Vol. V, 1st Ed., UK: Global Science Books Ltd., 375-391.
- KNOP, W.**, 1865. *Quantitative Untersuchungen Über die Ernährungsprozesse der Pflanzen*. Landwirtsch. Versuchssat. Stn 7: 93-107.
- Parab G.V. and S. Krishnan**, 2012. Rapid *in vitro* mass multiplication of orchids *Aerides maculosa* Lindl. and *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. from immature seeds. *Indian Journal of Biotechnology*, 11: 288-294.
- Pinaki S. and A.A.J Miskat**, 2012. Clonal Propagation of *Rhynchostylis retusa* (Lin.) Blume through *in vitro* Culture and their Establishment in the Nursery. *Plant tissue cult. and Biotech.*, 22(1): 1-11.
- Radhika B. and N. Murthy**, 2013 Preliminary phytochemical analysis and *in vitro* bioactivity against clinical pathogens on medicinally important orchid of *Rhynchostylis retusa* Blume. *Am. J. Pharm. Tech. Res.*, 3: 510-520.
- Shanavaskhan, A.E., M. Sivadasan, A.H. Al-Farhan, and J. Thomas**, 2012. Ethnomedical aspects of angiospermic epiphytes and parasites of Kerala, India. *Indian J. Trad. Know.*, 11(2): 250-258.
- Stewart S.L. and M.E. Kane**, 2006. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 86: 159-167.
- Subedi A., B. Kunwar, Y. Choi, Y. Dai, T.V. Andel, R.P. Chaudhury, H.J.D. Boer, and B. Gravendeel**, 2013. Collection and trade of wild-harvested orchids in Nepal. *J. Ethnobot. Ethnomed.*, 9(1): 64-74.
- Tiwari A.P., B. Joshi, and A.A. Ansari**, 2012. Less known ethnomedicinal uses of some orchids by the tribal inhabitants of Amarkantak Plateau, Madhya Pradesh. *India. Nat. Sci.*, 10(12): 33-37.

Clonal propagation of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume from immature seeds by *in vitro* culture

Bui Van Thang, Nguyen Thi Hong Gam

Abstract

A procedure for clonal propagation of *R. retusa* has been developed. The result showed that the seeds of immature capsule were grown on Knops medium supplemented with 100 ml/l potato homogenate (PH), 100 ml/l coconut water (CW), and 20 g/l sucrose, by which the rate of seed germination achieved 95% after 6 weeks of culture. Secondary protocorms were developed from primary protocorms on medium fortified with different concentrations and combinations of cytokinins (BAP and Kin) and auxins (NAA). The highest numbers of secondary protocorms were 16.09 times/cycle of propagation after 5 weeks obtained from the primary protocorms in Knops medium supplemented with 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l NAA, 0.3 mg/l Kin, 100 ml/l PH, 100 ml/l CW, and 30 g/l sucrose. Knops medium supplemented with 0.5 mg/l BAP, 0.3 mg/l NAA, 0.3 mg/l GA3, 100 ml/l PH, 100 ml/l CW, and 30 g/l sucrose was the optimal medium for shoot regeneration from protocorms (97,55%, 8.82 shoots/explant). 100% shoots have rooted on Knops medium contained 0.3 mg/l IBA, 100 ml/l PH, and 20 g/l sucrose, with the remarkable figures being 6.5 roots/shoot after 4 weeks of culture. *In vitro* regenerated plantlets were acclimatized under greenhouse conditions. The survival rate of plantlets were 90% in the potting mixture containing sphagnum moss and coconut husk in the ratio of 1:1. This procedure can be applied for mass production of *R. retusa* to meet the commercial demand.

Key words: *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume, *in vitro* culture, propagation, protocorm

Ngày nhận bài: 10/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

Ngày phản biện: 15/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY NGƯU TẮT (*Achyranthes bidentata* Blume) TỪ CHỒI BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ

Nguyễn Thị Hồng Gấm¹, Bùi Văn Thăng¹

TÓM TẮT

Nhân giống cây Ngưu tất bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được nghiên cứu thành công, với hệ số nhân giống cao: Chồi non chứa mắt ngủ khử trùng bằng 0,1% (w/v) HgCl₂ trong thời gian 4 phút và nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 30 g/l sucrose cho tỷ lệ mắt sạch tái sinh chồi (72,5%) sau 4 tuần nuôi cấy; tỷ lệ chồi tái sinh tạo cụm chồi (95,7%), 12,2 số chồi/mẫu cấy và 92,5% chồi hữu hiệu sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l Kin + 0,1 mg/l NAA + 30 g/l sucrose; tỷ lệ chồi ra rễ đạt 94,8% và trung bình 7,2 rễ/chồi sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA + 30 g/l sucrose. Cây hoàn chỉnh được huấn luyện 10 ngày trong nhà lưới cho thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, cây con trồng trên giá thể đất đồi tầng B và cát (tỷ lệ 3:1), cho tỷ lệ cây sống đạt 83,3% sau 2 tuần ra ngôi. Quy trình này có thể áp dụng để sản xuất cây giống Ngưu tất chất lượng tốt phục vụ công tác bảo tồn nguồn gen và phát triển loài cây dược liệu quý này.

Từ khóa: Cây Ngưu tất, nhân giống vô tính, nuôi cấy mô

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Ngưu tất (*Achyranthes bidentata* Blume) là một trong những loài cây thuốc quan trọng của họ Amaranthaceae. Ngưu tất là một loài cây thảo mộc, lâu năm được tìm thấy ở nhiều vùng nhiệt đới ở châu Á và châu Phi bao gồm Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Java, Nhật Bản, v.v. (Chopra, 1958; Đỗ Tất Lợi, 1999). Cây này có chứa nhiều chất phytochemicals như alkaloids (achyranthine), rutin, axit oleanolic, axit caffeic, polysaccharides, saponin, terpenoids, triterpenoid, sitosterol, stigmasterol, ecdysterone, rubrosterone, v.v hầu hết đều có giá trị trị liệu (Nguyen *et al.*, 1995; Nguyen and Doan, 1989). Các bộ phận khác nhau của cây được sử dụng có hiệu quả để điều trị một số bệnh như ho, hen, sốt, phát ban da, tiêu chảy, tiểu đường, đau răng, viêm loét, viêm khớp, bệnh về gan và thận, giảm huyết áp, tăng cường tuần hoàn máu, kích thích miễn dịch (Chandra and Pandey 1983; Manandhar, 2002; Zhao *et al.*, 2004). Do có giá trị nên loài cây dược liệu này đã bị khai thác quá mức, dẫn đến khan hiếm ngoài tự nhiên. Vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống, bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây Ngưu tất là cần thiết hiện nay.

Trong những năm gần đây, kỹ thuật nuôi cấy mô đã được áp dụng cho việc bảo tồn nguồn gen và nhân giống nhiều loài cây thuốc. Với sự hỗ trợ của phương pháp nuôi cấy mô, có thể tạo ra một số lượng lớn các cây giống từ một nguồn mẫu hạn chế trong khoảng thời gian ngắn nhất. Một số nghiên cứu về mô nuôi cấy cây Ngưu tất cũng được báo cáo, tuy nhiên tần suất tái sinh chồi từ các loại mẫu cấy là rất thấp; thậm chí có sự khác nhau về tỷ lệ tái sinh khi nuôi cấy cùng một loại mẫu (Dong *et al.*, 2002;

Li *et al.*, 2004; Wesely *et al.*, 2012; Md. Jakir *et al.*, 2013). Trong nhân giống *in vitro*, mỗi giống xuất xứ khác nhau thì hiệu suất nhân giống khác nhau. Do đó, đối với mỗi giống cần xác định được môi trường nhân giống phù hợp mới đem lại hiệu quả. Trong công trình này, thông báo kết quả nghiên cứu nhân giống thành công cho loài cây Ngưu tất thu mẫu tại tỉnh Hà Giang, Việt Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là đoạn chồi non của cây Ngưu tất sinh trưởng, phát triển tốt và không bị sâu bệnh đã được tuyển chọn tại Hà Giang, do Trung tâm Giống cây trồng Đạo Đức, Hà Giang cung cấp.

Môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản MS, (Murashige and Skoog, 1962).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng và nuôi cấy khởi động

Các đoạn chồi (15 - 20 cm) được rửa sạch bằng nước máy, ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng 5 - 10 phút và rửa sạch xà phòng. Sau đó, mẫu được cho vào các bình thủy tinh có nút vặn và đưa vào tủ cấy vô trùng; khử trùng bề mặt bằng dung dịch cồn 70% trong 30 giây; tiếp theo khử trùng mẫu bằng 0,1% (w/v) HgCl₂ trong các khoảng thời gian khác nhau (2; 3; 4; 5; 7 phút), tráng lại bằng nước cất vô trùng (5 lần) và thấm khô bằng giấy thấm. Các đoạn chồi sau khi khử trùng được cắt thành các đoạn ngắn (khoảng 2 cm) chứa mắt ngủ và cấy lên môi trường cơ bản MS bổ sung 0,3 mg/l BAP và 30 g/l sucrose, nuôi dưới ánh sáng gián đoạn trong 4 tuần để mẫu cấy tái sinh chồi.

¹ Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp