

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT BỔ SUNG HỮU CƠ LÊN QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CHỒI LAN VÂN HÀI (*PAPHIOPEDILUM CALLOSUM*) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Vũ Quốc Luận¹, Trịnh Thị Hương¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Đỗ Khắc Thịnh²,
Đương Tấn Nhựt^{1,*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

*Email: duongtannhut@gmail.com

Đến Toà soạn: 25/9/2013; Chấp nhận đăng: 15/1/2014

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng các chồi lan Vân Hài (*Paphiopedilum callosum*) *in vitro* được nuôi cấy tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên làm nguồn mẫu ban đầu. Các chồi lan Vân Hài có 3 lá và chiều dài lá 2 cm được nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung các chất bổ sung hữu cơ khác nhau bao gồm nước dừa non, nước vo gạo, bột khoai tây, bột chuối và peptone nhằm tìm ra chất bổ sung hữu cơ thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hài đồng thời tạo ra được cây giống khỏe mạnh và góp phần làm hạ giá thành cây giống. Kết quả cho thấy có sự khác biệt trong quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hài trên 5 môi trường. Trong đó, môi trường có bổ sung 200 ml/l nước vo gạo là tốt nhất thể hiện qua quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi sau 90 ngày nuôi cấy. Mặt khác, thay thế các chất bổ sung hữu cơ như, bột khoai tây (100 - 200 g/l), bột chuối 100 g/l hoặc peptone 1 g/l thay thế cho nước dừa non trong môi trường nuôi cấy sẽ làm giảm được giá thành cây giống và vẫn đảm bảo chồi lan Vân Hài sinh trưởng và phát triển tốt.

Từ khóa: chất bổ sung hữu cơ, bột khoai tây, lan Vân Hài, nước dừa non, nước vo gạo.

1. GIỚI THIỆU

Lan Vân Hài (*Paphiopedilum*) là một trong những loài hoa lan đẹp, phân bố từ Himalaya, Indonesia, Philippine và quần đảo Bougainville; trong đó, khu vực biên giới Việt Nam - Trung Quốc là một trong những cái nôi của lan Vân Hài. Lan Vân Hài rất đa dạng về kích cỡ, hình dáng và màu sắc [1]. Chúng rất thích hợp để trang trí trong nhà cũng như những khu vực trồng và trang trí cây cảnh. Với phương pháp nhân giống hiện nay, nước dừa thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm làm tăng chất lượng của cây giống. Việc sử dụng nước dừa non không phải lúc nào cũng gặp thuận lợi vì phải phụ thuộc vào mùa và giá nước dừa non là 25.000 – 30.000 đ/l. Chính vì vậy, chi phí cho quá trình nuôi cấy để tạo được một cây con *in vitro* hoàn chỉnh là rất cao. Trong các môi trường nuôi cấy phong lan, bên cạnh các thành phần muối,

vitamin, nguồn carbon và chất điều hòa sinh trưởng, còn có một thành phần quan trọng được thêm vào trong môi trường nuôi cấy là các chất phụ gia phức tạp như bột khoai tây, nước dừa, bột chuối, nước ép cà chua, táo, mật ong, nước chiết thịt bò và peptone. Những chất hữu cơ này có hiệu quả đáng kể đối với sự nảy mầm và vi nhân giống của nhiều loài phong lan [2 - 6]. Vì vậy, nghiên cứu này thực hiện với các chất bổ sung hữu cơ sẵn có với giá thành thấp như: bột khoai tây, bột chuối, peptone và nước vo gạo bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm tìm ra chất bổ sung hữu cơ thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của lan Vân Hải, đồng thời tạo ra được cây giống khỏe mạnh, cũng như góp phần làm hạ giá thành cây giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nguồn mẫu ban đầu là những chồi non lan Vân Hải *in vitro* có 3 lá với chiều dài lá 2 cm được nuôi cấy tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Các chất bổ sung hữu cơ: nước dừa non khoảng 4 tháng tuổi (*Cocos nucifera*); chuối tây xanh thương phẩm (*Musa Rastali*); khoai tây thương phẩm (*Solanum tuberosum*); peptone (Himedia Laboratories); nước vo gạo (gạo thương phẩm).

Chỉ tiêu theo dõi: số lá, chiều dài lá, số rễ, chiều dài rễ, trọng lượng tươi, hình thái chồi.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường SH [7] có bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, pH = 5,8 và: nước dừa, khoai tây, nước gạo, peptone và chuối vào các nghiệm thức để đánh giá ảnh hưởng của các chất này tới khả năng sinh trưởng và phát triển của lan Vân Hải.

2.3. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.500 - 3.000 lux, nhiệt độ 25 ± 3 °C với độ ẩm phòng nuôi là 75 – 85 %.

2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nước dừa non lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Các chồi non của cây lan Vân Hải được cấy trên môi trường SH có bổ sung thêm nước dừa non ở các tỉ lệ khác nhau: 0, 100, 200, 300, 400 và 500 ml/l.

2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nước vo gạo lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Trong nghiên cứu này, nước gạo được lấy như sau: đổ 1 kg gạo mịn thơm vào một lít nước cất, khuấy đều trong khoảng 10 giây, đem đổ nước để loại bỏ tạp chất. Sau đó, đổ 1 lít nước cất vào và vo trong khoảng 5 phút và lọc lấy nước dùng cho các thí nghiệm.

Các chồi non của cây lan Vân Hải được cấy trên môi trường SH có bổ sung thêm nước vo gạo ở các tỉ lệ khác nhau: 0, 100, 200, 300, 400 và 500 ml/l.

2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của bột khoai tây lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Trong nghiên cứu này, bột khoai tây được lấy như sau: củ khoai tây được rửa sạch, gọt bỏ vỏ, được cắt nhỏ và cân ở các tỉ lệ khác nhau và dùng máy xay sinh tố để xay thành bột. Sau đó, bột khoai tây được nấu chín trước khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Các chồi non của cây lan Vân Hải được cấy trên môi trường SH có bổ sung thêm bột khoai tây ở các tỉ lệ khác nhau: 0, 50, 100, 150, 200 và 250 (g/l).

2.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của peptone lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Các chồi non của cây lan Vân Hải được cấy trên môi trường SH có bổ sung thêm peptone ở các tỉ lệ khác nhau: 0, 1, 2, 3, 4 và 5 (g/l).

2.3.5. Khảo sát ảnh hưởng của bột chuối lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Bột chuối được lấy như sau: chuối xanh được gọt bỏ vỏ, cắt nhỏ và cân ở các tỉ lệ khác nhau và dùng máy xay sinh tố để xay thành bột. Sau đó, bột chuối được nấu chín trước khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Các chồi non của cây lan Vân Hải được cấy trên môi trường SH có bổ sung thêm bột chuối ở các tỉ lệ khác nhau: 0, 50, 100, 150, 200 và 250 (g/l).

2.4. Xử lí số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 4 lần, mỗi thí nghiệm tiến hành trên 10 bình, mỗi bình 3 chồi. Các số liệu được xử lí bằng cách sử dụng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trên đối tượng lan Vân Hải, đã có một số tác giả sử dụng một số chất hữu cơ bổ sung vào môi trường nuôi cấy phục vụ cho quá trình nhân giống *in vitro*. Khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất hữu cơ, bao gồm: nước dừa, bột chuối, bột khoai tây và peptone đã cho thấy tác động của chúng lên quá trình nuôi cấy *in vitro* ít hay nhiều. Huang và cộng sự (2001) cho thấy kết quả khi bổ sung 150 ml/l nước dừa phù hợp cho quá trình nhân chồi và rễ trên đối tượng lan Vân Hải lai (*Paphiopedilum philippinense* x *Paphiopedilum Susan Booth*). Trong khi đó, bột khoai tây thúc đẩy sự tăng trưởng chồi bất định khi bổ sung 10 g/l vào môi trường nuôi cấy, nhưng không có tác dụng lên quá trình hình thành rễ. Bột chuối kích thích sự hình thành chồi bất định nhưng ức chế quá trình hình thành rễ, đặc biệt là ở nồng độ cao (40 và 60 g/l) [8]. Chyuam và Saleh (2011) đã bổ sung với các nồng độ khác nhau của bột chuối và khoai tây (15, 30, 45, 60 g/l) hoặc 50, 100, 150, 200 ml/l nước dừa vào môi trường ½ MS nhằm kích thích quá trình hình thành PLB. Kết quả cho thấy 200 ml/l nước dừa là thích hợp nhất cho quá trình hình thành PLB trên đối tượng lan Vân Hải (*Paphiopedilum rothschildianum*) và sự phát triển tiếp theo của cây con [9]. Chyuam và cộng sự [10] báo cáo rằng có thể nhân nhanh chồi từ các đốt thân và chồi đơn trên giống lan Vân Hải (*Paphiopedilum rothschildianum*) trên môi trường ½ MS không có

chất điều hòa sinh trưởng và môi trường có bổ sung các chất hữu cơ. Số lượng chồi đã tăng lên khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nguồn nitơ hữu cơ (peptone và tryptone-peptone). Số lượng chồi hình thành cao nhất (2,9 chồi/mẫu) thu được trên môi trường ½ MS có bổ sung 1,0 g/l peptone sau 16 tuần nuôi cấy trên mẫu đốt thân chính. Tuy nhiên, số lượng chồi hình thành cao trên môi trường có bổ sung 2,0 g/l tryptone-peptone với số chồi trung bình 2,8 chồi/mẫu. Ngược lại, peptone có thể không có hiệu quả kích thích sự hình thành nhiều chồi khi cấy mẫu chồi đơn, ngoại trừ ở nồng độ thấp (0,5 g/l). Việc bổ sung vào môi trường nuôi cấy hàm lượng cao của peptone 2,0 g/l đã ức chế sự hình thành nhiều chồi [10]. Trên đối tượng lan Vân Hải, đã có một số nghiên cứu về tác động của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình nhân giống *in vitro* [11, 12, 13]. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác động của chất hữu cơ trên đối tượng lan Vân Hải *in vitro*, vì vậy nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm mục đích đánh giá tác động của việc bổ sung các chất hữu cơ bao gồm: nước dừa, nước vo gạo, bột khoai tây, peptone, bột chuối tây lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*.

3.1. Ảnh hưởng của nước dừa non lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Nước dừa được sử dụng rộng rãi như một thành phần thúc đẩy tăng trưởng trong môi trường nuôi cấy mô hơn một nửa thế kỷ trước, khi Overbeek và cộng sự [14] đầu tiên giới thiệu nước dừa như một thành phần mới của môi trường dinh dưỡng cho các nuôi cấy mô sẹo [14]. Một số thành phần quan trọng có trong nước dừa là tập hợp của phytohormone; trong đó, quan trọng và hữu ích nhất là cytokinin [15]. Theo George [16], nước dừa bao gồm nhiều axit amin, hợp chất đạm, hợp chất vô cơ, các axit hữu cơ, nguồn carbon, vitamin và có khả năng điều chỉnh sự phát triển như cytokinin và auxin [16]. Yong và cộng sự [17] cho thấy nước dừa chứa 94 % là nước và là chất thúc đẩy tăng trưởng của chồi [17]. Trong một số loài thực vật, quá trình tái sinh được gia tăng bằng cách bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy [18, 19, 20, 21, 22]. Ngoài ra, nước dừa đã được báo cáo là có khả năng làm tăng quá trình sinh trưởng và phát triển của hoa lan trong ống nghiệm do có sự liên quan đến sự hiện diện của một loại cytokinin [23]. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của Shantz và cộng sự [24] khi bổ sung nước dừa có tác dụng kích thích quá trình nhân nhanh tế bào và mô do nước dừa có chứa một số yếu tố tăng trưởng [24]. Khi bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy, hiệu quả kích thích được nhận thấy chỉ xảy ra khi hàm lượng nước dừa được thêm vào từ 10 – 15 % và hàm lượng 20 % là cần thiết cho quá trình tăng trưởng của mô sẹo ở một số loài cây [25, 26]. Năm 2012, Saranjeet và cộng sự nhận thấy bổ sung 10 % nước dừa đã thúc đẩy quá trình nhân nhanh protocorm và hình thành chồi có từ 2 - 3 lá và 1 - 2 rễ, đạt 73,75 % [27].

Sau 90 ngày nuôi cấy, các chồi lan Vân Hải trên môi trường có bổ sung nước dừa non ở các tỉ lệ khác nhau cho thấy có sự khác biệt đáng kể so với đối chứng (0 % nước dừa). Các chỉ tiêu theo dõi đạt kết quả tối ưu khi bổ sung 200 ml/l nước dừa (bảng 1). Các chồi đang trong quá trình sinh trưởng và phát triển mạnh thể hiện qua khối lượng tươi trung bình đạt 1,67 g/chồi, chiều dài lá 5,10 cm và số lá 4,5 lá/chồi (hình 1C). Khi tăng hàm lượng nước dừa trên 300 ml/l thì quá trình sinh trưởng của chồi có xu hướng giảm dần, thể hiện qua hình thái bên ngoài như chồi sinh trưởng chậm, lá xanh nhạt, ngắn và chiều dài lá cũng như trọng lượng tươi giảm dần (hình 1D, E, F). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Abdullahil và cộng sự (2011) nhận thấy khi hàm lượng nước dừa cao sẽ làm giảm sự tăng trưởng và gây ra sự bất thường về hình thái học của chồi [28]. Như vậy, chồi non lan Vân Hải sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường SH có bổ sung 200 ml/l nước dừa non, 9 g/l agar, 30 g/l đường, 1 g/l than hoạt tính.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nước dừa non lên quá trình sinh trưởng và phát triển *in vitro* của chồi lan Vân Hải.

Nước dừa non (ml/l)	Chiều dài lá/chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ/chồi (cm)	Khối lượng tươi/chồi (g)	Hình thái chồi
0	3,40 ^{c*}	3,75 ^{ab}	3,92 ^a	3,22 ^b	1,10 ^d	Chồi xanh, nhỏ
100	4,37 ^b	4,50 ^a	4,10 ^a	3,32 ^b	1,42 ^{ab}	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
200	5,10^a	4,50^a	3,90^a	3,67^a	1,67^a	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
300	4,42 ^b	4,50 ^a	3,80 ^a	3,72 ^a	1,45 ^{ab}	Chồi xanh nhạt, lá cứng, khàn
400	3,57 ^c	3,50 ^b	2,92 ^b	3,12 ^b	1,30 ^{bc}	Chồi xanh nhạt, lá cứng, khàn
500	2,55 ^d	3,25 ^b	1,85 ^c	1,55 ^c	0,77 ^d	Chồi xanh nhạt, lá cứng, khàn, phát triển chậm

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



Hình 1. Chồi lan Vân Hải nuôi cấy trên môi trường có bổ sung nước dừa. A: 0 ml/l, B: 100 ml/l, C: 200 ml/l, D: 300 ml/l, E: 400 ml/l, F: 500 ml/l.

3.2. Ảnh hưởng của nước vo gạo lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Nước vo gạo thường được biết đến với rất nhiều tác dụng trong đời sống con người. Chúng còn được sử dụng để hỗ trợ điều trị viêm loét dạ dày, cao huyết áp, phòng bệnh Alzheimer, giảm thân nhiệt cơ thể, và rất tốt cho hệ tiêu hóa. Ngoài ra, nước vo gạo còn được ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực như: làm trắng da, sữa rửa mặt, sữa tắm, nước tẩy trang, mượt tóc, trắng răng. Trong nước vo gạo có hơn 12 loại vitamin và khoáng chất, bao gồm các chất chống oxi hóa, anthocyanins, vitamin nhóm B, vitamin E, sắt, lignans, mangan, magnesium, kali, selen, kẽm. Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, nước vo gạo đã được sử dụng trong quá trình nhân nhanh phôi vô tính lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis spp.*), kết quả cho thấy khi bổ sung 350 ml/l nước vo gạo cho kết quả tốt nhất cho quá trình chuyển cấu trúc từ phôi sang PLB của lan Hồ Điệp. Trong các thí nghiệm khi bổ sung nước vo gạo thì thời gian giữ mẫu tăng lên 24 tuần, trong khi các thí nghiệm khác thì mẫu cây chỉ duy trì sau 8 tuần nuôi cấy [29].

Kết quả thu được sau 90 ngày nuôi cấy, môi trường bổ sung 200 ml/l nước vo gạo cho kết quả tối ưu về các chỉ tiêu theo dõi so với đối chứng, các chồi có màu xanh đậm, khối lượng tươi trung bình của chồi là 2,10 g/chồi, chiều dài lá là 6,10 cm, số lá là 5,25 lá/chồi, chiều dài rễ là 5,92 cm (hình 2C) (bảng 2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trịnh Thị Hương và cộng sự (2009) khi sử dụng nước vo gạo 150 ml/l để giữ phôi lan Hồ Điệp [29]. Khi tăng tỉ lệ nước vo gạo lên 300 ml/l, sinh trưởng và phát triển của chồi giảm dần về tất cả các chỉ tiêu theo dõi, khối lượng tươi trung bình của chồi là 1,42 g/chồi, chiều dài lá là 4,85 cm, số lá là 4,75 lá/chồi, chiều dài rễ là 4,87 cm, đặc biệt, các lá non có sự chuyển màu từ xanh đậm sang xanh nhạt (hình 2D). Khi tăng tỉ lệ nước vo gạo lên cao từ 400 tới 500 ml/l, các chỉ tiêu theo dõi như: khối lượng tươi và chiều dài lá có sự khác biệt so với đối chứng (bảng 2). Tuy nhiên, các chỉ tiêu về số lá và số rễ/chồi thấp hơn so với đối chứng, sắc tố lá non có sự biến đổi sang màu vàng nhạt và trắng (hình E, F). Việc tăng cao tỉ lệ nước vo gạo có thể đã làm biến đổi thành phần dinh dưỡng của môi trường cũng như là thay đổi pH làm cho cây con không thể hấp thu một số chất khoáng đa vi lượng cần thiết dẫn đến sự biến đổi màu sắc lá non. Như vậy, chồi non lan Vân Hải sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường SH có bổ sung 200 ml/l nước vo gạo, 9 g/l agar, 30 g/l đường, 1 g/l than hoạt tính.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nước vo gạo lên quá trình sinh trưởng và phát triển *in vitro* của chồi lan Vân Hải.

Nước vo gạo (ml/l)	Chiều dài lá/chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ/chồi (cm)	Khối lượng tươi/chồi (g)	Hình thái chồi
0	3,40 ^{c*}	3,75 ^{ab}	3,92 ^{ab}	3,22 ^e	1,10 ^c	Chồi xanh, nhỏ
100	4,85 ^b	4,50 ^a	4,10 ^{ab}	4,35 ^c	1,50 ^b	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
200	6,10^a	5,25^a	4,25^a	5,92^a	2,10^a	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
300	4,85 ^b	4,75 ^a	3,75 ^b	4,87 ^b	1,42 ^b	Chồi xanh nhạt
400	4,75 ^b	4,25 ^b	3,37 ^c	3,85 ^d	1,40 ^b	Chồi xanh nhạt
500	4,70 ^b	4,50 ^b	2,97 ^d	3,30 ^e	1,40 ^b	Chồi xanh nhạt

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



Hình 2. Nuôi cấy có bổ sung nước vo gạo. A: 0 ml/l, B: 100 ml/l, C: 200 ml/l, D: 300 ml/l, E: 400 ml/l, F: 500 ml/l.

3.3. Ảnh hưởng của bột khoai tây lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

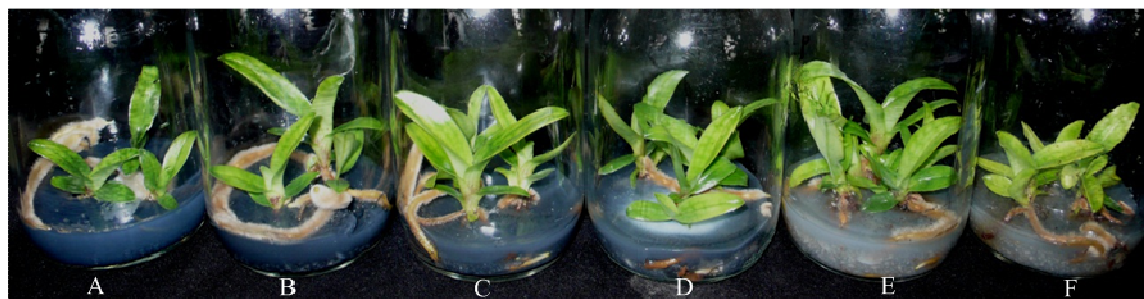
Mohamed và cộng sự [30] sử dụng bột khoai tây như một chất làm đông thay cho agar, khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy 50 hoặc 60 g/l bột khoai tây + 1 g/l agar đã làm tăng số lượng chồi/mẫu cao nhất (6,8 chồi) trên đối tượng khoai tây (*Solanum tuberosum*). Khi bổ sung 60 g/l bột khoai tây vào môi trường nuôi cấy đã làm pH môi trường giảm đáng kể sau 4 tuần nuôi cấy từ 5,31 xuống 4,0 so với môi trường đối chứng có bổ sung 7 g/l agar giảm xuống 4,93. Trong khi đó, môi trường không bổ sung agar đã làm thay đổi EC của môi trường cao hơn đáng kể (172 - 214 $\mu\text{mhos/cm}$) so với môi trường đối chứng EC (129 $\mu\text{mhos/cm}$) [30].

Khi bổ sung bột khoai tây vào môi trường nuôi cấy các chồi sinh trưởng mạnh và có sự khác biệt so với đối chứng (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của bột khoai tây lên quá trình sinh trưởng và phát triển *in vitro* của chồi lan Vân Hải.

Bột khoai tây (g/l)	Chiều dài lá/chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ trung bình/chồi (cm)	Khối lượng tươi/chồi (g)	Hình thái chồi
0	3,40 ^{c*}	3,75 ^c	3,92 ^{bc}	3,22 ^d	1,10 ^d	Chồi xanh, nhỏ
50	4,42 ^b	4,75 ^{ab}	4,22 ^{ab}	4,02 ^{bc}	1,30 ^{bcd}	Chồi xanh nhạt, khỏe mạnh
100	5,05 ^a	4,75 ^{ab}	4,20 ^{ab}	4,10 ^b	1,45 ^{abc}	Chồi xanh nhạt, khỏe mạnh
150	5,10 ^a	5,00 ^{ab}	3,97 ^{abc}	4,00 ^{bc}	1,52 ^{ab}	Chồi xanh nhạt, mỗi chồi hình thành thêm từ 1 - 2 chồi bên mới
200	5,45^a	5,50^a	4,32^a	4,60^a	1,65^a	Chồi xanh nhạt, chồi hình thành thêm từ 1 - 2 chồi bên mới
250	4,02 ^b	4,25 ^{bc}	3,77 ^c	3,75 ^c	1,27 ^{cd}	Chồi xanh nhạt, khắt, phát triển chậm, chồi hình thành thêm từ 1 - 2 chồi bên mới

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



Hình 3. Nuôi cấy bổ sung bột khoai tây. A: 0 g/l, B: 50 g/l, C: 100 g/l, D: 150 g/l, E: 200 g/l, F: 250 g/l.

Khi tăng hàm lượng bột khoai tây từ 50 đến 200 g/l thì có sự gia tăng rõ rệt về các chỉ tiêu theo dõi và đạt cao nhất ở nghiệm thức có bổ sung 200 g/l bột khoai tây, khối lượng tươi đạt 1,65 g/chồi, số lá đạt 5,50 lá/chồi và chiều dài lá đạt 5,45 cm (hình 3E). Khi bổ sung 250 g/l bột khoai tây vào môi trường nuôi cấy, quá trình sinh trưởng của chồi chậm lại, lá chuyển sang màu vàng nhạt, các chỉ tiêu theo dõi đều giảm. Điều này có thể là do bột khoai tây bổ sung vào môi trường cao làm đặc môi trường nuôi cấy nên ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của chồi. Riêng ở hàm lượng từ 150 - 250 g/l trong quá trình sinh trưởng của chồi có hiện tượng các chồi hình thành thêm chồi bên, đây là một hiện tượng rất hiếm gặp trong quá trình nuôi cấy lan Hải và đây cũng là một hướng mới cho các nghiên cứu tiếp theo lên quá trình gia tăng hệ số nhân của chồi bên trên đối tượng lan Hải. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Norhayati và cộng sự [31] khi bổ sung 100 g/l bột khoai tây đã gia tăng hệ số nhân lên gấp 3 lần trên đối tượng *Celosia* sp. [31] và nghiên cứu của Phùng Văn Phê và cộng sự (2010) khi bổ sung 100 g/l bột khoai tây vào môi trường nuôi cấy lan Kim Tuyên (*Anoectochilus roxburghii*), kết quả hệ số nhân nhanh chồi *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy đã tăng gấp 5,5 lần [32]. Như vậy, sau 90 ngày nuôi cấy, chồi non lan Vân Hải sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường SH có bổ sung 100 - 200 g/l bột khoai tây, 9 g/l agar, 30 g/l đường, 1 g/l than hoạt tính.

3.4. Ảnh hưởng của peptone lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

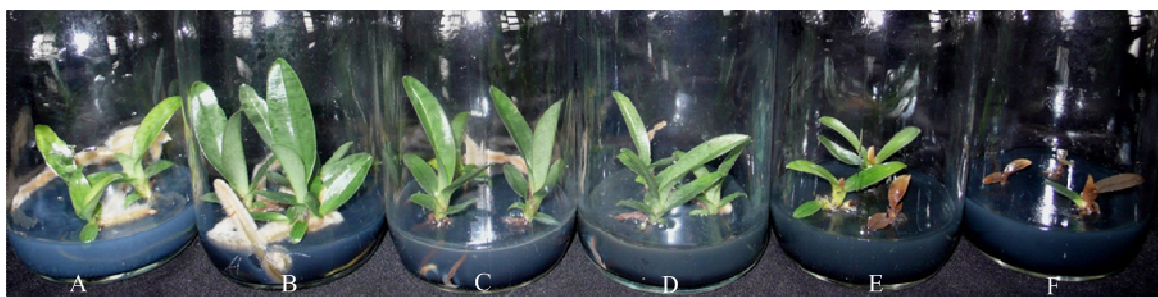
Peptone thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở rất nhiều đối tượng cây trồng, chúng được sử dụng như là một nguồn carbon và nitơ trong nuôi cấy mô thực vật và thúc đẩy sự tăng trưởng của mẫu cấy [33]. Vai trò của peptone là yếu tố tăng cường sự sinh trưởng và phát triển của các mô thực vật. Khi bổ sung peptone vào môi trường nuôi cấy, chức năng của peptone như một elicitor hình thành rễ tơ của nhân sâm [34], sản xuất phôi của *Oncidium* [33]. Seyring [35] cho rằng 2,5 g/l peptone là thích hợp cho sự nảy mầm của hoa Anh Thảo [35]. Nhut và cộng sự [36] đã bổ sung peptone vào môi trường nuôi cấy chồi cây bơ và thu được kết quả tốt nhất khi thêm vào môi trường 2 g/l peptone [36].

Sau 90 ngày nuôi cấy, trên môi trường có bổ sung 1 g/l peptone chồi lan Vân Hải sinh trưởng và phát triển tốt nhất về các chỉ tiêu theo dõi so với đối chứng, các chồi to, khỏe, lá xanh đậm, khối lượng tươi trung bình là 1,52 g/l, chiều dài lá là 4,97 cm, số lá là 4,75 lá/chồi và chiều dài rễ là 4,5 cm (hình 4B). Khi tăng hàm lượng peptone lên 2 g/l các chỉ tiêu theo dõi không có sự khác biệt về mặt thống kê, trừ trọng lượng tươi có giảm nhưng không đáng kể (bảng 4). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Chyuam và cộng sự [9,10] khi bổ sung 1 g/l peptone cho quá trình sinh trưởng và tạo chồi bên của giống lan Vân Hải *Paphiopedilum rothschildianum* và Hossain và cộng sự (2008) cũng đã bổ sung 2 g/l peptone vào môi trường nuôi cấy và nhận thấy có hiệu quả cho quá trình nảy mầm và tăng trưởng mạnh mẽ của protocorm [9, 10, 37]. Trong số các chất bổ sung tăng trưởng hữu cơ thử nghiệm, peptone (2 g/l) chứng tỏ có lợi cho tái sinh chồi và hình thành chồi cao nhất [27]. Khi tăng hàm lượng peptone từ 3 - 5 g/l thì quá trình sinh trưởng của chồi chậm dần. Ở hàm lượng 3 g/l chồi phát triển chậm, các lá xanh cứng, khản và khi tăng từ 4 đến 5 g/l các chồi ngừng hẳn sự phát triển và có biểu hiện chết lá từ trong ra ngoài sau 45 ngày và chết hoàn toàn sau 90 ngày nuôi cấy. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trên chồi hoa của cây *Dianthus* bị thủy tinh thể là do nồng độ peptone cao hơn 3 g/l [38]. Như vậy, chồi non lan Vân Hải sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường SH có bổ sung 1 g/l peptone, 9 g/l agar, 30 g/l đường, 1 g/l than hoạt tính.

Bảng 4. Ảnh hưởng của peptone lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*.

Peptone (g/l)	Chiều dài lá/chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ trung bình/chồi (cm)	Khối lượng tươi/chồi (g)	Hình thái chồi
0	3,40 ^{c*}	3,75 ^b	3,92 ^a	3,22 ^c	1,10 ^d	Chồi xanh, nhỏ
1	4,97 ^a	4,75 ^a	4,27 ^a	4,5a	1,52 ^a	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
2	4,67 ^a	4,75 ^a	3,42 ^a	3,95 ^b	1,37 ^{ab}	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
3	4,20 ^b	4,75 ^a	3,00 ^a	3,20 ^c	1,30 ^b	Chồi xanh đậm, lá cứng, khản
4	2,80 ^d	3,50 ^b	2,12 ^b	1,27 ^d	1,22 ^{cd}	Chồi có hiện tượng hóa nâu, chết đọt
5	2,15 ^e	3,50 ^b	0,00 ^c	0,00 ^e	0,52 ^e	Chồi chết hoàn toàn

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



Hình 4. Nuôi cấy có bổ sung peptone. A: 0 g/l, B: 1 g/l, C: 2 g/l, D: 3 g/l, E: 4 g/l, F: 5 g/l.

3.5. Ảnh hưởng của bột chuối lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*

Bột chuối có hàm lượng fructose, glucose và nitrat cao, khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy làm tăng hàm lượng đường cũng như hàm lượng khoáng của môi trường [39]. Tác dụng kích thích của bột chuối hiệu quả do khả năng ổn định pH của môi trường nuôi cấy [40]. Bổ sung bột chuối vào môi trường đóng vai trò như một chất kháng acid và trung hòa nồng độ acid. Ngoài ra, bột chuối có chứa một hàm lượng lớn như sắt, kali, vitamin B6, B12 và tryptophan thúc đẩy PLBs tăng trưởng [41].

Sau 90 ngày nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy có sự gia tăng đáng kể khi hàm lượng bột chuối tăng từ 50 - 100 g/l (Bảng 5) và đạt cao nhất khi bổ sung 100 g/l bột chuối thể hiện qua các chỉ tiêu theo dõi như khối lượng tươi (1,50 g/chồi), chiều dài lá (4,60 cm), chiều dài rễ (4,37 cm) (hình 5C). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Minea và cộng sự [42] khi bổ sung 100 g/l bột chuối vào môi trường nuôi cấy lan Vanda đã kích thích làm tăng chiều dài chồi và tăng kích thước lá của loài *Spathoglottis kimbal-lianai* [42]. Bột chuối bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã kích thích làm tăng số lượng lá trong nuôi cấy *Dendrobium Nobile* [43]. Bột chuối của các giống chuối khác nhau bổ sung vào môi trường nuôi cấy có sự kích thích đáng kể lên

quá trình tăng trưởng của PLB, bột chiết chuối Rastali, Rastali và Grand naine khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã kích thích nhân nhanh PLB và tối ưu tại 100 g/l, trừ Grand naine có hiệu quả tối ưu ở 200 g/l [41]. Trong thí nghiệm của Saranjeet và cộng sự [27], 50 g/l bột chuối chứng tỏ có lợi cho sự phát triển mạnh của chồi *Cymbidium pendulum* [27]. Các kết quả hiện nay cũng phù hợp với báo cáo của Aktar và cộng sự (2008) cho thấy sự tương tác giữa môi trường ½MS và bột chuối Sabri cho thấy hiệu quả vượt trội về trọng lượng tươi của PLBs *Dendrobium* [39].

Khi hàm lượng bột chuối tăng trên 150 g/l tất cả các chỉ tiêu theo dõi đều có xu hướng giảm dần, các lá non hầu như không phát triển, lá khảm và đặc biệt có sự hình thành của các chồi bên. Khi hàm lượng bột chuối trong môi trường nuôi cấy quá cao làm ức chế sự phát triển của chồi, có thể do áp lực thẩm thấu của môi trường cao và ngăn chặn sự hấp thu nước và các chất cần thiết cho sự phát triển của chồi. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Saranjeet và cộng sự [27] khi hàm lượng bột chuối bổ sung vào môi trường cao hơn (75 g/l) đã chứng minh là bất lợi cho sự sống còn của mẫu cấy, các cơ quan như protocorm bị hoại tử và chết ngay sau đó [27]. Tuy nhiên, hàm lượng cao hơn của bột chiết chuối (200 - 300 g/l) có thể ức chế sự tăng trưởng các PLBs *Phalaenopsis violacea*. Ở hàm lượng cao hơn (200 - 300 g/l) bột chiết chuối Mas làm giảm sự gia tăng tỉ lệ hình thành PLB từ 80 % xuống 70 % và 60 % [41]. Như vậy, chồi non lan Vân Hải sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường SH có bổ sung 100 g/l bột chuối tây, 9 g/l agar, 30 g/l đường, 1 g/l than hoạt tính.

Bảng 5. Ảnh hưởng của bột chuối lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân Hải *in vitro*.

Bột chuối (g/l)	Chiều dài lá/chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ trung bình/chồi (cm)	Khối lượng tươi/chồi (g)	Hình thái chồi
0	3,40 ^{c*}	3,75 ^{ab}	3,92 ^a	3,22 ^b	1,10 ^c	Chồi xanh, nhỏ
50	3,67 ^b	4,50 ^a	4,20 ^a	4,15 ^a	1,35 ^{ab}	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
100	4,60^a	4,25^{ab}	4,10^a	4,37^a	1,50^a	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
150	3,22 ^b	4,00 ^{abc}	2,70 ^a	3,12 ^b	1,22 ^{bc}	Chồi xanh nhạt, lá cứng, khảm
200	3,22 ^c	3,50 ^{bc}	2,47 ^b	2,52 ^c	1,17 ^{bc}	Chồi xanh nhạt, lá cứng, khảm
250	2,37 ^d	3,25 ^c	1,75 ^d	1,62 ^d	0,75 ^d	Chồi xanh nhạt, lá cứng, khảm

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



Hình 5. Nuôi cấy có bổ sung bột chuối. A: 0 g/l, B: 50 g/l, C: 100 g/l, D: 150 g/l, E: 200 g/l, F: 250 g/l.

4. KẾT LUẬN

Trong 5 chất hữu cơ bổ sung vào môi trường nuôi cấy, chồi non lan Vân Hải *in vitro* sinh trưởng và phát triển tốt nhất thu được trên môi trường SH có bổ sung 200 ml/l nước vo gạo, 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 9 g/l agar, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính. Hàm lượng các chất bổ sung hữu cơ như: bột khoai tây (100 - 200 g/l), bột chuối 100 g/l hoặc peptone 1 g/l bổ sung vào môi trường SH với 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 9 g/l agar, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, có thể thay thế cho nước dừa non nhằm mục đích hạ giá thành mà chất lượng cây giống luôn ổn định.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Leonid Averyanov, Phillip Cribb, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tiến Hiệp - Lan Hải Việt Nam, Nhà xuất bản Giao thông vận tải, 2004.
2. Aktar S., Nasiruddin K. M., Khaldun A. B. M. - Organogenesis of *Dendrobium* orchid using traditional media and organic extracts, J. Agr. Rural. Dev. **5** (1&2) (2007) 30-35.
3. Arditti J., Abdul K. A. G. - Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications, New. Phytol. **145** (2000) 367-421.
4. Lee Y. I., Lee N. - Plant regeneration from pro-tocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*, In Vitro. Cell. Dev. Plant. **39** (2003) 475-479.
5. Lo S. F., Nalawade S. M., Kuo C. L., Chen C. L., Tsay S. H. - Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex-vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino- a medicinally important orchid, In Vitro. Cell. Dev. Plant. **40** (2004) 528-535.
6. Malmgren S. - Orchid propagation: theory and practice. dlm: Allen, C. (ed.). North American Native Terrestrial Orchid: Propagation and Production, North American Native Terrestrial Orchid Conference, Maryland, Ms, 1996, pp. 63-71.
7. Schenk R. U., Hildebrandt A. C. - Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyle-donous plant cell cultures, Can. Bot. **50** (1972) 199-204.
8. Huang L. C., Lin C. J., Kuo C. I., Huang B. L., Murashige T. - Paphiopedilum cloning *in vitro*, Sci. Hort. **91** (2001) 111-121.

9. Chyuam Y. N., Saleh N. M. - *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies, *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* **105** (2011)193-202.
10. Chyuam Y. N., Saleh N. M., Zaman F. Q. - *In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae), *Afr. J. Biotechnol.* **9** (14) (2010) 2062-2068.
11. Lin Y. H., Chang C., Chang W. C. - Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid, *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* **62** (2000) 21-25.
12. Patcharawadee W., Eric B., Kongkanda C., Sureeya T. - Effect of cytokinins (BAP and TDZ) and auxin (2,4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*. *Kasetsart. J. Nat. Sci.* **45** (2011) 12-19.
13. Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Trịnh Thị Hương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt. 2012. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan Hải (*Paphiopedilum callosum*), *Tạp chí Công nghệ sinh học* **10** (3) (2012) 487-494.
14. Overbeek van J., Conklin M. E., Blakeslee A. F. - Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos, *Science* **94** (1941) 350-351.
15. Jean W. H., Yong., Liya G., Yan F. N., Swee N. T. - The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water, *Molecules* **14** (2009) 5144-5164.
16. George E. F., Hall M. A., and De Klerk G. J. - *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, The Netherlands **1** (2008) 501.
17. Yong J. W. H., Ge L., Ng Y. F., Tan S. N. - The chemical composition and biology properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water, *Molecules* **14** (2009) 5144-5164.
18. Al-Khayri J. M., Huang F. H., Morelock T. E., Buasharar T. A. - Spinach tissue culture improve with coconut water, *Hort. Sci.* **27** (1992) 357-358.
19. Boase M. R., Wright S., McLeay P. L. - Coconut milk enhancement of axillary shoots growth *in vitro* of kiwifruit. New Zealand, *J. Crop. Hort. Sci.* **21** (1993) 171-176.
20. Maddock S. E., Lancaster V. A., Risiott R., Franklin J. - Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivar of wheat (*Triticum aestivum*), *J. Exp. Bot.* **34** (1983) 915-926.
21. Mathias R. J., Simpson E. S. - The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) callus, *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* **7** (1986) 31-37.
22. Nasib A., Ali K., Khan S. - An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water, *Pak. J. Bot.* **40** (2008) 2355-2360.
23. Bhasker J. - *Micropropagation of Phalaenopsis*. [Ph.D. Thesis.] Thrissur, Kerala Agricultural University, 1996.
24. Shantz E. M., Steward F. C. - Coconut milk factor: The growth promoting substance in coconut milk, *J. Amer. Chem. Soc.* **74** (1952) 6133-6135.
25. Burnet G., Ibrahim R. K. - Tissue culture of Citrus peel and its potential for flavonoid synthesis, *Z. Pflanzenphysiol.* **69** (1973) 152-162.
26. Intuwong O., Sagawa Y. - Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescences, *Amer. Orc. Soc. Bull.* **42** (1973) 264-270.

27. Saranjeet K., Bhutani K. K. - Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum*, HortScience **9** (1) (2012) 47-52.
28. Abdullahil B. M., Shin Y. K., Elshdari T., Lee E. J., Paek K. Y. - Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'), Aust. J. Cro Sci. **5** (10) (2011) 1247-1254.
29. Trịnh Thị Hương, Trịnh Thị Lan Anh, Huỳnh Kim Thùy My, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Nguyễn Minh Nhật, Đặng Xuân Thành, Dương Tấn Nhựt - Ảnh hưởng của một số dịch chiết có nguồn gốc thực vật và thời gian cấy chuyển tới quá trình nhân nhanh phôi vô tính lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis spp.*), Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc khu vực phía Nam (2009) 341-346.
30. Mohamed M. A. H., Alsdon A. A., Al Mohaidib M. S. - Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation, Afr. J. Biotechnol **9** (1) (2010) 12-16.
31. Norhayati D., Rosna M. T., Nor N. M. N., Hasimah A. - Provision of low cost media options for *in vitro* culture of *Celosia sp*, Afr. J. Biotechl. **10** (80) (2011) 18349-18355.
32. Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Trung Thành - Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* loài Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii*, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ **26** (2010) 248-253.
33. Chen J. T., Chang W. C. - Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey', Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. **69** (2002) 41-44.
34. Sivakumar G., Yu K. W., Hahn E. J., Paek K. Y. - Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors, Curr. Sci. India. **89** (2005) 641-649.
35. Seyring M. - Einfluss von pepton auf die differenzierung und keimungsomatischer embryonen von *cyclamen persicum* Mill, BHGL-Schriften-reihe **23** (2005) 119.
36. Nhut D. T., Thi N. N., Khiet B. L. T., Luan V. Q. - Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.), Sci. Hort. **115** (2008) 124-128.
37. Hossain M. M. - Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae), Afr. J. Biotech. **7** (20) (2008) 3614-3619.
38. Seiki S., Manabu H., Sumio I. - Recovering vitrified carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoots using Bacto-peptone and its subfractions, Plant. Cell. Rep. **12** (1993) 370-374.
39. Aktar S., Nasiruddin K. M., Hossain K. - Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* orchid, J. Agr. Rural. Dev. **6** (2008) 69-74.
40. Pierik R. L. M. - *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops, Acta. Hort. **226** (1988) 25-40.
41. Pavallekoodi G., Xavier R., Uma R. S., Sreeramanan S. - A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (plbs) growth of *phalaenopsis violacea* orchid, J. Phycol. **2** (1) (2010) 029-033.
42. Minea M., Piluek C., Menakani T. A., Tantiwiwat S. - A study on seed germination and seedling development of *Spathoglottis kimbaliiani*, J. Nat. Aca. Sci. **38** (2004) 141-156.

43. Sudeep R., Rajeevan P. K., Valasalakumari P. K., Geetha C. K. - Influence of organic supplements on shoot proliferation in *Dendrobium*, J. Hort. Sci. **3** (1997) 38-44.

ABSTRACT

EFFECTS OF ORGANIC ADDITIVES ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF *IN VITRO PAPHIOPEDILUM CALLOSUM* SHOOT

Vu Quoc Luan¹, Trinh Thi Huong¹, Nguyen Phuc Huy¹, Do Khac Thinh², Duong Tan Nhut^{1,*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam,
Vietnam Academy of Agricultural Sciences

*E-mail: duongtannhut@gmail.com

In this study, *in vitro Paphiopedilum callosum* shoots cultured at Department of Plant Molecular Biology and Plant Breeding Biology (Tay Nguyen Institute for Scientific Research) were used as source material. *P. Callosum* shoots with three 2 cm long leaves were cultured on media supplemented with different organic additives in order to find out the most suitable extract for shoot growth and development, to obtain healthy plantlet and to decrease consumer price of seedlings. The supplementation of young coconut water, rice-wash water, potato starch, banana extract, and peptone were investigated. Results showed that kind of organic additive had a great influence on the shoot growth and development. Media supplemented with 200 ml/l rice-wash water resulted in the best growth and development after 90 days of culture. Moreover, these organic additives used as replacements to young coconut water could be applied to reduce costs for media preparation and price of seedlings while vigorous *P. Callosum* shoot growth and development is achieved.

Keywords: coconut water, organic, *Paphiopedilum callosum*, potato starch, rice-wash water.