

# NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT HỮU CƠ TỰ NHIÊN ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) TRONG ĐIỀU KIỆN IN VITRO

Phan Xuân Huyền<sup>1</sup>, Phan Mộng Thùy Dương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Hằng<sup>1</sup>,  
Đinh Văn Khiêm<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Kết<sup>2</sup>

Ngày nhận bài: 08/11/2023; Ngày phản biện thông qua: 10/12/2023; Ngày duyệt đăng: 11/12/2023

## TÓM TẮT

Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl.) là một trong những loại thảo dược quý, sinh trưởng phát triển tốt ở điều kiện tự nhiên của vùng Tây Nguyên. Đây là một loại thảo dược rất tốt cho sức khỏe của con người, do đó nó cần nghiên cứu bảo tồn và phát triển. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng sinh trưởng của cây Lan kim tuyến mọc từ các đốt thân trên môi trường bổ sung phối hợp các chất hữu cơ tự nhiên gồm nước dừa, chuối mủ, khoai tây, đậu nành trong điều kiện in vitro, lượng môi trường, mật độ nuôi cấy, loại ánh sáng nuôi cấy và đánh giá sự tích lũy hợp chất kinsenoside của nó. Kết quả cho thấy, giá thể thích hợp nhất là bổ sung kết hợp 10% nước dừa, 20 g/l chuối mủ, 20 g/l khoai tây và 20 g/l đậu nành. Lượng môi trường thích hợp là 60 ml/bịch. Mật độ nuôi cấy tốt nhất là 8 cây/bịch. Ánh sáng thích hợp nuôi cấy là đèn neon. Kết quả phân tích định lượng hợp chất kinsenoside cho thấy, cây nuôi cấy trên môi trường có bổ sung phối hợp các chất hữu cơ tự nhiên 7 tháng tuổi, cây nuôi trồng theo phương pháp truyền thống 08 tháng tuổi, cây mọc ngoài tự nhiên đã ra hoa có hàm lượng kinsenoside đạt lần lượt là 7,85%, 7,97% và 9,82%.

**Từ khóa:** Cây Lan kim tuyến, chất hữu cơ tự nhiên, điều kiện in vitro, môi trường, nuôi cấy.

## 1. MỞ ĐẦU

Tây Nguyên nói chung và Đà Lạt, Lâm Đồng nói riêng có điều kiện tự nhiên phù hợp cho nhiều loại cây dược liệu sinh trưởng phát triển. Trong đó, cây Lan kim tuyến là một loại thảo dược quý và có giá trị kinh tế. Y học cổ truyền và y học hiện đại đã nghiên cứu cho thấy, Lan kim tuyến có tác dụng tốt đến sức khỏe, phòng ngừa và chữa trị nhiều loại bệnh cho con người (Ket et al., 2004; Du et al., 2008; Chao et al., 2017). Vì vậy, việc nghiên cứu bảo tồn và phát triển cây Lan kim tuyến nuôi cấy trên môi trường bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện in vitro và không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật - CĐHSTTV, phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật, nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu dược liệu tốt phục vụ trong lĩnh vực y học, thực phẩm và mỹ phẩm là vấn đề cần thiết.

Trên thế giới đã có nhiều công bố nghiên cứu nhân giống in vitro cây Lan kim tuyến (loài *Anoectochilus roxburghii* và *Anoectochilus formosanus*) bằng phương pháp nuôi cấy mô không sử dụng CĐHSTTV, chỉ sử dụng các chất hữu cơ tự nhiên như: chuối bóc vỏ, khoai tây gọt vỏ, đậu nành, cà rốt gọt vỏ, cà chua, hành tây, ngô, đậu xanh, táo tàu, hạt kỷ tử, nước ép giá đỗ. Phương pháp này thực hiện đơn giản, chi phí thấp, sản xuất cây giống ở qui mô công nghiệp, đảm bảo an toàn cho cây con, có thể sử dụng trực tiếp làm

thuốc, rút ngắn chu kỳ sản xuất và cải thiện lợi ích kinh tế (Qing & Bo, 2013; Baoxin, 2015; Mei et al., 2017). Ở nước ta cũng đã có nghiên cứu công bố sử dụng các chất hữu cơ nước dừa, chiết xuất nấm men, chiết xuất tảo *Spirulina*, cao nấm men và casein hydrolysate trong nhân giống in vitro cây Lan kim tuyến loài *Anoectochilus formosanus* (Giap et al., 2018; Trang và cs., 2019). Hiện nay đã công bố của Huyền và cộng sự (2023) nghiên cứu nuôi cấy cây Lan kim tuyến trên môi trường bổ sung độc lập các chất hữu cơ tự nhiên (nước dừa, chuối mủ, khoai tây và đậu nành) trong điều kiện in vitro không sử dụng CĐHSTTV, nhưng chưa có công bố nghiên cứu nuôi cấy trên môi trường bổ sung phối hợp các chất hữu cơ tự nhiên. Phương pháp nuôi cấy này khắc phục những hạn chế của phương pháp nuôi trồng truyền thống như: sử dụng đốt thân để nuôi cấy sẽ giảm chi phí cây giống đến 75%, không sử dụng CĐHSTTV, phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật, cây trồng không bị chết và tạo được nguồn nguyên liệu dược liệu tốt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nuôi cấy những đốt thân của cây Lan kim tuyến trên môi trường kết hợp các chất hữu cơ tự nhiên nước dừa, chuối mủ, khoai tây và đậu nành trong điều kiện in vitro, không sử dụng CĐHSTTV, khảo sát lượng giá thể, mật độ và nguồn ánh sáng nhằm đánh giá sự sinh trưởng của cây và tích lũy hợp chất kinsenoside của nó.

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;

<sup>2</sup>Trường Đại học Đà Lạt;

Tác giả liên hệ: Phan Xuân Huyền; ĐT: 0919 066 566; Email: phanxuanhuyen1974@gmail.com

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp nước dừa, chuối mốc, khoai tây và đậu nành đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của lượng môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng tự nhiên và ánh sáng đèn neon đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*.

- Phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là những mẫu cây đốt thân chứa chồi ngủ có chiều dài khoảng 01 cm từ cây Lan kim tuyến *in vitro* được nuôi cấy tại phòng Công nghệ thực vật, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

#### 2.2.2. Nguyên vật liệu và điều kiện nuôi cấy

- **Môi trường nuôi cấy:** Thành phần của môi trường nuôi cấy là dinh dưỡng khoáng đa vi lượng và vitamin của môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), 30 g/l sucrose, 8 g/l rau câu Hải Phòng (Công ty TNHH Hải Long) và có bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên (nước dừa, chuối mốc, khoai tây và đậu nành) với các nồng độ khác nhau. Tất cả các môi trường được điều chỉnh pH = 5,8 và hấp khử trùng ở 121 °C với áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút.

- Bịch nylon nuôi cấy: Bịch nylon nuôi cấy chịu nhiệt, có chiều cao 20 cm, phần đáy hình chữ nhật có chiều dài là 08 cm và chiều rộng là 06 cm.

- Điều kiện thí nghiệm: Trong phòng thí nghiệm, sử dụng ánh sáng đèn neon để nuôi cấy cây, thời gian chiếu sáng 08 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 34  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm không khí 75 - 85%. Ở điều kiện ngoài vườn ươm, nhà màng có che 02 lớp lưới đen (cường độ ánh sáng của ngày nắng lúc 10; 12 và 14 giờ tương ứng 10,14; 14,52 và 6,18  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), nhiệt độ 20 - 25°C, độ ẩm 80 - 90%.

#### 2.2.3. Bố trí thí nghiệm

**Nội dung 1:** Khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp nước dừa, chuối mốc, khoai tây và đậu nành đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều

kiện *in vitro*

Các mẫu cây được cấy lên môi trường nuôi cấy của Phan Xuân Huyền và công sự (2023) có một số thay đổi. Theo đó, mẫu cây đốt thân Lan kim tuyến có chiều dài khoảng 01 cm được cấy lên môi trường MS có chứa 30 g/l sucrose, 08 g/l agar và có bổ sung kết hợp các hợp chất hữu cơ tự nhiên: (1) 10% nước dừa và 20 g/l chuối mốc; (2) 10% nước dừa, 20 g/l chuối mốc và 20 g/l khoai tây; (3) 10% nước dừa, 20 g/l chuối mốc, 20 g/l khoai tây và 20 g/l đậu nành. Lượng giá thể nuôi cấy là 50 ml/bịch. Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân *in vitro*, mỗi nghiệm thức cấy 30 đốt và lặp lại 03 lần, sau 07 tháng nuôi cấy tiến hành thu số liệu.

**Nội dung 2:** Khảo sát ảnh hưởng của lượng môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*

Kế thừa thí nghiệm trên chọn môi trường nuôi cấy thích hợp nhất để thực hiện thí nghiệm này. Thí nghiệm nhằm đánh giá sự sinh trưởng của cây được nuôi cấy trên 3 lượng môi trường khác nhau: 40 ml/bịch, 50 ml/bịch và 60 ml/bịch. Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân *in vitro*, mỗi nghiệm thức cấy 30 đốt và lặp lại 03 lần, sau 07 tháng nuôi cấy tiến hành thu số liệu.

**Nội dung 3:** Khảo sát ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*

Kế thừa thí nghiệm trên chọn môi trường và lượng môi trường thích hợp nhất để thực hiện thí nghiệm này. Thí nghiệm nhằm đánh giá sự sinh trưởng của cây được nuôi cấy ở những mật độ khác nhau: 8, 10, 12 và 15 cây/bịch. Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân *in vitro* và lặp lại 03 lần, sau 07 tháng nuôi cấy sẽ tiến hành thu số liệu.

**Nội dung 4:** Khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng tự nhiên và ánh sáng đèn neon đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*

Kế thừa thí nghiệm trên chọn môi trường, lượng môi trường và mật độ thích hợp nhất để thực hiện thí nghiệm này. Thí nghiệm nhằm đánh giá sự sinh trưởng của cây được nuôi cấy ở hai điều kiện ánh sáng khác nhau: ánh sáng tự nhiên trong nhà màng (cường độ ánh sáng của ngày nắng lúc 10; 12 và 14 giờ tương ứng 10,14; 14,52 và 6,18  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) và ánh sáng đèn neon trong phòng thí nghiệm (34  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân *in vitro* và lặp lại 03 lần, sau 07 tháng nuôi cấy sẽ tiến hành thu số liệu.

**Nội dung 5:** Phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến

Hàm lượng hợp chất chính kinsenoside trong cây Lan kim tuyến được phân tích định lượng với mẫu nuôi cấy 07 tháng tuổi trên môi trường, lượng môi trường, mật độ nuôi cấy và ánh sáng thích hợp nhất, so sánh với mẫu của cây nuôi trồng theo phương pháp truyền thống ở điều kiện nhà màng 08 tháng tuổi và mẫu của cây mọc ngoài tự nhiên đã ra hoa. Mẫu thí nghiệm được sấy khô ở nhiệt độ 50°C và chiết 3 - 4 lần với dung môi methanol (MeOH) ở nhiệt độ phòng. Các dịch chiết được gộp chung, cô loại dung môi trên máy cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C để thu cặn khô. Cặn tiếp tục được hòa với nước cất loại ion và lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$  để phân tích bằng HPLC. Mẫu được phân tích lặp lại 03 lần. Hàm lượng kinsenoside được tính theo khối lượng khô (%). Định lượng hợp chất kinsenoside trong cây Lan kim tuyến được thực hiện tại phòng Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

#### 2.2.4. Chỉ tiêu theo dõi

Chiều cao cây (cm) (chiều cao trung bình của các cây từ gốc đến ngọn), chiều dài rễ (cm) (chiều dài trung bình của rễ dài nhất của các cây), số rễ/cây (số rễ trung bình của các cây), chiều dài lá (cm) (chiều dài trung bình của lá lớn nhất), chiều rộng lá (cm) (chiều rộng trung bình của lá lớn nhất), khối lượng tươi của cây (g/cây) (khối lượng tươi trung bình của cả cây) và hàm lượng hợp chất chính kinsenoside (% theo khối lượng khô) (mẫu để định lượng là toàn bộ cây Lan kim tuyến).

#### 2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 16.0) trong Duncan's test (Duncan, 1955) với  $P \leq 0,05$ .

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp nước dừa, chuối mốc, khoai tây và đậu nành đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*

Ảnh hưởng của sự kết hợp nước dừa, chuối mốc, khoai tây và đậu nành đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro* sau 07 tháng nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3.1. Kết quả cho thấy, tất cả các đợt thân đều bật chồi và sinh trưởng, tỷ lệ bật chồi đạt 100%, tuy nhiên, ở những môi trường bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên khác nhau thì cây có sự sinh trưởng khác nhau (Hình 1a<sub>1</sub>, 1a<sub>2</sub>, 1a<sub>3</sub>). Môi trường bổ sung kết hợp 10% nước dừa, 20 g/l chuối mốc, 20 g/l khoai tây, 20 g/l đậu nành là tốt nhất đến sự sinh trưởng của cây, với chiều cao cây đạt

14,52 cm, chiều dài rễ là 3,16 cm, số rễ là 7,00 rễ/cây, chiều dài lá là 3,71 cm, chiều rộng lá là 2,68 cm và khối lượng tươi là 2,65 g/cây. Môi trường bổ sung 10% nước dừa và 20 g/l chuối mốc thì cây sinh trưởng kém nhất, môi trường bổ sung 03 chất hữu cơ thì cây sinh trưởng kém hơn môi trường bổ sung 04 chất, nhưng tốt hơn môi trường bổ sung 02 chất hữu cơ. Điều này có thể giải thích, sự kết hợp 04 chất hữu cơ trên tạo một môi trường hỗn hợp các chất phù hợp và đủ lượng dinh dưỡng cho cây sinh trưởng tốt, sự kết hợp 02 chất hữu cơ cũng phù hợp cho đợt thân tái sinh chồi nhưng chưa đầy đủ các chất dinh dưỡng cho cây sinh trưởng tốt. Kết quả cũng cho thấy, khi kết hợp tăng nhiều chất hữu cơ thì sự sinh trưởng của cây theo chiều cao, chiều dài rễ và khối lượng tươi tăng lên, điều này cho thấy, khi bổ sung tăng thêm các chất hữu cơ vào môi trường nuôi cấy thì kích thích sự sinh trưởng của cây. Kết quả của nghiên cứu này tốt hơn kết quả của Phan Xuân Huyền và cộng sự (2023) khi nghiên cứu sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến loài *Anoectochilus roxburghii* nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung độc lập các chất hữu cơ tự nhiên nước dừa, chuối mốc, khoai tây và đậu nành. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác đã công bố chỉ sử dụng môi trường MS bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên trong nhân giống *in vitro* cây Lan kim tuyến không sử dụng phytohormone, mà không đánh giá khả năng sinh trưởng của cây như: kết hợp chuối bóc vỏ, khoai tây gọt vỏ, cà rốt gọt vỏ, cà chua và hành tây trong nhân giống *in vitro* loài *Anoectochilus roxburghii* (Baixin, 2015); kết hợp khoai tây và chuối nghiền nhuyễn trong nhân giống *in vitro* loài *Anoectochilus formosanus* (Qing & Bo, 2013); kết hợp chuối, ngô, khoai tây, đậu xanh, đậu nành, táo tàu và hạt ký tử trong nhân giống *in vitro* loài *Anoectochilus roxburghii* (Mei et al., 2017).

Như vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp 10% nước dừa, 20 g/l chuối mốc, 20 g/l khoai tây và 20 g/l đậu nành là tốt nhất đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro*.

**Bảng 3.1. Ảnh hưởng của sự kết hợp nước dừa, chuối mốc, khoai tây và đậu nành đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện in vitro sau 07 tháng nuôi cấy**

Môi trường bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi/cây	Tỷ lệ bật chồi (%)
10% nước dừa + 20 g/l chuối mốc	13,26 <sup>b</sup>	2,16 <sup>b</sup>	6,60 <sup>a</sup>	3,64 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,32 <sup>b</sup>	100
10% nước dừa + 20 g/l chuối mốc + 20 g/l khoai tây	13,65 <sup>b</sup>	2,68 <sup>ab</sup>	6,90 <sup>a</sup>	3,69 <sup>a</sup>	2,64 <sup>a</sup>	2,44 <sup>b</sup>	100
10% nước dừa + 20 g/l chuối mốc + 20 g/l khoai tây + 20 g/l đậu nành	14,52 <sup>a</sup>	3,16 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	3,71 <sup>a</sup>	2,68 <sup>a</sup>	2,65 <sup>a</sup>	100

Chú thích: Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $P \leq 0,05$  trong Duncan's test

**3.2. Khảo sát ảnh hưởng của lượng môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện in vitro**

Kế thừa kết quả của thí nghiệm trên chọn môi trường nuôi cấy có bổ sung các chất hữu cơ thích hợp nhất để thực hiện thí nghiệm này. Ảnh hưởng của lượng môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện in vitro sau 07 tháng nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3.2. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu nuôi cấy đều bật chồi và sinh trưởng, tỷ lệ bật chồi 100%, tuy nhiên, với những lượng môi trường khác nhau thì cây có sự sinh trưởng khác nhau (Hình 1b<sub>1</sub>, 1b<sub>2</sub>, 1b<sub>3</sub>). Cây nuôi cấy trên môi trường 60 ml/bịch sinh trưởng tốt nhất, với chiều cao cây đạt 15,31 cm, chiều dài rễ là 3,15 cm, số rễ là 7,10 rễ/cây, chiều dài lá là 3,72 cm, chiều rộng lá là 2,69 cm và khối lượng tươi là 2,86 g/cây. Môi trường với lượng 40 ml/bịch thì cây sinh trưởng kém nhất, môi trường với

lượng 50 ml/bịch thì cây sinh trưởng kém hơn môi trường 60 ml/bịch, nhưng tốt hơn môi trường 40 ml/bịch. Sự sinh trưởng của cây về chiều cao và khối lượng tươi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, nhưng đối với chiều dài rễ, số rễ/cây, chiều dài lá và chiều rộng lá thì có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể giải thích, môi trường 60 ml/bịch phù hợp và đủ lượng dinh dưỡng cho cây sinh trưởng tốt, môi trường 40 ml/bịch và 50 ml/bịch chưa đủ các chất dinh dưỡng cho cây sinh trưởng tốt. Kết quả cũng cho thấy, khi tăng lượng môi trường thì sự sinh trưởng của cây theo chiều cao và khối lượng tươi tăng lên, điều này cho thấy, khi tăng lượng môi trường thì kích thích sự sinh trưởng của cây.

Như vậy, nuôi cấy Lan kim tuyến trên môi trường bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện in vitro với lượng 60 ml/bịch là tốt nhất đến sự sinh trưởng của cây.

**Bảng 3.2. Ảnh hưởng của lượng môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện in vitro sau 07 tháng nuôi cấy**

Lượng môi trường nuôi trồng (ml/bịch)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi/cây	Tỷ lệ bật chồi (%)
40	13,12 <sup>c</sup>	3,12 <sup>a</sup>	6,80 <sup>b</sup>	3,68 <sup>a</sup>	2,65 <sup>a</sup>	2,41 <sup>c</sup>	100
50	14,50 <sup>b</sup>	3,14 <sup>a</sup>	6,90 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2,64 <sup>b</sup>	100
60	15,31 <sup>a</sup>	3,15 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>	3,72 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	100

Chú thích: Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $P \leq 0,05$  trong Duncan's test

**3.3. Khảo sát ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện in vitro**

Kế thừa kết quả của thí nghiệm trên chọn môi trường có bổ sung các chất hữu cơ và lượng môi trường nuôi cấy thích hợp nhất để thực hiện thí nghiệm này. Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện

in vitro sau 07 tháng nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3.3. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu nuôi cấy đều bật chồi và sinh trưởng, tỷ lệ bật chồi 100%, tuy nhiên, với những mật độ nuôi cấy khác nhau thì cây có sự sinh trưởng khác nhau (Hình 1c<sub>1</sub>, 1c<sub>2</sub>, 1c<sub>3</sub>, 1c<sub>4</sub>). Cây nuôi cấy ở mật độ 8 cây/bịch sinh trưởng tốt nhất, với chiều cao cây đạt 16,48 cm, chiều dài rễ là 3,16 cm, số rễ là 7,20 rễ/cây, chiều

dài lá là 3,70 cm, chiều rộng lá là 2,69 cm và khối lượng tươi là 2,98 g/cây. Sự sinh trưởng của cây theo chiều cao và khối lượng tươi giảm dần khi mật độ nuôi trồng tăng dần 10, 12 và 15 cây/bịch, và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nhưng đối với chiều dài rễ, số rễ/cây, chiều dài lá và chiều rộng lá thì có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể giải thích, khi mật độ cây tăng

lên thì cây phải cạnh tranh dinh dưỡng, ánh sáng, quang hợp và hô hấp. Kết quả cũng cho thấy, khi tăng mật độ cây thì sự sinh trưởng của cây theo chiều cao và khối lượng tươi bị ức chế giảm xuống.

Như vậy, mật độ 08 cây/bịch là tốt nhất đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến nuôi cấy trên môi trường bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện *in vitro*.

**Bảng 3.3.** Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro* sau 07 tháng nuôi cấy

Mật độ nuôi cấy (cây/bịch)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi/cây	Tỷ lệ bột chồi (%)
8	16,48 <sup>a</sup>	3,16 <sup>a</sup>	7,20 <sup>b</sup>	3,74 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>	2,98 <sup>a</sup>	100
10	15,27 <sup>b</sup>	3,14 <sup>a</sup>	6,90 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,80 <sup>b</sup>	100
12	14,23 <sup>c</sup>	2,96 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>	3,57 <sup>b</sup>	2,60 <sup>a</sup>	2,52 <sup>c</sup>	100
15	12,72 <sup>d</sup>	2,53 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>	3,55 <sup>b</sup>	2,56 <sup>a</sup>	2,21 <sup>d</sup>	100

Chú thích: Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $P \leq 0,05$  trong Duncan's test.



**Hình 1.** Cây Lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* trên môi trường MS bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên, cây trồng theo phương pháp truyền thống và cây mọc ngoài tự nhiên

Ghi chú: a<sub>1</sub>. Cây nuôi trồng trên môi trường bổ sung nước dừa và chuối, a<sub>2</sub>. Cây nuôi trồng trên môi trường bổ sung nước dừa, chuối và khoai tây, a<sub>3</sub>. Cây nuôi trồng trên môi trường bổ sung nước dừa, chuối, khoai tây và đậu nành; b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub>. Cây nuôi trồng trên lượng môi trường 40, 50 và 60 ml/bịch; b<sub>4</sub>, b<sub>5</sub>, b<sub>6</sub>. Cây nuôi trồng trên môi trường với mật độ 8, 10, 12 và 15 cây/bịch; d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>. Sinh trưởng của cây ở ánh sáng tự nhiên và ánh sáng đèn Neon; e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>, e<sub>3</sub>. Cây nuôi trồng trên môi trường bổ sung kết hợp các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện *in vitro*, cây nuôi trồng theo phương pháp truyền thống trong điều kiện nhà màng và cây mọc ngoài tự nhiên; f<sub>1</sub>, f<sub>2</sub>. Cây nuôi cấy với một số lượng lớn trên môi trường bổ sung kết hợp các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện *in vitro*.

**3.4. Khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng tự nhiên và ánh sáng đèn neon đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro***

Kế thừa kết quả của thí nghiệm trên chọn môi trường có bổ sung các chất hữu cơ, lượng môi trường và mật độ nuôi cấy thích hợp nhất để thực

hiện thí nghiệm này. Ảnh hưởng của ánh sáng tự nhiên và ánh sáng đèn neon đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro* sau 07 tháng nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3.4. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu nuôi cấy đều bật chồi và sinh trưởng, tỷ lệ bật chồi đạt 100%, tuy nhiên, với loại ánh sáng khác nhau thì cây có sự sinh trưởng khác nhau (Hình 1d<sub>1</sub>, 1d<sub>2</sub>). Cây nuôi cấy dưới ánh sáng đèn neon (chiều cao cây đạt 16,48 cm, chiều dài rễ là 3,10 cm, số rễ là 7,10 rễ/cây, chiều dài lá là 3,72 cm, chiều rộng lá là 2,63 cm và khối lượng tươi là 2,92 g/cây) sinh trưởng tốt hơn ánh sáng tự nhiên (chiều cao cây đạt 14,70 cm, chiều dài rễ là 2,49 cm, số rễ là 5,90 rễ/cây, chiều dài lá là 3,58 cm, chiều rộng lá là 2,51 cm và khối lượng tươi là 2,59 g/cây). Sự sinh trưởng của cây theo chiều cao,

số rễ/cây và khối lượng tươi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P \leq 0,05$ ). Nhưng đối với chiều dài rễ, chiều dài lá và chiều rộng lá thì có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $P \geq 0,05$ ). Điều này có thể giải thích, cây nuôi trồng dưới ánh sáng đèn neon với cường độ  $34 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , thời gian chiếu sáng 08 giờ/ngày và trong điều kiện phòng thí nghiệm thích hợp cho cây sinh trưởng hơn nuôi trồng dưới ánh sáng tự nhiên, trong điều kiện nhà màng có che 02 lớp lưới đen (cường độ ánh sáng của ngày nắng lúc 10; 12 và 14 giờ tương ứng 10,14; 14,52 và  $6,18 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Như vậy, sử dụng ánh sáng đèn neon nuôi cấy cây Lan kim tuyến trên giá thể bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện *in vitro* tốt hơn ánh sáng tự nhiên.

**Bảng 3.4. Ảnh hưởng của ánh sáng tự nhiên và ánh sáng đèn neon đến sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến trong điều kiện *in vitro* sau 07 tháng nuôi cấy**

Nguồn ánh sáng	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi/cây	Tỷ lệ bật chồi (%)
Ánh sáng tự nhiên	14,70 <sup>b</sup>	2,49 <sup>a</sup>	5,90 <sup>b</sup>	3,58 <sup>a</sup>	2,51 <sup>a</sup>	2,59 <sup>b</sup>	100
Ánh sáng đèn neon	16,22 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>	3,72 <sup>a</sup>	2,63 <sup>a</sup>	2,92 <sup>a</sup>	100

*Chú thích: Những chữ khác nhau (a, b) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $P \leq 0,05$  trong T-test*

### 3.5. Phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến

Hàm lượng hợp chất kinsenoside của mẫu 07 tháng tuổi nuôi cấy trên môi trường bổ sung kết hợp 10% nước dừa, 20 g/l chuối móc, 20 g/l khoai tây và 20 g/l đậu nành, lượng môi trường 60 ml/bịch, mật độ nuôi cấy 08 cây/bịch và sử dụng ánh sáng đèn neon (Hình 1e<sub>1</sub>), mẫu nuôi trồng theo phương pháp truyền thống ở điều kiện nhà màng 08 tháng tuổi (Hình 1e<sub>2</sub>) và mẫu cây mọc ngoài tự nhiên đã ra hoa (Hình 1e<sub>3</sub>) được thể hiện trên Bảng 3.5. Kết quả cho thấy, các mẫu phân tích đều có hợp chất kinsenoside, tuy nhiên, các mẫu khác nhau thì hàm lượng kinsenoside khác nhau. Mẫu của cây mọc ngoài tự nhiên có hàm lượng kinsenoside cao nhất, đạt 9,82%, mẫu của cây nuôi cấy môi trường bổ sung kết hợp các chất hữu cơ trong điều kiện *in vitro* là thấp nhất, đạt 7,85%, mẫu của cây nuôi trồng theo phương pháp truyền thống có hàm lượng cao hơn mẫu nuôi cấy trên môi trường bổ sung các chất hữu cơ, nhưng kém hơn mẫu cây mọc ngoài tự nhiên. Kết quả phân tích định lượng hợp chất kinsenoside cây nuôi cấy trên môi trường bổ sung kết hợp các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện *in vitro* của nghiên cứu này cao hơn kết quả của Phan Xuân Huyền và cộng sự (2023) cũng nuôi cấy loài *Anoectochilus roxburghii* trên môi trường bổ

sung độc lập các chất hữu cơ tự nhiên nước dừa, chuối móc, khoai tây và đậu nành, tương ứng là 6,44, 6,25, 6,47 và 6,07%. Kết quả phân tích của nghiên cứu này cũng cao hơn kết quả của Giáp et al. (2018) đã công bố hàm lượng chất kinsenoside của loài *Anoectochilus formosanus* nuôi cấy *in vitro* trong môi trường bổ sung các chất hữu cơ là 5,07%. Hiện nay đã có nhiều công bố phân tích định lượng hợp chất kinsenoside của các loài Lan kim tuyến nuôi trồng theo phương pháp truyền thống và cây ngoài tự nhiên như: Chao et al. (2017) phân tích 03 loài Lan kim tuyến và xác định hàm lượng kinsenoside nằm trong khoảng từ 6,37% đến 22,66%, với hàm lượng trung bình là 15%; Phan Xuân Huyền và cộng sự (2021) phân tích 03 loài Lan kim tuyến 14 tháng tuổi đã ra hoa và thu kết quả loài *Anoectochilus roxburghii* đạt 10,92%, *Anoectochilus lylei* đạt 9,63% và loài *Anoectochilus formosanus* đạt 8,53%; Võ Tấn Hưng và Phan Xuân Huyền (2023) cũng phân tích loài *Anoectochilus roxburghii* nuôi trồng theo phương pháp truyền thống 08 tháng tuổi là 7,19% và cây mọc ngoài tự nhiên là đã ra hoa là 7,38%.

Như vậy, cây Lan kim tuyến nuôi cấy từ đốt thân trên giá thể bổ sung kết hợp các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện *in vitro* có khả năng tích lũy hợp chất chính kinsenoside.

**Bảng 3.5. Phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến**

<b>Độ tuổi của cây</b>	<b>Hàm lượng kinsenoside (% theo khối lượng khô)</b>
Cây nuôi cấy trên giá thể bổ sung kết hợp các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện in vitro 07 tháng tuổi	7,85 ± 0,22
Cây nuôi trồng theo phương pháp truyền thống 08 tháng tuổi	7,97 ± 0,38
Cây mọc ngoài tự nhiên đã ra hoa	9,82 ± 0,07

*Chú thích: Giá trị trung bình của 03 lần lặp lại.*

#### 4. KẾT LUẬN

Môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp 10% nước dừa, 20 g/l chuối mốc, 20 g/l khoai tây và 20 g/l đậu nành là tốt nhất đến sự sinh trưởng của cây (chiều cao cây đạt 14,52 cm, chiều dài rễ là 3,16 cm, số rễ là 7,00 rễ/cây, chiều dài lá là 3,71 cm, chiều rộng lá là 2,68 cm và khối lượng tươi là 2,65 g/cây); lượng môi trường 60 ml/bịch là tốt nhất (chiều cao cây đạt 15,31 cm, chiều dài rễ là 3,15 cm, số rễ là 7,10 rễ/cây, chiều dài lá là 3,72 cm, chiều rộng lá là 2,69 cm và khối lượng tươi là 2,86 g/cây); mật độ nuôi cấy 08 cây/bịch là tốt nhất (chiều cao cây đạt 16,48 cm, chiều dài rễ là 3,16 cm, số rễ là 7,20 rễ/cây, chiều dài lá là 3,70 cm, chiều rộng lá là 2,69 cm và khối lượng tươi

là 2,98 g/cây); sử dụng ánh sáng đèn neon nuôi cấy tốt hơn ánh sáng tự nhiên (chiều cao cây đạt 16,48 cm, chiều dài rễ là 3,10 cm, số rễ là 7,10 rễ/cây, chiều dài lá là 3,72 cm, chiều rộng lá là 2,63 cm và khối lượng tươi là 2,92 g/cây); hàm lượng kinsenoside của cây nuôi cấy trên giá thể bổ sung kết hợp các chất hữu cơ tự nhiên trong điều kiện in vitro 07 tháng tuổi là 7,85%, cây nuôi trồng theo phương pháp truyền thống 08 tháng tuổi là 7,97% và cây mọc ngoài tự nhiên đã ra hoa là 9,82%.

Lời cảm ơn: Cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này.

## STUDY ON THE EFFECTS OF NATURAL ORGANIC SUBSTANCES ON THE GROWTH OF *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) IN IN VITRO CONDITIONS

Phan Xuan Huyen<sup>1</sup>, Phan Mong Thuy Duong<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thanh Hang<sup>1</sup>,  
Dinh Van Khiem<sup>1</sup>, Nguyen Van Ket<sup>2</sup>

Received Date: 08/11/2023; Revised Date: 10/12/2023; Accepted for Publication: 11/12/2023

### ABSTRACT

*Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl.) is one of the precious herbs that grows well in the natural conditions of Tay Nguyen. This is a very good herb for human health, so it needs research, conservation and development. In this study, we evaluated the growth ability of *Anoectochilus roxburghii* grown from stem nodes on a substrate supplemented with a combination of organic substances including coconut water, bananas, potatoes, and soybeans under in vitro conditions, amount of substrate, planting density, type of growing light and evaluated the accumulation of kinsenoside compounds in the plant samples. The results showed that the most suitable substrates were supplemented with a combination of 10% coconut water, 20 g/l bananas, 20 g/l potatoes and 20 g/l soybeans. The appropriate medium amount was 60 ml/bag. The best planting density was 8 plants/bag. The suitable light for growing was neon

<sup>1</sup>Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology;

<sup>2</sup>Dalat University;

Corresponding author: Phan Xuan Huyen; Tel: 0919 066 566; Email: phanxuanhuyen1974@gmail.com.

light. The results of quantitative analysis of kinsenoside compounds showed that plants cultivated on a substrate supplemented with a combination of natural organic substances were 7 months old, plants grown by traditional methods were 8 months old and plants grown in the wild flowered with kinsenoside content of 7.85%, 7.97% and 9.82%, respectively.

**Keywords:** *Anoectochilus roxburghii*, culture, in vitro condition, natural organic substances, substrate.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baoxin, Y. (2015). Culture medium used for *Anoectochilus roxburghii* terminal bud organic tissue culture. Patent CN103416310B.
- Chao, Z., Jian-guo, W., Jun, Y., Jin-zhong, W., Cheng-jian, Z. & Yan-bin, W. (2017). Content determination of kinsenoside in Jin-Xian-Lian from three *Anoectochilus* species by HPLC-ELSD. *Food Science and Technology International*, 65(44): 9685-9692.
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and F tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
- Du, X.M., Irino, N., Furusho, N., Hayashi, J., Shoyama, Y. (2008). Pharmacologically active compounds in the *Anoectochilus* sp. and *Goodyera* species L. *Journal of Natural Medicines*, 62:132-148.
- Giap, D.D., Thai, T.D., Thang, D.D., Trang, N.T.H., Tuan, T.T., Xuyen, N.T. & Hieu, D.D. (2018). Effects of several organic extracts on the growth, yield and quality of *Anoectochilus formosanus* biomass. *International Journal of Agricultural Technology*, 14(2): 171-182.
- Ket, N.V., Hahn, E.J., Park, S.Y., Chakrabarty, D. & Paek, K.Y. (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia plantarum*, 48(3): 339-344.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). "Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue", *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Mei, H.X., Chao, L.Y. & Ying, W.Y. (2017). A kind of cultural method of edible without hormone tissue culture *Anoectochilus roxburghii* terminal bud. Patent CN103416310B.
- Nguyễn Thị Huyền Trang, Đặng Thị Kim Thúy, Đỗ Đức Thăng, Trần Thị Mỹ Trâm, Trần Trọng Tuấn & Đỗ Đăng Giáp (2019). Ứng dụng các hợp chất hữu cơ thay thế nguồn nitrate vô cơ trong môi trường nuôi cấy sinh khối và thử hoạt tính sinh học của cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus formosanus* Hayata) in vitro. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(1): 134-141.
- Phan Xuân Huyền, Phan Mộng Thùy Dương, Nguyễn Thị Thanh Hằng & Đinh Văn Khiêm (2023). Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất hữu cơ tự nhiên đến sự sinh trưởng và tích lũy hợp chất kinsenoside của cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.). *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2023*, 538-543.
- Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Nguyễn Thị Phương Hoàng & Đinh Văn Khiêm (2021). Đánh giá sự sinh trưởng phát triển và hợp chất kinsenoside của các loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus* sp.) nuôi trồng trên giá thể trong điều kiện nhà màng. *Báo cáo Khoa học hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2021*, 177-181.
- Qing, L.X. & Bo, Z.X. (2013). Hormone-free rapid propagation organic production method of *Anoectochilus formosanus* germchit. Patent CN104429965A.
- Võ Tấn Hưng & Phan Xuân Huyền (2023). Nghiên cứu khả năng nhân giống, sinh trưởng và tích lũy hợp chất kinsenoside của cây Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. ở điều kiện ex vitro. *Tạp chí Đại học Khoa học Tây Nguyên*, 43: 40-47.