

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TỈNH KON TUM
TRUNG TÂM ỨNG DỤNG TIỀN BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG VÀ TRỒNG THỦ NGHIỆM CÂY KIM TUYẾN (*ANOECTOCHILUS* SP.)

Chủ nhiệm đề tài


ThS. Chu Đình Liệu

Cơ quan chủ trì




PHÓ GIÁM ĐỐC

Nguyễn Thanh Xuân

Kon Tum, tháng 12 năm 2017

MỤC LỤC

Mục lục	I
Danh mục bảng.....	VI
Danh mục hình.....	VIII
Danh mục chữ viết tắt.....	IX
PHẦN I. MỞ ĐẦU	1
I. Mở đầu	1
II. Thông tin chung về đề tài.....	2
1. Tên đề tài:	2
2. Mã số:	2
3. Thời gian thực hiện:.....	2
4. Cấp quản lý:	2
5. Kinh phí thực hiện:	2
III. Mục tiêu của đề tài	2
1. Mục tiêu tổng quát:.....	2
2. Mục tiêu cụ thể	2
IV. Nội dung nghiên cứu – triển khai của đề tài.....	2
V. Sản phẩm khoa học và công nghệ của đề tài.....	3
PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ CÂY LAN KIM TUYẾN.....	6
I. Giới thiệu khái quát về cây lan kim tuyến.....	6
1. Phân loại thực vật học.....	6
2. Đặc điểm phân bố của cây lan kim tuyến	7
3. Giá trị dược liệu của cây lan kim tuyến.....	7
II. Những nghiên cứu trên thế giới và việt nam về cây lan kim tuyến.....	9
1. Những nghiên cứu trên thế giới về cây lan kim tuyến.....	9
2. Những nghiên cứu trong nước về cây lan kim tuyến	12
CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN VỀ PHƯƠNG PHÁP NHÂN GIỐNG	13
I. Nhân giống cây lan Kim tuyến (<i>Anoectochilus</i> sp.).....	13
1. Nhân giống bằng hạt.....	13

2.	Nhân giống bằng cây con	13
2.1.	Phương pháp giâm cây	13
2.2.	Nhân giống in vitro	14
II.	Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy	17
1.	Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng mẫu cấy.....	17
2.	Ảnh hưởng của các thành phần hóa học	17
2.1.	Các nguyên tố khoáng	18
2.2.	Chất hữu cơ bổ sung.....	18
2.3.	Nguồn cacbon.....	18
2.4.	Chất điều tiết sinh trưởng	19
2.5.	Than hoạt tính.....	20
2.6.	Các chất hữu cơ bổ sung	20
2.7.	Tác nhân làm đặc môi trường.....	20
3.	Ảnh hưởng của điều kiện ra cây	20
	CHƯƠNG 3. KHÁI QUÁT ĐIỀU KIỆN TỰ NHIÊN CỦA VÙNG CÓ.....	22
I.	Khái quát về điều kiện tự nhiên của huyện Kon Plông, tỉnh Kon Tum	22
1.	Vị trí địa lý.....	22
2.	Địa hình.....	22
3.	Khí hậu.....	23
4.	Tài nguyên rừng.....	23
II.	Khái quát về điều kiện tự nhiên của huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum.....	24
1.	Vị trí địa lý.....	24
2.	Địa hình.....	24
3.	Khí hậu.....	25
4.	Tài nguyên nước	26
5.	Tài nguyên đất	26
	PHẦN III. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	28
	CHƯƠNG 4. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
I.	Vật liệu nghiên cứu	28
1.	Vật liệu điều tra, khảo sát	28
2.	Vật liệu nghiên cứu nhân giống.....	28

2.1.	Nhân giống bằng nuôi cấy mô.....	28
2.2.	Vật liệu nhân giống bằng phương pháp giâm hom	28
2.3.	Môi trường và điều kiện nuôi cấy	29
3.	Vật liệu nghiên cứu điều kiện trồng, chăm sóc cây lan kim tuyến.....	29
4.	Vật liệu phân tích hoạt chất	30
II.	Nội dung và phương pháp nghiên cứu	30
1.	Nội dung và phương pháp điều tra khảo sát cây lan kim tuyến trong tự nhiên	30
1.1.	Nghiên cứu đặc điểm hình thái chung của cây lan kim tuyến	30
1.2.	Khảo sát sự phân bố và đặc điểm phân bố của lan kim tuyến	31
1.3.	Phương pháp điều tra, khảo sát cây lan kim tuyến trong tự nhiên	31
2.	Nội dung và phương pháp nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến.....	31
2.1.	Nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến bằng phương pháp	31
2.1.1.	Thí nghiệm 1: Khảo sát thời gian khử trùng mẫu Lan kim tuyến	31
2.1.2.	Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi.....	32
2.1.3.	Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA.	33
2.1.4.	Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của NAA.....	34
2.1.5.	Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của giá thể trồng	34
2.2.	Nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến bằng phương pháp giâm hom ...	35
	Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng tạo chồi.	35
2.3.	Nghiên cứu điều kiện trồng, chăm sóc và thu hoạch cây lan kim tuyến.	36
2.3.1	Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng mật độ trồng.....	36
2.3.2	Thí nghiệm 8: Nghiên cứu ảnh hưởng phân bón.....	37
2.3.3	Thí nghiệm 9: Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại giá thể.....	38
2.3.4	Thí nghiệm 10: Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ che sáng	39
2.4.	Điều tra đánh giá và cách phòng trừ sâu bệnh trên cây lan kim tuyến ...	40
2.5.	Phân tích và so sánh thành phần hoạt chất hóa học	40
2.5.1	Nghiên cứu định tính các nhóm hoạt chất bằng phản ứng ống nghiệm ..	40
2.5.2	Nghiên cứu định tính các nhóm hoạt chất bằng phương pháp	40
2.5.3	Hàm lượng Flavonoid toàn phần trong dược liệu	41
III.	Các chỉ tiêu theo dõi và cách xử lý số liệu.....	42
1.	Các chỉ tiêu theo dõi	42

2. Xử lý số liệu.....	43
PHẦN IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU - TRIỂN KHAI	44
CHƯƠNG 5. KẾT QUẢ ĐIỀU TRA KHẢO SÁT.....	44
I. Kết quả điều tra khảo sát đặc điểm hình thái cây lan kim tuyến.....	44
1. Thân rễ (thân ngầm).....	44
2. Thân khí sinh	44
3. Rễ.....	44
4. Lá cây.....	45
5. Hoa.....	45
II. Kết quả điều tra khảo sát về sự phân bố của cây lan kim tuyến.....	48
III. Đặc điểm phân bố của cây lan kim tuyến.....	51
1. Phân bố theo kiểu rừng	51
2. Phân bố Lan Kim Tuyến theo địa lý, địa hình và đai cao.....	52
CHƯƠNG 6. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG, TRỒNG	53
I. Kết quả nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến.....	53
1. Kết quả khảo sát thời gian khử trùng mẫu Lan kim tuyến	53
2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi	55
3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân nhanh	57
4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của NAA lên quá trình tạo.	59
5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của giá thể trồng	61
Bảng 4.6. Ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỷ lệ sống.....	61
6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng.	62
II. Kết quả nghiên cứu các điều kiện trồng, chăm sóc cây lan kim tuyến	65
1. Kết quả về ảnh hưởng khoảng cách trồng đến sự sinh trưởng	65
2. Kết quả về ảnh hưởng phân bón đến sự sinh trưởng	68
3. Kết quả về ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự sinh trưởng.....	71
4. Kết quả về ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sự sinh trưởng.....	74
III. Kết quả điều tra đánh và các cách phòng trừ sâu bệnh hại	77
1. Một số đối tượng gây hại trên cây lan kim tuyến.....	77
1.1. Sâu khoang	77
1.2. Rầy nâu.....	77

1.3. Nhện đỏ	78
1.4. Chuột	79
1.5. Ốc sên	79
2. Bệnh hại trên cây lan kim tuyến	80
CHƯƠNG 7. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT	82
1. Kết quả định tính các nhóm chất bằng phương pháp phản ứng	82
2. Kết quả định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng sắc ký lớp mỏng	82
3. Một số tác dụng dược học của nhóm flavonoid đã được công bố	85
4. Tác dụng của nhóm acid amin	85
CHƯƠNG 8. ĐÁNH GIÁ VỀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA ĐỀ TÀI	86
1. Đánh giá chung về kết quả triển khai thực hiện đề tài	86
2. Phương án duy trì và nhân rộng kết quả của đề tài	86
2.1. Khả năng duy trì và nhân rộng	86
2.2. Phương án duy trì và nhân rộng	87
3. Đánh giá về tác động của đề tài	88
3.1. Về công tác đào tạo, tập huấn	88
3.2. Về hiệu quả kinh tế- xã hội	88
4. Đề xuất giải pháp bảo tồn cho cây lan kim tuyến tại tỉnh Kon Tum	90
4.1. Công tác tuyên truyền nâng cao nhận thức cộng đồng	91
4.2. Về cơ chế, chính sách	92
4.3. Về khoa học và công nghệ	93
4.4. Về tổ chức	93
4.5. Về công tác phối hợp	94
I. KẾT LUẬN	95
II. KIẾN NGHỊ	96
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC. MỘT SỐ HÌNH ẢNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI	

DANH MỤC BẢNG

	Trang
☞ Bảng 3.1. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát thời gian khử trùng mẫu Lan kim tuyến	32
☞ Bảng 3.2. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi từ đốt thân Lan kim tuyến	32
☞ Bảng 3.3. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân nhanh chồi Lan kim tuyến	33
☞ Bảng 3.4. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của NAA lên quá trình tạo cây Lan kim tuyến hoàn chỉnh	34
☞ Bảng 3.5. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của giá thể trồng đến tỷ lệ sống của cây Lan kim tuyến <i>ex vitro</i>	35
☞ Bảng 3.6. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng tạo chồi của đoạn thân giâm Lan kim tuyến <i>ex vitro</i>	36
☞ Bảng 3.7. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng mật độ trồng đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến	37
☞ Bảng 3.8. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng phân bón đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến	38
☞ Bảng 3.9. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các loại giá	39
☞ Bảng 3.10. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây kim tuyến trồng ngoài thực địa	40
☞ Bảng 3.11. Tiến hành thí nghiệm xác định hàm lượng Flavonoid toàn phần trong dược liệu (tính theo Quercetin) bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử	42
☞ Bảng 4.1. Tình hình phân bố Lan Kim Tuyến trong tự nhiên	50
☞ Bảng 4.2. Kết quả khảo sát thời gian khử trùng mẫu lan kim tuyến	53
☞ Bảng 4.3. Ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi Lan kim tuyến sau 45 ngày nuôi cấy	55

☞ Bảng 4.4. Ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân nhanh chồi Lan kim tuyến	57
☞ Bảng 4.5. Kết quả ảnh hưởng của NAA lên quá trình tạo cây Lan kim tuyến hoàn chỉnh sau 60 ngày nuôi cấy	59
☞ Bảng 4.6. Ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỷ lệ sống cây Lan kim tuyến ex vitro sau 30 ngày ra cây	61
☞ Bảng 4.7. Ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng tạo chồi của đoạn thân giâm Lan kim tuyến ex vitro qua các giai đoạn theo dõi	62
☞ Bảng 4.8. Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến sinh trưởng cây Lan kim tuyến sau 180 ngày theo dõi	65
☞ Bảng 4.9. Ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng cây Lan kim tuyến sau 180 ngày theo dõi	68
☞ Bảng 4.10. Ảnh hưởng của các loại giá thể trồng đến sinh trưởng cây Lan kim tuyến	71
☞ Bảng 4.17. Ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sinh trưởng của cây Lan kim tuyến sau 180 ngày theo dõi	74
☞ Bảng 4.12. Định tính bằng phản ứng hóa học mẫu lan kim tuyến	82
☞ Bảng 4.13. Hiệu quả kinh tế mô hình trồng cây lan kim tuyến	89

DANH MỤC HÌNH

	Trang
☞ Hình 1.1. Lan kim tuyến giống <i>Anoectochilus roxburghii</i> và giải phẫu các bộ phận của hoa giống <i>Anoectochilus roxburghii</i>	6
☞ Hình 4.1. Hình mặt trên (1a) và mặt dưới (1b) của giống lan kim tuyến phân bố tại Kon Tum ký hiệu giống KT1	47
☞ Hình 4.2. Hình mặt trên (2a) và mặt dưới (2b) của giống lan kim tuyến phân bố tại Kon Tum ký hiệu giống KT2	47
☞ Hình 4.3. Hình mặt trên (3a) và mặt dưới (3b) của giống lan kim tuyến phân bố tại Kon Tum ký hiệu giống KT3	47
☞ Hình 4.4. Sơ đồ các tuyến điều tra trên địa bàn tỉnh Kon Tum - 1. Xã Đăk Tăng, huyện Kon Plông; 2. Xã Măng Bút, huyện Kon Plông; 3. Xã Hiếu, huyện Kon Plông; 4. Xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông; 5. Xã Ngọc Yêu, huyện Tu Mơ Rông	48
☞ Hình 4.5. Mẫu cây Lan kim tuyến sau 15 ngày	54
☞ Hình 4.6. Chồi phát sinh trong các môi trường sau 45 ngày nuôi cấy	56
☞ Hình 4.7. Chồi phát sinh trong các môi trường sau 60 ngày nuôi cấy	58
☞ Hình 4.8. Cây hình thành sau 60 ngày nuôi cấy ở các môi trường khác nhau	60
☞ Hình 4.9. Lan kim tuyến cấy mô được ra cây trên các loại giá thể khác nhau	61
☞ Hình 4.10. Hình ảnh chồi phát sinh sau 30 ngày giâm	64
☞ Hình 4.11. Chồi phát sinh sau 60 ngày giâm ở các nghiệm thức	64
☞ Hình 4.12. Chồi phát sinh sau 75 ngày giâm ở các nghiệm thức	64
☞ Hình 4.13. Chồi phát sinh sau 90 ngày giâm ở các nghiệm thức	64
☞ Hình 4.14. Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sự tăng trưởng cây Lan kim tuyến	67
☞ Hình 4.15. Ảnh hưởng của phân bón đến sự sinh trưởng của cây Lan Kim Tuyến	70
☞ Hình 4.16. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự sinh trưởng của Lan kim tuyến	73
☞ Hình 4.17. Ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sinh trưởng của cây Lan kim tuyến	76
☞ Hình 4.18. Nhện đỏ đang đẻ trứng	78
☞ Hình 4.19. Lan Kim tuyến bị ốc sên gây hại	79
☞ Hình 4.20. Lan Kim Tuyến bị nấm bệnh, vàng lá	80
☞ Hình 4.21. Lan Kim Tuyến bị chết rụt, thối thân	80
☞ Hình 4.22. Sắc ký đồ định tính thành phần flavonoid	84
☞ Hình 4.23. Sắc ký đồ định tính thành phần terpenoid	84
☞ Hình 4.24. Sắc ký đồ định tính thành phần acid amin	84

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

BA	: 6- benzyladenine
BC	: Báo cáo
CĐ	: Chuyên đề
CGCN	: Chuyển giao công nghệ
Cv	: Coefficient of variation (Hệ số biến động)
Cs	: Cộng sự
DNA	: Deoxyribonucleic acid
ĐC	: Đối chứng
IBA	: Indole -3-butyric acid.
MS	: Môi trường cơ bản Murashige & Skoog (1962)
NT	: Nghiệm thức
NAA	: 1-Naphthalene acetic acid.
Prob	: Probability (Giá trị xác suất)
QT	: Quy trình
RNA	: Ribonucleic acid
TDZ	: Thidiazuron (1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea)
TB	: Trung bình
2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
EN	: Endangered

PHẦN I. MỞ ĐẦU

I. Mở đầu

Kon Tum là tỉnh miền núi, vùng cao biên giới với tổng diện tích tự nhiên 9.676,5 km². Trong đó diện tích đất lâm nghiệp chiếm 68,14% diện tích tự nhiên và nơi có điều kiện tự nhiên thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của hệ động, thực vật rừng; đây là vùng có tiềm năng lớn về đa dạng sinh học. Trong hệ thực vật ở đây có nhiều loài thực vật đặc hữu như Pơ mu, Lát, gụ, Dổi, Thông hai - ba lá, Dẻ, Re, Đỗ quyên, Chua, Xoan đào... Đặc biệt là nơi tập trung nhiều loài cây dược liệu quý như sâm Ngọc Linh, Đảng sâm, Hà thủ ô, Lan Kim tuyến....

Trên thế giới Lan Kim tuyến thuộc phân họ Phong lan Orchidaceae và đã thống kê có 51 loài. Trong đó tại khu vực châu Á và châu Úc đã phát hiện được 25 loài. Ở Việt Lan Kim tuyến (*Anoectochilus* sp.) là một loài lan quý hiếm có trong sách đỏ Việt Nam thuộc nhóm thực vật cấm khai thác, gồm khoảng 40-50 giống và có vùng phân bố rộng ở hầu hết các tỉnh trong cả nước. Tại Kon Tum lan Kim tuyến có sự phân bố ở một số huyện như: Tu Mơ Rông, Kon Plông, Đăk Glei... Đây là nơi có điều kiện về khí hậu và thổ nhưỡng phù hợp với sự sinh trưởng và phát triển của loài cây này.

Trong y học, Lan kim tuyến được sử dụng làm thuốc trị lao phổi, ho do phế nhiệt, phong thấp, đau nhức khớp xương, chấn thương, viêm dạ dày mãn tính, viêm khí quản, viêm gan mãn tính, suy nhược thần kinh, giúp tăng cường sức khỏe, làm khí huyết lưu thông, có tính kháng khuẩn. Trong y học hiện đại đã chứng minh nhiều tác dụng quý của lan kim tuyến như tác dụng giảm đường huyết, điều trị ung thư. Do có giá trị kinh tế nên hiện nay trên địa bàn các huyện Tu Mơ Rông, Kon Plông... người dân đang tập trung khai thác cây Kim tuyến trong rừng một cách tận thu, làm cạn kiệt và giảm khả năng tái sinh nguồn cây trong tự nhiên. Nếu như trước đây, trữ lượng cây Kim tuyến có khá nhiều trong tự nhiên và dễ tìm thấy thì hiện nay đã khan hiếm dần. Trong tương lai không xa, nguồn cây dược liệu mang tính đặc hữu của vùng sẽ dần khan hiếm.

Tại tỉnh Kon Tum chưa có công trình nào nghiên cứu nào về nhân giống và phát triển cây Kim tuyến. Trong khi đó, trong tự nhiên khả năng tái sinh của cây Kim tuyến

từ hạt đạt tỷ lệ rất thấp do phải có sự cộng sinh với nấm thì hạt mới nảy mầm được. Vì vậy, muốn thu lợi và phát triển nguồn cây dược liệu có giá trị kinh tế này thì không thể khai thác mãi trong tự nhiên được mà phải tổ chức nhân giống và trồng sản xuất chúng như cây hàng hóa. Xuất phát từ những lý do trên, đồng thời nhằm đánh giá khả năng nhân giống, đưa loại cây có giá trị kinh tế vào sản xuất, tạo vùng nguyên liệu nhằm phát triển thành cây hàng hóa và bảo tồn nguồn gen cây thuốc của tỉnh Kon Tum. Vì vậy chúng tôi đã đề xuất và thực hiện đề tài **"Nghiên cứu nhân giống và trồng thử nghiệm cây kim tuyến *Anoectochilus sp.*"**. Đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn; góp phần chuyển đổi cơ cấu cây trồng, phát triển nguồn cây dược liệu; đa dạng hóa các sản phẩm nông nghiệp; thúc đẩy phát triển kinh tế- xã hội tại các địa bàn còn khó khăn.

II. Thông tin chung về đề tài

1. Tên đề tài: Nghiên cứu nhân giống và trồng thử nghiệm cây kim tuyến (*Anoectochilus sp.*)

2. Mã số:

3. Thời gian thực hiện: từ tháng 5 năm 2014 đến tháng 4 năm 2017

4. Cấp quản lý: cấp tỉnh

5. Kinh phí thực hiện: 584.820.000 đồng

III. Mục tiêu của đề tài

1. Mục tiêu tổng quát: phát triển cây dược liệu có giá trị kinh tế thành cây hàng hóa; góp phần bảo tồn đa dạng hóa cây trồng, đa dạng sản phẩm nông nghiệp.

2. Mục tiêu cụ thể

- Xác định được phương pháp thích hợp nhân giống cây lan kim tuyến
- Đánh giá các điều kiện sinh trưởng, phát triển của cây lan kim tuyến
- Xây dựng quy trình kỹ thuật nhân giống; quy trình trồng, chăm sóc, thu hoạch phù hợp với điều kiện sinh thái tại địa phương.

IV. Nội dung nghiên cứu – triển khai của đề tài

1. Nội dung 1. Nghiên cứu đánh giá đặc tính sinh thái và tính thích nghi, sự phân bố của cây kim tuyến trên địa bàn tỉnh Kon Tum

2. Nội dung 2. Nghiên cứu nhân giống cây kim tuyến bằng 2 phương pháp (nuôi cấy mô tế bào thực vật và giâm hom)

3. Nội dung 3. Nghiên cứu các điều kiện trồng, chăm sóc, thu hoạch cây kim tuyến trên địa bàn huyện Kon Plông với diện tích dự kiến 100m²

4. Nội dung 4. Điều tra đánh giá và cách phòng trừ sâu bệnh cây kim tuyến trồng ngoài thực địa

5. Nội dung 5. Phân tích và so sánh thành phần hoạt chất hóa học có trong cây kim tuyến ngoài tự nhiên và cây trồng ngoài thực địa

6. Nội dung 6. Xây dựng tài liệu hướng dẫn kỹ thuật nhân giống; tài liệu hướng dẫn kỹ thuật trồng và chăm sóc cây kim tuyến

V. Sản phẩm khoa học và công nghệ của đề tài

1. Sản phẩm dạng I

Stt	Tên sản phẩm cụ thể và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu của sản phẩm	Đơn vị đo	Mức chất lượng			Dự kiến số lượng, quy mô sản phẩm tạo ra
			Cần đạt	Mẫu tương tự (theo các tiêu chuẩn mới nhất)		
				Trong nước	Thế giới	
1	Cây kim tuyến giống	Cây	Chất lượng theo yêu cầu			4.000
2	Bình giống cây mô	Bình	Đảm bảo tiêu chuẩn			300
3	Diện tích trồng thử nghiệm	m ²	Đảm bảo mô hình			100

2. Sản phẩm dạng II

TT	Nội dung thực hiện, sản phẩm KH&CN tạo ra	Đơn vị tính	Quy mô, số lượng theo thuyết minh và hợp đồng	Quy mô, số lượng đã thực hiện	Tỷ lệ % khối lượng đạt được so với kế hoạch
1	Xây dựng chuyên đề KH&CN:	CĐ	02	02	100
-	Đặc tính sinh thái, sự phân bố của lan kim tuyến	CĐ	01	01	100
-	Giải pháp bảo tồn và phát triển cây lan kim tuyến	CĐ	01	01	100
2	Phân tích đánh giá hoạt chất mẫu lan kim tuyến tự nhiên và mẫu trồng ngoài thực địa	KQ	02	02	100
3	Xây dựng chuyên đề phân tích đánh giá hoạt chất của lan kim tuyến	CĐ	01	01	100
4	Xây dựng tài liệu hướng dẫn kỹ thuật KHCN: - Tài liệu hướng dẫn kỹ thuật nhân giống cây lan kim tuyến - Tài liệu hướng dẫn kỹ thuật trồng và chăm sóc cây lan kim tuyến	CĐ	01	01	100
5	Báo cáo tổng thuật tài liệu: - Báo cáo phân tích số liệu tại phòng TN, vườn ươm. - Báo cáo phân tích số liệu về TN trồng ngoài thực địa	BC	01	01	100

6	Báo cáo chuyên đề: - Nghiên cứu phương pháp nhân giống lan kim tuyến. - Nghiên cứu điều kiện trồng và chăm sóc lan kim tuyến	CĐ	02	02	100
7	Báo cáo tổng kết đề tài	BC	1	1	100

PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ CÂY LAN KIM TUYẾN

I. Giới thiệu khái quát về cây lan kim tuyến

1. Phân loại thực vật học

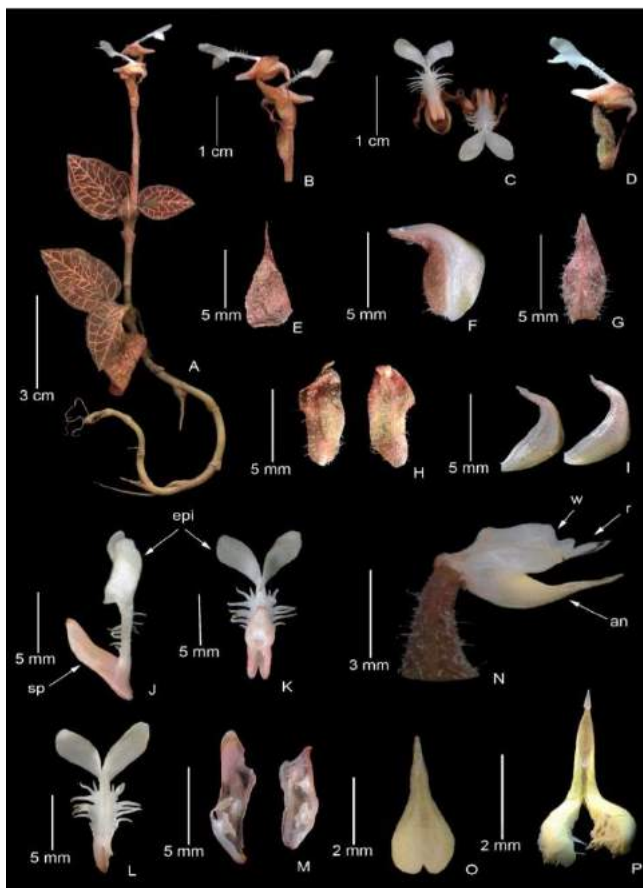
Lan kim tuyến - *Anoetochilus* sp. có phân loại như sau:

- Giới: *Plantae*
- Ngành: *Angiospermae*
- Bộ: *Asparagales*
- Họ: *Orchidaceae*
- Phân họ: *Orchidoideae*
- Tông: *Cranichideae*
- Phân tông: *Goodyerineae*
- Chi: *Anoetochilus*

Lan kim tuyến còn có nhiều tên gọi khác như: Kim tuyến, Kim tuyến tở, Giải thủy tở, lan giám, Cỏ nhung, Kim cương.

Chi Lan kim tuyến ở Việt Nam hiện thống kê được 12 loài, được biết đến nhiều không những bởi giá trị làm cảnh, mà bởi giá trị làm thuốc của nó.[1]

Do bị thu hái nhiều để bán làm thuốc từ rất lâu, nên loài Lan kim tuyến đang bị đe dọa nghiêm trọng, rất có thể sẽ bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên nếu chúng ta không có biện pháp bảo tồn hữu hiệu. Hiện nay, Lan kim tuyến được xếp trong nhóm IA của Nghị định 32/2006/NĐ-CP, nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại; và nhóm thực vật đang nguy cấp EN A1a,c,d trong sách đỏ Việt Nam năm 2007, phần thực vật [2,3].



Hình 1. Lan kim tuyến giống *Anoetochilus roxburghii* và giải phẫu các bộ phận của hoa giống *Anoetochilus roxburghii* (nguồn *The MIOS journal* 14(6):8-13.2013)

2. Đặc điểm phân bố của cây lan kim tuyến

Lan kim tuyến là một loài lan đất có mặt ở Trung Quốc, Lào và Việt Nam... chúng sinh sống trên các triền núi đá vôi, dọc theo khe suối, dưới các tán cây to trong rừng ẩm ở độ cao 500 - 1.600m. Cây ưa độ ẩm cao và ưa bóng râm, kỵ ánh sáng, yêu cầu đất nhiều mùn, tơi xốp và thoáng khí.[9]

Ở Việt Nam Lan kim tuyến là loài có phân bố rộng, chúng phân bố ở hầu hết các tỉnh của Việt Nam như Lào Cai, Tam Đảo, Quảng Trị, Kon Tum, Gia Lai, Sơn La, Yên Bái,... Trên địa bàn tỉnh Kon Tum, qua kết quả điều tra khảo sát đã phát hiện Lan kim tuyến có mặt tại huyện Kon Plông (xã Đăk Tăng, Măng Bút, xã Hiếu) và huyện Tu Mơ Rông (xã Măng Ri, Ngọc Yêu). Lan kim tuyến thường phân bố ở kiểu rừng kín lá rộng thường xanh mưa mùa nhiệt đới và kiểu rừng kín lá rộng thường xanh á nhiệt đới núi thấp [3][4][5].

3. Giá trị dược liệu của cây lan kim tuyến

Trong y học, Lan kim tuyến được sử dụng làm thuốc trị lao phổi, ho do phế nhiệt, phong thấp, đau nhức khớp xương, chấn thương, viêm dạ dày mãn tính, viêm khí quản, viêm gan mãn tính, suy nhược thần kinh; giúp tăng cường sức khỏe, làm khí huyết lưu thông, có tính kháng khuẩn. Trong y học hiện đại đã chứng minh nhiều tác dụng quý của lan kim tuyến như tác dụng giảm đường huyết, điều trị ung thư.

Trên thế giới có nhiều nghiên cứu về các loài lan kim tuyến và thấy có nhiều tác dụng quý như:

Theo nhóm tác giả Trung Quốc gồm Huang L. F. và cộng sự năm 2007 cho thấy dịch chiết các chất có tính dược của lan kim tuyến *Anoetochili herba* có tác dụng bảo vệ gan trên chuột gây tổn thương bởi CCl₄[20]. Li-Chan Yang, Chang-Chi H.sieh, Ting-Jang Lu, Wen-Chuan Lin. Tại Viện Khoa học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Quốc gia Đài Loan, nhóm tác giả đã nghiên cứu về nhóm chất (*Arabinogalactan cấu trúc đặc trưng từ Anoetochilus formosanus có tính chất như một miễn dịch chống lại ung thư ruột kết CT26 ở chuột BALB / c*)[29].

Năm 2013, nhóm nghiên cứu của Cui S.C và cs đã tiến hành đánh giá tác dụng hạ đường huyết và chống oxy hóa của dịch chiết nước từ loài *Anoetochilus roxburghii* trên chuột bị tiểu đường do tác nhân alloxan gây ra. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi

cho chuột uống cao chiết nước từ loài *A. roxburghii* với mức liều 0,5 hoặc 2,0 g/kg trọng lượng trong 14 ngày làm giảm đáng kể ($p<0,05$) nồng độ đường trong máu so với nhóm đối chứng. Đồng thời, khi cho chuột uống cao chiết nước từ loài *A. roxburghii* làm giảm hàm lượng cholesterol tổng số và triglycerid trong huyết thanh cũng như gia tăng nồng độ cholesterol lipoprotein mật độ cao ở chuột bị tiểu đường ($p<0,05$). Ngoài ra, cao chiết nước từ *A. roxburghii* làm tăng đáng kể ($p<0,05$) hoạt tính của các enzym chống oxy hoá và nồng độ vitamin E trong gan và thận của chuột bị tiểu đường. Như vậy, tất cả các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, cao chiết nước từ loài *A. roxburghii* có tác dụng hạ đường huyết và chống oxy hóa trên chuột bị tiểu đường do tác nhân alloxan gây ra [16].

- Theo một vài tác giả nghiên cứu về tính dược liệu cây kim tuyến dùng trong các vị thuốc bắc thì toàn thân cây kim tuyến đều có thể chữa bệnh, chủ trị bệnh phổi, di tinh, xuất tinh sớm, yếu gan, yếu tỳ và các vết thương do rắn cắn; còn có tác dụng bổ máu, giải nhiệt (Tả Mộc Thuần).

- Kim tuyến có vị ngọt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, thanh huyết, bổ phổi, giải trừ u uất, thông trung khí, bồi dưỡng sức khỏe, chủ trị lực phủ ngũ tạng đầy lùì tâm hỏa, nóng gan, bệnh phổi, thổ huyết, ho hen, đau ngực, đau lá lách, đau cuống họng, cao huyết áp, trẻ con chậm lớn, suy thận (Cam Vĩ Tùng).

- Hạ sốt, giải nhiệt, giải trừ u uất phiền muộn, trị ho khan, đau ngực, đau họng, sắc uống với nước đường (Lâm Minh Quyền).

- Người dân tộc miền núi (Đài Loan) thường dùng kim tuyến liên sắc uống để trị đau ruột, đau bụng, sốt cao, đắp bên ngoài để trị các chỗ sưng vết thương và chỗ bị rắn cắn (Sơn Điền Kim Trị).

- Thanh huyết, nhuận phổi, trị bệnh phổi: sắc uống với nước đường (Khuru Tái Phúc).

- Kim tuyến liên 20 phân, sắc uống với nước đường, có tác dụng thanh huyết, trị bệnh cao huyết áp (Diệp Hải Ba).

Bộ phận sử dụng làm thuốc là toàn bộ cây tươi hay cây khô sắc uống. Liều lượng trung bình cho loại thuốc sắc trong 1 ngày là 20g tươi hoặc 5g khô. Sử dụng đắp ngoài toàn bộ cây tươi rửa sạch, giã nát đắp vào nơi sưng đau.

Chữa ho khạc ra máu: kim tuyến 30g, mạch môn 25g, huyền sâm 20g, ngư tử 15g, quyết minh tử 15g, hoài sơn 20g. Sắc uống ngày 1 thang, chia 3 lần. Cần uống liền 5 - 7 thang.

Chữa thần kinh suy nhược, mất ngủ: kim tuyến 25g, hoa thiên lý 10g, hoa nhài 12g, tâm sen 8g, mạch môn 15g, huyền sâm 10g, ngư tử 8g, quyết minh tử 20g, hoài sơn 12g, cam thảo đất 8g. Sắc uống ngày 1 thang, chia 3 lần trong ngày. Cần uống 3 - 5 thang.

Chữa kém ăn: kim tuyến 25g, hoài sơn 10g, liên nhục 8g, sơn tra 6g, trần bì 5g, huyền sâm 20g, quyết minh tử 5g. Sắc lấy nước thuốc chia 3 lần uống trong ngày (ngày 1 thang), cần uống 5 - 7 thang liền. [35]

II. Những nghiên cứu trên thế giới và việt nam về cây lan kim tuyến

1. Những nghiên cứu trên thế giới về cây lan kim tuyến

Năm 1982, Chow và cộng sự đã nghiên cứu thành công nhân giống loài lan Kim Tuyến *Anoectochilus formosannus* từ hạt với công thức môi trường vào mẫu là: 1/2MS + 0,2% than hoạt tính + 8% dịch chiết chuối. Môi trường được sử dụng để nhân nhanh chồi là: 1/2MS + 0,2% than hoạt tính + 8% dịch chiết chuối + 2mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA [30].

Năm 2002, Tsay và cộng sự đã nghiên cứu nhân nhanh lan kim tuyến bằng cách cắt các mắt đốt thân lấy từ cây *Anoectochilus formosanus* Hayata 2 năm tuổi cấy vào môi trường MS lỏng dung tích 500 ml + 2mg/l BAP + 0,5mg/l NAA +2% than hoạt tính [30].

Năm 2004, Nguyễn Văn Kiệt tại đại học Chungbuk, Hàn Quốc đã tiến hành nhân giống *in vitro* loài lan Kim Tuyến *Anoectochilus formosanus* với vật liệu ban đầu là từ chồi đỉnh. Môi trường tạo vật liệu khởi đầu là H3 (Hyponex: 6,5N-4,5P-19K 1g/l + 20N-20P-20K 1g/l) + 2g/l peptone). Môi trường nhân nhanh là: H3 + 1mg/l BAP (hoặc 1-2mg/l TDZ) + 1% than hoạt tính [26].

Năm 2008, Du Hiều Minh; Irino; Morinaga; Shoyama đã vi nhân giống loài *Anoectochilus formosanus* Hayata trong ống nghiệm và nghiên cứu hóa dược học. Trong quá trình nghiên cứu vi nhân giống loài *A. formosanus* bằng kỹ thuật nuôi cấy mô để sản xuất cây con. Dịch chiết *A. formosanus* cho thấy hoạt tính quan trọng trong

cao chiết cây kim tuyến (*Anoectochilus formosanus*) có tác dụng làm giảm nồng độ các enzym: LDH, GOT, GPT. Do đó, có thể thấy rằng cao chiết loài kim tuyến có tác dụng bảo vệ gan trước tác nhân gây độc cho gan là CCl_4 . Ngoài ra, nghiên cứu này cũng đã chứng minh tác dụng chống béo phì của cao chiết loài kim tuyến với tác nhân gây béo phì là aurothioglucose. Bằng phương pháp HPLC đã chứng minh hợp chất kinsenosid (1) có hàm lượng cao trong 02 loài *A. formosanus* và *A. koshunensis*. Nghiên cứu này cũng đã xây dựng được phương pháp đơn giản, hiệu suất cao để tinh chế hợp chất kinsenosid (1) phục vụ các thử nghiệm dược lý. Từ 1,0 g dược liệu khô đã tinh chế được 180 mg kinsenosid (1). Thử nghiệm tác dụng chống béo phì trên chuột cho thấy, chất số 1 làm giảm đáng kể trọng lượng cơ thể, đồng thời làm giảm hàm lượng triglycerid trong gan khi so sánh với nhóm đối chứng[30].

Năm 2013, Cui SC và cs đã nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết và chống oxy hóa của cao chiết nước từ loài lan kim tuyến(*Anoectochilus roxburghii*). Nghiên cứu này đã tiến hành đánh giá tác dụng hạ đường huyết và chống oxy hóa của dịch chiết nước từ loài lan kim tuyến trên chuột bị tiểu đường do tác nhân alloxan gây ra. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi cho chuột uống cao chiết nước từ loài lan kim tuyến với mức liều 0,5 hoặc 2,0 g/kg trong 14 ngày làm giảm đáng kể ($p < 0,05$) nồng độ đường trong máu so với nhóm chứng. Tác dụng này không phụ thuộc vào liều sử dụng. Đồng thời, khi cho chuột uống cao chiết nước từ loài lan kim tuyến làm giảm hàm lượng cholesterol tổng số và triglycerid trong huyết thanh cũng như gia tăng nồng độ cholesterol lipoprotein mật độ cao ở chuột bị tiểu đường ($p < 0,05$) Ngoài ra, cao chiết nước từ lan kim tuyến làm tăng đáng kể ($p < 0,05$) hoạt tính của các enzym chống oxy hoá và nồng độ vitamin E trong gan và thận của chuột bị tiểu đường. Tất cả các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, cao chiết nước từ loài lan kim tuyến có tác dụng hạ đường huyết và chống oxy hóa trên chuột bị tiểu đường do tác nhân alloxan gây ra. [16]

Năm 2014, Tian H.Z. và cs đã nghiên cứu về *Anoectochilus longilobus* (phân họ *orchidoideae*: họ *orchidaceae*), một loài mới từ Vân Nam, Trung Quốc. Chi lan kim tuyến *Anoectochilus* Blume thuộc Phân tông Goodyerinae. Tên *Anoectochilus* có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp: ‘anoiktos’ (mở) và ‘cheilos’ (môi), hoa môi đẹp khi nở.

Chi này có khoảng 30 loài, phân bố ở Ấn Độ và phía đông dãy Himalaya, trải dài qua miền Nam và Đông Nam Á đến Australia và các đảo phía đông nam Thái Bình Dương. Ở Trung Quốc, chi lan kim tuyến có 15 loài, trong đó có 08 loài đã được tìm thấy ở tỉnh Vân Nam. Một loài thuộc chi lan kim tuyến đã được thu thập ở Vân Nam vào năm 2006 và 2013. Trên cơ sở phân tích đặc điểm và so sánh với các loài có hình thái gần giống, xác định đây là một loài mới. Loài mới này gần giống với loài *A. zhejiangensis* Wei & Chang, một loài đặc hữu ở Trung Quốc, phân bố tại trung tâm và miền Bắc tỉnh Phúc Kiến, phía bắc tỉnh Quảng Tây, phía tây nam tỉnh Chiết Giang và phía bắc tỉnh Quảng Đông. Loài này cũng gần giống với loài *A. chapaensis* Gagnepain, một loài đã được tìm thấy tại Trung Quốc và Việt Nam [24].

Năm 2015, Cai J và cs đã nghiên cứu một dẫn chất flavol triglycosid mới phân lập từ loài *Anoectochilus elwesii* kích thích hoạt động hấp thu glucose trên các tế bào HEPG2 kháng insulin. Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng phân tích dữ liệu phổ kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo. Tất cả các hợp chất đều lần đầu tiên được phân lập từ loài *Anoectochilus elwesii* và hai trong số đó (4 và 5) là những flavonol triglycosid lần đầu tiên được phân lập từ chi *Anoectochilus*. Các hợp chất 1–7 được đánh giá trên các tế bào HepG2 kháng insulin để kích thích hoạt động hấp thu glucose. Trong đó, hợp chất mới (4) thể hiện tác dụng mạnh và phụ thuộc vào liều sử dụng [15].

Năm 2016, Zeng B và cs đã nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của các polysaccharid từ lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii*). Nghiên cứu này báo cáo các tính chất hóa lý (khối lượng phân tử và thành phần các monosaccharid), tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ tế bào gan của các polysaccharid phân lập được từ lan kim tuyến. Trên mô hình gây độc gan chuột bằng carbon tetrachlorid, khi cho chuột uống ARPP80 có tác dụng ($p < 0,01$) làm giảm đáng kể nồng độ của aspartat, alanin amino transferase và malonyldialdehyd. Đặc biệt, sử dụng ARPP80 ($p < 0,01$) làm tăng hoạt độ của superoxid dismutase, catalase, glutathion peroxidase, giảm glutathion trong huyết thanh hoặc dịch nghiền đồng thể của tế bào gan. Tác dụng bảo vệ gan được so sánh với đối chứng dương silymarin ở mức liều 200mg/kg. Kết quả

nghiên cứu đã chứng minh rằng các ARPP, đặc biệt là ARPP80 có tiềm năng để phát triển thành thực phẩm chức năng với tác dụng bảo vệ gan [30].

2. Những nghiên cứu trong nước về cây lan kim tuyến

Năm 2007, Khoa Nông lâm thuộc trường Đại học Đà Lạt đã nhân giống bằng biện pháp nuôi cấy mô gần 30 loài lan đặc hữu của Vườn quốc gia Cát Tiên trong đó có rất nhiều loài lan quý và trong đó có lan Kim tuyến.

Năm 2008, Các nhà khoa học thuộc Trung tâm Sinh học thực nghiệm (Viện Ứng dụng công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ) đã bước đầu nhân nhanh loài lan Kim tuyến bằng phương pháp giâm hom, trung bình 6 chồi/mẫu cấy, chồi khỏe và xanh, mập. Cây có tỷ lệ ra rễ đạt cao nhất 80%.

Năm 2010, Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Trung Thành, khoa Nông lâm trường Đại học Lâm nghiệp; Khoa sinh học trường Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội đã nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *In vitro* loài Lan kim tuyến (*Anoetochilus roxburghii* (Wall.) Lindl) [8].

Năm 2015, Nguyễn Khắc Hưng và cộng sự đã nghiên cứu Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* loài lan kim tuyến (*Anoetochilus setaceus* blume) thông qua cảm ứng tạo protocorm like bodies. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ cảm ứng tạo PLBs đạt 86,25% với nguồn mẫu là lát cắt ngang thể chồi. Khối lượng tươi trung bình của cụm PLBs sau 30 ngày nuôi cấy đạt 0,23 gam. Các cụm PLBs được nuôi cấy trên môi trường phát sinh và sinh trưởng chồi trong 30 ngày. Các chồi hình thành được tách riêng và chuyển sang giai đoạn tạo rễ. Quá trình tạo rễ bao gồm 2 giai đoạn, mỗi giai đoạn kéo dài trong 30 ngày. Sau 60 ngày, 100% chồi tạo rễ với trung bình $3,20 \pm 0,67$ rễ/chồi, chiều cao cây trung bình đạt $4,57 \pm 0,85$ cm với $4,21 \pm 0,42$ lá/cây. Hệ số nhân chồi của toàn bộ quy trình đạt $29,66 \pm 4,04$ chồi/cụm PLBs. [6]

CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN VỀ PHƯƠNG PHÁP NHÂN GIỐNG

I. Nhân giống cây lan Kim tuyến (*Anoectochilus* sp.)

1. Nhân giống bằng hạt

Nhân giống bằng hạt hay con gọi là nhân giống hữu tính, trong thiên nhiên sự thụ phấn của lan do côn trùng thực hiện, cấu trúc hoa hoàn toàn thích ứng với sự thụ phấn đó. Hoa lan là một loại hoa lưỡng tính, nhưng do cấu trúc của hoa và sự chín của các cơ quan sinh dục trong hoa không đều nên sự giao phấn nhờ sâu bọ có tính bắt buộc đối với tất cả các loài *setaceus*. Sự thụ phấn của hoa trong môi trường tự nhiên được côn trùng thực hiện trên cơ sở của mùi thơm, mật, màu sắc sặc sỡ và những cấu tạo của hoa là những nhân tố chính để thu hút các tác nhân thụ phấn từ khoảng cách xa.

Ở vườn nuôi trồng lan để đảm bảo kết quả của sự giao phấn cao và tạo ra các giống lai theo ý muốn, con người phải tiến hành thụ phấn nhân tạo. Sự thụ phấn có thể cùng cây, có thể khác cây.

Phương pháp này có nhiều ưu điểm: Dễ làm, giá thành hạ, thu được nhiều cây khỏe, không bị bệnh, ngoài ra do đặc điểm giao phấn chéo có thể thu được những dòng biến dị cho vật liệu chọn tạo giống. Tuy nhiên trong thực tế hạt Lan Kim tuyến rất hiếm, số lượng hạt rất nhiều nhưng tỉ lệ nảy mầm ít, hơn nữa thời gian khá lâu để cây ra hoa có chất lượng tốt.

2. Nhân giống bằng cây con

Khi rễ cây con tương đối nhiều, cây có từ 3-5 lá, cây cứng cáp có thể tách để trồng riêng. Đây là cách nhân giống đơn giản và dễ làm nhất.

2.1. Phương pháp giâm cây

Lấy một thân cây cắt ra làm nhiều đoạn, mỗi đoạn có nhiều mắt. Đặt các đoạn này vào một nơi ẩm; chỉ cần cát và rêu. Sau vài tuần sẽ xuất hiện những cây con có thể đem trồng vào các chậu mới.

Phương pháp này là phương pháp cổ điển, dễ làm, quen với tập quán, kinh nghiệm của người lao động, giá thành thấp. Tuy nhiên phương pháp này cũng có một số trở ngại như: chậm (tăng khoảng 2-4 cây/năm), chất lượng giống không cao, cây

hoa trồng lâu bị thoái hoá, bệnh virus có nhiều khả năng lan truyền và phát triển, từ đó làm giảm phẩm chất hoa.[13]

2.2. Nhân giống *in vitro*

Nhân giống *in vitro* là một trong 4 lĩnh vực ứng dụng chính của công nghệ tế bào thực vật và đã mang lại hiệu quả kinh tế lớn nhất.

Kỹ thuật nhân nhanh *in vitro* nhằm phục vụ các mục đích sau:

Duy trì và nhân nhanh các kiểu gen quý hiếm và làm vật liệu cho công tác tạo giống. Nhân nhanh và duy trì các cá thể đầu dòng tốt để cung cấp hạt giống các loại cây trồng khác nhau như cây lương thực có củ, các loại cây rau, cây hoa, cây cảnh, cây dược liệu thuộc nhóm thân thảo. Nhân nhanh và kinh tế các kiểu gen quý của giống cây lâm nghiệp và gốc ghép trong nghề trồng cây ăn quả, cây cảnh thuộc nhóm cây thân gỗ. Nhân nhanh ở điều kiện vô trùng và cách ly tái nhiễm kết hợp với làm sạch virus. Bảo quản các tập đoàn giống nhân vô tính và các loại cây giao phấn trong ngân hàng gen.[10]

2.1.1. Cơ sở khoa học của nhân giống *in vitro*

Tính toàn năng của tế bào (totipotency), từ năm 1902 nhà khoa học người Đức Haberlandt đã đề xướng ra phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật để chứng minh cho tính toàn năng của tế bào thực vật. Theo ông, mỗi tế bào được lấy từ bất kỳ cơ quan sinh vật đa bào đều có khả năng tiềm tàng phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh. Khả năng này do mỗi tế bào đều chứa bộ gen mang thông tin di truyền của toàn bộ cơ thể, khi được đặt vào môi trường thích hợp tế bào này sẽ có khả năng giống như một hợp tử ban đầu.[10]

Một đặc tính quan trọng khác, làm cơ sở cho nuôi cấy mô tế bào thực vật là khả năng biệt hóa và phản biệt hóa của tế bào. Khả năng biệt hóa là sự biến đổi của tế bào từ tế bào phôi thành toàn bộ các tế bào chức năng trong các cơ quan của cơ thể. Ngược lại, khi được đặt vào môi trường thích hợp, các tế bào chuyên hóa của cơ thể có thể trở lại trạng thái của tế bào đầu tiên sinh ra nó - tế bào phôi. Tuy nhiên, thực tế nghiên cứu đã chứng minh, khả năng phản biệt hóa của các tế bào là khác nhau, các tế bào chuyên hóa sâu như tế bào của hệ thống mạch dẫn thực vật, tế bào thần kinh động vật, khả năng biệt hóa rất khó xảy ra. Đối với thực vật, khả năng hình thành cơ quan hay cơ thể giảm dần theo chiều từ ngọn xuống gốc.

Trong tự nhiên, tất cả các loài sinh vật đều tồn tại trong mình tiềm năng sinh sản dù là vô tính hay hữu tính, như thế các loài mới có thể duy trì được kiểu gen của mình, chiến thắng trong quá trình tiến hóa. Nhưng ngay từ khi ra đời, công nghệ nuôi cấy mô đã trở thành công cụ đắc lực phục vụ mục đích nhân giống của con người.

2.1.2. Ý nghĩa của nhân giống *in vitro*

Nuôi cấy mô tế bào thực vật, thực chất là một phương pháp nhân giống vô tính. Đối với nhiều loại thực vật quý hiếm, có giá trị kinh tế và ý nghĩa sinh học cao, gặp khó khăn trong vấn đề nhân giống hữu tính thì nhân giống vô tính *in vitro* là công cụ vô cùng hữu ích. Nhưng trên thực tế có nhiều loại thực vật nhân giống hữu tính bằng hạt có hệ số nhân cao nhưng vẫn tiến hành nhân giống vô tính *in vitro* là do:

Các phương pháp nhân giống hữu tính bằng hạt mặc dù cho hệ số nhân giống cao, dễ bảo quản và vận chuyển nhưng với một số cây trồng, khi nhân giống bằng hạt sẽ cho các cây con không hoàn toàn giống bố mẹ cả về hình thái và thành phần hóa học. Sự không đồng nhất này gây ra khó khăn trong việc đưa cây vào sản xuất theo dây chuyền công nghiệp, vì các cây có chất lượng sản phẩm không đồng đều, làm giảm giá trị thương phẩm. Đặc biệt, đối với các cây thuốc thì việc không đồng nhất về chất lượng hay chính là hàm lượng các chất hoạt tính sẽ dẫn đến hậu quả là nguyên liệu không ổn định, không đáp ứng được nhu cầu sản xuất. Ví dụ: đối với các cây lấy tinh dầu, việc nhân giống bằng hạt dẫn tới sự phân ly không đều về hàm lượng các thành phần hoạt chất. [12]

Để khắc phục những nhược điểm trên, phương pháp nhân giống vô tính được áp dụng đã mang lại nhiều hiệu quả kinh tế và ý nghĩa sinh học lớn. Phương pháp nhân giống vô tính đã khắc phục được nhiều nhược điểm của nhân giống hữu tính, ưu điểm lớn nhất của nhân giống vô tính là các cây con đồng đều về mặt di truyền do duy trì được các tính trạng của cây mẹ, nên có thể áp dụng sản xuất đại trà cho sản phẩm có chất lượng ổn định; rút ngắn thời gian từ khi trồng đến thu hoạch tạo điều kiện cho tăng vụ, tăng sản lượng đối với những cây có thời gian nảy mầm của hạt kéo dài... Mặc dù vậy, phương pháp nhân giống vô tính truyền thống (chiết, giâm, ghép) vẫn còn nhiều nhược điểm như sự lây nhiễm bệnh qua nguyên liệu thường phổ biến và phức tạp, hệ số nhân thấp... hơn nữa, việc sử dụng chính các bộ phận làm thuốc để nhân giống rất lãng phí, tốn kém.

Để khắc phục các nhược điểm của phương pháp nhân giống vô tính truyền thống, một phương pháp nhân giống khác đã áp dụng rộng rãi trên thế giới cũng như ở Việt Nam, đó là phương pháp nhân giống *in vitro*, phương pháp này có nhiều ưu điểm nổi trội như:

- Hệ số nhân giống cao, từ một cây trong vòng một năm có thể tạo thành hàng triệu cây.
- Tính đồng nhất và ổn định di truyền cao: Các cây con được tạo ra giống hệt với cây bố mẹ ban đầu. Theo lý thuyết từ bất kỳ một cây chọn lọc ưu việt nào đều có thể tạo ra một quần thể với độ đồng đều cao, số lượng không hạn chế.
- Nâng cao chất lượng giống do tạo được các giống sạch bệnh, loại bỏ được các nguồn vi khuẩn, virus, nấm bệnh.
- Nhân giống *in vitro* có thể nhân nhanh cây không kết hạt hoặc kết hạt kém trong những điều kiện sinh thái nhất định.
- Có tiềm năng công nghiệp hóa, do chủ động về chế độ chăm sóc và chiếu sáng, nhiệt độ... nên có thể sản xuất quanh năm trong một dây chuyền sản xuất liên tục.
- Tạo được cây có kiểu gen mới bằng xử lý đa bội.
- Bảo quản và lưu giữ được tập đoàn gen.

Bên cạnh những ưu điểm trên, nhân giống *in vitro* vẫn không tránh khỏi một số nhược điểm như:

- Hạn chế về chủng loại sản phẩm: Nhiều loài thực vật quý hiếm chưa thể tiến hành nhân giống do gặp khó khăn liên quan tới lý thuyết nuôi cấy và tái sinh thực vật.
- Chi phí sản xuất cao do nhân giống *in vitro* đòi hỏi trang thiết bị hiện đại và lao động có tay nghề.
- Hiện tượng sản phẩm bị biến đổi kiểu hình mà nguyên nhân là do biến dị soma, đã làm cho các cây con không giữ được kiểu hình của bố mẹ (đặc biệt là khi nuôi cấy từ callus).

Trong quá trình nuôi cấy, các mô tế bào thực vật thực hiện quá trình phân biệt hóa rồi lại biệt hóa để cho ra cây hoàn chỉnh. Mỗi đối tượng thực vật có đặc tính khác nhau, do đó có những cách thức biến đổi khác nhau, mặc dù kết quả cuối cùng là tái

sinh cây hoàn chỉnh nhưng không phải chỉ có một phương thức chung cho tất cả các thực vật.

II. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy

1. Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng mẫu cấy

Việc khử trùng mẫu trước khi đưa vào nuôi cấy là một vấn đề cần thiết, vì mẫu cấy ở trong tự nhiên tiếp xúc với môi trường xung quanh nên mang rất nhiều vi khuẩn, nấm... Nhưng, do mức độ nhiễm của mỗi loại mẫu là khác nhau và đặc điểm của từng loại mẫu cũng khác nhau nên cần có sự thử nghiệm về khử trùng mẫu cấy nhằm thu được lượng mẫu vô trùng nhiều mà tổn ít nhiên liệu ban đầu.

Khả năng tiêu diệt nấm và khuẩn của hóa chất khử trùng phụ thuộc vào nồng độ, thời gian xử lý và mức độ xâm nhập của chúng vào các ngõ ngách trên bề mặt của mô cấy.

Thời gian khử trùng là một điều kiện quan trọng, nó phụ thuộc vào từng loại dung dịch khử trùng và đặc điểm của từng loại mẫu cấy. Với hypochlorite, người ta thường khử trùng trong thời gian 15-30 phút, $HgCl_2$ thường có thời gian ít hơn. Thời gian quá lâu, dung dịch khử trùng xâm nhập vào mẫu có thể gây chết mẫu, thời gian quá ngắn sẽ không loại bỏ hết nấm và vi khuẩn nên mẫu dễ bị nhiễm.

Sau khi khử trùng, mẫu cấy được đặt vào các môi trường nuôi cấy, từ đây giai đoạn nuôi cấy *in vitro* bắt đầu. Thành phần của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng quyết định tới nuôi cấy.

2. Ảnh hưởng của các thành phần hóa học

Trong nuôi cấy *in vitro*, cả yếu tố hóa học và yếu tố vật lý của cây trong các bình nuôi đều phải được cung cấp đầy đủ. Môi trường dinh dưỡng phải cung cấp tất cả các ion khoáng cần thiết, nguồn chất hữu cơ bổ sung như amino acid và vitamin, nguồn cacbon cố định, và một thành phần cần cho sự sống cũng phải được cung cấp đó là nước. Các nhân tố vật lý như nhiệt độ, pH, môi trường khí, ánh sáng và áp lực thẩm thấu, cũng phải được duy trì trong giới hạn chấp nhận.

Hiện nay trên thế giới có rất nhiều môi trường được sử dụng như môi trường Murashige và Skoog (1962), môi trường Gamborg (1968), môi trường Knop (1974), môi trường Anderson, Went, Knudson, Lindemann... Trong đó môi trường MS được

đánh giá là phù hợp rộng rãi nhất với nhiều loại cây trồng, bao gồm cả cây hai lá mầm và cây một lá mầm [12]. Thông thường trong một môi trường nuôi cấy phải đảm bảo các thành phần hóa học sau:

2.1. Các nguyên tố khoáng

Tùy theo nồng độ sử dụng, các nguyên tố khoáng được chia vào hai nhóm là nguyên tố đa lượng và nguyên tố vi lượng.

- Nguyên tố đa lượng: Các nguyên tố này thường chiếm 0,1 % khối lượng khô của thực vật. Nitơ, photpho, kali, magiê, canxi, và lưu huỳnh là các muối vô cơ. Chúng có mặt trong các hợp chất quan trọng (diệp lục, protein, acid nucleic, acid amin...), tham gia vào các quá trình như điều chỉnh áp suất thẩm thấu tế bào, vận chuyển năng lượng trong hô hấp, quang hợp, thực hiện vai trò tín hiệu tế bào,... [13]

- Nguyên tố vi lượng: Được cung cấp với lượng rất thấp cho thực vật sinh trưởng, phát triển và có nhiều vai trò khác nhau. Mangan, iốt, đồng, coban, bo, molybden, sắt và kẽm là các nguyên tố vi lượng, ngoài ra niken và nhôm cũng được tìm thấy trong một số công thức. Nguyên tố vi lượng thường có mặt trong thành phần của một số coenzyme, vitamin; tham gia vào các phản ứng trao đổi điện tử, sinh tổng hợp diệp lục,...[13]

2.2. Chất hữu cơ bổ sung

- Các vitamin là những chất hữu cơ tham gia vào cấu trúc enzyme và cofactor trong nhiều phản ứng sinh hóa. Các loại vitamin B1, B6, PP và myoinositol là cần thiết cho nuôi cấy tế bào thực vật *in vitro*. Tuy nhiên, vì lý do lịch sử các loại vitamin khác nhau cũng được thêm vào để nuôi cấy.[13]

- Các amino acid có vai trò quan trọng trong việc phát sinh hình thái, amino acid, alanine, glutamic acid, glutamine và proline cũng được sử dụng nhưng trong nhiều trường hợp là không cần thiết.

2.3. Nguồn cacbon

Các mô và tế bào thực vật nuôi cấy nói chung, không thể tự quang hợp hoặc quang hợp yếu do thiếu chlorophin và các điều kiện khác...do đó phải bổ sung thêm cacbon. Saccharose thường được sử dụng làm nguồn cacbon do đó những đặc tính như rẻ, dễ kiểm, đồng hóa triệt để và tương đối ổn định. Ngoài ra, các loại đường

khác như glucose, maltose, galactose và sorbitol cũng có thể được sử dụng và trong những trường hợp đặc biệt có thể cung cấp tốt hơn đường saccharose. [10]

Đường vừa là nguồn cacbon cung cấp cho mẫu nuôi cấy, đồng thời còn tham gia điều chỉnh áp suất thẩm thấu của môi trường.

2.4. Chất điều tiết sinh trưởng

Chất điều tiết sinh trưởng thực vật là thành phần môi trường khắt khe trong việc xác định con đường phát triển của tế bào thực vật. Các chất điều tiết sinh trưởng được sử dụng thông thường là các hormone thực vật hoặc các chất tổng hợp tương tự chúng, phổ biến là auxin và cytokinin, gibberellins, abscisic acid, ethylene. Trong đó auxin và cytokinin là hai nhóm được sử dụng phổ biến nhất.

- Nhóm auxin gồm một số hợp chất có chứa nhân indol trong phân tử. Trong nuôi cấy *in vitro*, auxin thúc đẩy sinh trưởng của mẫu do hoạt hóa sự phân chia và giãn nở của tế bào, kích thích các quá trình tổng hợp và trao đổi chất, tham gia điều chỉnh sự phân hóa của rễ, chồi...[12]

Các auxin được sử dụng với nồng độ thấp từ $10^{-6} - 10^{-1}$ M tùy theo từng chất, mục đích và đối tượng nghiên cứu. Hàm lượng auxin thấp sẽ kích thích sự phân hóa rễ, hàm lượng cao kích thích hình thành mô sẹo.

- Cytokinin kích thích sự phân chia và ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của tế bào, cảm ứng hình thành chồi phụ và loại bỏ ưu thế ngọn. Trong nuôi cấy mô thực vật cytokinin được dùng để kích thích sự phát sinh chồi, sử dụng kết hợp với auxin kích thích phân chia tế bào. Nồng độ cytokinin cao kìm hãm sự hình thành và phát triển của rễ (Narayaswamy, 1994). Trong các cytokinin tự nhiên có hai nhóm được sử dụng trong môi trường nuôi cấy, đó là zeatin và 2iP (2-isopentyl adenine). Nhưng chúng không được dùng phổ biến vì rất đắt (đặc biệt là zeatin) và không ổn định. Các chất tổng hợp tương tự như kinetin và BAP được sử dụng phổ biến hơn. Các chất hóa học không có based purin và thay thế bằng phenylureas, cũng được sử dụng như cytokinin trong môi trường nuôi cấy tế bào thực vật.

Trong cây có sự cân bằng nội hormone. Do vậy, khi sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng trong nuôi cấy cần đặc biệt lưu ý để sử dụng nồng độ thích hợp đạt hiệu quả cao. Nhiều tác giả đã tổng kết, tỷ lệ auxin/cytokinin nếu nghiêng về phía auxin sẽ

kích thích hình thành rễ; nghiêng về phía cytokinin sẽ thúc đẩy hình thành chồi; ở tỷ lệ trung gian sẽ hình thành mô sẹo. [13]

2.5. Than hoạt tính

Than hoạt tính ban đầu được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cố gắng mô phỏng điều kiện trồng trọt, sau đó nó được sử dụng rộng rãi trong nhiều môi trường nuôi cấy. Nhiều nghiên cứu cho thấy tác dụng của than hoạt tính trong môi trường nuôi cấy mô thực vật. Đó là: sự hấp thụ các chất màu, các hợp chất phenol, các sản phẩm trao đổi thứ cấp, ảnh hưởng tới pH, xúc tác bẻ gãy đường saccharose trong khử trùng. Ngoài ra than cũng hút các chất hữu cơ như phytohormone, vitamin, sắt, kẽm...[12]

2.6. Các chất hữu cơ bổ sung

Ngoài các thành phần dinh dưỡng bắt buộc kể trên trong môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật *in vitro*, người ta còn bổ sung thêm một số thành phần hỗn hợp tự nhiên khác như nước dừa, dịch chiết nấm men, nước ép cà chua, khoai tây, chuối... Các thành phần này thường chứa nguồn dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng đa dạng như amino acid, đường, vitamin, nucleic acid, auxin, cytokinin.

Nước dừa là thành phần khá phổ biến trong nhiều môi trường nuôi cấy. Tất cả phân tích thành phần của nước dừa từ non tới già của Tulecke et al.,(1961) cho thấy trong nước dừa có: amino acid, acid hữu cơ, đường, RNA, DNA, Inositol, auxin, cytokinin,... Hàm lượng sử dụng của nước dừa từ 10-20%.

2.7. Tác nhân làm đặc môi trường

Tùy thuộc vào loại sinh trưởng, môi trường nuôi cấy cần được sử dụng ở dạng lỏng hoặc đặc, nhiều loại môi trường nuôi cấy đòi hỏi tế bào hoặc mô thực vật phải sinh trưởng trên bề mặt, agar là tác nhân làm đặc môi trường được sử dụng phổ biến nhất. Agar được sản xuất từ tảo biển, loại tinh khiết hay agarose có thể cũng được sử dụng, nhưng có thể khác nhau về độ đặc.[10]

3. Ảnh hưởng của điều kiện ra cây

Đây là giai đoạn cuối cùng của quá trình sản xuất một cây giống *in vitro*. Mục đích của giai đoạn này nhằm đưa cây giống *in vitro* trong phòng nuôi ra ngoài tự

nhiên; huấn luyện cây thích nghi với các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng tự nhiên và chuyển từ chế độ dị dưỡng sang chế độ tự dưỡng.

Mỗi loài cây có đặc điểm khác nhau, do đó để đạt tỷ lệ cây sống cao cần nghiên cứu để tìm giá thể phù hợp cho cây. Giá thể trồng cây có thể là cát, đất mùn hoặc các hỗn hợp nhân tạo không chứa đất, mùn cưa và bột biển...

Cây nuôi cấy *in vitro* có đặc điểm là các khí khổng luôn mở. Vì vậy, khi chuyển cây ra vườn ươm, cây thường bị mất nước rất nhanh, do đó cần phải che phủ cẩn thận và cung cấp đủ độ ẩm cho cây bằng cách phun sương. Cần cung cấp cho cây lượng nước vừa đủ, lượng nước quá ít hoặc quá nhiều đều có ảnh hưởng không tốt cho cây.

Ngoài ra, ở giai đoạn đầu đưa ra ngoài vườn ươm, bộ rễ của cây nuôi cấy *in vitro* thường chưa có khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng từ giá thể. Để tăng chất lượng của cây giống, có thể sử dụng các dung dịch dinh dưỡng để tưới cho cây.

CHƯƠNG 3. KHÁI QUÁT ĐIỀU KIỆN TỰ NHIÊN CỦA VÙNG CÓ LAN KIM TUYẾN PHÂN BỐ TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH KON TUM

I. Khái quát về điều kiện tự nhiên của huyện Kon Plông, tỉnh Kon Tum

1. Vị trí địa lý

Huyện Kon Plông là một huyện vùng cao, miền núi, nằm ở phía Đông Bắc tỉnh Kon Tum và ở vị trí trung điểm giữa vùng Tây nguyên và Duyên Hải Trung bộ. Phía Bắc giáp tỉnh Quảng Nam, phía Đông giáp tỉnh Quảng Ngãi, phía Nam giáp tỉnh Gia Lai, phía Tây giáp huyện Tu Mơ Rông, huyện Kon Rẫy.

2. Địa hình

Huyện Kon Plông nằm chung trong vùng Tây Nguyên được hình thành trên một nhân đá cổ là địa khối Kon Tum, trải qua quá trình phong hóa tạo nên hai lớp phủ thổ nhưỡng điển hình tương phản nhau về màu sắc và độ phì nhiêu của đất:

a. Lớp phủ thổ nhưỡng trên đá macma bazơ và trung tính với tầng đất dày, tơi xốp, độ phì nhiêu cao, màu đỏ rực rỡ, thành phần cơ giới nặng.

b. Lớp phủ vàng đỏ, vàng xám và xám hình thành trên các đá macma axit và đá cát, phù sa cổ với độ dày tầng đất biến động, độ phì thấp, nhiều kết von đá lẫn, thành phần cơ giới nhẹ, quá trình rửa trôi mạnh mẽ.

Huyện Kon Plông có địa hình nhìn chung là bậc núi thấp với dạng địa hình núi trung bình. Toàn huyện chia làm các dạng địa hình chính như sau:

- Địa hình núi cao có độ dốc trên 25°: diện tích 60.838ha, chiếm 44,64% diện tích tự nhiên.

- Địa hình núi cao có độ dốc 25°: diện tích 34.046ha, chiếm 25,0% tổng diện tích tự nhiên.

- Địa hình núi thấp có độ dốc 8-15°: diện tích 22.572ha, chiếm 16,58% tổng diện tích tự nhiên. Đây là dạng địa hình tiếp giáp giữa dạng địa hình núi cao dốc và dạng địa hình thung lũng đồng bằng, dốc 8-15°, thích hợp cho phát triển các loại cây công nghiệp, cây ăn quả.

- Địa hình thung lũng đồng bằng: diện tích 18.704ha, chiếm 13,73% tổng diện tích tự nhiên. Dạng địa hình này chủ yếu có độ dốc < 8°, phân bố rải rác theo các suối, các hợp thủy và các bậc thềm cao vùng đồi gò. Diện tích không lớn nhưng có điều

kiện thuận lợi cho việc phát triển sản xuất nông nghiệp, nhất là lúa nước và bố trí dân cư.

3. Khí hậu

Huyện Kon Plông có vị trí nằm ở phía Đông Bắc dọc theo dãy Trường Sơn, là điểm phân thủy giữa Đông - Tây Trường Sơn, nằm ở độ cao trung bình từ 1.000 - 1.500m so với mặt nước biển và nằm trong vành đai khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa, quanh năm mát mẻ nên chịu ảnh hưởng khí hậu của 2 vùng tây nguyên và đồng bằng. Nhiệt độ trung bình năm là 20,7°C; tháng lạnh nhất là tháng 12 có nhiệt độ trung bình 15°C; tháng nóng nhất là tháng 5 có nhiệt độ trung bình dưới 22,7°C. Mùa lạnh từ tháng 10 đến tháng 2 năm sau, thời gian còn lại có khí hậu mát mẻ, rất thích hợp với việc sinh trưởng và phát triển của nhiều loài thực vật rừng trong đó có Lan Kim Tuyến.

Lượng mưa hàng năm cao trung bình là 2.200 - 2.400mm, nhưng phân bố không đều, có năm mưa kéo dài 8 - 9 tháng. Mưa nhiều nhất trong huyện là khu vực Măng Đen và trung tâm xã Hiếu. Mùa mưa nhiều từ tháng 8 đến tháng 02 năm sau, độ ẩm bình quân từ 82 - 87%. Mùa mưa ít từ tháng 4 đến tháng 6 trong năm.

Chế độ khí hậu đặc trưng như trên cùng với sự đa dạng về địa hình và thổ nhưỡng là điều kiện thuận lợi cho việc sinh trưởng, phát triển của nhiều loại thực vật và động vật rừng làm đa dạng sinh học có nguồn gốc nhiệt đới.

4. Tài nguyên rừng

+ *Rừng và tài nguyên rừng.*

Tổng diện tích đất lâm nghiệp có rừng là 114.466ha (niên giám thống kê 2012). Trong đó đất rừng sản xuất là 73.860,15ha, rừng phòng hộ là 43.511,10ha. Độ che phủ rừng khoảng 80% xếp vào loại cao so với các huyện khác trong tỉnh và so với mức trung bình của tỉnh. Đây là vùng có tiềm năng lớn về đa dạng sinh học. Trong hệ thực vật ở đây có 7 loài thực vật đặc hữu và có 1 loài có tên trong danh sách các loài bị đe dọa toàn cầu. Rừng trên lưu vực sông Đăk Snghe có nhiều loại gỗ quý như Pơ mu, Lát, gụ, Dổi, Thông hai - ba lá, Dẻ, Re, Đỗ quyên, Chua, Xoan đào và nhiều loại lâm sản ngoài gỗ như song mây, tre nứa, mật ong, sa nhân, sâm...

Tài nguyên rừng của huyện rất đa dạng và nhiều loại gỗ quý như: Trắc, Hương, Huỳnh Đàn, Pơ Mu... Đặc biệt là các loại lâm sản dưới tán rừng rất phong phú, đa

dạng như nấm hương, mộc nhĩ, quế, sa nhân, sâm, trâm... Đây là nguồn nguyên liệu quan trọng được quan tâm khai thác hợp lý, bảo vệ và tu bổ, cải tạo rừng.

Rõ ràng tài nguyên rừng là một trong những tài nguyên quý nổi trội của huyện Kon Plông. Nhiệm vụ cần thiết là phải bảo vệ và khai thác hợp lý để phát triển kinh tế - xã hội.

Rừng tự nhiên huyện Kon Plông chủ yếu là diện tích rừng đầu nguồn có ý nghĩa cực kỳ quan trọng trong việc bảo vệ nguồn nước, sinh cảnh, các động thực vật quý hiếm, đồng thời lưu giữ, điều tiết nước thượng nguồn của các công trình thủy điện, thủy điện lớn có tầm ảnh hưởng trong khu vực như Thượng Kon Tum, Đăk Đring, Công trình thủy lợi Thạch Nham. Tiềm năng gỗ và lâm sản rất lớn, hiện còn nhiều khu rừng được phân loại là rừng giàu và trung bình có thể coi là đại diện của rừng nguyên sinh tương đối chưa bị tác động bởi con người và chiếm khoảng 22% tổng diện tích vùng. Thảm thực vật tự nhiên của quần thể rừng khu vực Kon Plông bao gồm dạng rừng lá rộng hỗn giao với rừng lá kim.

II. Khái quát về điều kiện tự nhiên của huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum

1. Vị trí địa lý

Huyện Tu Mơ Rông là một huyện vùng cao, miền núi, nằm ở phía Đông Bắc tỉnh Kon Tum, giáp với tỉnh Quảng Nam, cách trung tâm tỉnh lỵ khoảng 80km và cách đường Hồ Chí Minh xuyên Bắc Nam khoảng 40km. Phía Bắc giáp huyện Đăk Glei và tỉnh Quảng Nam, phía Nam giáp huyện Đăk Tô và Đăk Hà, phía Đông giáp với huyện Kon Plông, phía Tây giáp với huyện Ngọc Hồi.

2. Địa hình

Huyện có địa hình phức tạp, bị chia cắt nhiều bởi các sông suối, hợp thủy và núi cao. Địa hình thấp dần từ Bắc xuống Nam và từ Đông sang Tây. Huyện có nhiều bậc thềm địa hình, tạo nên nhiều kiểu địa hình đa dạng: gò đồi, vùng trũng và núi cao xen kẽ nhau khá phức tạp. Trong đó mỗi bậc là địa hình đồi núi bao quanh tạo thành những thung lũng hẹp. Nhìn chung địa hình toàn huyện có ba dạng địa hình chính:

+ Địa hình núi trung bình: Phân bố ở sườn núi phía Nam dãy núi Ngọc Linh; núi Ngọc Tu Măng, Ngọc Puôk, Ngọc Păng. Độ cao trung bình so với mặt nước biển 1.000 -2.333m; gồm các dãy núi phía Bắc và Đông Bắc huyện, thuộc địa bàn các xã

Đăk Na, Ngọc Lây, Tê Xăng, Măng Ri, Ngọc Yêu. Độ dốc khu vực này trên 25°; có nhiều thung lũng hẹp và sâu.

+ Địa hình núi thấp: Có độ cao trung bình 800 - 1.000m, phân bố ở phía Bắc và Đông của huyện, có nhiều thung lũng hẹp và sâu.

+ Địa hình thấp được bồi tụ: Có độ cao trung bình dưới 800m; phân bố ở khu vực phía Nam và Tây Nam huyện.

3. Khí hậu

Khí hậu huyện Tu Mơ Rông là khí nhiệt đới gió mùa cao nguyên; khu vực phía Đông Bắc gián tiếp ảnh hưởng của khí hậu Đông Trường Sơn. Chia làm 2 tiểu vùng khí hậu:

+ Tiểu vùng 1: Là khu vực trung tâm và phía Tây của huyện, bao gồm các xã Đăk Hà, Đăk Tô Kan, Đăk Rơ Ông, Đăk Sao, Tu Mơ Rông. Nhiệt độ trung bình trong năm từ 22- 23°C; nhiệt độ trung bình tháng lạnh nhất (tháng 12, 01) đạt dưới 18°C; nhiệt độ trung bình tháng cao nhất (tháng 4) khoảng 23°C. Lượng mưa hàng năm tương đối cao, phổ biến từ 2.200 - 2.400mm; mùa mưa bắt đầu từ tháng 5 và kết thúc vào đầu tháng 11. Phù hợp với cây có nguồn gốc á nhiệt đới.

+ Tiểu vùng 2: Thuộc khu vực Đông Bắc huyện bao gồm các xã Đăk Na, Măng Ri, Tê Xăng, Ngọc Lây, Ngọc Yêu.... Nhiệt độ trung bình trong năm từ 21 - 22,5°C. Nhiệt độ trung bình tháng lạnh nhất (tháng 12, 01) xuống dưới 18°C; nhiệt độ trung bình tháng cao nhất (tháng 4) khoảng 23°C. Lượng mưa hàng năm tương đối cao phổ biến từ 2.200 - 2.400mm; mùa mưa bắt đầu từ tháng 5 và kết thúc vào đầu tháng 11; Tháng có lượng mưa và số ngày mưa cao là tháng 8, 9, 10, 11. Chế độ nhiệt tại huyện là chế độ nhiệt đới gió mùa cao nguyên; nền nhiệt tương đối thấp, nhưng có sự phân hóa rõ rệt giữa các vùng theo độ cao. Nhiệt độ tại khu vực phía Tây Nam cao hơn khu vực Đông Bắc, chênh lệch phổ biến từ 1 - 2°C. Nhiệt độ không khí đạt thấp nhất vào tháng 1 và tháng 12, đạt cao nhất vào tháng 4, 5. Các tháng 1, 2, 11, 12 có nhiệt độ trung bình dưới 19°C (lạnh); các tháng còn lại nhiệt độ trung bình từ 20 - 23°C. Lượng mưa tại khu vực huyện phụ thuộc vào chế độ gió mùa và địa hình. Mùa mưa bắt đầu từ tháng 5 và cho đến hết tháng 10 là do tác động của gió mùa Tây Nam mang lại. Từ tháng 11 đến tháng 4 năm sau do tác động trực tiếp của gió mùa Đông Bắc bị chặn bởi dãy Trường sơn là mùa khô. Lượng mưa tại khu vực Đông Bắc huyện đạt trên

2.400mm; tại khu vực còn lại của huyện lượng mưa phổ biến 2.000 - 2.400mm. Độ ẩm không khí: Khu vực Đông Bắc có độ ẩm lớn hơn khu vực phía Tây Nam huyện; độ ẩm đạt thấp nhất xảy ra vào tháng 3 phổ biến từ 74 - 75%; cao nhất xảy ra vào các tháng 7, 8, 9 phổ biến là 91 - 92%.

4. Tài nguyên nước

+ Nguồn nước mặt: Trên địa bàn huyện không có sông lớn mà chỉ có suối nhỏ và hệ thống suối đầu nguồn của các sông sâu. Lưu vực sông Đăk PSi: nằm trong địa bàn huyện có diện tích lớn nhất tập trung ở phía Đông-Nam huyện; gồm các hệ thống suối như: Suối nước Chim, suối Đăk PSi, suối Đăk Lây, suối Đăk Ter, suối Đăk Xe,.... . Lưu vực sông Đăk Tờ Kan: thuộc địa bàn huyện chủ yếu ở phía Tây-Nam của huyện (xã Đăk Tờ Kan, Đăk Rơ Ông). Lưu vực sông Pô Kô: Các suối thuộc lưu vực sông Pô Kô phân bố chủ yếu ở phía Tây-Bắc huyện (xã Đăk Na, Đăk Sao).

+ Nguồn nước ngầm: Nguồn nước ngầm trên địa bàn huyện tuy khá phong phú nhưng việc khai thác gặp nhiều khó khăn do địa hình chia cắt, không bằng phẳng.

5. Tài nguyên đất

Căn cứ vào một số kết quả điều tra nghiên cứu về phân loại lập bản đồ đất tỉnh Kon Tum theo phân loại định lượng FAO - UNESCO, đặc điểm thổ nhưỡng huyện Tu Mơ Rông có 4 nhóm đất chính và 7 loại đất, cụ thể như sau:

+ Nhóm đất phù sa suối (Py): Có diện tích 1.182ha, chiếm 1,4% tổng diện tích toàn huyện, nhóm đất này được hình thành do sản phẩm bồi tụ của sông suối lớn như lưu vực sông Đăk Tờ Kan; nhóm đất này phân bố ở xã Đăk Hà, Đăk Rơ Ông, Đăk Tờ Kan và Đăk Sao.

+ Nhóm đất xám (X); Có diện tích 79.255ha, chiếm 92,8% tổng diện tích đất toàn huyện, phân bố ở tất cả các xã, gồm 3 loại đất: Đất xám, đỏ vàng: Diện tích có 1.419ha, chiếm 1,7% diện tích đất toàn huyện. Đất phân bố ở tất cả các xã trên toàn huyện trên đá biến chất (1.200ha) và macma axit (219ha). Hầu hết diện tích đất có độ dốc 15 - 25° có 1.227ha, diện tích đất dốc < 15° có 192ha. Ở độ dốc thấp < 15° có thể sử dụng trồng các loại hoa màu, cây ăn quả, cây công nghiệp; diện tích có độ dốc > 15° thuận lợi cho việc khoanh nuôi bảo vệ hoặc trồng mới rừng. Đất xám giàu mùn, tích nhôm: Diện tích 70.044ha, chiếm 82% tổng diện tích toàn huyện, được hình thành trên đá biến chất; toàn bộ diện tích đất có tầng dày đất mịn trên 100cm, nhưng phân bố

ở độ dốc $> 25^\circ$, đất này thuận lợi để sử dụng cho mục đích lâm nghiệp. Đất xám, sỏi sạn nâu, đỏ vàng: Diện tích 7.792ha, chiếm 9,1% diện tích đất toàn huyện. Đất phân bố ở tất cả các xã trong huyện, trong đó tập trung chủ yếu ở xã Đăk Tờ Kan, Đăk Rơ Ông (4.048ha), xã Đăk Hà (1.965ha), xã Tu Mơ Rông (1.435ha), xã Ngọc Yêu (344ha). Toàn bộ diện tích đất có tầng dày trên 50cm, trong đó phân bố chủ yếu ở độ dốc $> 25^\circ$ (7.671ha), diện tích đất $\sim 15^\circ$ chỉ có 121ha. Đất có độ dốc $< 15^\circ$ có thể sử dụng trồng hoa màu, cây ăn quả, chè. Đất có độ dốc trên 15° nên khoanh nuôi hoặc trồng rừng.

+ Nhóm đất đỏ (Fd): Diện tích đất đỏ có 1.589ha, phát triển trên đá bazan, gồm 2 loại đất: Đất đỏ chua, tầng mặt giàu mùn: Đất được hình thành trên đá bazan, phân bố ở xã Ngọc Yêu. Toàn bộ diện tích đất có tầng dày trên 100cm, độ dốc $> 25^\circ$, ít có khả năng sử dụng cho nông nghiệp. Đất đỏ chua, tầng mặt giàu mùn: Đất được hình thành trên đá bazan có diện tích 84ha, chiếm 0,1% diện tích đất toàn huyện, phân bố ở xã Ngọc Yêu. Toàn bộ diện tích đất có tầng dày trên 100cm, độ dốc $< 8^\circ$. Hướng sử dụng là trồng các loại cây hoa màu, cây ăn quả, cây công nghiệp lâu năm.

+ Nhóm đất mùn axit trên núi cao: Diện tích có 3.361ha, chiếm 3,9% diện tích đất toàn huyện, phân bố ở các xã Đăk Na (1.010ha), Đăk Sao (50ha), Măng Ri (1.464ha), Ngọc Lậy (837ha). Toàn bộ diện tích đất phân bố ở độ dốc $> 25^\circ$, tầng dày > 100 cm; loại đất này sử dụng cho mục đích lâm nghiệp và phát triển cây dược liệu. Diện tích đất theo độ dốc tầng dày: Toàn huyện có 8.676ha đất phân bố ở độ dốc $< 15^\circ$, chiếm 10,2% tổng diện tích đất toàn huyện, trong đó đất có tầng dày đất mịn > 70 cm là 8.267ha, có khả năng sử dụng cho phát triển nông nghiệp, chủ yếu là đất xám (6.383ha) và đất phù sa (1.033ha). Diện tích đất có độ dốc $> 15^\circ$ cần sử dụng cho mục đích lâm nghiệp như trồng rừng, khoanh nuôi bảo vệ rừng hoặc sử dụng nông lâm kết hợp; trồng bờ lờ, ca ri, quế....

PHẦN III. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

CHƯƠNG 4. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

I. Vật liệu nghiên cứu

1. Vật liệu điều tra, khảo sát

Trong quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi tiến hành khảo sát đánh giá sơ bộ về hình thái và đặc điểm phân bố của lan kim tuyến trên địa bàn huyện Kon Plông (xã Đăk Tăng, Măng Bút, xã Hiếu); huyện Tu Mơ Rông (xã Măng Ri, Ngọc Yêu), tỉnh Kon Tum.

2. Vật liệu nghiên cứu nhân giống

2.1. Nhân giống bằng nuôi cấy mô

- *Nuôi cấy khởi động- khảo sát thời gian khử trùng mẫu*: Nguồn mẫu là các giống lan kim tuyến thu thập được trong quá trình điều tra khảo sát tại các xã thuộc 02 huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum.

- *Khảo sát ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng lên quá trình tạo chồi và nhân nhanh chồi lan kim tuyến*: Nguồn mẫu lan kim tuyến được thu thập ngoài thực địa sau giai đoạn nuôi cấy khởi động được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy khảo sát quá trình tạo chồi và nhân nhanh chồi.

- *Khảo sát ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh*: các chồi được nhân lên trong quá trình nhân nhanh được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.

- *Khảo sát sinh trưởng cây lan kim tuyến in vitro giai đoạn ngoài vườn ươm*: cây lan kim tuyến *in vitro* sau khi được nuôi cấy thành cây hoàn chỉnh được lấy ra khỏi bình, rửa sạch agar, để ráo nước. Sau đó, chọn các cây có kích thước tương đồng để làm vật liệu thí nghiệm với mục đích khảo sát điều kiện nuôi trồng cây lan kim tuyến *in vitro* giai đoạn ngoài vườn ươm.

2.2. Vật liệu nhân giống bằng phương pháp giâm hom

Cây lan kim tuyến đã trồng ngoài thực địa 1 năm, tiến hành cắt đốt thân ngầm thành đoạn có chứa 3 mắt ngủ làm vật liệu thử nghiệm phương pháp giâm hom.

2.3. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung độc lập hay phối hợp giữa các chất kích thích sinh trưởng BA, NAA, IBA, TDZ, nước dừa (trái dừa non), than hoạt tính, sucrose, agar, pH 5,8. Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1.800 - 2.000 Lux, nhiệt độ: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí là 75 – 85%. Ở vườn ươm, giá thể nuôi trồng là vụn xơ dừa và dớn. Vườn ươm có mái che mưa và che lưới đen chắn 70% ánh sáng, nhiệt độ 20 – 25°C, độ ẩm 80 – 85%.

3. Vật liệu nghiên cứu điều kiện trồng, chăm sóc cây lan kim tuyến

3.1. Giá thể

- **Giá thể là xơ dừa:** Mụn xơ dừa được ngâm trong hỗn hợp nước vôi 4% để xử lý chất chát, ngâm trong 2 tuần sau đó xả hết nước và ngâm lại trong nước sạch từ 2-3 lần (mỗi lần ngâm trong 2-3 ngày) ta thu được giá thể chuẩn bị cho thí nghiệm ra cây vườn ươm.

- **Giá thể phối trộn:** Là giá thể thể gồm: 1/3 xơ dừa (đã qua xử lý chất chát) + 1/3 đất mặt + 1/3 phân bò được đảo đều và có bổ sung thêm chế phẩm, phụ gia (vôi tôi 1% + trichoderma 1% + phân NPK 1% + phân lân 5% + phân vi sinh 1%) tưới đủ ẩm, phủ kín bạt. Sau 1 tháng đảo lại giá thể và bổ sung thêm độ ẩm. sau 2 tháng ủ giá thể được sử dụng cho các thí nghiệm ngoài thực địa.

3.2. Cây giống

Cây lan kim tuyến được nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô trong quá trình thực hiện đề tài tại Trung tâm ứng dụng tiến bộ khoa học và công nghệ Kon Tum, cây giống sau khi nuôi cấy được huấn luyện với điều kiện môi trường tự nhiên sau 35 ngày huấn luyện, chăm sóc cây giống đạt tiêu chuẩn (khỏe mạnh, sạch bệnh và có chiều cao từ $3,5 \pm 0,5\text{cm}$; 4-5 lá thật; 2-3 rễ) sẽ được chọn là vật liệu nghiên cứu điều kiện trồng, chăm sóc và thu hoạch tiến hành tại huyện Kon Plông.

3.3. Chuẩn bị nhà kính

Nhà kính cần xây dựng thông thoáng, cao ráo, bên trên có 2 lớp: 1 lớp nilon trong che mưa, 1- 2 lớp lưới đen che nắng. Khu vực trồng che thêm lưới đen tránh ánh nắng trực tiếp chiếu vào cây, tránh côn trùng chích hút gây bệnh xâm hại.

3.4. Phân bón, thuốc bảo vệ thực vật:

- **Phân bón:** Phân bón đơn như (Ure, Kali, Phân lân); hoặc phân bón lá (Atonik, gibber TB...)

- **Thuốc bapor vệ thực vật:** Ridomil gold, Regent 800WG.....

4. Vật liệu phân tích hoạt chất

- 02 mẫu lan kim tuyến có nguồn gốc từ tự nhiên, khoảng từ 6-7 tháng tuổi và cây nuôi trồng ngoài thực địa khoảng 8-10 tháng tuổi. Ký hiệu mẫu M1 (mẫu thu từ tự nhiên) và M2 (mẫu nuôi trồng).

- Dung môi, hóa chất: methanol, ethanol, H_2SO_4 , ethyl acetat, cloroform, acid formic, toluen, nước cất hai lần. Các dung môi, hoá chất sử dụng đều là hoá chất tinh khiết phân tích (PA).

- Chất đối chiếu quercetin của hãng sigma.

II. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Trong quá trình nghiên cứu- triển khai chúng tôi sử dụng phối hợp các phương pháp sau:

- Phương pháp kế thừa.
- Phương pháp thực nghiệm.
- Phương pháp thống kê.
- Phương pháp đối chiếu, so sánh.
- Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật, kỹ thuật vườn ươm

Phương pháp nghiên cứu và bố trí thí nghiệm như sau:

1. Nội dung và phương pháp điều tra khảo sát cây lan kim tuyến trong tự nhiên

1.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái chung của cây lan kim tuyến

- Đặc điểm hình thái chung của cây trưởng thành
- Đặc điểm thân rễ
- Đặc điểm thân khí sinh
- Đặc điểm của rễ

- Đặc điểm của lá

1.2. Khảo sát sự phân bố và đặc điểm phân bố của lan kim tuyến tại 02 huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông

- Tình hình phân bố của lan kim tuyến tại 2 huyện khảo sát
- Đặc điểm phân bố của lan kim tuyến

1.3. Phương pháp điều tra, khảo sát cây lan kim tuyến trong tự nhiên

Dựa vào bản đồ địa hình, trạng thái rừng, đất đai để lập tuyến điều tra. Bố trí 05 khu vực với 15 tuyến điều tra cho 02 huyện. Lập tuyến điều tra song song với đường đồng mức, quan sát 2 bên, mỗi bên 1,5m. Định vị toàn bộ tuyến với vị trí tọa độ đã xác định bằng GPS và trình bày kết quả lên bản đồ bằng phần mềm Mapinfo 11.

2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến

2.1. Nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến bằng phương pháp nuôi cấy mô và điều kiện nuôi trồng ex vitro

2.1.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát thời gian khử trùng mẫu Lan kim tuyến thích hợp bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5%

❖ **Mục đích:** Xác định được thời gian thích hợp để khử trùng mẫu Lan kim tuyến bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5%.

❖ **Các bước thực hiện:** Mẫu Lan kim tuyến được lựa chọn là các cây khỏe mạnh, không bị dập nát, bị bệnh, nấm mốc. Tiến hành rửa mẫu dưới vòi nước chảy cho sạch đất cát bám trên thân, lá. Dùng lưỡi dao sắc cắt bỏ toàn bộ lá và rễ, chỉ giữ lại phần thân và ngọn. Lưu ý trong quá trình cắt tránh gây tổn thương thêm cho thân cây và các mắt ngủ nằm dưới nách lá. Sau đó mẫu được cho vào bình tam giác và rửa với nước xà phòng và rửa lại nhiều lần với nước sạch. Bình chứa mẫu cấy được vệ sinh bằng cồn 70% và được đưa vào tủ cấy vô trùng để tiếp tục khử trùng mẫu. Tráng nhẹ mẫu bằng nước cất vô trùng rồi chuyển sang lắc qua cồn 70% trong 30 giây để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của các chất diệt khuẩn, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Cuối cùng mẫu được khử trùng bằng dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% với các thời gian khác nhau, sau đó rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần. Dùng dao cắt bỏ phần tế bào bị chết, giữ lại phần đốt thân chứa mắt ngủ khoảng $1 \pm 0,1\text{cm}$; cấy vào các ống nghiệm chứa môi trường MS_0 để khảo sát tỷ lệ sống của mẫu.

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại; Lấy chỉ tiêu theo dõi sau 30 ngày vào mẫu.

❖ **Thời gian bố trí thí nghiệm:** tháng 6/2014 đến tháng 7/2014.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiến bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.1. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát thời gian khử trùng mẫu Lan kim tuyến

Nghiem thức	Thời gian khử mẫu bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% (phút)
NT1.1	18
NT1.2	20
NT1.3	22
NT1.4	25

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số mẫu cấy trên ống nghiệm: 1
- Số ống nghiệm cho một nghiệm thức: 20
- Tổng số ống nghiệm thí nghiệm: 240

2.1.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi từ đốt thân Lan kim tuyến.

❖ **Mục đích:** Thí nghiệm nhằm xác định được nồng độ BA bổ sung trong môi trường nuôi cấy thích hợp với sự tạo chồi Lan kim tuyến.

❖ **Các bước thực hiện:** Mẫu cấy là các đốt thân chứa mắt ngủ $1 \pm 0,1$ cm của chồi Lan kim tuyến có được của thí nghiệm 1. Mẫu được cấy vào chai chứa môi trường MS có bổ sung BA (0 - 2 mg/l).

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi vào ngày thứ 45 sau cấy

❖ **Thời gian bố trí thí nghiệm:** tháng 7/2014 đến tháng 9/2014.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiến bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.2. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi từ đốt thân Lan kim tuyến

Nghiem thức	Nồng độ BA (mg/l)
NT2.1 (ĐC)	0
NT2.2	0,5
NT2.3	1
NT2.4	1,5
NT2.5	2

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số mẫu cấy trên chai: 5
- Số chai cho một nghiệm thức: 5
- Tổng số chai thí nghiệm: 75

2.1.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân nhanh chồi Lan kim tuyến.

❖ **Mục đích:** Thí nghiệm nhằm tìm ra nồng độ của BA và NAA thích hợp đến sự hình thành và sinh trưởng của chồi Lan kim tuyến.

❖ **Các bước thực hiện:** Cắt những đoạn đốt thân chứa mắt ngủ (mẫu) có kích thước tương đồng $1 \pm 0,1$ cm cấy vào chai có chứa môi trường MS có bổ sung BA và NAA với các nồng độ khác nhau.

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi vào ngày thứ 60 sau cấy.

❖ **Thời gian bố trí thí nghiệm:** tháng 9/2014 đến tháng 11/2014.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiến bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.3. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân nhanh chồi Lan kim tuyến

Nghiem thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)
NT3.1 (ĐC)	0	0
NT3.2	0,5	0,5
NT3.3	0,5	1
NT3.4	0,5	1,5
NT3.5	0,5	2
NT3.6	0,5	3

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số mẫu cấy trên chai: 5
- Số chai cho một nghiệm thức: 5
- Tổng số chai thí nghiệm: 90

2.1.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của NAA lên quá trình tạo cây Lan kim tuyến hoàn chỉnh.

❖ **Mục đích:** Thí nghiệm nhằm xác định nồng độ NAA thích hợp lên sự hình thành cây Lan kim tuyến *in vitro* hoàn chỉnh.

❖ **Các bước thực hiện:** Chọn những chồi (mẫu) có kích thước tương đồng (chồi cao khoảng $2 \pm 0,2$ cm, có 2 lá), cấy vào chai có chứa môi trường MS có bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau.

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi vào ngày thứ 60 sau cấy.

❖ **Thời gian bố trí thí nghiệm:** tháng 1/2015 đến tháng 4/2015.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiến bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.4. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của NAA lên quá trình tạo cây Lan kim tuyến hoàn chỉnh

Nghiem thức	Nồng độ NAA (mg/l)
NT4.1 (ĐC)	0
NT4.2	0,3
NT4.3	0,5
NT4.4	0,7
NT4.5	1

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số mẫu cấy trên chai: 10
- Số chai cho một nghiệm thức: 5
- Tổng số chai thí nghiệm: 75

2.1.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của giá thể trồng đến tỷ lệ sống của cây Lan kim tuyến *ex vitro*

❖ **Mục đích:** Thí nghiệm nhằm xác định loại giá thể tối ưu cho cây Lan kim tuyến *ex vitro*.

❖ **Các bước thực hiện:** Cây Lan kim tuyến *in vitro* hoàn chỉnh đạt tiêu chuẩn xuất vườn (qua thời gian huấn luyện tối ưu ở thí nghiệm 5) là vật liệu để thực hiện thí nghiệm này. Sau đó được đem xử lý để trồng ra ngoài vườn. Cây lan kim tuyến được

giâm trên khay ở các loại giá thể khác nhau, khoảng cách cây cách cây là 2cm, hàng cách hàng 2cm, diện tích mỗi ô thí nghiệm là $0,5m^2$. Cường độ ánh sáng vườn ươm 1200- 1300 lux; độ ẩm từ 70-80%.

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi vào ngày thứ 30 sau ra cây.

❖ **Thời gian bố trí thí nghiệm:** tháng 4/2015 đến tháng 5/2015.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiến bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.5. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của giá thể trồng đến tỷ lệ sống của cây Lan kim tuyến *ex vitro*

Nghiệm thức	Thời gian huấn luyện cây ngoài vườn ươm (ngày)
NT5.1	Dớn
NT5.2	Xơ dừa
NT5.3	Đất phù sa
NT5.4	$\frac{1}{2}$ Đất + $\frac{1}{2}$ Xơ dừa

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số cây trồng trên một khay: 500
- Số khay cho một nghiệm thức: 1
- Tổng số khay thí nghiệm: 12

2.2. Nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến bằng phương pháp giâm hom

Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng tạo chồi của đoạn thân giâm Lan kim tuyến *ex vitro*.

❖ **Mục đích:** Thí nghiệm nhằm xác định nồng độ BA thích hợp đến sự tạo chồi của đoạn thân giâm Lan kim tuyến *ex vitro*.

❖ **Các bước thực hiện:** Cây Lan kim tuyến đã trồng ngoài thực địa 1 năm tuổi. Tiến hành cắt các đốt thân thành từng đoạn chứa 3 đốt. Sau đó đem ngâm các đoạn thân này trong dung dịch chứa BA ở các nồng độ khác nhau trong thời gian 5 phút. Các đoạn thân này sau khi được xử lý sẽ được giâm vào giá thể là đất trồng đã qua xử lý. Diện tích mỗi ô thí nghiệm là $0,5m^2$, khoảng cách trồng là 5cm x 5cm.

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi định kỳ 15 ngày/lần.

❖ **Thời gian bố trí thí nghiệm:** từ tháng 10/2014 đến tháng 01/2015

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiên bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.6. Các nghiệm thức thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng tạo chồi của đoạn thân giâm Lan kim tuyến *ex vitro*

Nghiem thức	Nồng độ BA (mg/l)
NT6.1 (ĐC)	0
NT6.2	0,5
NT6.3	1
NT6.4	1,5
NT6.5	2

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số thân giâm trên một ô: 100
- Số ô cho một nghiệm thức: 1
- Tổng số ô thí nghiệm: 15

2.3. Nghiên cứu điều kiện trồng, chăm sóc và thu hoạch cây lan kim tuyến

2.3.1 Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng mật độ trồng đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến.

❖ **Mục đích:** Xác định được mật độ trồng thích hợp nhất đối với Lan kim tuyến trồng sản xuất.

❖ **Các bước thực hiện:** Cây Lan kim tuyến đã được huấn luyện ra cây, lựa chọn các cây khỏe mạnh, không có dấu hiệu bị bệnh, chiều cao cây $3,5 \pm 0,5$ cm; có 4-5 lá, có 2 – 3 rễ. Cây Lan kim tuyến được trồng trên luống, giá thể ra cây là xơ dừa đã qua xử lý, với các khoảng cách trồng khác nhau. Diện tích mỗi ô thí nghiệm là 1m^2 .

- Sau khi trồng xong phun Ridomil gold (chống chết cây con, chống dịch bệnh).
- Một tuần sau phun thêm Ridomil gold và phân bón lá Atonik (ngừa nấm, kích thích sinh trưởng rễ, thân, lá).
- Cách một tuần phun phân bón lá hoặc Gibber TB và Ridomil gold (liều lượng 0,5g/1 lít nước).

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên RCB, 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi định kỳ 30 ngày/lần. Mỗi ô lấy ngẫu nhiên 10 mẫu, theo kiểu zích zắc, cách mép luống 10cm mỗi bên.

❖ **Thời gian bố trí thí nghiệm:** từ tháng 9/2015 đến tháng 02/2016.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiến bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.7. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng mật độ trồng đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến

Nghiem thức	Khoảng cách trồng
NT7.1	Cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 5cm
NT7.2	Cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 10cm
NT7.3	Cây cách cây 10cm, hàng cách hàng 10cm
NT7.4	Cây cách cây 15cm, hàng cách hàng 10cm

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số ô thí nghiệm cho một nghiệm thức: 3
- Số nghiệm thức: 4
- Tổng số ô thí nghiệm: 12

2.3.2 Thí nghiệm 8: Nghiên cứu ảnh hưởng phân bón đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến.

❖ **Mục đích:** Xác định được công thức phân bón phù hợp cho sự sinh trưởng của Lan kim tuyến.

❖ **Các bước thực hiện:** Cây Lan kim tuyến đã được huấn luyện ra cây, lựa chọn các cây khỏe mạnh, không có dấu hiệu bị bệnh, chiều cao cây $3,5 \pm 0,5$ cm; có 4-5 lá, có 2 - 3 rễ. Cây Lan kim tuyến được trồng trên luống, giá thể ra cây là xơ dừa đã qua xử lý, với các khoảng trồng tối ưu ở thí nghiệm 8, thời gian đầu chăm sóc như thí nghiệm 8. Từ tháng thứ 2 trở đi bón phân theo các công thức khác nhau định kỳ 2 tháng/lần. Diện tích mỗi ô thí nghiệm là 1m^2 .

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên RCB, 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi định kỳ 30 ngày/lần. Mỗi ô lấy ngẫu nhiên 10 mẫu, theo kiểu zích zắc, cách mép luống 10cm mỗi bên.

❖ **Thời gian thực hiện:** từ tháng 3/2016 đến tháng 8/2016.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm ứng dụng tiến bộ KH và CN Kon Tum.

Bảng 3.8. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng phân bón đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến

Nghiem thức	Công thức phân bón
NT8.1 (ĐC)	60N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O
NT8.2	70N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O
NT8.3	80N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O
NT8.4	90N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số ô thí nghiệm cho một nghiệm thức: 3
- Số nghiệm thức: 4
- Số cây trên mỗi ô thí nghiệm: 400
- Tổng số ô thí nghiệm: 12

2.3.3 Thí nghiệm 9: Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự sinh trưởng và phát triển của cây kim tuyến trồng ngoài thực địa.

❖ **Mục đích:** Xác định được loại giá thể phù hợp cho sự sinh trưởng của Lan kim tuyến trồng sản xuất.

❖ **Các bước thực hiện:** Cây Lan kim tuyến đã được huấn luyện ra cây, lựa chọn các cây khỏe mạnh, không có dấu hiệu bị bệnh, chiều cao cây $3,5 \pm 0,5$ cm; có 4-5 lá, có 2 - 3 rễ. Cây Lan kim tuyến được trồng trên luống, với các khoảng trồng tối ưu ở thí nghiệm 8, chăm sóc với các công thức phân bón tối ưu ở thí nghiệm 9 và với các loại giá thể trồng khác nhau. Diện tích mỗi ô thí nghiệm là 1m².

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên RCB, 6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi định kỳ 30 ngày/lần. Mỗi ô lấy ngẫu nhiên 10 mẫu, theo kiểu zích zắc, cách mép luống 10cm mỗi bên.

❖ **Thí nghiệm được thực hiện:** Từ tháng 9/2016 đến tháng 02/2017.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm NC & PT nông nghiệp Công nghệ cao.

Bảng 3.9. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự sinh trưởng và phát triển của cây kim tuyến trồng ngoài thực địa

Nghiem thức	Công thức các loại giá thể trồng
NT9.1	100% sơ dừa
NT9.2	100% đất mùn từ lá, thân cây mục
NT9.3	1/2 sơ dừa + 1/2 đất mùn từ lá, thân cây mục
NT9.4	1/2 sơ dừa + 1/2 phân chuồng
NT9.5	1/2 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/2 phân chuồng
NT9.6	1/3 sơ dừa + 1/3 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/3 phân chuồng

❖ **Quy mô thí nghiệm:**

- Số ô thí nghiệm cho một nghiệm thức: 3
- Số nghiệm thức: 6
- Số cây trên mỗi ô thí nghiệm: 400
- Tổng số ô thí nghiệm: 18

2.3.4 Thí nghiệm 10: Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây kim tuyến trồng ngoài thực địa

❖ **Mục đích:** Xác định được cường độ ánh sáng phù hợp cho sự sinh trưởng của Lan kim tuyến trồng sản xuất.

❖ **Các bước thực hiện:** Cây Lan kim tuyến đã được huấn luyện ra cây, lựa chọn các cây khỏe mạnh, không có dấu hiệu bị bệnh, chiều cao cây $3,5 \pm 0,5\text{cm}$; có 4-5 lá, có 2 - 3 rễ. Cây Lan kim tuyến được trồng trên luống, với các khoảng trồng tối ưu ở thí nghiệm 8, chăm sóc với các công thức phân bón tối ưu ở thí nghiệm 9, giá thể trồng tối ưu ở thí nghiệm 10 và trong các điều kiện ánh sáng khác nhau. Diện tích mỗi ô thí nghiệm là 1m^2 .

❖ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên RCB, 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Lấy chỉ tiêu theo dõi định kỳ 30 ngày/lần. Mỗi ô lấy ngẫu nhiên 10 mẫu, theo kiểu zích zắc, cách mép luống 10cm mỗi bên.

❖ **Thí nghiệm được thực hiện:** Từ tháng 02/2017 đến tháng 04/2017.

❖ **Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm NC & PT nông nghiệp Công nghệ cao.

Bảng 3.10. Các nghiệm thức thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây kim tuyến trồng ngoài thực địa

Nghiem thức	Cường độ ánh sáng
NT10.1	30.000-40.000 lux
NT10.2	1.800 – 3.000 lux
NT10.3	800-1.200 lux
NT10.4	400-600 lux

❖ Quy mô thí nghiệm:

- Số ô thí nghiệm cho một nghiệm thức: 3
- Số nghiệm thức: 4
- Số cây trên mỗi ô thí nghiệm: 400
- Tổng số ô thí nghiệm: 12

2.4. Điều tra đánh giá và cách phòng trừ sâu bệnh trên cây lan kim tuyến nuôi trồng

Trong quá trình tiến hành các thí nghiệm trồng và chăm sóc cây lan kim tuyến, tiến hành theo dõi tình hình sâu bệnh hại trên cây lan kim tuyến và đưa ra các biện pháp phòng trừ.

2.5. Phân tích và so sánh thành phần hoạt chất hóa học có trong cây kim tuyến ngoài tự nhiên và cây trồng ngoài thực địa

2.5.1 Nghiên cứu định tính các nhóm hoạt chất bằng phản ứng ống nghiệm

Chuẩn bị mẫu: Mẫu lan kim tuyến sau khi thu hái, rửa sạch, sấy khô được liệu ở nhiệt độ 60°C. Tán nhỏ bằng thuyền tán thành bột thô, bảo quản trong túi nilon kín, để ở chỗ thoáng mát, khô ráo.

Định tính các nhóm chất hữu cơ chính trong dược liệu lan kim tuyến bằng phản ứng hóa học đặc trưng.

2.5.2 Nghiên cứu định tính các nhóm hoạt chất bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Dược liệu được xay nhỏ, chiết nóng hồi lưu bằng dung môi ethanol 96% ở 60°C trong vòng 2 giờ. Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở 70°C thu được cao ethanol. Cao ethanol được hòa trong lượng nước nhất định, sau đó chiết lỏng - lỏng

với các dung môi có độ phân cực tăng dần theo thứ tự lần lượt là *n*-hexan, ethyl acetat, *n*-butanol (tỷ lệ 1:1; v/v). Tách riêng các dịch chiết phân đoạn, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở 60°C thu được cặn tương ứng.

Tiến hành thăm dò trên nhiều hệ dung môi khác nhau để lựa chọn hệ dung môi cho kết quả phân tách tốt nhất. Kết quả được quan sát ở bước sóng UV (254nm và 366 nm) và ánh sáng trắng với các thuốc thử hiện màu đặc trưng.

Cách tiến hành:

- Hoạt hóa bản mỏng Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ở 110°C trong 1 giờ.
- Bão hòa hệ dung môi khai triển trong 10-15 phút.
- Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 - 15µl các dung dịch phân tích.
- Sau khi triển khai bản mỏng trong bình sắc ký, bỏ ra ngoài không khí, sấy khô.
- Phun các thuốc thử hiện màu đặc trưng cho các nhóm chất và sấy ở nhiệt độ phù hợp.
- Quan sát dưới ánh sáng UV 254nm, 366nm, ánh sáng trắng trước và sau khi phun thuốc thử.

2.5.3 Hàm lượng Flavonoid toàn phần trong dược liệu (tính theo Quercetin) bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS)

Chuẩn bị mẫu thử: cân chính xác 1,0 g mẫu thử (đã được xay thành bột mịn, đồng thời xác định độ ẩm) cho vào bình nón 50 ml, thêm 25 ml hỗn hợp dung dịch methanol - nước (4:1), siêu âm trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, lọc vào bình định mức 50 ml. Lặp lại 1 lần, định mức vừa đủ bằng hỗn hợp dung môi trên được dung dịch làm phản ứng.

Chuẩn bị dãy dung dịch Quercetin chuẩn: Chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn quercetin trong hỗn hợp dung dịch methanol – nước (4 : 1) nồng độ chính xác khoảng 100, 200, 400, 600 và 800 µg/ml để xây dựng đường chuẩn.

Tiến hành thí nghiệm

Làm phản ứng: Lần lượt hút chính xác vào 3 ống nghiệm to

Bảng 3.11. Tiến hành thí nghiệm xác định hàm lượng Flavonoid toàn phần trong dược liệu (tính theo Quercetin) bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử

Mẫu	Chuẩn	Thử	Trắng	Ghi chú
Dung dịch chuẩn (ml)	1	0	0	
Dung dịch thử (ml)	0	1	0	
Nước cất (ml)	4	4	5	
NaNO ₂ 5% (ml)	0,3	0,3	0,3	Đề yên 5 phút
AlCl ₃ 10% (ml)	0,3	0,3	0,3	Đề yên 5 phút
NaOH 10% (ml)	3	3	3	
Nước cất	Vừa đủ 10 ml			

Sau khi tiến hành phản ứng lắc đều, để yên 15 phút, đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 510 nm. Tính toán xây dựng đường chuẩn của quercetin giữa nồng độ dung dịch ($\mu\text{g/ml}$) và độ hấp thụ quang tương ứng theo phương trình $y = ax + b$.

Hàm lượng flavonoid toàn phần (X %) tính theo quercetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) trong dược liệu khô tuyệt đối được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{C_{\text{thử}} \times 10 \times 100 \times P \times 100}{m_{\text{cân}} \times (100 - b) \times 1000}$$

Trong đó:

$C_{\text{chuẩn}}$: nồng độ quercetin trong mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$) được tính từ đường chuẩn

$m_{\text{cân}}$: khối lượng mẫu thử (g)

b : độ ẩm mẫu thử (%)

P : độ tinh khiết của mẫu chuẩn

III. Các chỉ tiêu theo dõi và cách xử lý số liệu

1. Các chỉ tiêu theo dõi

- Tỷ lệ % mẫu sống = $(\text{Số mẫu sống} / \text{Tổng số mẫu}) \times 100$.
- Tỷ lệ % mẫu nhiễm nấm = $(\text{Số mẫu nhiễm nấm} / \text{Tổng số mẫu}) \times 100$.
- Tỷ lệ % mẫu nhiễm khuẩn = $(\text{Số mẫu nhiễm khuẩn} / \text{Tổng số mẫu}) \times 100$.
- Tỷ lệ % mẫu tạo chồi = $(\text{số mẫu tạo chồi} / \text{Tổng số mẫu}) \times 100$
- Số chồi phát sinh/mẫu = $\text{Tổng số chồi phát sinh} / \text{Tổng số mẫu}$
- Số đốt/chồi phát sinh = $\text{tổng số đốt} / \text{tổng số chồi phát sinh}$.

- Tỷ lệ phát sinh chồi = Số mẫu phát sinh chồi/Tổng số mẫu cây
- Đường kính chồi (mm): Dùng thước kẹp micrometer để đo đường kính thân chồi phát sinh lớn nhất.
 - Khối lượng tươi trung bình (g): Tổng khối lượng tươi mẫu/Tổng số mẫu.
 - Chiều cao cây (cm): Đo từ gốc đến đỉnh ngọn.
 - Đường kính thân (mm): Dùng thước kẹp micrometer để đo phần đường kính thân lớn nhất.
- Số lá/cây
- Chiều dài lá (mm): Đo từ đầu phiến lá đến chóp lá lớn nhất, không tính phần cuống lá.
 - Chiều rộng lá (mm): Đo chiều ngang phiến mặt lá lớn nhất.
- Số rễ phát sinh
- Chiều dài rễ (cm): Đo từ cổ rễ đến chóp rễ dài nhất
- Đường kính rễ phát sinh (mm): Dùng thước kẹp micrometer để đo đường kính cổ rễ lớn nhất.
- Tỷ lệ % chồi phát sinh = (Số chồi phát sinh/Tổng số thân giâm) x100.

2. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phần mềm excel, phân tích thống kê bằng chương trình thống kê SAS 9.1.3, sau đó dựa vào giá trị Prob trong bản ANOVA để quyết định có thực nghiệm phân hạng hay không.

PHẦN IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU - TRIỂN KHAI
CHƯƠNG 5. KẾT QUẢ ĐIỀU TRA KHẢO SÁT
CÂY LAN KIM TUYẾN TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH KON TUM

I. Kết quả điều tra khảo sát đặc điểm hình thái cây lan kim tuyến trên địa bàn tỉnh Kon Tum

Trên địa bàn tỉnh Kon Tum chúng tôi tiến hành điều tra sự phân bố của lan kim tuyến trên địa bàn 2 huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, qua khảo sát chúng tôi ghi nhận đặc điểm hình thái chung cây lan kim tuyến trưởng thành là cây thảo, có thân rễ mọc dài; thân trên đất mọc nước mang 2 - 6 lá mọc xoè sát đất, với các đặc điểm cụ thể như sau:

1. Thân rễ (thân ngầm)

Thân rễ nằm ngang sát mặt đất, đôi khi hơi nghiêng, bò dài. Chiều dài thân rễ từ 5 - 12cm, trung bình là 8,5cm. Đường kính thân rễ từ 2,5 - 3,5mm, trung bình là 3,28mm. Số lông trên thân rễ từ 3 - 7 lông, trung bình là 4,03 lông. Chiều dài của lông từ 1 - 5cm, trung bình là 2,14cm. Thân rễ thường có màu xanh trắng, đôi khi có màu nâu đỏ, thường nhẵn, không phủ lông.

2. Thân khí sinh

Thân khí sinh thường mọc thẳng đứng trên mặt đất, ít khi mọc nghiêng. Chiều dài thân khí sinh từ 3 - 7cm, trung bình 5,63cm. Đường kính thân khí sinh từ 2,5 - 3,5mm, trung bình là 3,09mm. Thân khí sinh mang nhiều lông, các lông có chiều dài khác nhau. Số lông trên thân khí sinh thay đổi từ 2 - 5 lông, trung bình là 3,07 lông. Chiều dài mỗi lông từ 1,5 - 4cm, trung bình 1,87cm. Thân khí sinh thường mọc nước, nhẵn, không phủ lông; có màu xanh trắng, đôi khi có màu hồng nhạt.

3. Rễ

Rễ được mọc ra từ các mấu trên thân rễ. Đôi khi rễ cũng được hình thành từ thân khí sinh. Rễ thường đâm thẳng xuống đất. Thông thường mỗi mấu chỉ có một rễ, đôi khi có vài rễ cùng được hình thành từ một mấu trên thân rễ. Số lượng và kích thước rễ cũng rất thay đổi tùy theo cá thể. Số rễ trên một cây thường từ 2 - 9 rễ, trung bình là 5,2 rễ. Chiều dài của rễ thay đổi từ 1 - 9cm, rễ dài nhất trung bình là 6,37cm và ngắn nhất trung bình là 1,04cm, chiều dài trung bình của các rễ trên một cây là 4,07cm.

4. Lá cây

Lá hình trứng, gần tròn ở gốc, chóp hơi nhọn và có mũi ngắn, cỡ 3,5 - 4,5cm x 2,5 - 3,5cm. Lá có màu nâu đỏ ở mặt trên. Hệ gân lá mạng lưới lông chim, thường có 5 gân gốc. Các gân này thường có màu hồng ở mặt trên và nổi rất rõ. Đôi khi gân ở giữa có màu vàng nhạt. Mặt dưới lá có màu nâu đỏ nhạt, nhẵn với 5 gân gốc nổi rõ. Các gân bên ở phía rìa lá nổi rõ, gân ở giữa lá ở mặt dưới không rõ. Số lượng lá trên một cây thay đổi từ 2 - 6 chiếc, thông thường có 4 lá. Lá mọc cách xoắn quanh thân, xoè trên mặt đất. Kích thước của lá cũng thay đổi, thường dài từ 3 - 5cm, trung bình là 3,87cm và rộng của lá từ 2 - 4cm, trung bình là 2,93cm. Các lá trên một cây thường có kích thước khác nhau rõ rệt. Chiều rộng trung bình của các lá trên một cây là 2,5cm. Cuống lá dài 0,6 – 1,2cm, thường nhẵn và có màu trắng xanh, đôi khi hơi đỏ tía ở bẹ lá. Bẹ lá nổi rõ và nhẵn.

5. Hoa

Hoa tự chùm mọc ở đầu ngọn thân, trục hoa dài từ 5 - 20cm, thường phủ lông màu nâu đỏ, mang từ 4 - 10 hoa. Mùa hoa nở tháng 9 - 12. Mùa quả chín tháng 12 - 3 năm sau. Hoa có cánh môi màu trắng. Hai bên rìa mang từ 6 - 8 râu mỗi bên.

Trong quá trình điều tra khảo sát cây Kim tuyến tại huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, chúng tôi xác định có 3 loài lan Kim Tuyến trong khu vực điều tra. Các loài lan Kim tuyến này có sự khác biệt về màu sắc lá và hệ gân lá, cụ thể như sau:

- Hình 1A và 1B: loài Lan Kim Tuyến có lá hình trứng, gần tròn ở gốc và nhọn ở phần chóp lá. Lá có màu tím đậm ở mặt trên. Hệ gân lá ít chạy dọc thân lá; gân chính của lá to, nổi rõ hơn hẳn các gân còn lại và có màu vàng nhạt; hai gân bên mảnh và có màu vàng nhạt, đôi khi không nhìn thấy rõ. Mặt dưới lá có màu nâu đỏ đậm, nhẵn với gân chính nổi rõ. Cuống lá nhẵn, không có lông và có màu nâu đỏ nhạt. Bẹ lá nổi rõ và nhẵn. Thân rễ có màu nâu đỏ, thường nhẵn và không phủ lông.

- Hình 2A và 2B: loài Lan Kim Tuyến này có lá hình trứng, gần tròn ở gốc, chóp hơi thuôn tròn. Lá có màu xanh đậm ở mặt trên. Hệ gân lá mạng lưới lông chim, thường có 5 gân gốc. Các gân này có màu vàng sáng, có ánh kim ở mặt trên và nổi rất rõ. Mặt dưới lá có màu xanh nhạt, nhẵn với 5 gân gốc nổi rõ. Các gân bên ở phía rìa lá nổi rõ. Cuống lá thường nhẵn và có màu trắng xanh. Bẹ lá nổi rõ và nhẵn. Thân rễ có màu xanh, nhẵn và không có lông.

- Hình 3A và 3B: loài Lan Kim Tuyền này có lá hình trứng, gân tròn ở gốc, chóp hơi nhọn. Lá có màu tím xanh ở mặt trên. Hệ gân lá mạng lưới lông chim, thường có 5 gân gốc. Các gân này thường có màu hồng ở mặt trên, có ánh kim màu vàng và nổi rất rõ. Mặt dưới lá có màu nâu đỏ nhạt, nhẵn với 5 gân gốc nổi rõ. Các gân bên ở phía rìa lá nổi rõ. Cuống lá thường nhẵn và có màu trắng xanh, đôi khi hơi đỏ tía ở bẹ lá. Bẹ lá nổi rõ và nhẵn. Thân rễ có màu hơi đỏ tía, nhẵn và không có lông. Các loài lan kim tuyến trên đều có thân bò, chồi có thể cao chừng 25 cm, Thân đứng mang 2-4 lá. Hoa màu trắng có cựa hơi vàng; mùa hoa nở từ tháng 9 đến tháng 12.



Hình 4.1. Hình mặt trên (1a) và mặt dưới (1b) của giống lan kim tuyến phân bố tại Kon Tum ký hiệu giống KT1



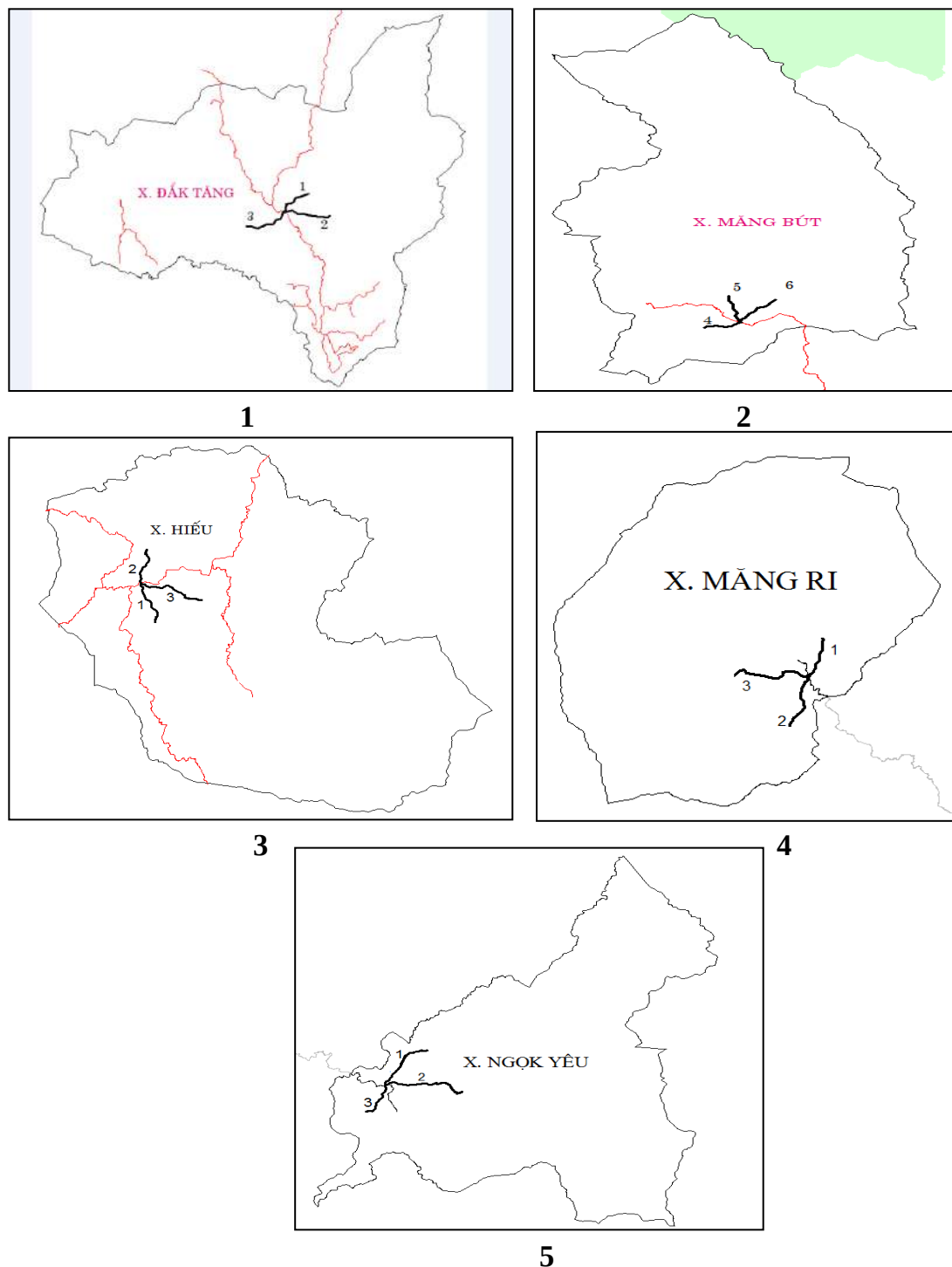
Hình 4.2. Hình mặt trên (2a) và mặt dưới (2b) của giống lan kim tuyến phân bố tại Kon Tum ký hiệu giống KT2



Hình 4.3. Hình mặt trên (3a) và mặt dưới (3b) của giống lan kim tuyến phân bố tại Kon Tum ký hiệu giống KT3

II. Kết quả điều tra khảo sát về sự phân bố của cây lan kim tuyến

Sơ đồ các tuyến điều tra khảo sát tình hình phân bố của cây lan kim tuyến như sau:



Hình 4.4. Sơ đồ các tuyến điều tra trên địa bàn tỉnh Kon Tum - 1. Xã Đắc Tăng, huyện Kon Plông; 2. Xã Măng Bút, huyện Kon Plông; 3. Xã Hiếu, huyện Kon Plông; 4. Xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông; 5. Xã Ngọc Yêu, huyện Tu Mơ Rông

Trong khuôn khổ nội dung đề tài: *Nghiên cứu nhân giống và trồng thử nghiệm cây Kim tuyến (Anoectochilus sp.)* chúng tôi đã tiến hành điều tra khảo sát để đánh giá sơ bộ về các loài Lan Kim Tuyến và tình hình phân bố của cây Lan Kim Tuyến trong điều kiện tự nhiên trên địa bàn huyện Kon Plông (xã Đăk Tăng, Măng Bút, xã Hiếu), huyện Tu Mơ Rông (xã Măng Ri, Ngọc Yêu), tỉnh Kon Tum.

Qua quá trình điều tra tại địa bàn hai huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum chúng tôi nhận thấy mật độ Lan Kim Tuyến trong tự nhiên vào thời điểm khảo sát là rất thưa thớt, phân bố chủ yếu ở độ cao từ 1.000m trở lên và có thể gặp chúng ở hầu hết các dạng địa hình, như chân núi, sườn núi, đỉnh núi; chúng thường phân bố ở những nơi dốc hay rất dốc nhưng mật độ thường gặp nhất là dọc theo các khe suối có tán rừng, những cây gặp trong tự nhiên chủ yếu là những cây nhỏ chiều dài thân khoảng 3 – 16cm.

Cây Lan Kim Tuyến là loại cây dược liệu có giá trị kinh tế cao và hiện nay đang bị người dân khai thác trong rừng một cách triệt để làm trữ lượng giảm một cách nghiêm trọng và khả năng tái sinh của loài cây này trong tự nhiên ngày càng thấp dần. Nếu như trước đây, mức độ bắt gặp cây Lan Kim Tuyến trong rừng trên địa bàn các xã thuộc huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông là khá thường xuyên thì nay đã khan hiếm nhiều do cách thức khai thác quá mức như hiện nay.

Kết quả điều tra thu được như sau:

Bảng 4.1. Tình hình phân bố Lan Kim Tuyến trong tự nhiên

STT	Tuyến điều tra	Độ dài tuyến (km)	Độ gập cây			Hiện trạng		Tổng số	Ghi chú
			<10cm	10 - 20cm	>20cm	Có hoa	Có quả		
1	Xã Đăk Tăng, huyện Kon Plông, Tỉnh Kon Tum								
	1	5,4	13	6	0	0	0	19	
	2	6,9	16	8	0	0	0	24	
	3	7,8	19	9	0	0	0	28	
2	Xã Măng Bút, huyện Kon Plông, Tỉnh Kon Tum								
	1	5,7	12	9	0	0	0	21	
	2	6,5	10	7	0	0	0	17	
	3	7,4	16	11	0	0	0	27	
3	Xã Hiếu, huyện Kon Plông, Tỉnh Kon Tum								
	1	8,2	16	11	0	6	0	33	
	2	7,6	16	8	0	7	0	31	
	3	8,5	18	10	0	8	0	36	
4	Xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông, Tỉnh Kon Tum								
	1	8,2	16	11	0	6	0	33	
	2	7,6	16	8	0	7	0	31	
	3	8,5	18	10	0	8	0	36	
5	Xã Ngọc Yêu, huyện Tu Mơ Rông, Tỉnh Kon Tum								
	1	8,9	20	9	0	8	0	37	
	2	9,3	23	12	0	9	0	41	
	3	7,6	19	9	0	9	0	37	

Qua bảng 4.1 chúng tôi nhận thấy:

- Tại các địa điểm khảo sát chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt nhiều về số lượng cây gập trong quá trình điều tra trên các tuyến điều tra.

+ Tại Đăk Tăng độ gập cây trung bình là 3,5 cây/km.

+ Tại Măng Bút độ gập cây trung bình là 3,3 cây/km.

+ Tại xã Hiếu độ gập cây trung bình là 3,2 cây/km.

+ Tại Măn Ri độ gập cây trung bình là 3,2cây/km.

+ Tại Ngọc Yêu độ gập cây trung bình là 3,5 cây/km.

- Tại địa điểm khảo sát chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt nhiều về số lượng cây gập trong quá trình điều tra trên các tuyến điều tra. Điều này có thể giải thích nguyên nhân của hiện tượng mật độ Lan Kim Tuyến tại các tuyến điều không có

sự sai khác nhiều là do điều kiện tự nhiên như: khí hậu, thổ nhưỡng tại 3 tuyến điều tra trên tương đối như nhau và phù hợp hơn với sinh thái, sinh lý của cây Lan Kim Tuyến.

- Trong quá trình điều tra chúng tôi thấy độ gặp cây < 10cm là nhiều nhất chiếm 58% - 67%. Cây tập trung chủ yếu trên các tán rừng ven suối vì những nơi này có độ tre phủ của tán rừng, độ ẩm và độ mùn cao phù hợp với sự sinh trưởng và phát triển của Lan Kim Tuyến còn tại các đỉnh núi và các khu rừng mới tái sinh độ gặp cây là rất thưa thớt. Mặt khác, thời điểm điều tra khảo sát vào thời điểm đầu mùa mưa nên độ gặp cây Lan Kim Tuyến không nhiều và các cây chủ yếu ở dạng có kích thước vừa và nhỏ.

- Trong quá trình điều tra khảo sát chúng tôi nhận thấy cây Lan Kim Tuyến thường mọc thành cụm từ 1 đến 3 cây và mọc dưới tán rừng tại những hốc cây, hốc đá, dưới thân cây mục có độ mùn, độ ẩm cao và thường ở những nơi có cường độ ánh sáng tương đối yếu khoảng 20% - 30% cường độ ánh sáng tự nhiên.

- Mặt khác, tại địa bàn xã Hiếu, Măng Ri và Ngọc Yêu thời điểm điều tra khảo sát vào thời điểm giữa mùa mưa nên độ gặp cây Lan Kim Tuyến có hoa chiếm 21% - 22,6% và các cây chủ yếu ở dạng có kích thước vừa và ngồng hoa mới xuất hiện .

-Tuy nhiên, trong quá trình điều tra chúng tôi cũng không thấy sự có mặt của những cây có kích thước > 20 cm và điều này có thể giải thích được vì trước tình hình khai thác tận thu của người dân vào năm trước nên số lượng cây lớn đã được tận thu chỉ còn sót lại cây vừa và nhỏ.

III. Đặc điểm phân bố của cây lan kim tuyến

1. Phân bố theo kiểu rừng

Tại huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, thảm thực vật nơi có loài Lan Kim Tuyến phân bố thuộc các kiểu rừng kín lá rộng thường xanh mưa mùa nhiệt đới và kiểu rừng kín lá rộng thường xanh á nhiệt đới núi thấp. Rừng thường có cấu trúc 2 tầng cây gỗ với độ tàn che hơn 70%.

Mật độ phân bố: của Lan Kim Tuyến ở đây là khá cao từ 200 – 300 cây/ha, trung bình là 130 cây/ha. Tuy nhiên, Lan Kim Tuyến không phân bố đều trong rừng mà thường tập trung thành từng đám hoặc rải rác. Thông thường chúng mọc tập trung vài 3 cây tại một điểm.

2. Phân bố Lan Kim Tuyến theo địa lý, địa hình và đai cao

- Về địa lý, địa hình: Lan Kim Tuyến phân bố khá thưa thớt trên các tuyến điều tra, mức độ gặp ở các tuyến điều tra không có sự sai khác đáng kể. Chúng phân bố ở hầu hết các dạng địa hình, như chân núi, sườn núi, đỉnh núi; chúng thường phân bố ở những nơi dốc hay rất dốc. Là cây chịu bóng có khả năng tái sinh từ thân khí sinh hoặc thân rễ ngầm, tái sinh vào mùa mưa trong rừng già hoặc dưới tán rừng ven các con suối có độ ẩm, độ mùn cao cùng với cường độ ánh sáng yếu.

- Về đai cao: Lan Kim Tuyến thường phân bố ở đai cao trên 550m, tập trung chủ yếu ở độ cao từ 1.000 – 1.200m.

Kết luận sơ bộ

1- Đã xác định được đặc điểm hình thái cây trưởng thành và các loài Lan Kim Tuyến có ở huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum.

2- Tại huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum, Lan Kim Tuyến thường phân bố ở kiểu rừng kín lá rộng thường xanh mưa mùa nhiệt đới và kiểu rừng kín lá rộng thường xanh á nhiệt đới núi thấp.

3- Lan Kim Tuyến thường phân bố ở trạng thái rừng IIIA2 (Rừng qua khai thác kiệt bắt đầu phục hồi, đặc trưng của trạng thái này là đã hình thành tầng giữa vươn lên chiếm ưu thế với lớp cây đại bộ phận có đường kính 20 – 30cm. Rừng có hai tầng trở lên, tầng trên tán không liên tục được hình thành chủ yếu từ những cây cũ còn lại, còn có những cây to khỏe vượt tán. Độ tàn che của rừng $S > 0,3$, $G < 10\text{m}^2/\text{ha}$, $GD > 40 < 2\text{M}^2/\text{ha}$, trữ lượng 80 – 120 m^3). Lan Kim Tuyến chủ yếu mọc trên đất, thậm chí ngay trên lớp thảm mục của rừng đang phân hủy. Đôi khi chúng mọc trên các tảng đá ẩm, trên các đoạn thân cây gỗ mục, trong gốc cây. Có thể gặp Lan Kim Tuyến ở trong rừng nơi ẩm ướt, ven các khe suối, dưới tán rừng cây gỗ lớn, hoặc trên đường mòn đi lại trong rừng.

4- Khí hậu nơi loài Lan Kim Tuyến phân bố thuộc khí hậu nhiệt đới ẩm. Lượng mưa trung bình năm là 1.826mm. Độ ẩm không khí trung bình 85%. Nhiệt độ trung bình năm từ dưới 20°C đến 22°C - 23°C.

5- Tại huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum, Lan Kim Tuyến được phát hiện có khu phân bố và số lượng đang bị suy giảm nghiêm trọng. Cần triển khai nhân giống và trồng chúng, cung cấp nguồn dược liệu xuất khẩu.

CHƯƠNG 6. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG, TRỒNG VÀ CHĂM SÓC LAN KIM TUYẾN

I. Kết quả nghiên cứu nhân giống lan kim tuyến

1. Kết quả khảo sát thời gian khử trùng mẫu Lan kim tuyến

Bảng 4.2. Kết quả khảo sát thời gian khử trùng mẫu lan kim tuyến

Thí nghiệm	Thời gian khử mẫu (phút)	Chỉ tiêu theo dõi			
		Tỷ lệ % mẫu sống	Tỷ lệ % mẫu chết	Tỷ lệ % mẫu nhiễm nấm	Tỷ lệ % mẫu nhiễm khuẩn
NT1.1	18	18,33 c	2,47	43,24	35,96
NT1.2	20	28,33 b	17,32	32,06	22,29
NT1.3	22	36,67 a	29,13	21,82	12,38
NT1.4	25	11,67 c	55,91	23,02	9,41
CV%		12,15			

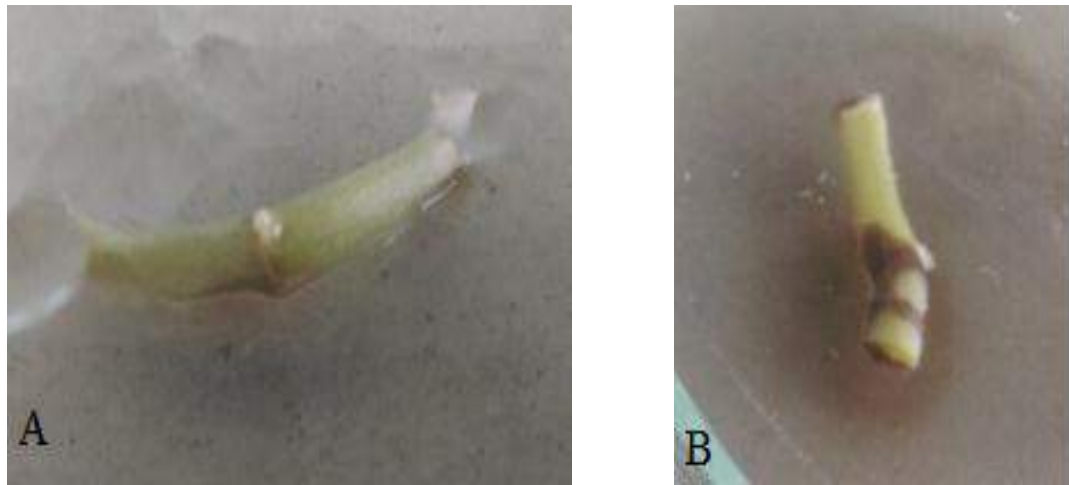
Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$)

Từ bảng 4.2 cho thấy: khi thời gian khử trùng mẫu tăng thì tỷ lệ % mẫu nhiễm giảm. Tuy nhiên, khi thời gian khử trùng quá cao, tỷ lệ mẫu sống cũng giảm vì mẫu bị ngộ độc chất khử trùng.

Ở tất cả các thí nghiệm thời gian khử mẫu bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% khác nhau thì đều đạt tỷ lệ % mẫu sống nhất định và có sự khác biệt giữa các thí nghiệm rất có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,01$).

Kết quả thu được sau khi vào mẫu 30 ngày cho thấy: Ở thời gian khử mẫu là 22 phút, tỷ lệ % mẫu chết, mẫu nhiễm nấm và khuẩn tương đối thấp nhất, tỷ lệ % mẫu sống đạt cao nhất (36,67%) và có sự khác biệt có ý nghĩa so với các thí nghiệm còn lại. Ở thí nghiệm thời gian khử mẫu là 18 phút thì tỷ lệ % mẫu chết là thấp nhất, tuy nhiên, tỷ lệ % mẫu bị nhiễm nấm và khuẩn lại cao nhất vì vậy tỷ lệ mẫu sống và sạch còn lại rất thấp chỉ đạt 18,33%. Ở thời gian khử mẫu là 20 phút thì tỷ lệ % mẫu chết, mẫu nhiễm nấm và nhiễm khuẩn đều tương đối cao. Ở thời gian khử mẫu là 25 phút thì tỷ lệ % mẫu chết chiếm đến 55,91%, tỷ lệ % mẫu nhiễm nấm và khuẩn thấp nhưng tỷ lệ % mẫu sống cũng không cao (11,67%).

Kết luận: Trong khử trùng Lan kim tuyến bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% ở thời gian 22 phút đạt kết quả tối ưu nhất, tỷ lệ % mẫu sống đạt 36,67%.



Hình 4.5. Mẫu cây Lan kim tuyến sau 15 ngày

A: Mẫu sống

B: Mẫu bị chết

2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi của Lan kim tuyến

Bảng 4.3. Ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi Lan kim tuyến sau 45 ngày nuôi cấy

Thí nghiệm	Nồng độ BA (mg/l)	Chỉ tiêu theo dõi				
		Tỷ lệ % mẫu tạo chồi	Số chồi phát sinh/mẫu	Chiều cao chồi phát sinh (cm)	Đường kính thân chồi phát sinh (mm)	Số đốt trên chồi phát sinh
NT2.1(ĐC)	0	15,77 d	0,19 d	1,17 c	1,43 c	2,70 c
NT2.2	0,5	62,74 c	1,49 c	2,16 b	1,91 b	3,55 b
NT2.3	1	98,45 a	2,51 a	3,25 a	2,25 a	4,89 a
NT2.4	1,5	83,41 b	2,00 b	2,34 b	1,78 b	3,42 bc
NT2.5	2	79,96 b	1,33 c	2,16 b	1,84 b	3,44 bc
CV%		8,31	8,94		3,41	6,63

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$)

BA (6- benzyladenine) là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, với tính chất sinh lý đặc trưng là gây ảnh hưởng rõ rệt lên sự hình thành và phân hóa của cơ quan, đặc biệt là phân hóa chồi. Kết quả xử lý thống kê hàm Anova một nhân tố cho thấy, giữa các công thức có bổ sung hàm lượng BA khác nhau có sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ mẫu tạo chồi, số lượng chồi phát sinh, chiều cao chồi, đường kính thân và số đốt trên chồi phát sinh ở độ tin cậy 99% và khác biệt so với đối chứng.

Theo kết quả thu được ở Bảng 4.3 cho thấy, môi trường có bổ sung 1,0 mg/l BAP cho kết quả trên tất cả các chỉ tiêu theo dõi là cao hơn các nghiệm thức còn lại (tỷ lệ mẫu tạo chồi: 98,45%; số chồi phát sinh: 2,51chồi/mẫu; chiều cao chồi: 3,25cm; đường kính thân chồi 2,25mm và 4,89 đốt/chồi). Ở nghiệm thức có nồng độ BA thấp hơn mức 1mg/lít số chồi phát sinh thấp (tỷ lệ mẫu tạo chồi: 62,74%; số chồi phát sinh: 1,49 chồi/mẫu; chiều cao chồi: 2,16cm; đường kính thân chồi 1,91 mm và 3,55 đốt/chồi). ở nghiệm thức bổ sung BA nồng độ cao hơn 1mg/lít môi trường (1,5mg/l và 2mg/l) do nồng độ quá cao và nên chồi nhỏ và yếu, xanh nhạt, thể hiện rõ tại các chỉ tiêu theo dõi.

Như vậy, việc bổ sung BA ở nồng độ 1,0 mg/l là thích hợp nhất cho sự phát sinh hình thái và hệ số nhân chồi lan Kim tuyến. Nghiên cứu này phù hợp với kết quả khảo sát của tác giả Phí Thị Cẩm Niệm thực hiện năm 2012 trên loài *Anoectochilus Setaceus* Blume.



Hình 4.6. Chồi phát sinh trong các môi trường sau 45 ngày nuôi cấy

3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân nhanh chồi Lan kim tuyến

Bảng 4.4. Ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân nhanh chồi Lan kim tuyến

Thí nghiệm	Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)	Chỉ tiêu theo dõi			
			Số chồi phát sinh/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Đường kính thân chồi (mm)	Khối lượng tươi chồi phát sinh (mg)
NT3.1 (ĐC)	0	0	1,18 c	1,77 f	1,49 e	0,16 d
NT3.2	0,5	0,5	1,57 c	2,92 d	1,85 cd	0,21 c
NT3.3	0,5	1	2,59 b	3,37 c	1,98 bc	0,26 b
NT3.4	0,5	1,5	3,00 ab	4,46 a	2,51 a	0,32 a
NT3.5	0,5	2	3,32 a	2,96 b	2,00 b	0,22 c
NT3.6	0,5	2,5	2,92 ab	1,99 e	1,83 d	0,22 c
CV%			7,10	1,52	3,02	4,58

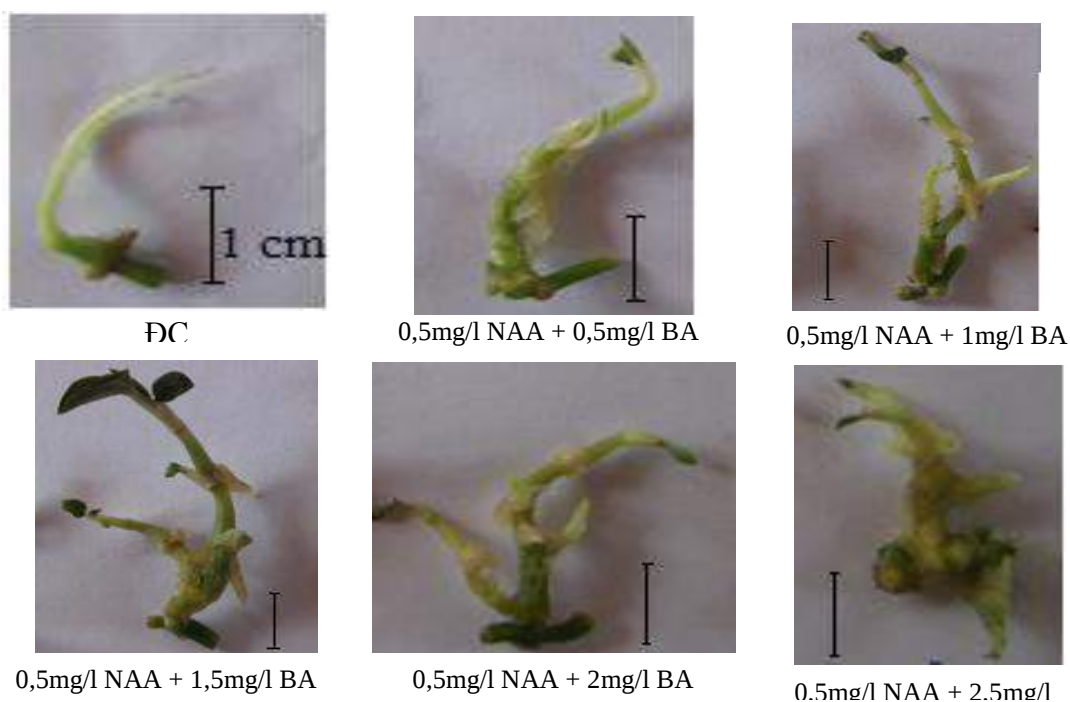
Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$)

Sau 60 ngày nuôi cấy trong các môi trường bổ sung nồng độ BA và NAA khác nhau ta thu được kết quả được thể hiện như ở bảng 4.4. Qua bảng 4.4 ta thấy, trong môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA kết hợp 2 mg/l BA có số chồi phát sinh trên mẫu đạt cao nhất (3,32 chồi). Tuy nhiên, chồi phát sinh có chiều cao, đường kính thân và khối lượng tươi không cao (chiều cao chồi 2,96cm; đường kính thân 2,00mm và khối lượng tươi chồi 0,22mg) theo nhận xét cảm quan chúng tôi thấy, ở nồng độ phối hợp này, tỷ lệ tạo chồi cao, chồi nhỏ, màu xanh nhạt, ốm.

Nguyên nhân là vì khi ta bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy, NAA sẽ kích thích cây tạo rễ, rễ cây khi được hình thành sẽ sản sinh cytokinin nội sinh, kết hợp với BA bổ sung vào môi trường (tức là cytokinin ngoại sinh) làm tăng khả năng phân hóa tạo chồi của cây nên trong nghiệm thức này, chồi hình thành nhiều hơn các nghiệm thức còn lại. Cytokinin có tác động chủ yếu đến quá trình sinh tổng hợp AND và ARN, thông qua cơ chế di truyền nó tác động lên quá trình sinh tổng hợp protein, nếu hàm lượng này quá cao sẽ làm rối loạn quá trình sinh tổng hợp protein, có thể gây biến dị trên đối tượng nuôi cấy nên ở nghiệm thức kết hợp BA:NAA là 2,5mg/l:0,5mg/l chồi bắt đầu ít hình thành, chiều cao chồi thấp, nhận xét cảm quan chồi có màu trắng, và yếu.

Ở nghiệm thức môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA kết hợp 1,5 mg/l BA đạt kết quả cao nhất (chiều cao chồi trung bình đạt 4,46cm, đường kính chồi trung bình đạt 2,51mm và khối lượng tươi chồi đạt 0,32mg) nhận xét cảm quan ta thấy chồi phát sinh có màu xanh, thân khỏe, lá hình thành tốt.

Như vậy, qua kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng tới sự phát sinh hình thái và hệ số nhân chồi thấy rằng công thức môi trường thích hợp nhất để nhân nhanh là: môi trường MS + 0,5mg/l NAA + 1,5mg/l BA + cho hệ số nhân cao, chất lượng chồi tốt, xanh, lá khỏe.



Hình 4.7. Chồi phát sinh trong các môi trường sau 60 ngày nuôi cấy

4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của NAA lên quá trình tạo cây Lan kim tuyến hoàn chỉnh.

Cây nuôi cấy mô *in vitro* trước khi chuyển ra vườn ươm thường phải có bộ rễ hoàn chỉnh. Nếu rễ kém phát triển sẽ làm cho quá trình hút nước cũng như khả năng bám đất của cây bị ảnh hưởng. Do đó cần nghiên cứu để tìm ra môi trường ra rễ thích hợp cho cây để tạo cây hoàn chỉnh trước khi đưa ra vườn ươm. Sau giai đoạn nuôi cấy chồi, khi các chồi đạt tiêu chuẩn cho ra rễ, có chiều cao $2 \pm 0,2\text{cm}$, có 2 lá, chồi mập, khỏe, xanh thì được chuyển sang các môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh.

Qua thí nghiệm, chúng tôi sử dụng loại kích thích thuộc nhóm auxin là NAA là chất kích thích tạo rễ giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* đối với lan Kim tuyến. Kết quả được thể hiện qua bảng 4.5 như sau:

Bảng 4.5. Kết quả ảnh hưởng của NAA lên quá trình tạo cây Lan kim tuyến hoàn chỉnh sau 60 ngày nuôi cấy

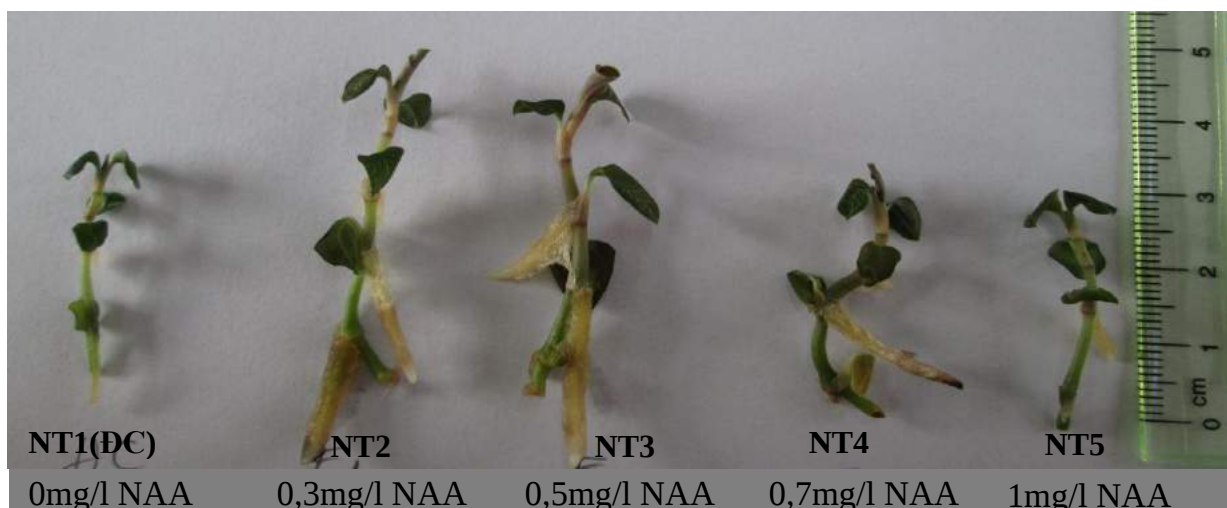
Thí nghiệm	Nồng độ NAA (mg/l)	Chỉ tiêu theo dõi								
		Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân (mm)	Khối lượng tươi (mg)	Số lá TB/cây	Chiều rộng lá (mm)	Chiều dài lá (mm)	Số rễ TB	Chiều dài rễ (cm)	Đường kính rễ (mm)
NT4.1 (ĐC)	0	2,80 c	0,97 d	71,86 e	4,73 b	5,66 c	6,70 c	1,73 b	1,50 bc	0,77 c
NT4.2	0,3	3,19 b	1,44 b	205,16 b	4,67 bc	7,70 b	9,75 b	2,40 a	1,57 b	1,14 b
NT4.3	0,5	3,49 a	2,39 a	229,37 a	5,20 a	10,29 a	12,01 a	2,67 a	1,92 a	1,81 a
NT4.4	0,7	3,01 bc	1,41 b	154,45 c	4,33 c	7,47 b	9,08 b	1,60 b	1,35 bc	1,27 b
NT4.5	1	3,12 bc	1,11 c	112,60 d	4,53 bc	6,43 bc	7,45 c	1,67 b	1,27 c	1,67 b
CV%		7,25	2,68	5,67	2,91	7,48	5,19	6,28	7,60	5,34

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$)

Sau 60 ngày nuôi cấy trong môi trường có bổ sung NAA với dải nồng độ từ 0,3-1 mg/l thu được kết quả qua xử lý hàm Anova một nhân tố cho thấy, NAA có hiệu quả sản sinh rễ bất định và khác biệt hẳn giữa các nghiệm thức có nồng độ khác nhau. Cụ thể là nghiệm thức có bổ sung nồng độ NAA 0,5mg/l cho kết quả cao nhất về tất cả các chỉ tiêu theo dõi (chiều cao cây: 3,49cm; đường kính thân: 22,39mm; khối lượng tươi: 229,37mg; số lá trung bình 5,2 lá/cây; chiều rộng lá: 10,29mm; chiều dài lá: 12,01mm; số rễ trung bình: 2,67 rễ; Chiều dài rễ: 1,92cm; đường kính rễ: 1,81mm), nhận xét cảm quan thấy cây khỏe, mập, thân lá màu xanh đậm, rễ hình thành tốt.

Trong nghiệm thức đối chứng không bổ sung NAA, cây sinh trưởng kém, thân ốm, rễ ít hình thành và nếu có cũng rất nhỏ. Trong môi trường bổ sung 0,3mg/l NAA cây sinh trưởng tương đối tốt, thân lá màu xanh đậm, rễ hình thành dài, tuy nhiên thân cây hơi ốm. Ngoài ra, trong các nghiệm thức bổ sung NAA với nồng độ lớn hơn 0,5mg/l cây hình thành lá, rễ ít. Trong môi trường bổ sung 1mg/l NAA rễ hình thành kém, cây ốm.

Như vậy, môi trường tạo cây Lan kim tuyến hoàn chỉnh được lựa chọn là môi trường MS bổ sung 0,5mg/l NAA.



Hình 4.8. Cây hình thành sau 60 ngày nuôi cấy ở các môi trường khác nhau

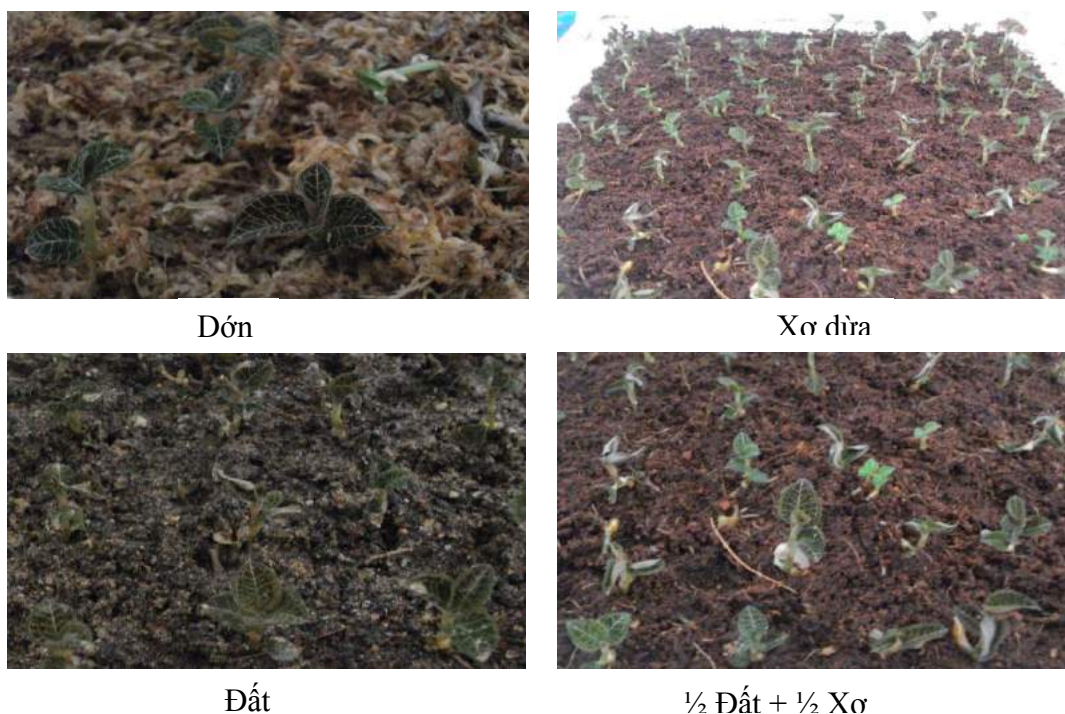
5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của giá thể trồng đến tỷ lệ sống của cây Lan kim tuyến ex vitro.

Bảng 4.6. Ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỷ lệ sống cây Lan kim tuyến ex vitro sau 30 ngày ra cây

Thí nghiệm	Giá thể ra cây	Chỉ tiêu theo dõi
		Tỷ lệ % mẫu sống
NT5.1 (ĐC)	Dớn	69,00 bc
NT5.2	Xơ dừa	97,50 a
NT5.3	Đất (phù xa)	56,25 c
NT5.4	½ Đất + ½ Xơ dừa	80,50 b

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$).

Kết quả khảo sát các loại giá thể ra cây Lan kim tuyến cấy mô sau 30 ngày trồng, chăm sóc được thể hiện ở bảng 4.6. Theo đó, loại giá thể phù hợp nhất cho việc ra cây Lan kim tuyến cấy mô là Xơ dừa đã qua xử lý đạt 97,50% và sự khác biệt giữa các thí nghiệm rất có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,01$). Loại giá thể không phù hợp cho sự ra cây Lan kim tuyến cấy mô là đất phù sa, cây có biểu hiện dễ bị héo sinh lý, dễ bị các loại nấm, bệnh và vi sinh vật trong đất gây hại.



Hình 4.9. Lan kim tuyến cấy mô được ra cây trên các loại giá thể khác nhau

6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng tạo chồi của đoạn thân giâm Lan kim tuyến *ex vitro*.

Bảng 4.7. Ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng tạo chồi của đoạn thân giâm Lan kim tuyến *ex vitro* qua các giai đoạn theo dõi

Thí nghiệm	Nồng độ BA (mg/l)	Tỷ lệ % chồi phát sinh			Nhận xét cảm quan
		15 ngày	30 ngày	90 ngày	
NT6.1 (ĐC)	0	-	1,11 a	10,00 c	Chồi yếu, nhỏ, màu vàng xanh nhạt
NT6.2	0,5	-	2,22 a	16,67 bc	chồi yếu, có màu vàng xanh nhạt
NT6.3	1	-	2,22 a	24,44 b	chồi tương đối khỏe, có màu xanh nhạt
NT6.4	1,5	1,11	3,33 a	25,56 b	chồi khỏe, thân mập, có màu xanh nhạt, có lá hình thành.
NT6.5	2	2,22	4,44 a	36,67 a	chồi khỏe, thân mập, có màu xanh tươi, có lá hình thành
CV%				10,36	

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,05$)

Bảng 4.7 thể hiện tỷ lệ % chồi phát sinh của các mẫu thân giâm ngoài vườn ươm. Sau 15 ngày giâm, chỉ có thí nghiệm ngâm 1,5mg/l BA và 2mg/l BA là hình thành chồi. Sau 30 ngày giâm, tất cả các thí nghiệm kể cả thí nghiệm đối chứng đều đã có chồi phát sinh, tuy nhiên giữa các thí nghiệm chưa có sự khác biệt trong thống kê. Sau 90 ngày giâm, tỷ lệ % chồi phát sinh đã có sự khác biệt giữa các thí nghiệm. Cụ thể, ở thí nghiệm đối chứng (không ngâm đoạn thân giâm với BA) tỷ lệ chồi phát sinh là thấp nhất. thí nghiệm ngâm đoạn thân giâm với 2mg/l BA cho tỷ lệ chồi phát sinh đạt cao nhất 36,67%. Năm 1963 Letham và Miller đã tách được cytokinin tự nhiên ở dạng kết tinh từ hạt Ngô, sau đó người ta phát hiện ra rất nhiều loài thực vật có chứa nhóm cytokinin, tính chất sinh lý của cytokinin là kích thích phân chia tế bào, đặc biệt là phân hóa chồi nên trong thí nghiệm này, với những thí nghiệm ngâm đoạn thân giâm với chất kích thích BA nồng độ càng cao thì khả năng phân hóa chồi càng sớm và càng mạnh. Trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ mới khảo sát

đến nồng độ BA ngâm đoạn thân là 2mg/l trong 5 phút và nhận thấy đây là nồng độ tốt nhất trong nhân giống lan kim tuyến bằng phương pháp ngâm hom. Các nghiên cứu khác có thể nghiên cứu thêm nồng độ BA, chất kích thích sinh trưởng khác hoặc khảo sát thời gian ngâm đoạn thân trước khi ngâm.

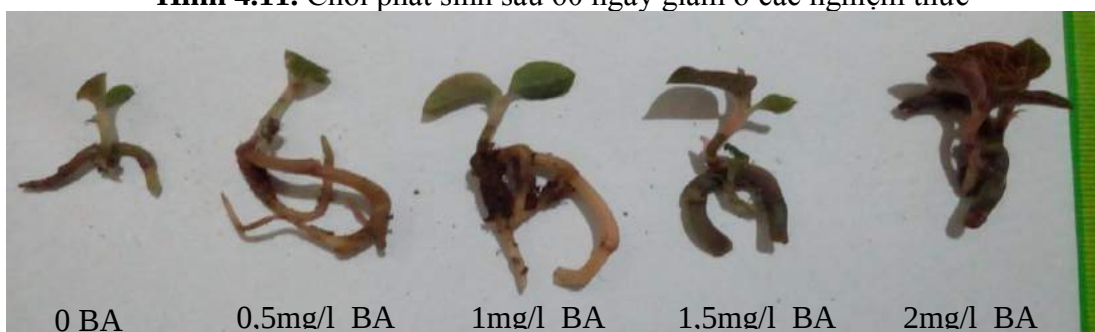
Như vậy, trong khuôn khổ nghiên cứu của đề tài, chúng tôi tiến hành nghiên cứu hai phương pháp nhân giống cây kim tuyến là phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật và phương pháp ngâm hom. Sau quá trình nghiên cứu nhận thấy, nhân giống cây kim tuyến bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật là tối ưu nhất. phương pháp nhân giống này cho hệ số nhân chồi cao nên hệ số tạo cây lớn, cây con đồng đều, khỏe mạnh, sạch bệnh. Với phương pháp này có thể đáp ứng được nguồn giống số lượng lớn, trong thời gian ngắn và điều kiện sản xuất luôn chủ động.



Hình 4.10. Hình ảnh chồi phát sinh sau 30 ngày giâm



Hình 4.11. Chồi phát sinh sau 60 ngày giâm ở các nghiệm thức



Hình 4.12. Chồi phát sinh sau 75 ngày giâm ở các nghiệm thức



Hình 4.13. Chồi phát sinh sau 90 ngày giâm ở các nghiệm thức

II. Kết quả nghiên cứu các điều kiện trồng, chăm sóc cây lan kim tuyến

1. Kết quả về ảnh hưởng khoảng cách trồng đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến

Sau khi thí nghiệm kết thúc các kết quả thu được như sau:

Bảng 4.8. Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến sinh trưởng cây Lan kim tuyến sau 180 ngày theo dõi

Thí nghiệm	Khoảng cách trồng	Chỉ tiêu theo dõi							
		Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân (mm)	Số lá	Chiều dài lá	Chiều rộng lá	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi cây (g)
NT7.1	Cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 5cm	8,79 a	3,05 a	7,59 a	3,08 a	2,48 a	4,28 a	7,37 a	5,13 a
NT7.2	Cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 10cm	7,62 b	2,53 b	6,40 b	2,61 b	2,19 b	4,21 a	6,88 a	4,44 b
NT7.3	Cây cách cây 10cm, hàng cách hàng 10cm	7,60 b	2,44 b	6,39 b	2,60 b	2,18 b	4,18 a	6,14 b	4,35 b
NT7.4	Cây cách cây 15cm, hàng cách hàng 10cm	7,02 b	2,43 b	5,87 b	2,52 b	2,13 b	4,13 a	6,00 b	4,36 b
CV%		4,75	6,10	5,64	6,20	4,23	7,28	3,03**	4,88*

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01(*)$ và có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,05(**)$).

Qua bảng 4.8 ta thấy: Ở nghiệm thức 7.1 khoảng cách cây cách cây là 5cm, hàng cách hàng là 5cm cho kết quả chiều cao cây là tốt nhất sau 180 ngày theo dõi (8,79cm). Ở khoảng cách trồng cây cách cây 15cm, hàng cách hàng 10cm cho kết quả chiều cao cây thấp nhất ở tất cả các giai đoạn. Về chỉ tiêu đường kính thân ta thấy ở nghiệm thức 7.1 khoảng cách trồng cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 5cm cho sự tăng trưởng đường kính thân là tốt nhất sau 180 ngày theo dõi.

Bảng 4.8 thể hiện tốc độ tăng trưởng cây Lan kim tuyến qua các giai đoạn thông qua sự tăng số lá, chiều dài lá và chiều rộng lá. Sau 180 ngày theo dõi số liệu được xử lý hàm Anova đơn yếu tố ta thấy

Ở nghiệm thức 7.1 khoảng cách cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 5cm có sự tăng trưởng số lá. Chiều dài lá, chiều rộng lá là lớn nhất (đạt trung bình 7,59 lá/cây, chiều dài TB 3,08cm, chiều rộng TB lá đạt 2,48cm) và sự khác biệt giữa các nghiệm thức có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,01$). Các nghiệm thức còn lại cho kết quả các chỉ tiêu theo dõi trên là thấp.

- Về số rễ ở các nghiệm thức không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê.

- Về chiều dài rễ ở nghiệm thức 7.1 cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 5cm và nghiệm thức 7.2 cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 10cm cho kết quả tốt nhất lần lượt là 7,37cm và 6,88cm.

- Về khối lượng tươi cây trung bình ở nghiệm thức 7.1 là tốt nhất (đạt trung bình 5,13g) và sự khác biệt so với các nghiệm thức còn lại là có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,05$).

Kết luận: ở khoảng cách trồng cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 5cm có tốc độ tăng trưởng cây Lan kim tuyến tối ưu nhất, các nghiên cứu khác đề nghị khảo sát thêm khoảng cách trồng nhỏ hơn 5cm x 5 cm để đánh giá thêm



NT 1

Cây cách cây 5cm, hàng cách hàng 10cm



NT 2

Cây cách cây 10cm, hàng cách hàng 10cm



NT 3

Cây cách cây 15cm, hàng cách hàng 10cm



NT 4

Cây cách cây 15cm, hàng cách hàng 15cm

Hình 4.14. Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sự tăng trưởng cây Lan kim tuyến

2. Kết quả về ảnh hưởng phân bón đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến.

Bảng 4.9. Ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng cây Lan kim tuyến sau 180 ngày theo dõi

Nghiem thức	Công thức phân bón	Chỉ tiêu theo dõi							
		Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân (mm)	Số lá	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi cây (gam)
NT8.1	60N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O	7,09 b	2,10 b	5,69 c	2,11 c	2,09 c	4,21 a	7,37 a	3,92 c
NT8.2	70N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O	7,52 b	2,27 b	6,42 bc	2,63 b	2,23 bc	4,18 a	6,52 b	4,40 bc
NT8.3	80N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O	8,81 a	2,81 a	7,89 a	3,32 a	2,74 a	4,27 a	5,47 c	5,25 a
NT8.4	90N : 40P ₂ O ₅ : 90K ₂ O	7,85 b	2,38 b	6,85 b	2,79 b	2,42 b	4,19 a	6,49 b	5,02 b
CV%		4,05	5,65	7,67	4,49	4,03	5,87	3,72	5,38

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$)

Qua bảng 4.9 ta thấy sau 180 ngày theo dõi

- Về chiều cao cây ở các chế độ phân bón khác nhau đều có sự tăng trưởng. Trong đó, Ở nghiệm thức 8.3 có chiều cao cây tốt nhất (đạt 8,81cm) so với các nghiệm thức còn lại.

- Về đường kính thân: ở nghiệm thức 8.3 có đường kính thân cây trung bình đo được đạt cao nhất là 2,81mm và có sự khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,01$) so với các nghiệm thức chế độ phân bón khác.

- Về số lá/cây ở tất cả các nghiệm thức phân bón đều có sự tăng trưởng, trong đó sự tăng số lá lớn nhất là ở nghiệm thức 8.3 (trung bình 7,89 lá). Ở nghiệm thức 8.1 có số lá trung bình trên cây thấp nhất là 5,69 lá.

- Về chỉ tiêu chiều dài lá: Ở tất cả các nghiệm thức có sự tăng trưởng về chiều dài lá tương đối thấp. Tuy nhiên, ở nghiệm thức 8.3 đạt chiều dài lá trung bình cao nhất (đạt trung bình 3,32cm) và có sự khác biệt so với các nghiệm thức khác là rất có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,01$). Ở nghiệm thức 8.1 (đối chứng) chiều dài lá trung bình đạt thấp nhất 2,11cm.

- Về chỉ tiêu chiều rộng lá: Ở tất cả các nghiệm thức, chiều rộng lá trung bình có sự tăng chậm. Ở nghiệm thức 8.3 chiều rộng lá trung bình đạt 7,74cm là tốt nhất so với các nghiệm thức còn lại.

- Về số rễ trung bình của cây Lan Kim Tuyến ở nghiệm thức khác nhau về chế độ phân bón, không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê.

- Về chỉ tiêu chiều dài rễ thì ở nghiệm thức 8.1 có chiều dài rễ lớn nhất (trung bình 7,37cm) so với các nghiệm thức phân bón khác. Nghiệm thức 8.3 có chiều dài rễ trung bình là thấp nhất (trung bình 5,47cm).

- Về chỉ tiêu khối lượng tươi sau 180 ngày trồng: Ở nghiệm thức 8.3 có khối lượng tươi trung bình/cây cao nhất (đạt 5,25g). Ở các nghiệm thức phân bón còn lại có sự chênh lệch về khối lượng tươi cây trung bình, tuy nhiên sự chênh lệch này không có ý nghĩa trong thống kê.

Kết luận, Ở công thức phân bón $80N : 40P_2O_5 : 90K_2O$ góp phần thúc đẩy sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến là tốt nhất. Ở công thức phân bón này, cây Lan Kim Tuyến sinh trưởng mạnh, đồng đều về chiều cao cây, số lá, diện tích lá, số rễ và sự tăng sinh khối là tốt nhất.



NT 8.1
60N : 40P₂O₅ : 90K₂O (đối chứng)



NT 8.2
70N : 40P₂O₅ : 90K₂O



NT 8.3
80N : 40P₂O₅ : 90K₂O



NT 8.4
90N : 40P₂O₅ : 90K₂O

Hình 4.15: Ảnh hưởng của phân bón đến sự sinh trưởng của cây Lan Kim Tuyến

3. Kết quả về ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến trồng ngoài thực địa

Bảng 4.10. Ảnh hưởng của các loại giá thể trồng đến sinh trưởng cây Lan kim tuyến.

Thí nghiệm	Công thức giá thể	Chỉ tiêu theo dõi							
		Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân (mm)	Số lá	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi cây (g)
NT9.1	100% sơ dừa	7,20 c	2,39 c	5,28 c	2,60 d	2,08 d	4,15 d	6,47 d	4,46 e
NT9.2	100% đất mùn từ lá, thân cây mục	7,61 bc	2,43 bc	6,20 bc	2,65 cd	2,13 cd	4,18 cd	6,59 cd	4,64 d
NT9.3	1/2 sơ dừa + 1/2 đất mùn từ lá, thân cây mục	8,17 b	2,63 b	6,70 b	2,77 b	2,37 b	4,25 b	7,23 a	5,12 b
NT9.4	1/2 sơ dừa + 1/2 phân chuồng	8,14 b	2,63 b	6,33 bc	2,71 bc	2,19 c	4,21 bc	6,88 b	4,99 c
NT9.5	1/2 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/2 phân chuồng	8,04 b	2,54 bc	6,26 bc	2,67 cd	2,17 cd	4,19 cd	6,71 bc	4,74 d
NT9.6	1/3 sơ dừa + 1/3 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/3 phân chuồng	8,87 a	2,87 a	7,78 a	2,90 a	2,54 a	4,31 a	7,20 a	5,23 a
CV%		8,17	6,46	6,41	8,04	8,65	8,41	8,17	7,82

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$)

Sau khi xử lý hàm Anova một yếu tố các nghiệm thức bố trí trên các loại giá thể trồng khác nhau theo dõi trong 180 ngày trồng thể hiện trong bảng 4.10 ta thấy:

- Ở nghiệm thức 9.6 (1/3 xơ dừa + 1/3 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/3 phân chuồng) cho kết quả về các chỉ tiêu theo dõi đạt cao nhất về tất cả các chỉ tiêu theo dõi cụ thể về chiều cao TB đạt 8,87cm; đường kính thân TB đạt 2,87mm; số lá TB đạt 7,78 lá; chiều dài lá TB đạt 2,90 cm; chiều rộng lá TB đạt 2,54cm; số rễ TB đạt 4,31 rễ/cây; chiều dài rễ TB 7,20cm và khối lượng tươi TB của cây đạt 5,23g) và có sự khác biệt so với các nghiệm thức còn lại, rất có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,01$). nhận xét cảm quan ta thấy, cây trong nghiệm thức 10.6 sinh trưởng tốt, thân mập, khỏe, màu sắc lá đậm, ánh tím như giống khảo sát ngoài tự nhiên, cây phát triển đồng đều.

- Nghiệm thức 9.1: 100% xơ dừa có tốc độ tăng trưởng về các chỉ tiêu theo dõi là thấp nhất cụ thể về chiều cao TB đạt 7,20cm; đường kính thân TB đạt 2,39mm; số lá TB đạt 5,28 lá; chiều dài lá TB đạt 2,60 cm; chiều rộng lá TB đạt 2,08cm; số rễ TB đạt 4,15 rễ/cây; chiều dài rễ TB 6,47cm và khối lượng tươi TB của cây đạt 4,46g). Nhận xét cảm quan ta thấy, cây trong nghiệm thức 9.1 giai đoạn đầu phát triển tốt như sau 180 ngày theo dõi, cây còi, lá vàng xanh nhạt không giống màu cây ngoài tự nhiên, cây yếu, khối lượng tươi cây thấp.

Kết luận, với loại giá thể 1/3 xơ dừa + 1/3 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/3 phân chuồng là phù hợp nhất cho sự sinh trưởng của Lan kim tuyến. Với loại giá thể này đảm bảo giữ được ẩm độ phù hợp với cây Lan kim tuyến, đồng thời cung cấp các chất hữu cơ cần thiết và phù hợp cho cây sinh trưởng nhanh, cây khỏe, ít sâu bệnh.



NT 9.1
100% xơ dừa



NT 9.2
100% đất mùn từ lá, thân cây mục



NT 9.3
1/2 xơ dừa + 1/2 đất mùn từ lá, thân cây mục



NT 9.4
1/2 xơ dừa + 1/2 phân chuồng



NT 9.5
1/2 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/2 phân chuồng



NT 9.6
1/3 xơ dừa + 1/3 đất mùn từ lá, thân cây mục + 1/3 phân chuồng

Hình 4.16. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự sinh trưởng của Lan kim tuyến

4. Kết quả về ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến trồng ngoài thực địa

Bảng 4.11. Ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sinh trưởng của cây Lan kim tuyến sau 180 ngày theo dõi

Thí nghiệm	Chế độ ánh sáng	Các chỉ tiêu theo dõi							
		Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân (mm)	Số lá	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi cây (g)
NT10.1	Ánh sáng tự nhiên không che lưới cản quang (đối chứng),	7,10 d	180 NST	6,48 b	2,60 c	2,12 b	4,00 a	6,27 b	4,38 b
NT10.2	che lưới cản quang 25% ánh sáng tự nhiên.	7,46 c	2,45 b	6,68 ab	2,71 b	2,15 b	4,16 a	6,64 ab	4,36 b
NT10.3	che lưới cản quang 50% ánh sáng tự nhiên.	8,73 a	2,64 b	7,25 a	2,90 a	2,53 a	4,32 a	7,19 a	5,09 a
NT10.4	che lưới cản quang 75% ánh sáng tự nhiên.	8,04 b	2,87 a	6,45 b	2,54 c	2,13 b	4,08 a	5,83 b	4,13 b
CV%		8,32	2,60 b	9,90	10,21	4,62	6,01	7,59	8,85

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình không cùng ký tự thì khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê (sự khác biệt ở mức $\alpha = 0,01$)

Tốc độ tăng trưởng cây Lan kim tuyến sau 180 ngày theo dõi thể hiện thông qua các chỉ tiêu theo dõi, kết quả phân tích thống kê hàm Anova một yếu tố được trình bày tại bảng 4.11 cho thấy:

- Về chiều cao cây: ở nghiệm thức 10.3 - che 50% ánh sáng tự nhiên lại có tốc độ tăng trưởng về chiều cao cây vượt trội và đạt tốt nhất (chiều cao cây trung bình đạt 8,73cm). Ở nghiệm thức 10.1 - không che sáng, tốc độ tăng trưởng về chiều cao cao đạt thấp nhất (trung bình 7,10cm).

- Về đường kính thân: ở nghiệm thức 10.3 - che 50% ánh sáng tự nhiên có tốc độ tăng trưởng về đường kính thân luôn đạt cao nhất ở tất cả các giai đoạn theo dõi (đường kính thân trung bình đạt 2,87mm sau 180 ngày theo dõi). Ở nghiệm thức 10.1 – không che sáng, sự tăng trưởng về đường kính thân cây rất chậm và đạt thấp nhất ở tất cả các giai đoạn (trung bình đạt 2,45mm sau 180 ngày theo dõi).

- Về số lá: Ở tất cả các nghiệm thức chế độ che sáng, tốc độ tăng trưởng về số lá tương đối chậm. Ở nghiệm thức 10.3 - che 50% ánh sáng tự nhiên có sự tăng trưởng về số lá tốt nhất (đạt trung bình 7,25 lá/cây), tiếp theo là nghiệm thức 10.2 - che 25% ánh sáng tự nhiên (đạt trung bình 6,68 lá/cây). Tuy nhiên, sự tăng trưởng về số lá của hai nghiệm thức trên không có sự khác biệt trong thống kê.

- Về chiều dài lá: Ở nghiệm thức 10.3 có sự tăng trưởng về chiều dài lá tốt nhất (trung bình đạt 2,90cm sau 180 ngày theo dõi). Ở nghiệm thức 10.4 - che 75% ánh sáng tự nhiên có sự tăng trưởng về chiều dài lá là thấp nhất (trung bình đạt 2,54cm sau 180 ngày theo dõi).

- Về chiều rộng lá: Ở nghiệm thức 10.3 có sự tăng trưởng về chiều rộng lá là tốt nhất (trung bình đạt 2,53cm).

- Về số rễ: chế độ che sáng ảnh hưởng như nhau đến khả năng hình thành rễ của các nghiệm thức, thể hiện ở số liệu thống kê sau phân tích là không có sự khác biệt.

- Về chiều dài rễ: Ở nghiệm thức 10.3 sự tăng trưởng về chiều dài rễ đạt tốt nhất (trung bình rễ dài 7,19cm sau 180 ngày theo dõi), nghiệm thức 10.2 có sự tăng trưởng chiều dài rễ tốt (trung bình rễ dài 6,64cm) và sự khác biệt về chiều dài rễ giữa hai nghiệm thức 10.3 và 10.2 không có ý nghĩa trong thống kê. Ở nghiệm thức 10.4 có sự tăng trưởng về chiều dài rễ đạt thấp nhất (trung bình 5,83cm). Tuy nhiên, sự khác biệt

về chiều dài rễ giữa nghiệm thức 10.1, 10.4 và nghiệm thức 10.3 là rất có ý nghĩa trong thống kê ($\alpha \leq 0,01$).

- Về khối lượng tươi cây sự tăng trưởng về khối lượng tươi cây ở nghiệm thức 10.3 - che sáng 50% đạt tốt nhất (trung bình 5,09 gam/cây). Các nghiệm thức còn lại không có sự khác biệt mang ý nghĩa trong thống kê.

Kết luận, cường độ ánh sáng cũng có tác động không nhỏ đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến. Ở chế độ che 50% ánh sáng (khoảng 900lux) cây Lan kim tuyến có tốc độ sinh trưởng mạnh nhất, cây to khỏe, cây sinh trưởng hài hòa giữa thân, lá và rễ.



NT 10.1
100% ánh sáng tự nhiên



NT 10.2
Che 25% ánh sáng tự nhiên



NT 10.2
Che 50% ánh sáng tự nhiên



NT 10.2
Che 75% ánh sáng tự nhiên

Hình 4.17. Ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sinh trưởng của cây Lan kim tuyến

III. Kết quả điều tra đánh và các cách phòng trừ sâu bệnh hại trên cây lan kim tuyến

Trong quá trình làm các thí nghiệm trồng và chăm sóc cây Lan Kim tuyến, tiến hành theo dõi tình hình sâu bệnh hại trên cây và các biện pháp phòng trừ.

1. Một số đối tượng gây hại trên cây lan kim tuyến

1.1. Sâu khoang

Đặc điểm hình thái

- Ngài có vỏ màu xanh bạc, cánh trước có vân ngang bạc trắng óng ánh.
- Trứng hình bán cầu, mới đẻ màu trắng vàng sau màu tro tối, xếp với nhau thành ổ màu nâu vàng.
- Sâu non màu nâu đen, nâu tối. Đốt bụng thứ nhất có một vết đen to bao quang, sâu non có 6 tuổi, tuổi 1 dài 3-5 mm, tuổi 6 dài 35-50mm.
- Nhộng màu nâu tươi, cuối bụng có một đôi gai ngắn.

Đặc điểm sinh học và quy luật phát triển

- Ngài hoạt động mạnh từ nửa đêm về trước có su tính ánh sáng bước sóng ngắn và mùi chua ngọt.
- Ngài đẻ trứng thành ổ trên lá.
- Sâu non mới nở tập trung ở mặt dưới lá ăn hết thịt lá chừa lại biểu bì và gân lá.
- Ở tuổi 3-4 sâu phân tán và cắn khuyết lá hoặc có khi cắn trụi lá, cành hoa mù quả. Khi đầy sức sâu chui xuống đất làm kén và hoá nhộng.
- Thời gian phát dục của trứng: 3-7 ngày; sâu non: 12-27 ngày; Nhộng: 8-10 ngày.

Biện pháp phòng trừ

- Điều tra phát hiện sớm sự gây hại của sâu khoang, diệt sâu bằng ngắt ổ trứng hoặc bắt tay với sâu tuổi lớn.
- Phun thuốc BVTV khi cần thiết. Sử dụng các loại thuốc trừ sâu sinh học...

1.2. Rệp nâu

Đặc điểm sinh học và quy luật phát triển

- Rệp trưởng thành và rệp non bám vào lá, thân, cành, hoa, quả để hút nhựa cây, cây bị nặng lá quăn queo, lá vàng, ngọn rụng lại; nhiệt độ thích hợp cho rệp sinh trưởng từ 14 - 15°C.

Biện pháp phòng trừ

- Chăm sóc cây ngay từ khi mới trồng.
- Phát hiện rệp sớm, có thể phun thuốc BVTV (penattyl,...).

1.3. Nhện đỏ

Đặc điểm hình thái và quy luật phát triển

Thành trùng hình bầu dục, thân rất nhỏ khoảng 0,4 mm, thành trùng đực có kích thước nhỏ, khoảng 0,3 mm. Toàn thân phủ lông thưa và thường có màu xanh, trắng hay đỏ với đốm đen ở 2 bên thân mình.

Nhện có 8 chân, thành trùng cái màu vàng nhạt hay hơi ngả sang màu xanh lá cây. Nhìn xuyên qua cơ thể có thể thấy được hai đốm màu đậm bên trong, đó là nơi chứa thức ăn. Sau khi bắt cặp, thành trùng cái bắt đầu đẻ trứng từ 2 - 6 ngày, mỗi nhện cái đẻ khoảng 70 trứng.



Hình 4.18. Nhện đỏ đang đẻ trứng

Trứng rất nhỏ, hình cầu, bóng láng và được gắn chặt vào mặt dưới của lá, thường là ở những nơi có tơ do nhện tạo ra trong khi di chuyển. Khoảng 4 - 5 ngày sau trứng nở.

Ấu trùng nhện đỏ rất giống thành trùng nhưng chỉ có 3 đôi chân. Những ấu trùng sẽ nở ra thành trùng cái thay da 3 lần trong khi những ấu trùng sẽ nở ra thành trùng đực thay da chỉ có 2 lần. Giai đoạn ấu trùng phát triển từ 5 - 10 ngày.

Nhện đỏ hoàn tất một thế hệ từ 20 - 40 ngày.

Triệu chứng gây hại

Nhện di chuyển rất nhanh và nhả tơ mỏng bao thành một lớp ở mặt dưới lá nên trông lá có màu trắng dơ do lớp da để lại sau khi lột cùng với bụi và những tạp chất khác. Cả ấu trùng và thành trùng nhện đỏ đều chích hút mô của lá cây làm cây bị mất màu xanh và có màu vàng và sau cùng lá sẽ bị khô đi. Màu vàng của lá dễ nhìn thấy nhất là ở mặt dưới lá.

Biện pháp phòng trừ

Nhện đỏ rất khó trị vì rất nhỏ và thường sống ở gần gân lá, nơi thuốc trừ sâu rất khó tiếp xúc, hơn nữa, nhện tạo lập quần thể rất nhanh nên mật số tăng nhanh và nhiều. Có thể sử dụng các loại thuốc trừ nhện (confidor + dầu khoáng ...) nhưng phải để ý đến quần thể thiên địch.

1.4. Chuột

Chuột thường phá hại cây vào buổi tối và sáng sớm. Ở những khu vực trồng thường có chuột xuất hiện, tổn thất do chuột gây ra đối với vườn trồng Lan kim tuyến rất nặng. Nếu không có biện pháp ngăn chặn kịp thời có thể làm tổn thất 100% vườn trồng trong vài ngày.

Biện pháp phòng trừ

- Càn rào vườn bằng lưới kín để chuột không vào được, thường xuyên thăm vườn để phát hiện sớm và ngăn chặn kịp thời.
- Phun hoặc rải thuốc diệt chuột ở quanh vườn vài tại các góc nếu phát hiện khu vực vườn có chuột phá hại.

1.5. Ốc sên

Đặc điểm hình thái

- Thành trùng ốc sên có vỏ với cứng (calcium) màu nâu vàng, xám hoặc đen, hình hơi tròn và có vòng xoắn.

- Trứng ốc sên có vỏ nâu hình cầu có đường kính 1,9 – 2,1mm màu trắng sữa, vỏ ngoài trơn và bóng. Trứng được đẻ thành từng ổ và được đẻ sâu trong lớp giá thể.



Hình 4.19. Lan Kim tuyến bị ốc sên gây hại

Đặc điểm sinh học và quy luật phát triển

- Ốc sên thường hoạt động và gây hại vào ban đêm và những ngày u ám có mưa.
- Trên Lan Kim tuyến ốc sên thường cắn đứt ngang thân cây và ăn sạch lá và ngọn cây.

Biện pháp phòng trừ

- Xử lý tốt giá thể nhằm hạn chế các ổ trứng ốc sên.
- Rải thuốc trị ốc thường xuyên trong quá trình trồng.

2. Bệnh hại trên cây lan kim tuyến

2.1. Nấm bệnh, vàng lá

Triệu chứng

Là bệnh do các loại nấm ký sinh trên cây gây ra. Nấm bệnh tấn công và hủy các tế bào lá cây nên lá mất khả năng quang hợp và bị vàng. Lâu dần cây sẽ chết.

Biện pháp quản lý

- Nguồn cây con sạch bệnh, cây giống không bị nhiễm nấm bệnh

- Nhổ triệt để cây bị bệnh nếu phát hiện, tiêu hủy nơi xa.

- Không bón, phân chuồng tươi, nước có nguồn bệnh.

- Sử dụng các loại thuốc như Ridomil, daconil, mancozec... phun định kỳ để phòng bệnh.



Hình 4.20. Lan Kim Tuyến bị nấm bệnh, vàng lá

2.2. Chết rục, thối thân

Triệu chứng và đặc điểm lây lan

Cây héo đột ngột, lá vẫn còn xanh, cây bị thối ngang thân

Là bệnh do vi khuẩn gây nên, vi khuẩn thích hợp trong điều kiện nhiệt độ 27-27⁰C, xâm nhập qua vết thương vào cây.



Hình 4.21. Lan Kim Tuyến bị chết rục, thối thân

Biện pháp quản lý

Nguồn cây con sạch bệnh: Kỹ thuật làm vườn ươm phải đảm bảo hạt giống sạch bệnh, trồng trên đất vụ trước không bị bệnh hoặc không trồng cây họ cà.

- Nhổ triệt để cây bị bệnh nếu phát hiện, tiêu huỷ nơi xa.
- Đất ruộng chưa có thể bón vôi bột (20kg/sào) khi làm đất.
- Không bón, phân chuồng tươi, nước có nguồn bệnh.
- Không để giống trên ruộng đã bị bệnh.

CHƯƠNG 7. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT HÓA HỌC

1. Kết quả định tính các nhóm chất bằng phương pháp phản ứng ống nghiệm

Bảng 4.12. Định tính bằng phản ứng hóa học mẫu lan kim tuyến

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả		Kết luận
			M1 (Tự nhiên)	M2 (nuôi trồng)	
1	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin		++	Có
		Phản ứng với NaOH 10%	+	++	Có
		Phản ứng với FeCl ₃ 5%	+	++	Có
		Phản ứng Diazo	+	+	Có
2	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	+	+	Có
3	Acid amin	Phản ứng với TT Ninhydrin	++	++	Có
4	Coumarin	Phản ứng mở đóng vòng lacton	-	-	Không
5	Alkaloid	Phản ứng với TT. Mayer	-	-	Không
		Phản ứng với TT. Dragendorff	-	-	

Ghi chú:-: Phản ứng âm tính +: Phản ứng dương tính ++: Phản ứng dương tính rõ

Kết luận: Cả 02 mẫu Lan kim tuyến (tự nhiên và nuôi trồng ngoài thực địa) đều có các nhóm chất flavonoid, saponin và acid amin; không có nhóm chất coumarin và alkaloid. Trong đó nhóm flavonoid mẫu nuôi trồng nhiều hơn mẫu tự nhiên.

2. Kết quả định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng sắc ký lớp mỏng

Kết quả định tính bằng phản ứng ống nghiệm cho thấy, trong dược liệu lan kim tuyến có chứa có các nhóm chất flavonoid, saponin và acid amin, chúng tôi tiếp tục tiến hành định tính các nhóm chất bằng sắc ký lớp mỏng.

2.1. Định tính nhóm flavonoid

Kết quả định tính nhóm flavonoid trong dược liệu lan kim tuyến được thể hiện trong hình 4.22

Hệ dung môi triển khai: Toluen: ethyl acetat: aceton: acid formic (5:2:2:1)

Thuốc thử nhận biết: Hỗn hợp dung dịch *acid boric 10% trong nước và acid oxalic 10 %* trong nước tỷ lệ 2: 1.

Dấu hiệu nhận biết: Nhóm flavonoid cho các vết phát quang màu xanh nón chuối khi quan sát bản mỏng dưới UV 366nm sau khi phun thuốc thử.

M1, M2: Các mẫu Lan kim tuyến gửi

C: Chất đối chiếu Quercetin

2.2. Định tính nhóm terpenoid

Kết quả định tính terpenoid trong dược liệu lan kim tuyến được thể hiện trong hình 4.23

Hệ dung môi triển khai: Cloroform: methanol: nước (65:35:10), lấy phân lớp dưới

Thuốc thử nhận biết: dung dịch anisaldehyd/acid sulfuric.

Dấu hiệu nhận biết: Nhóm terpenoid – glycoside cho các vết màu hồng đến tím (quan sát ở ánh sáng thường – Hình 2.A) và tím đến vàng (quan sát ở UV 366 nm – Hình 2.B) sau khi phun thuốc thử.

Chú thích: **M1, M2:** Các mẫu Lan kim tuyến gửi.

2.3. Định tính acid amin

Kết quả định tính acid amin trong dược liệu lan kim tuyến được thể hiện trong hình 4.24.

Hệ dung môi triển khai: *n*-propanol-ethyl acetat-acid formic - H₂O (4 :2 :1 :2)

Thuốc thử nhận biết: dung dịch ninhydrin.

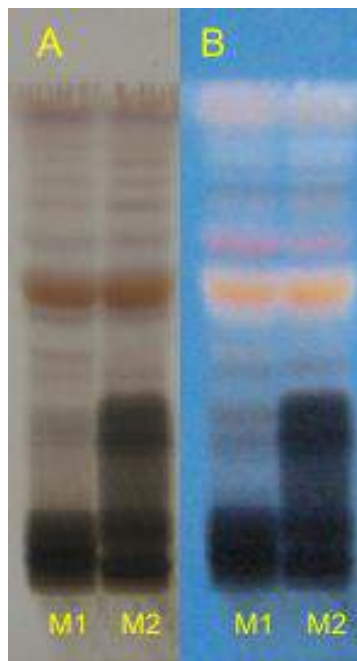
Dấu hiệu nhận biết: Nhóm acid amin cho sắc ký đồ có các vết màu hồng đến tím quan sát ở ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử.

Chú thích:

M1, M2: Các mẫu Lan kim tuyến gửi.



Hình 4.22. Sắc ký đồ định tính thành phần flavonoid



Hình 4.23. Sắc ký đồ định tính thành phần terpenoid



Hình 4.24. Sắc ký đồ định tính thành phần acid amin

2.4. Định lượng flavonoid tổng số trong lan kim tuyến

Nhóm nghiên cứu đã xác định được trong mẫu lan kim tuyến nghiên cứu (cả mẫu tự nhiên và nuôi trồng) đều có các nhóm chất chính: flavonoid, triterpenoid-glycosid, acid amin như tài liệu tham khảo đã công bố cho loài *Anoectochilus roxburghii*. Không có nhóm chất alkaloid, coumarin. Nhìn chung, giữa mẫu tự nhiên và mẫu nuôi trồng các nhóm chất không có sự khác biệt, riêng nhóm flavonoid mẫu nuôi trồng ngoài thực địa có hàm lượng dược chất cao hơn nhiều so với mẫu ngoài tự nhiên (1,2%) so với 0,31 %. Có thể, mẫu tự nhiên khi thu hái chúng ta không biết mẫu già hay non, đã tích lũy đủ hoạt chất chưa vì vậy mà hàm lượng dược chất biến động. Mẫu nuôi trồng ngoài thực địa được chăm sóc trong điều kiện phù hợp, được cung cấp đủ chất dinh dưỡng và thu hái vào thời điểm đã tích lũy đủ dược chất nên hàm lượng cao.

Như đã trình bày ở phần tổng quan, cũng như trong phần thực nghiệm cho thấy flavonoid là nhóm hoạt chất chính trong lan kim tuyến, là nhóm chất có nhiều tác dụng quý có ý nghĩa dược học: Tác dụng chống oxy hóa (tác dụng thải độc cho cơ thể), bảo vệ gan,...

3. Một số tác dụng dược học của nhóm flavonoid đã được công bố

3.1. Tác dụng chống oxy hóa

Flavonoid có nhiều tính chất hoá sinh, nhưng tính chất được mô tả nhiều là khả năng chống oxy hoá. Khả năng chống oxy hoá phụ thuộc vào sự sắp xếp của nhóm chức năng trên cấu trúc nhân. Cấu hình, các nhóm thế, và tổng nhóm hydroxyl về căn bản ảnh hưởng đến cơ chế chống oxy hoá như dọn gốc tự do và khả năng tạo phức chelat ion kim loại. Với khả năng này, Trong cơ thể flavonoid chúng giúp trung hòa các phân tử có chứa oxy phản ứng quá mức và ngăn ngừa các phân tử đó gây hại cho tế bào, do đó ngăn ngừa nguy cơ gây bệnh như viêm, tim mạch,... Một số các flavonoid đã được chứng có tác dụng chống oxy hóa mạnh như quercetin; kaempferol,...[36]

3.2. Tác dụng chống viêm, chống ung thư và bệnh tim mạch

Nhiều flavonoid được báo cáo có tác dụng chống viêm, chống ung thư và bệnh tim mạch ví dụ: quercetin, rutin và morin và các flavanon (hesperetin và hesperidin) có tác dụng chống viêm cấp và mãn trên mô hình động vật [22]. Quercetin, rutin được sử dụng làm dược phẩm để điều trị bệnh dễ vỡ mao mạch và xơ vữa tĩnh mạch. Tác dụng của flavonoid là ức chế tính thấm mao mạch, theo trật tự sau: hesperetin > rutin > quercetin > naringetin > kaempferol > isoquercetin. Tangeratin, hesperidin, quercetin và rutin làm giảm kết tụ hồng cầu ngưng. Quercetin cũng được báo cáo ức chế kết tụ hồng cầu người [30]. Quercetin có tác dụng ngừng lại chu kỳ tế bào trong quá trình tăng sinh tế bào lympho. Thêm vào nữa, nó ức chế phát triển vài dòng tế bào ung thư ác tính trên *in vitro* như: tế bào bạch cầu, tế bào ung thư dạ dày, tế bào ung thư ruột kết, tế bào ung thư vú, buồng trứng...[37].

4. Tác dụng của nhóm acid amin

Acid amin là một trong những nhóm phổ biến của dược liệu, tùy từng loại dược liệu mà thành phần acid amin khác nhau. Acid amin trong dược liệu lan kim tuyến là nhóm chất cung cấp dinh dưỡng, bồi bổ cơ thể. Trong nghiên cứu này chúng ta thấy nhóm acid amin khá nhiều trong lan kim tuyến. Vì vậy trên thị trường hiện nay, sản phẩm thực phẩm chức năng có thành phần lan kim tuyến như “Kim tuyến bian T; Kim tuyến gold” của công ty cây thuốc việt đều dùng với công dụng bồi bổ cơ thể, nâng cao sức đề kháng...

CHƯƠNG 8. ĐÁNH GIÁ VỀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA ĐỀ TÀI

1. Đánh giá chung về kết quả triển khai thực hiện đề tài

Đến nay, cơ quan chủ trì và chủ nhiệm đề tài đã tổ chức triển khai đề tài đảm bảo theo đúng thời gian, mục tiêu, nội dung và khối lượng sản phẩm theo Thuyết minh đề cương đã duyệt và Hợp đồng đã ký kết.

Đề tài đã hoàn thành các nội dung chính như điều tra, khảo sát hiện trạng phân bố lan kim tuyến trong tự nhiên; mô tả đặc điểm hình thái của cây lan kim tuyến phân bố trên địa bàn tỉnh Kon Tum; nghiên cứu sản xuất và xây dựng các quy trình kỹ thuật nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô; nghiên cứu trồng thử nghiệm và xây dựng quy trình kỹ thuật trồng và chăm sóc cây lan kim tuyến.

Một số sản phẩm khoa học của đề tài đã vượt so với kế hoạch đề ra. Đặc biệt, kết quả của đề tài đang được cơ quan chủ trì triển khai ứng dụng và nhân rộng. Đến thời điểm hiện nay, Trung tâm Ứng dụng tiến bộ khoa học và công nghệ đã làm chủ được các quy trình kỹ thuật sản xuất giống cũng như quy trình trồng và chăm sóc cây lan kim tuyến, có thể áp dụng vào nhân giống và phát triển mô hình sản xuất trên địa bàn tỉnh.

2. Phương án duy trì và nhân rộng kết quả của đề tài

2.1. Khả năng duy trì và nhân rộng

Hiện nay, cây lan kim tuyến là loại cây trồng hiện đang được chính cơ quan chủ trì, doanh nghiệp, người dân mở rộng sản xuất nên kết quả của đề tài có khả năng duy trì và nhân rộng.

Đề tài được thực hiện trên cơ sở nhu cầu phát triển sản xuất cây lan kim tuyến, có vận dụng khoa học vào điều kiện thực tế tại địa phương; triển khai tại vùng có đất đai, khí hậu phù hợp, sản phẩm có thị trường tiêu thụ tại chỗ, do đó có tính khả thi và ứng dụng cao.

Các quy trình kỹ thuật đã được nghiên cứu, thử nghiệm, có tính ổn định nên việc mở rộng quy mô sản xuất là hoàn toàn khả thi.

Hiện tại, đơn vị chủ trì đã sẵn có phòng thí nghiệm, nhà ươm nhân giống, với đầy đủ trang thiết bị; cùng với chủ trương đầu tư, phát triển cây dược liệu của địa phương nên việc duy trì, nhân rộng kết quả đề tài là có cơ sở thực hiện. Dự kiến quy

mô nhân rộng trong thời gian đến có thể sản xuất lên đến vài trăm ngàn cây giống mỗi năm.

2.2. Phương án duy trì và nhân rộng

Cây lan kim tuyến là cây có thể trồng được nhiều nơi trên khắp cả nước nên việc sản xuất và cung cấp giống cho trong và ngoài tỉnh là rất khả thi. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu-triển khai đề tài, chúng tôi đề xuất phương án duy trì, nhân rộng như sau:

➤ Quan điểm chung

- Coi lan kim tuyến là cây dược liệu, cây hàng hóa có giá trị, có thể phát triển sản xuất ở quy mô lớn; góp phần chuyển đổi cơ cấu cây trồng; đa dạng hóa sản phẩm nông nghiệp; nâng cao thu nhập cho người dân.

- Phát triển mô hình sản xuất cây giống lan kim tuyến gắn với việc ứng dụng các tiến bộ khoa học kỹ thuật giảm thời gian nuôi cấy; tạo số lượng cây giống lớn đảm bảo chất lượng.

- Chú trọng và sẵn sàng tác đào tạo, tập huấn kỹ thuật cho người dân; xem đội ngũ cán bộ kỹ thuật, các doanh nghiệp, các hộ có kinh nghiệm sản xuất là lực lượng nòng cốt để duy trì, nhân rộng đề tài.

- Do điều kiện kinh tế và đời sống của đa số bộ phận dân cư tại địa bàn triển khai đang còn gặp nhiều khó khăn nên cần có sự hỗ trợ của nhà nước, đặc biệt là giống, kỹ thuật) để tạo điều kiện cho người dân phát triển sản xuất, nhân rộng mô hình.

➤ Một số nhiệm vụ và giải pháp

- Tăng cường công tác thông tin, tuyên truyền nhằm giới thiệu kết quả đề tài; đồng thời vận động nhân dân áp dụng khoa học kỹ thuật, thâm canh trong sản xuất.

- Lựa chọn, quy hoạch vùng sản xuất lan kim tuyến thích hợp, gắn với các đối tượng cây trồng khác. Tùy theo điều kiện có thể lựa chọn phương thức trồng cho phù hợp.

- Tập trung giải quyết vấn đề về phân tích và làm rõ hoạt chất mang tính dược liệu của cây để đảm bảo về tính cần thiết phát triển và định hướng tạo sản phẩm cuối cùng.

- Tiếp tục tập huấn kỹ thuật, đào tạo, tăng cường vai trò của đội ngũ kỹ thuật viên cơ sở để làm lực lượng nòng cốt cho triển khai nhân rộng.

- Thông qua các chương trình, có chính sách hỗ trợ giống, vật tư, phân bón cho đối tượng còn khó khăn để nhân rộng mô hình.

- Về thị trường: tập trung chiếm lĩnh thị trường trong tỉnh bằng chất lượng và giá thành sản phẩm; từng bước mở rộng thị trường ngoài tỉnh thông qua hợp tác với các doanh nghiệp, các cơ sở bán buôn, chế biến; tiến tới liên doanh, liên kết với các doanh nghiệp tạo lập thị trường xuất khẩu.

➤ **Tổ chức thực hiện**

- Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn sớm ban hành quy trình kỹ thuật nhân giống, sản xuất cây Sâm dây áp dụng trên địa bàn tỉnh.

- Cơ quan chủ trì đề tài, cùng với các đơn vị khác như Trung tâm khuyến nông, Phòng Nông nghiệp các huyện, các cơ quan đoàn thể tổ chức nhân rộng kết quả của đề tài. Trong đó, cơ quan chủ trì sẽ tiếp tục hỗ trợ về kỹ thuật; chính quyền xã và các phòng chức năng của huyện là đơn vị tuyên truyền, tổ chức sản xuất; các cơ quan quản lý nhà nước, các đơn vị trên địa bàn huyện lồng ghép các mô hình gắn với các chương trình mục tiêu, đi đôi với xây dựng các chính sách để hỗ trợ nhân dân phát triển sản xuất.

- Các cơ quan thông tin đại chúng như Đài phát thanh và truyền hình tỉnh, báo Kon Tum tăng cường công tác thông tin tuyên truyền kết quả đề tài; ngoài ra thông qua các trang thông tin điện tử của tỉnh; của các Sở, ngành; UBND các huyện, thành phố để giới thiệu mô hình phát triển cây lan kim tuyến.

3. Đánh giá về tác động của đề tài

3.1. Về công tác đào tạo, tập huấn

Thông qua đề tài đội ngũ cán bộ kỹ thuật của cơ quan chủ trì được tiếp cận với công tác nghiên cứu, ứng dụng và làm chủ được các quy trình kỹ thuật nhân giống; trồng và chăm sóc cây lan kim tuyến. Đây là cơ sở, để đề tài được tiếp tục duy trì, nhân rộng sau này.

3.2. Về hiệu quả kinh tế- xã hội

➤ **Về hiệu quả kinh tế**

Trong quá trình triển khai thực hiện và theo dõi chúng tôi nhận thấy việc sản xuất giống cây kim tuyến bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể tạo được nguồn giống lớn,

sạch bệnh, cây khỏe mạnh mà thị trường đang cần mang lại lợi ích lớn về mặt kinh tế; ngoài ra với giá bán cây thương phẩm hiện có trên thị trường là từ 1,2 – 1,5 triệu đồng/kg tươi, lan kim tuyến hiện đang là đối tượng cây trồng mang lại hiệu quả kinh tế cao.

Tính toán sơ bộ hiệu quả kinh tế trong sản xuất cây giống lan kim tuyến, cho kết quả sau: Từ bố trí thí nghiệm về mật độ chúng tôi nhận thấy mật 400 cây/m² là thích hợp nhất cho việc trồng sản xuất và chúng tôi bố trí trồng sản xuất trên 20 m² để tạm tính hiệu quả kinh tế của mô hình:

- + Tổng số cây trồng: 20m² x 400 cây/ 1m² = 8.000 cây
- + Tổng lượng giá thể: Cao 0,2m x rộng 1m x dài 20m = 4m³ giá thể
- + Tỷ lệ % cây thu hoạch: = 8.000 cây x 80% = 6.800 cây
- + Trọng lượng cây tươi: 150 cây/ 1kg tươi
- + Giá bán: 1.200.000đ/ 1kg cây tươi

Bảng 4.13. Hiệu quả kinh tế mô hình trồng cây lan kim tuyến

TT	Khoản mục	ĐVT	Số lượng	Đơn giá (1.000 đ)	Thành tiền (1.000 đ)
A	Tổng cộng chi phí (A1+A2+A3)				32.994
A1	Công lao động trực tiếp				
	- Công xử lý giá thể	Công	2	150	300
	- Làm đất	Công	2	150	300
	- Công trồng	Công	1	150	150
	- Chăm sóc (500.000đ/tháng)	Tháng	12	500	6.000
	- Thu hoạch	Công	1	150	150
A2	Nguyên vật liệu				26.094
	Giống Lan Kim tuyến	Cây	8.000	2.5	20.000
	Lân	kg	7	4	28
	Urê	kg	1,5	12	18
	Kali	kg	1,5	12	18
	Vôi	kg	5	4	20
	Thuốc BVTV				200
	Khác				500

	Xơ dừa	m ³	1,3	900	1.170
	Phân bò	m ³	1,3	600	780
	Điện nước				2.000
A3	Khấu hao, vật tư, thiết bị, nhà xưởng				1.360
B	Tổng giá trị thu nhập				
	Cây lan kim tuyến thương phẩm	kg	42,66	1.200	51.192
C	Lợi nhuận ròng không tính công lao động (B-A2)				25.098
D	Lợi nhuận ròng tính cả công lao động (B-A)				18.198
E	Tỷ suất lãi so với vốn đầu tư (C/A)				0.76

Qua bảng 4.13 trên ta thấy hiệu quả kinh tế từ mô hình trồng sản xuất 20m² lan kim tuyến từ mô sau 1 năm sẽ thu được kết quả:

- Tổng chi phí sản xuất: **32.994.000** đồng
- Tổng doanh thu cho: **51.192.000** đồng
- Lợi nhuận ròng không tính công lao động: **25.098.000** đồng
- Lợi nhuận ròng tính cả công lao động: **18.198.000** đồng
- Tỷ suất lãi so với vốn đầu tư : **0,76**

➤ Về hiệu quả xã hội

Kết quả của đề tài là cơ sở cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn cây dược liệu có giá trị. Qua đó, giúp cho người dân biết khai thác tài nguyên thiên nhiên, tài nguyên sinh vật một cách hợp lý; đồng thời nếu chúng ta biết tổ chức sản xuất tốt sẽ tạo việc làm cho nhiều người lao động biết làm giàu từ cây lan kim tuyến.

Đề tài đã mở ra một hướng mới trong việc sản xuất nguồn giống lan kim tuyến, áp dụng tiến bộ KH&CN để sản xuất số lượng lớn cây giống trong thời gian ngắn.

4. Đề xuất giải pháp bảo tồn cho cây lan kim tuyến tại tỉnh Kon Tum

Ở Việt Nam Lan Kim Tuyến là loài có phân bố rộng, chúng phân bố ở hầu hết các tỉnh Việt Nam như Lào Cai, Tam Đảo, Quảng Trị, Kon Tum, Gia Lai, Sơn La, Yên Bái ... mọc rải rác trong rừng núi đá vôi, nơi ẩm, dọc theo khe suối, ở độ cao 1.200 - 1.800m... Loài lan này có tên là Kim Tuyến hay có tên gọi khác là lan gấm, kim cương, mộc sơn thạch tùng..., tên khoa học là *Anoectochilus sp.* Cây Kim tuyến là

loài cây thuốc rất đặc biệt có tác dụng tăng cường sức khỏe, làm khí huyết lưu thông, có tính kháng khuẩn, chữa các bệnh viêm khí quản, viêm gan mãn tính, chữa suy nhược thần kinh...vì vậy hiện nay cây kim tuyến đang bị khai thác một cách tận thu, có thể cạn kiệt trong tự nhiên nên cây kim tuyến đã được đưa vào Nghị định 32/2006 về việc bảo tồn loài cây này. Đặc biệt, loại cây này là loại cây phát triển theo mùa, nếu bị khai thác tận diệt cùng lúc thì nguy cơ tuyệt chủng càng cao. Chính vì vậy việc bảo tồn và phát triển nguồn cây dược liệu này càng có ý nghĩa to lớn.

Quan điểm chung về bảo tồn và phát triển cây Lan Kim Tuyến đó là xem lại cây này là cây hàng hóa, cây dược liệu có giá trị kinh tế cao, có lợi thế so sánh với các loại cây trồng khác. Là loại cây góp phần thực hiện mục tiêu xóa đói giảm nghèo, tiến tới làm giàu, cải thiện và nâng cao đời sống cho đồng bào các dân tộc trên địa bàn, góp phần vào sự phát triển kinh tế - xã hội và bảo vệ an ninh quốc phòng trong vùng. Đồng thời, tạo nguồn nguyên liệu phục vụ cho sự phát triển ngành công nghiệp dược tại địa phương.

Mục tiêu chung nhằm bảo tồn và phát triển cây Lan Kim Tuyến trên địa bàn đó là phấn đấu tăng diện tích trồng và sản lượng không ngừng tăng lên. Để đạt mục tiêu trên, một số giải pháp then chốt cần tập trung giải quyết là:

4.1. Công tác tuyên truyền nâng cao nhận thức cộng đồng

Việc bảo tồn và phát triển cây Lan Kim Tuyến cần đi đôi với việc tuyên truyền, nâng cao nhận thức của cấp ủy đảng, chính quyền và đồng bào các dân tộc trên địa bàn. Thông qua đề tài “*Nghiên cứu nhân giống và trồng thử nghiệm cây Lan Kim Tuyến (Anoectochilus sp.)*” còn nâng cao ý thức bảo vệ, phát triển nguồn tài nguyên cây thuốc trong nhân dân; qua đó hạn chế nạn khai thác quá mức trong tự nhiên; đồng thời thông qua việc trồng trọt đối tượng này sẽ góp phần tăng thu nhập cho nhân dân vùng đồng bào dân tộc thiểu số.

Bên cạnh đó cần đẩy mạnh hơn nữa công tác tuyên truyền, vận động để các cấp, các ngành, các địa phương và người dân nâng cao nhận thức về giá trị nguồn tài nguyên dược liệu này. Có như thế, công tác bảo tồn và phát triển nguồn tài nguyên dược liệu Lan Kim Tuyến trong thời gian tới mới vững chắc, nguồn tài nguyên dược liệu này của Việt Nam trong thời gian sẽ không bị đứng trước nguy cơ cạn kiệt.

Tổ chức các lớp tuyên truyền, tập huấn cho người dân về các phương pháp khai thác bền vững loại cây dược liệu quý này. Nâng cao năng lực quản lý, bảo vệ nguồn tài nguyên cây Lan Kim Tuyến trên địa bàn.

4.2. Về cơ chế, chính sách

Việc bảo tồn và phát triển cây Lan Kim Tuyến phải có cơ chế chính sách lâu dài về vốn đầu tư, về lồng ghép các chương trình trên địa bàn, khuyến khích cán bộ kỹ thuật, về chính sách lấy ngắn nuôi dài, thu hút đầu tư của các doanh nghiệp và ưu đãi đối với người trồng, chính sách tiêu thụ sản phẩm và chính sách kinh tế - xã hội khác.

Trước mắt cần tập trung đầu tư hình thành một vườn nhân giống với công nghệ nhân giống có khả năng cung cấp giống cho phát triển cây Lan Kim Tuyến trong vùng và các vùng có điều kiện tự nhiên phù hợp cho sinh trưởng và phát triển của loài cây này.

Việc khai thác lan Kim Tuyến một cách ồ ạt, tận thu là do chưa có sự giám sát chặt chẽ về quản lý rừng tự nhiên. Vì vậy, cần có chính sách quản lý rừng tự nhiên, hạn chế việc đốt phá rừng để phát triển cây công nghiệp, di cư tự do...

- Ưu tiên đào tạo đội ngũ cán bộ tham gia công tác bảo tồn; đầu tư cơ sở vật chất, trang thiết bị và kinh phí để công tác bảo tồn phát triển cây Lan Kim Tuyến đáp ứng được yêu cầu, nhiệm vụ; xã hội hóa công tác bảo tồn.

- Chính sách đầu tư vốn:

- + Công tác bảo tồn cây lan Kim Tuyến cũng còn gặp nhiều khó khăn do kinh phí đầu tư còn hạn chế, cơ sở vật chất tại các đơn vị bảo tồn chưa được đầu tư đồng bộ, đội ngũ cán bộ làm công tác bảo tồn còn mỏng. Tuy nhiên, cần xem trọng đầu tư cho cây Lan Kim Tuyến như đầu tư cho cây công nghiệp, cây dược liệu có giá trị kinh tế cao góp phần xóa đói giảm nghèo và từng bước nâng cao đời sống các dân tộc trên địa bàn.

- + Đầu tư cho chủ dự án và hỗ trợ đầu tư cho nhân dân bằng nguồn ngân sách của Nhà nước và các nguồn vốn khác.

- + Tăng cường hợp tác đầu tư với các tổ chức trong và ngoài nước

- Chính sách ưu đãi đối với người trồng lan Kim Tuyến.

- + Ưu tiên cho các hộ trồng lan Kim Tuyến vay vốn ưu đãi như vốn xóa đói giảm nghèo, ...

- + Nhà nước cung cấp, hỗ trợ giống, hướng dẫn kỹ thuật và hỗ trợ kinh phí, phương tiện sản xuất cho địa phương tham gia trồng Lan Kim Tuyến.
- + Hỗ trợ nhân dân trong việc thu mua sản phẩm.

4.3. Về khoa học và công nghệ

Tiếp tục nghiên cứu, ứng dụng các công nghệ tiên tiến vào sản xuất và phát triển cây Lan Kim Tuyến. Để tăng diện tích trồng cần tập trung nghiên cứu sâu hơn về điều kiện tự nhiên thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển cây Lan Kim Tuyến, từ đó làm cơ sở để xây dựng và hoàn thiện quy trình trồng cây Lan Kim Tuyến. Hướng đến phát triển trồng cây Lan Kim Tuyến theo quy mô công nghiệp.

Đề tài “*Nghiên cứu nhân giống và trồng thử nghiệm cây Kim tuyến (Anoectochilus sp.)*” sẽ hoàn thiện công nghệ sản xuất giống với giá thành rẻ, là cơ sở cho phát triển vùng nguyên liệu cây dược liệu, mở rộng sản xuất cây hàng hóa với giá thành sản phẩm cao (Từ 1,2 -1,5 triệu đồng/kg tươi) sẽ góp phần xóa đói giảm nghèo cho người dân.

Đề tài còn góp phần thực hiện chuyển đổi cơ cấu cây trồng phù hợp tại địa phương, thay đổi phương thức canh tác, nhằm nâng cao đời sống cho nhân dân.

Từ kết quả phân tích các hoạt chất có trong lan kim tuyến làm cơ sở khoa học cho nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực y dược. Nghiên cứu các công nghệ chế biến ra các sản phẩm có giá trị thương mại từ Lan Kim Tuyến.

4.4. Về tổ chức

- Xây dựng và thống nhất đầu mối quản lý nguồn gen cây Lan Kim Tuyến tập trung; củng cố, mở rộng hệ thống bảo tồn; khuyến khích các thành phần kinh tế tham gia vào công tác bảo tồn và phát triển cây Lan Kim Tuyến

- Có sự chỉ đạo thống nhất trong việc bảo tồn, phát triển cây Lan Kim Tuyến trong nhân dân. Giao cho các đơn vị chức năng trên địa bàn chuyên sản xuất và cung cấp cây giống. Tiến tới thu hút đầu tư của các doanh nghiệp vào lĩnh vực sản xuất cây Lan Kim Tuyến.

4.5. Về công tác phối hợp

- Để bảo tồn và phát triển bền vững và có hiệu quả cây Lan Kim Tuyến cần có sự tham gia của nhiều bộ, ban ngành từ Trung ương đến địa phương và người dân.

- Kết hợp với các địa phương, doanh nghiệp, xây dựng các mô hình bảo tồn và phát triển cây thuốc tại các địa phương, đặc biệt quan tâm tới quan hệ bốn nhà: Nhà khoa học, nhà quản lý, nhà nông, nhà doanh nghiệp để tổ chức các mô hình bảo tồn và phát triển.

Hy vọng trong thời gian tới, cùng với sự giúp đỡ của Trung ương, địa phương, các cơ quan nghiên cứu, các nhà khoa học và nhân dân trên địa bàn sẽ giúp bảo tồn được nguồn cây dược liệu quý giá này và đưa Lan Kim Tuyến trở thành cây dược liệu triển vọng làm giàu cho đồng bào dân tộc trên địa bàn. Bên cạnh đó, sự hiện diện của loài Lan Kim Tuyến trong quần thể thực vật trên địa bàn huyện Kon Plông và Tu Mơ Rông làm phong phú thêm tính đa dạng sinh học đặc thù vốn có của địa phương. Vì vậy, việc bảo tồn và phát triển cây lan Kim Tuyến có ý nghĩa đặc biệt quan trọng, góp phần bảo vệ rừng, bảo vệ nguồn tài nguyên dược liệu quý không chỉ của địa phương mà của cả nước.

PHẦN V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

I. KẾT LUẬN

Sau 03 năm triển khai, đề tài đã hoàn thành các mục tiêu, nội dung nghiên cứu, khối lượng, sản phẩm KH&CN đã đề ra và đạt được một số kết quả sau:

➤ Về kết quả nghiên cứu

- Đã xác định 02 phương pháp nhân giống lan kim tuyến thích hợp, có thể áp dụng vào sản xuất giống tại tỉnh, đó là nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô và bằng phương pháp giâm hom. Mỗi phương pháp có những ưu và nhược điểm riêng, phương pháp giâm hom đơn giản, dễ tiến hành, không yêu cầu điều kiện vật chất, kỹ thuật cao nhưng số lượng cây giống tạo ra ít và không nhanh bằng phương pháp nuôi cấy mô. Trái lại, phương pháp nuôi cấy mô, tạo ra được số lượng lớn cây giống đồng đều trong thời gian ngắn hơn nhưng yêu cầu cơ sở vật chất, kỹ thuật cao. Vì vậy, tùy theo điều kiện sản xuất, nhu cầu về giống để lựa chọn phương pháp thích hợp để nhân giống cây lan kim tuyến.

- Qua nghiên cứu trồng thử nghiệm, đã xác định cây lan kim tuyến được sản xuất từ các phương pháp khác nhau đều thích hợp với điều kiện khí hậu, đất đai vùng nghiên cứu và có thể phát triển nhân rộng sản xuất đem lại hiệu quả kinh tế.

➤ Về tổ chức thực hiện

- Đào tạo được đội ngũ cán bộ khoa học kỹ thuật có khả năng tổ chức nghiên cứu độc lập và triển khai ứng dụng các thành tựu của công nghệ sinh học nói chung và kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật nói riêng vào công tác chọn lọc, nhân giống cây lan kim tuyến.

- Đã tổ chức khảo sát, đánh giá hiện trạng cây lan kim tuyến trong tự nhiên làm cơ sở cho công tác nghiên cứu nhân giống và phát triển sản xuất.

- Tiến hành nghiên cứu nhân giống cây lan kim tuyến bằng các phương pháp khác nhau. Kết quả đã nuôi cấy, nhân giống và lưu trữ hơn 2.000 bình giống lan kim tuyến cấy mô tại phòng thí nghiệm, sản xuất hơn 60.000 cây giống lan kim tuyến bằng phương pháp nuôi cấy mô.

- Tiến hành phân tích, đánh giá hàm lượng các hoạt chất mang tính dược học trong lan kim tuyến thu được ngoài tự nhiên và lan kim tuyến nuôi trồng. Kết quả cho thấy, cả trong lan kim tuyến tự nhiên và nuôi trồng đều có một số hoạt chất có lợi cho sức khỏe và đang được khoa học thế giới chứng minh.

- Tiến hành nghiên cứu trồng thử nghiệm 100 m² lan kim tuyến thuộc đề tài. Trên cơ sở nguồn giống đã sản xuất, qua theo dõi tình hình sinh trưởng và phát triển cây lan kim tuyến từ các nguồn giống khác nhau cho thấy thích nghi với điều kiện khí hậu, tại địa điểm triển khai.

- Xây dựng và hoàn thiện quy trình kỹ thuật nhân giống và quy trình kỹ thuật trồng và chăm sóc cây lan kim tuyến phù hợp với điều kiện sản xuất ở địa phương.

Hiện nay đề tài đang được cơ quan chủ trì tiếp tục duy trì, nhân rộng kết quả nghiên cứu và mở rộng quy mô sản xuất giống tại phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật để phục vụ nhu cầu của thị trường.

II. KIẾN NGHỊ

Nhằm phát huy kết quả của đề tài, đồng thời đẩy mạnh ứng dụng sau nghiên cứu, chúng tôi có một số kiến nghị với các cấp, các ngành một số nội dung sau:

- Xem cây lan kim tuyến là cây dược liệu, cây hàng hóa, có giá trị kinh tế có thể phát triển sản xuất. Vì vậy, đối với các địa phương có cây lan kim tuyến cần có quy hoạch vùng sản xuất, gắn với chuyển đổi cơ cấu cây trồng hợp lý; lồng ghép các chương trình, dự án nhằm phát triển, mở rộng sản xuất cây lan kim tuyến trong cộng đồng.

- Khảo sát thêm các thí nghiệm về nhân giống lan kim tuyến bằng phương pháp giâm hom.

- Có chính sách ưu tiên nhằm khuyến khích các doanh nghiệp đầu tư phát triển sản xuất, chế biến và kinh doanh các sản phẩm từ cây lan kim tuyến.

- Có chính sách hỗ trợ về giống, kỹ thuật cho người dân trong giai đoạn đầu để đầu tư sản xuất; khuyến khích việc hình thành các mô hình sản xuất lan kim tuyến tập trung quy mô lớn để thuận tiện cho việc đầu tư, chăm sóc và tiêu thụ sản phẩm.

- Về phía cơ quan chủ trì, tiếp tục phối hợp với chính quyền địa phương trong việc đào tạo đội ngũ kỹ thuật cơ sở và tập huấn cho người dân tiếp thu tốt về kỹ thuật áp dụng vào sản xuất.

- Các tổ chức khoa học tiếp tục nghiên cứu, ứng dụng các kỹ thuật mới trong nhân giống, sản xuất và chế biến các sản phẩm từ cây lan kim tuyến.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng việt

1. Nguyễn Tiến Bân (chủ biên), 2005, Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập 3, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ, 2007 Sách Đỏ Việt Nam (phần thực vật), Nxb. Khoa học Tự nhiên & Công nghệ, Hà Nội.
3. Chính Phủ Nước Cộng Hoà Xã Hội Chủ Nghĩa Việt Nam, 2006. Nghị định số 32/2006/NĐ-CP.
4. Võ Văn Chi và Dương Đức Tiến, 1978, Phân loại thực vật, NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp.
5. Phạm Hoàng Hộ, 2000, Cây cỏ Việt Nam, Quyển 3, Nxb. Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh.
6. Nguyễn Khắc Hưng và cộng sự, 2015, Nghiên cứu nhân nhanh in vitro loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus blume*) thông qua cảm ứng tạo protocorm like, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, tạp chí sinh học, 2015,37(1): 76-83
7. Phùng Văn Phê và cộng sự, 2009, Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống In vitro loài, Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume), Bao cao khoa học Trường Đại học Lâm nghiệp.
8. Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm, 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 ĐHQGHN, 26(4), 248-253.
9. Phùng Văn Phê, Nguyễn Trung Thành, Vương Duy Hưng, 2010, “Đặc điểm hình thái, phân bố của loài Lan Kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume ở Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc”, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, 26(2), 104-109.
10. Nguyễn Đức Thành, 2000, Nuôi cấy mô, tế bào thực vật, Nghiên cứu ứng dụng, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
11. Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miện, 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 2012 Tập 10, số 4: 597-603.

12. Nguyễn Đức Thành, (2000), Nuôi cấy mô - tế bào thực vật - Nghiên cứu ứng dụng, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
13. Vũ Văn Vụ (Chủ biên), 1999, Sinh lý thực vật ứng dụng, NXB Nông nghiệp.

Tài liệu tiếng nước ngoài

14. Ana Garcia-Lafuente, Eva Guillaumon, Ana Villares et al. (2009), "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease", *Inflammation*, 58, 537–552
15. Cai, J.Y., Gong, L.M., Zhang, Y.H., Ruan, H.L., Pi, H.F., Wu, J.Z., 2015. Studies on chemical constituents from *Anoectochilus roxburghii*. *J. Chin. Med. Mater.* 31,370–372.
16. Cui, S.C., Yu, J., Zhang, X.H., Cheng, M.Z., Yang, L.W., Xu, J.Y., 2013. Antihyperglycemic and antioxidant activity of water extract from *Anoectochilus roxburghii* in experimental diabetes. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65, 485.
17. J.G. Zhang, Q. Liu, Z.L. Liu, L. Li, L.T. Yi, 2015, antihyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin, *J Ethnopharmacol.*;164, 180-5.
18. Han MH et al. 2008, “Novel triterpenoid acyl esters and alkaloids from *Anoectochilus roxburghii*”, *Phytochemical Analysis*, 19: 438-443.
19. He CN et al. 2005, “Study on chemical constituents of *Anoectochilus roxburghii*”, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 30: 761-763.
20. HUANG L. F., Ruo-Yan L. U., Zhi-Min S. U., Shang-Tan, F. A. N., & Xi-Quan Y. U. 2007, Effect of Herba *Anoectochili* Extracts on Acutely and Chronically Damaged Livers Induced by CCl₄ in Mice [J]. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 4.
21. K. Raj Narayana, M. Sripal Reddy, M.R.Chauluvadi et al. (2001), "Biflavonoids classification, pharmacological, biomical effects and Therapeutic potential", *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2-16.
22. Liu Q et al., 2014, “3-Hydroxybutanolide derivatives and flavonoid glucosides from *Anoectochilus roxburghii*”, *Phytochemistry Letters*, 8: 109-115.
23. Pham Huong Son, Nguyễn Thị Lai, Nguyen Tien Đạt at al 2015, Isolation and simultaneous quantification of adenosine, narcissin and roseoside in

- Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall ex Lindl, Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, Vol. 5, No. 4, 4002-4007.
24. Tian H.Z. et al, 2014, *Anoectochilus longilobus* (orchidoideae: orchidaceae), a new species from Yunnan, China, *phytotaxa* 164 (4):276-278.
25. Tseng C. C., Shang H. F., Wang L. F., Su B., Hsu C. C., Kao H. Y., & Cheng K. T. 2006, Antitumor and immunostimulating effects of *Anoectochilus formosanus* Hayata, *Phytomedicine*, 13(5), 366-370.
26. Van Kiet Nguyen (2004), Effect of Environmental Conditions on in vitro and Ex Vitro Growth of Jewel Orchid *Anoectochilus formosanus* Hayata, Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Agriculture, The Graduate School of Chungbuk National University.
27. Velloso, J. C. R., Regasini, L. O., Khalil, N. M., Bolzani, V. D. S., Khalil, O. A., Manente, F. A., ... & Oliveira, O. M. (2011). Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Eclética química*, 36(2), 07-20.
28. Shashank Kumar, Abhay K.Pandey (2013), “Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview”, *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16.
29. Yang, X.W., Han, M.H., Jin, Y.P., 2007. Studies on the chemical constituents from herba *Anoectochili*. *J. Chin. Med. Mater.* 30, 797–800.

Tài liệu từ internet

30. <http://duoclieusachonline.com/ban-tin-duoc-lieu-so-12017-cac-loai-thuoc-chi-anoectochilus-blume/>
31. https://vi.wikipedia.org/wiki/Lan_kim_tuy%E1%BA%BFn
32. [http://iasvn.org/homepage/Cay-Lan-Ga%CC%81m-\(Anoectochilus-formosanus-Hayata\),-gia-tri-kinh-te-va-tiem-nang-phat-trien-tren-vung-dat-Tay-Nguyen-1973.html](http://iasvn.org/homepage/Cay-Lan-Ga%CC%81m-(Anoectochilus-formosanus-Hayata),-gia-tri-kinh-te-va-tiem-nang-phat-trien-tren-vung-dat-Tay-Nguyen-1973.html).
33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15500262>.
34. <http://web.nchu.edu.tw/pweb/users/taiwanfir/research/144.pdf>.
35. <https://www.caythaoduoc.com/tin-tuc/tac-dung-chua-benh-cua-lan-kim-tuyen-lan-gam-95.html>

PHỤ LỤC. MỘT SỐ HÌNH ẢNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

I. Một số hình ảnh điều tra khảo sát



II. Một số hình ảnh trong phòng nuôi cấy mô và ngoài vườn ươm



III. Một số hình ảnh trồng mô hình trồng lan kim tuyến



BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH VÀ KIỂM NGHIỆM

(Kết quả phân tích chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Số: 118.D.15

Tên mẫu gửi phân tích: Mẫu Lan kim tuyến

Số lượng: 02 mẫu

Ký hiệu mẫu: M1, M2

Đơn vị gửi mẫu: Trung tâm ứng dụng khoa học và chuyển giao công nghệ tỉnh Kon tum.

Nội dung yêu cầu:

- Sàng lọc thành phần hóa học và mô tả bột của mẫu gửi.
- Xác định độ ẩm, hàm lượng flavonoid toàn phần mẫu gửi

Phương pháp phân tích:

- Sàng lọc thành phần hóa học bằng các phản ứng hóa học [1] và phương pháp sắc ký lớp mỏng [2].
- Soi bột bằng phương pháp quan sát dưới kính hiển vi [2]
- Xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy cân [2]
- Định lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS [3-4].

TT	YÊU CẦU	KẾT QUẢ	
		M1	M2
1	Sàng lọc thành phần hóa học		
1.1	Bảng các phản ứng hóa học	Xem phụ lục 1	
1.2	Bảng phương pháp sắc ký lớp mỏng	Xem phụ lục 2	
2	Soi bột	Xem phụ lục 3	
3	Độ ẩm:	13,31 %	13,29 %
4	Định lượng: Hàm lượng flavonoid toàn phần tính theo khối lượng khô kiệt (tính theo chất chuẩn quercetin)	0,27 %	0,31 %

Khoa HPT-TC

[Signature]

Hà Nội, ngày 06 tháng 07 năm 2015.

KT. VIỆN TRƯỞNG
PHÓ VIỆN TRƯỞNG

[Signature]
TS. Lê Việt Dũng

Tài liệu tham khảo:

1. Bộ Y tế (2006), Bài giảng Dược liệu, Sách dùng cho sinh viên đại học.
2. Bộ Y tế (2009), Dược điển Việt Nam IV.
3. Saeed N et al (2012), "Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L.", *BMC Complement Altern Med*, 12, 221.
4. Milan S. Stanković (2011), "Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts", *Kragujevac J. Sci.*, 33, 63-72.

PHỤ LỤC 1:

ĐỊNH TÍNH BẰNG PHẢN ỨNG HÓA HỌC MẪU LAN KIM TUYỀN

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	+	Có
		Phản ứng với NaOH 10%	+	Có
		Phản ứng với FeCl ₃ 5%	+	Có
		Phản ứng Diazo	+	Có
2	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	+	Có
3	Acid amin	Phản ứng với TT. Ninhydrin	++	Có
4	Coumarin	Phản ứng mở vòng lacton	-	Không
5	Alkaloid	Phản ứng với TT. Mayer	-	Không
		Phản ứng với TT. Dragendorff	-	

Ghi chú:

-: Phản ứng âm tính

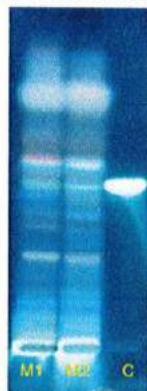
+: Phản ứng dương tính

++: Phản ứng dương tính rõ

Kết luận: Mẫu Lan kim tuyến có các nhóm chất flavonoid, saponin và acid amin; không có nhóm chất coumarin và alkaloid.

PHỤ LỤC 2:

**SẮC KÝ ĐỎ SẮC KÝ LỚP MỎNG ĐỊNH TÍNH
MỘT SỐ NHÓM CHẤT TRONG MẪU LAN KIM TUYỀN**



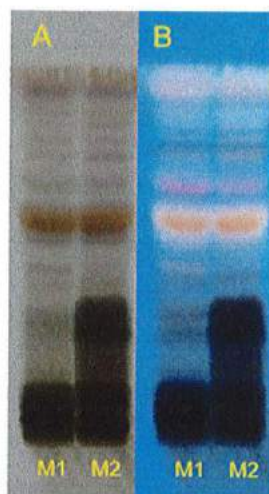
Hình 1: Sắc ký đỏ định tính thành phần flavonoid

Thuốc thử nhận biết: Hỗn hợp dung dịch acid boric 10% trong nước và acid oxalic 10 % trong nước tỷ lệ 2: 1.

Chú thích:

M1, M2: Các mẫu Lan kim tuyến gửi

C: Chất đối chiếu Quercetin



Hình 2: Sắc ký đồ định tính thành phần terpenoid

Thuốc thử nhận biết: dung dịch anisaldehyd/acid sulfuric.

Dấu hiệu nhận biết: Sắc ký đồ có các vết màu hồng đến tím (quan sát ở ánh sáng thường – Hình 2.A) và tím đến vàng (quan sát ở UV 366 nm – Hình 2.B) sau khi phun thuốc thử.

Chú thích:

M1, M2: Các mẫu Lan kim tuyến gửi.



Hình 3: Sắc ký đồ định tính thành phần acid amin

Thuốc thử nhận biết: dung dịch ninhydrin.

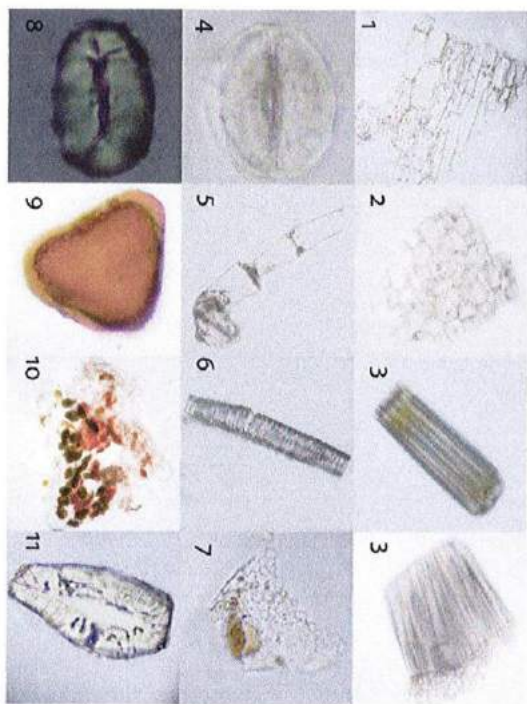
Dấu hiệu nhận biết: Sắc ký đồ có các vết màu hồng đến tím quan sát ở ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử.

Chú thích:

M1, M2: Các mẫu Lan kim tuyến gửi.

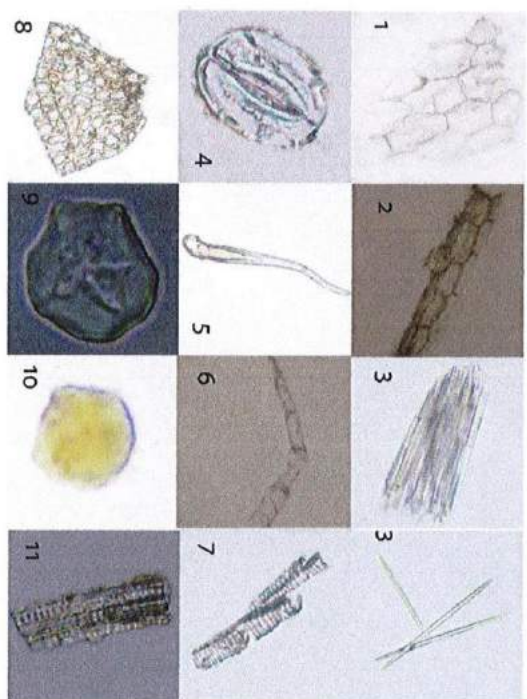
PHỤ LỤC 3:

KẾT QUẢ SOI BỘT CÁC MẪU LAN KIM TUYẾN



Hình 4: Đặc điểm bột Lan kim tuyến mẫu M1

Chú thích: Mảnh bản (1), mảnh mô mềm (2), tinh thể canci oxalat hình kim (3), lỗ khí (4), lông che chở đơn bào (5), mạch xoắn (6), mảnh mang màu (7), tinh bột (8), hạt phấn (9), mô mềm chứa các mảnh mang màu (10), tế bào cứng (11).



Hình 5: Đặc điểm bột Lan kim tuyến mẫu M2

Chú thích: Mảnh mô mềm (1), mảnh bản (2), tinh thể canci oxalat hình kim (3), lỗ khí (4), lông che chở đơn bào (5), mạch xoắn (6), mảnh mang màu (7), tinh bột (8), hạt phấn (9), mảnh mạch điểm (10), mảnh mạch điểm (11).

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH VÀ KIỂM NGHIỆM

(Kết quả phân tích chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Số: 105/DV.16

Tên mẫu gửi phân tích: Mẫu Lan kim tuyến

Số lượng: 01 mẫu

Đơn vị gửi mẫu: Trung tâm ứng dụng khoa học và chuyển giao công nghệ tỉnh Kon Tum

Địa chỉ: 16A Ngô Quyền, Thành phố Kon Tum, Tỉnh Kon Tum

Nội dung yêu cầu: Soi bột; sàng lọc thành phần hóa học; xác định độ ẩm và hàm lượng flavonoid toàn phần trong mẫu gửi.

Ngày nhận mẫu: 16/05/2016

Số đăng ký phân tích: 75 HPT-TC.2016

TT	Nội dung yêu cầu	Phương pháp thử	Đơn vị tính	Kết quả
1	Soi bột	ĐDVN IV ^[1]		Xem phụ lục/ Hình 1
2	Độ ẩm	ĐDVN IV ^[2]	%	7,7
3	Định lượng: Hàm lượng flavonoid toàn phần tính theo quercetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₇) trong mẫu gửi khô kiệt	UV-VIS ^[3]	g/100g	1,2
4	Sàng lọc thành phần hóa học			
4.1	Phản ứng hóa học đặc trưng	ĐDVN IV ^[4-5]		Xem phụ lục/ Bảng 1
4.2	Phương pháp sắc ký lớp mỏng			Xem phụ lục/ Hình 2

Khoa HPT-TC

Hà Nội, ngày 16 tháng 06 năm 2016

KT. VIỆN TRƯỞNG
PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Lê Việt Dũng

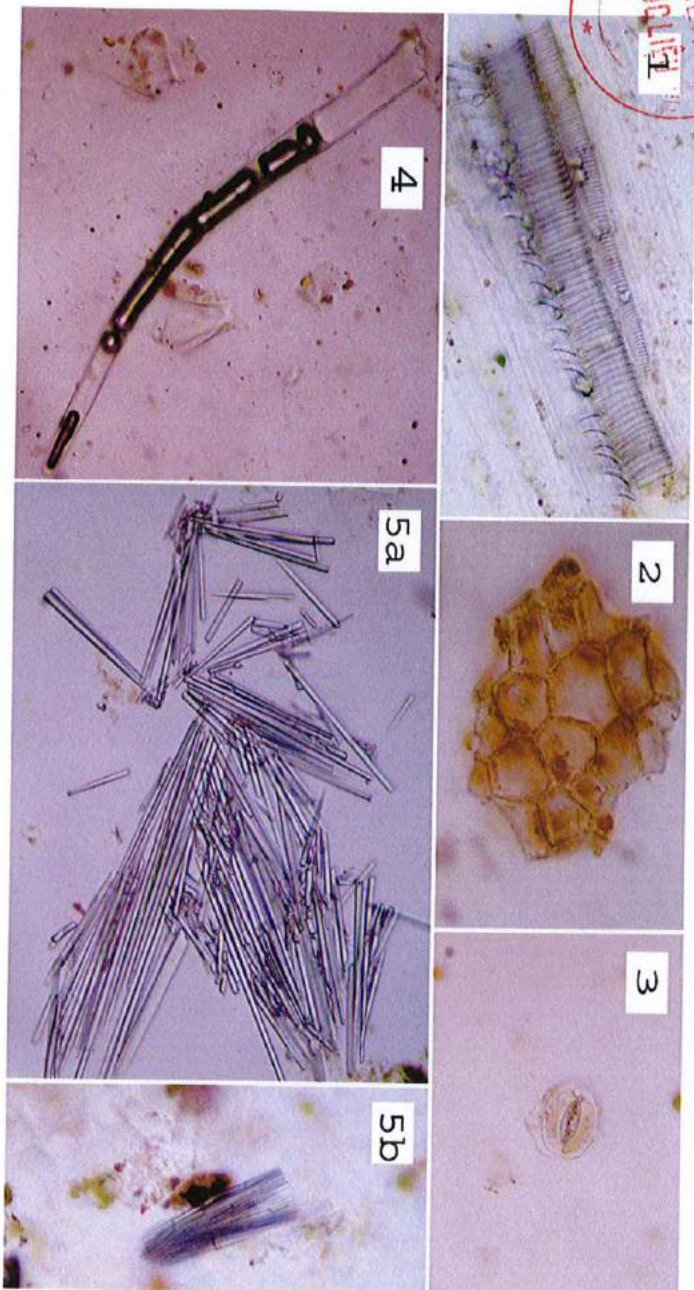
Tài liệu tham khảo:

- Bộ Y tế (2009), Dược điển Việt Nam IV, phụ lục 12.18, Định tính dược liệu và chế phẩm bằng kính hiển vi.
- Bộ Y tế (2009), Dược điển Việt Nam IV, phụ lục 9.6, Xác định mất khối lượng do làm khô.
- Pharmacopoeia of The People's Republic of China (2010), Volume I, page 419-420.
- Bộ Y tế (2006), Bài giảng Dược liệu, Sách dùng cho sinh viên đại học
- Bộ Y tế (2009), Dược điển Việt Nam IV, phụ lục 5.3, Phương pháp sắc ký lớp mỏng.

Ghi chú:

- Thông tin mẫu gửi do khách hàng cung cấp.
- Nghiêm cấm sao chép dưới mọi hình thức khi chưa được sự đồng ý của Viện Dược liệu

PHỤ LỤC:



0, 1 mm

Hình 1: Một số đặc điểm bột mẫu gửi số 75 HPT-TC.2016

Chú thích:

1 - Mảnh mạch; 2 - Mảnh mô mềm; 3 - Lỗ khí; 4 - Lông; 5 - Tinh thể calci oxalat

ĐỊNH TÍNH BẢNG PHẢN ỨNG HÓA HỌC MẪU GỬI SỐ 75 HPT-TC.2016

Bảng 1: Kết quả các phản ứng hóa học đặc trưng

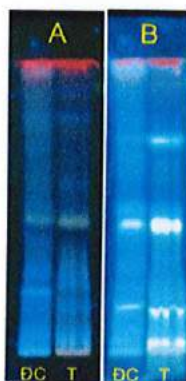
STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	++	Có
		Phản ứng với NaOH 10%	++	
		Phản ứng với FeCl ₃ 5%	++	
2	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	+	Có
3	Acid amin	Phản ứng với TT Ninhydrin	++	Có
4	Coumarin	Phản ứng mở vòng lacton	-	Không
5	Alkaloid	Phản ứng với TT. Mayer	-	Không
		Phản ứng với TT. Dragendorff	-	

Ghi chú:

- : Phản ứng âm tính + : Phản ứng dương tính ++ : Phản ứng dương tính rõ

Kết luận: Mẫu gửi số 75 HPT-TC.2016 có các nhóm chất flavonoid, saponin và acid amin; không có nhóm chất coumarin và alkaloid.

SẮC KÝ ĐỒ SẮC KÝ LỚP MỎNG ĐỊNH TÍNH



Hình 2.1: Sắc ký đồ định tính thành phần flavonoid

Hình 2.1.A: Hình ảnh quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm trước khi phun thuốc thử.

Hình 2.1.B: Hình ảnh quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm sau khi phun thuốc thử.

Thuốc thử nhận biết: Hỗn hợp dung dịch acid boric 10% trong nước và acid oxalic 10% trong nước tỷ lệ 2: 1.

Dấu hiệu nhận biết: Sắc ký đồ có các vết phát huỳnh quang xanh mạnh hơn sau khi phun thuốc thử khi quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm.



Hình 2.2: Sắc ký đồ định tính thành phần terpenoid

Thuốc thử nhận biết: Dung dịch anisaldehyd/acid sulfuric.

Dấu hiệu nhận biết: Sắc ký đồ có các vết màu vàng đến tím (quan sát ở ánh sáng thường) sau khi phun thuốc thử.



Hình 2.3: Sắc ký đồ định tính thành phần acid amin
quan sát dưới ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử

Thuốc thử nhận biết: Dung dịch ninhydrin.

Dấu hiệu nhận biết: Sắc ký đồ có các vết màu hồng đến tím quan sát ở ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử.

Chú thích:

ĐC: Mẫu dược liệu Lan kim tuyến đối chiếu của Viện Dược liệu (*Herba Anoectochilus roxburghii*)

T: Mẫu gửi số 75 HPT-TC.2016