

## ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH CHIẾT VI KHUẨN LAM ĐẾN NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY LAN HOÀNG THẢO GIẢ HẠC (*Dendrobium anosmum* Lindl.)

Trương Thị Bích Phượng<sup>1</sup>, Tống Văn Bảo Thanh<sup>1</sup>, Phan Thị Thảo Nguyễn<sup>1,2</sup>, Nguyễn Đức Tuấn<sup>1</sup>,  
Lâm Thị Ngọc Thúy<sup>1</sup>, Hoàng Thị Kim Hồng<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Liên<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế, Tinh Lộ 10, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Thu Liên <nthuliencnsh@gmail.com>

(Ngày nhận bài: 20-10-2021; Ngày chấp nhận đăng: 20-06-2022)

**Tóm tắt.** Protocorm của cây lan Hoàng thảo Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) bốn tuần tuổi được sử dụng để làm vật liệu khởi đầu cho nhân giống *in vitro*. Dịch chiết gốc vi khuẩn lam *Arthrospira* sp. được tạo thành bằng cách nghiền 1 g sinh khối tươi trong 100 mL nước cất. Kết quả cho thấy dịch chiết vi khuẩn lam có tác dụng tăng cường sự nhân chồi và ra rễ của cây lan Hoàng thảo Giả hạc nuôi cấy *in vitro*. Môi trường MS cơ bản bổ sung 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> saccharose và 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP kết hợp với 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết vi khuẩn lam thích hợp cho sự nhân protocorm và môi trường tối ưu cho nhân chồi. Đường kính cụm protocorm thu được là 2,43 cm. Môi trường MS cơ bản bổ sung 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> saccharose và 1,0 mg·L<sup>-1</sup> BAP kết hợp với 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết vi khuẩn lam là môi trường tối ưu cho nhân chồi, số chồi/mẫu đạt 4,7; chồi cao 1,37 cm. Môi trường MS cơ bản bổ sung 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> saccharose và 1,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA kết hợp với 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết vi khuẩn lam thích hợp nhất cho tạo rễ từ chồi *in vitro* với 4,87 rễ/chồi; chiều dài rễ là 0,74 cm và chiều cao chồi là 2,76 cm. Kết quả này sẽ mở ra triển vọng ứng dụng dịch chiết vi khuẩn lam giúp giảm chi phí trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.

**Từ khóa:** *Dendrobium anosmum*, dịch chiết vi khuẩn lam, nhân giống *in vitro*, nhân nhanh chồi, tạo rễ

## Effect of cyanobacterial extract on *in vitro* propagation of *Dendrobium anosmum* Lindl.

Trương Thị Bích Phượng<sup>1</sup>, Tống Văn Bảo Thanh<sup>1</sup>, Phan Thị Thảo Nguyễn<sup>1,2</sup>, Nguyễn Đức Tuấn<sup>1</sup>,  
Lâm Thị Ngọc Thúy<sup>1</sup>, Hoàng Thị Kim Hồng<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Liên<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Hue University, Provincial Highway 10 St., Hue, Vietnam

\* Correspondence to Nguyễn Thị Thu Liên <nthuliencnsh@gmail.com>

(Received: 20 October 2021; Accepted: 20 June 2022)

**Abstract.** Protocorms of 4-week-old *Dendrobium anosmum* Lindl. were used as initial material for *in vitro* propagation. The stock extract of *Arthrospira* sp. was prepared by grinding 1 g of fresh biomass in 100 mL of distilled water. The *in vitro* propagation results show that the cyanobacterial extract has the effect

of enhancing shoot multiplication and rooting of *Dendrobium anosmum*. An MS basal medium supplemented with 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> saccharose, and 1.5 mg·L<sup>-1</sup> BAP in combination with 20 mL·L<sup>-1</sup> cyanobacteria extract was suitable for protocorm multiplication with a protocorm cluster diameters of 2.43 cm. An MS medium supplemented with 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BAP combined with 20 mL·L<sup>-1</sup> cyanobacterial extract was optimal for shoot multiplication. The number of shoots/explant reached 4.7 and a shoot height of 1.37 cm. An MS medium supplemented with 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, and 1.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA in combination with 30 mL·L<sup>-1</sup> cyanobacteria extract was the most suitable for rooting with 4.87 roots/bud; the root length was 0.74 cm, and the shoot height was 2.76 cm. These results would open up the application of cyanobacterial extract to reduce costs in plant tissue culture technology.

**Keywords:** *Dendrobium anosmum*, cyanobacterial extract, *in vitro* propagation, shoot multiplication, rooting

## 1 Mở đầu

Khả năng tái sinh *in vitro* của thực vật phụ thuộc nhiều vào các kỹ thuật nuôi cấy mô mang lại nhiều thành công trong cải thiện cây trồng [1]. Hiện kỹ thuật nuôi cấy mô đã được ứng dụng thành công trên nhiều loại cây trồng, cây rừng và cây ăn quả ở các phòng thí nghiệm vi nhân giống thương mại trên toàn thế giới. Tuy nhiên, công nghệ tế bào thực vật sử dụng nhiều vốn, lao động và năng lượng. Do đó, cần phải có các lựa chọn các phương án kỹ thuật với chi phí thấp hỗ trợ cho công nghệ nuôi cấy mô. Trong các công nghệ chi phí thấp, việc giảm chi phí đạt được bằng cách cải thiện hiệu suất của quy trình và sử dụng tốt hơn các nguồn tài nguyên sẵn có trong tự nhiên thay cho hóa chất thương mại [2]. Hai loại phytohormone, tức là cytokinin và auxin rất quan trọng đối với quá trình tái sinh *in vitro* của thực vật [3]. Vi khuẩn lam (VKL) được biết là có khả năng tích lũy và giải phóng nhiều loại phytohormone như auxin, gibberellin, cytokinin, vitamin, polypeptide và amino acid, giúp thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của cây trồng [4]. Có nhiều ví dụ về vi khuẩn lam từ các chi khác nhau tạo ra cả IAA ngoại sinh và nội sinh [5] và ứng dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Tái sinh *in vitro* cây *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum*, *Brassica oleracea*, *Nicotiana tabacum* và cây cảnh *Lilium alexandrae* đã được thực hiện thành công trong môi trường MS có bổ sung chất chiết xuất từ

vi khuẩn lam [6, 7]. Ở Việt Nam, nghiên cứu sử dụng dịch chiết VKL *Spirulina* đã không những kích thích quá trình tạo chồi mà còn gia tăng tỉ lệ sống của cây Lan hài hồng *in vitro* [8].

Lan Hoàng thảo (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là một trong những loài lan rừng có giá trị nhờ vẻ đẹp và hương thơm của nó. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu hỗ trợ phát triển kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào với chi phí thấp và thân thiện môi trường để nhân nhanh giống lan phục vụ thị trường cây cảnh. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn lam *Arthrospira* sp. đến nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.). Loài vi khuẩn lam này có nguồn gốc địa phương, được nuôi trồng dễ dàng. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng dịch chiết VKL làm giảm chi phí trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.

## 2 Vật liệu và phương pháp

### 2.1 Vật liệu

– Vật liệu nuôi cấy khởi đầu của chúng tôi là protocorm của cây lan Hoàng thảo Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) bốn tuần tuổi do phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh học ứng dụng, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

– Dịch chiết vi khuẩn lam (*Arthrospira* sp.) có nguồn gốc từ sông Như Ý, thành phố Huế.

## 2.2 Phương pháp

### Chuẩn bị dịch chiết vi khuẩn lam

Vi khuẩn lam được nuôi trong môi trường Z8 [9] trong bình nuôi 5 L, thu sinh khối sau 18 ngày nuôi cấy bằng cách lọc qua lưới. Sinh khối tươi của VKL được giữ đông (trong ngăn đá tủ lạnh) trong 12 h để phá vỡ tế bào; sau đó nghiền bằng cối chày sứ vô trùng. Dịch chiết gốc được điều chế bằng cách nghiền 1 g sinh khối tươi trong 100 mL nước cất. Lọc dịch nghiền qua giấy lọc để lấy dịch chiết nội bào sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Dịch chiết được bảo quản trong tủ lạnh ở  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến khi sử dụng.

### Nhân protocorm

Các protocorm được cấy chuyển trên môi trường MS chứa  $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar,  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  saccharose và bổ sung dịch chiết vi khuẩn lam ở nồng độ  $10\text{--}40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  và chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) BAP (6-benzylaminopurine) hay KIN (kinetin) ở nồng độ  $0,5\text{--}2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  hoặc bổ sung dịch VKL ở nồng độ  $20$  và  $30\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  kết hợp với BAP hoặc KIN ở nồng độ  $0\text{--}2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  để đánh giá ảnh hưởng của dịch VKL riêng rẽ và kết hợp với chất ĐHST đến nhân protocorm. Theo dõi các chỉ tiêu gồm đường kính cụm protocorm (cm), hình thái protocorm và mức độ tạo chồi (đánh giá bằng cảm quang). Số liệu nghiên cứu được thu thập sau bốn tuần nuôi cấy.

### Nhân chồi

Chồi *in vitro* ( $1\text{--}1,5\text{ cm}$ ) được tách riêng rẽ, cấy trên môi trường MS chứa  $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar,  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  saccharose và bổ sung riêng rẽ BAP và KIN từ  $0,5$  đến  $2,0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , kết hợp với dịch chiết VKL ở nồng độ  $20$  và  $30\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  để thăm dò khả năng nhân nhanh chồi. Số liệu được thu thập sau bốn tuần nuôi cấy. Theo dõi các chỉ tiêu gồm số chồi, chiều cao chồi (cm), và đặc điểm chồi (bằng mô tả).

### Tạo rễ từ chồi *in vitro*

Chồi *in vitro* ( $1,5\text{--}2,0\text{ cm}$ ) được tách riêng rẽ và cấy trên môi trường cơ bản MS chứa  $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar,  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  saccharose và bổ sung dịch chiết VKL ở nồng độ ( $10\text{--}40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ) và NAA (1-naphthaleneacetic acid) hay IBA (indole-3-butyric acid) ở nồng độ  $0,5\text{--}2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  để đánh giá ảnh hưởng của VKL đối với sự tạo rễ so với chất ĐHST bổ sung. Số liệu nghiên cứu được thu thập sau bốn và sáu tuần nuôi cấy. Theo dõi các chỉ tiêu gồm số rễ và độ dài rễ.

### Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện đồng nhất về nhiệt độ ( $24\text{--}26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), cường độ chiếu sáng ( $2000\text{--}3000\text{ lux}$ ) và thời gian chiếu sáng ( $16\text{ h}$  trong một ngày). Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần, mỗi lần tối thiểu mười mẫu.

### Xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm SPSS 22 với mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

## 3 Kết quả

### 3.1 Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn lam đến nhân protocorm lan Hoàng thảo Giả hạc

Cụm protocorm (đường kính  $0,2\text{--}0,5\text{ cm}$ ) có màu xanh nhạt hoặc vàng chanh, được cấy chuyển lên môi trường MS bổ sung riêng rẽ BAP và KIN ở các nồng độ khác nhau ( $0,5\text{--}2,0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) hoặc dịch chiết vi khuẩn lam ở nồng độ  $10\text{--}40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  để thăm dò khả năng nhân nhanh protocorm sau bốn tuần nuôi cấy. Kết quả khảo sát khả năng nhân protocorm sau bốn tuần nuôi cấy thông qua theo dõi các thông số đường kính protocorm, đặc điểm hình thái và mức độ tạo chồi được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng riêng rẽ của BAP, KIN và dịch chiết VKL đến khả năng nhân protocorm sau bốn tuần nuôi cấy

Dịch chiết VKL (mL·L <sup>-1</sup> )	Chất ĐHST (mg·L <sup>-1</sup> )		Đường kính protocorm (cm)	Đặc điểm hình thái	Mức độ tạo chồi
	BAP	KIN			
10			1,35 <sup>b</sup>	Xanh, nhỏ	++
20			<b>1,66<sup>a</sup></b>	<b>Xanh, to</b>	+++
30			<b>1,69<sup>a</sup></b>	<b>Xanh, to</b>	+++
40			1,17 <sup>cd</sup>	Xanh nhạt, to	++
	0,5		0,82 <sup>f</sup>	Xanh nhạt, nhỏ	+
	1,0		0,95 <sup>f</sup>	Xanh nhạt	+
	1,5		1,33 <sup>b</sup>	Xanh, nhỏ	++
	2,0		1,08 <sup>cde</sup>	Xanh nhạt, nhỏ	+
		0,5	1,08 <sup>cde</sup>	Xanh nhạt, nhỏ	+
		1,0	1,23 <sup>bc</sup>	Xanh nhạt, nhỏ	++
		1,5	1,38 <sup>b</sup>	Xanh, nhỏ	++
		2,0	1,07 <sup>de</sup>	Xanh nhạt	+

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Kiểm định Duncan). -: Không phát sinh chồi; +: Phát sinh chồi yếu; ++: Phát sinh chồi trung bình; +++: Phát sinh chồi mạnh.

Sau bốn tuần nuôi cấy, môi trường bổ sung dịch chiết vi khuẩn lam có tác động tốt đến khả năng nhân protocorm. Trên môi trường bổ sung 20 và 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL, cụm protocorm có kích thước lớn và mức độ phát sinh chồi mạnh. Vì

vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phối hợp sử dụng dịch chiết với các chất ĐHST. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng kết hợp BAP, KIN và dịch chiết VKL đến khả năng nhân protocorm sau bốn tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của kết hợp BAP hoặc KIN với dịch chiết VKL đến khả năng nhân protocorm sau bốn tuần nuôi cấy

Dịch chiết VKL (mL·L <sup>-1</sup> )	Chất ĐHST (mg·L <sup>-1</sup> )		Đường kính protocorm (cm)	Đặc điểm hình thái	Mức độ tạo chồi
	BAP	KIN			
20	0,0		1,66 <sup>cd</sup>	Xanh	+++
	0,5		1,96 <sup>bcd</sup>	Xanh nhạt	+
	1,0		2,13 <sup>ab</sup>	Xanh	+++
	<b>1,5</b>		<b>2,43<sup>a</sup></b>	<b>Xanh</b>	+++
	2,0		2,18 <sup>ab</sup>	Xanh	+++
30	0,0		1,69 <sup>cd</sup>	Xanh	+++
	0,5		1,91 <sup>bcd</sup>	Xanh nhạt	+
	1,0		2,21 <sup>ab</sup>	Xanh	+++
	1,5		2,01 <sup>bc</sup>	Xanh nhạt	++
	2,0		1,62 <sup>d</sup>	Xanh nhạt	+

Dịch chiết VKL (mL·L <sup>-1</sup> )	Chất ĐHST (mg·L <sup>-1</sup> )		Đường kính protocorm (cm)	Đặc điểm hình thái	Mức độ tạo chồi
	BAP	KIN			
20		0,0	1,66 <sup>d</sup>	Xanh	+++
		0,5	1,79 <sup>bcd</sup>	Xanh nhạt	+
		1,0	2,05 <sup>ab</sup>	Xanh	+++
		<b>1,5</b>	<b>2,21<sup>a</sup></b>	<b>Xanh</b>	+++
		2,0	1,99 <sup>abc</sup>	Xanh nhạt	++
30		0,0	1,69 <sup>cd</sup>	Xanh	+++
		0,5	2,02 <sup>ab</sup>	Xanh	+++
		<b>1,0</b>	<b>2,18<sup>a</sup></b>	<b>Xanh</b>	+++
		1,5	1,76 <sup>bcd</sup>	Xanh nhạt	++
		2,0	1,53 <sup>d</sup>	Xanh nhạt	+

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Kiểm định Duncan). -: Không phát sinh chồi; +: Phát sinh chồi yếu; ++: Phát sinh chồi trung bình; +++: Phát sinh chồi mạnh; ++++: Phát sinh chồi rất mạnh

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy việc bổ sung 20 và 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL kết hợp với BAP và KIN vào môi trường nuôi cấy có tác động tốt đến khả năng nhân protocorm sau bốn tuần nuôi cấy. Môi trường bổ sung 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết vi khuẩn lam kết hợp với BAP và KIN nồng độ 1,5 mg·L<sup>-1</sup> có ảnh hưởng tốt nhất tới khả năng nhân protocorm với đường kính cụm 2,43 và 2,21 cm (Hình 1a,b). Protocorm có màu xanh, kích thước lớn; các protocorm tạo chồi và chồi phát triển mạnh. Môi trường kết hợp 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP và 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL cho đường kính protocorm tăng 1,82 lần so với môi trường chỉ bổ sung 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP (đường kính protocorm chỉ đạt 1,33 cm). Trên môi trường bổ sung 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL kết hợp với BAP nồng độ từ 0,5 và 2 mg·L<sup>-1</sup>, protocorm có kích thước nhỏ, màu xanh nhạt, mức độ phát sinh chồi yếu. Trong khi đó, môi trường bổ sung 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL kết hợp với KIN nồng độ 1 mg·L<sup>-1</sup> cho protocorm tốt (đường kính cụm protocorm đạt 2,18 cm) và chồi phát sinh mạnh (Hình 1c).

Như vậy, môi trường thích hợp cho nhân nhanh protocorm là môi trường kết hợp 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP và 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL cho đường kính protocorm 2,43 cm.



**Hình 1.** Nhân giống *in vitro* cây Lan Hoàng thảo Giả hạc

Protocorm sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung: a. 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL; b. 1,5 mg·L<sup>-1</sup> KIN + 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL; c. 1,0 mg·L<sup>-1</sup> KIN + 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL.

Chồi sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung: d. 1,0 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL; e. 1,0 mg·L<sup>-1</sup> KIN + 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL; f. 1,5 mg·L<sup>-1</sup> KIN + 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL.

Rễ sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung: g. 1,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA; h. 1,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL; i. 1,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL; — Thước 1 cm.

### 3.2 Ảnh hưởng của BAP, KIN và dịch chiết VKL đến khả năng nhân chồi

Các chồi phát triển từ protocorm (1–2 lá mầm) được tách riêng và cấy trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung riêng rẽ và phối hợp BAP, KIN (0,5–2 mg·L<sup>-1</sup>) và dịch chiết VKL (10–40 mL·L<sup>-1</sup>) để thăm dò khả năng nhân chồi. Kết quả ảnh hưởng của các chất ĐHST đến quá trình nhân chồi được đánh

giá thông qua số chồi/mẫu, chiều cao chồi và hình thái chồi (Bảng 3).

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy dịch chiết VKL có hiệu quả tích cực đến nhân chồi. Môi trường bổ sung 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL có ảnh hưởng tốt nhất tới khả năng nhân nhanh chồi với 3,07 chồi từ một chồi ban đầu, chiều cao chồi trung bình là 1,38 cm, chồi xanh, mập.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng riêng rẽ của BAP, KIN và dịch chiết VKL đến khả năng nhân nhanh chồi sau bốn tuần nuôi cấy

Dịch chiết VKL (mL·L <sup>-1</sup> )	Chất ĐHST (mg·L <sup>-1</sup> )		Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm hình thái
	BAP	KIN			
10			2,48 <sup>bc</sup>	1,06 <sup>bc</sup>	Chồi xanh, nhỏ
20			3,00 <sup>ab</sup>	<b>1,32<sup>a</sup></b>	Chồi xanh, mập
30			<b>3,07<sup>a</sup></b>	<b>1,38<sup>a</sup></b>	<b>Chồi xanh, mập</b>
40			2,12 <sup>cd</sup>	1,19 <sup>ab</sup>	Chồi chậm phát triển
	0,5		2,33 <sup>cd</sup>	0,95 <sup>c</sup>	Chồi xanh nhạt, nhỏ
	1,0		2,70 <sup>abc</sup>	1,04 <sup>bc</sup>	Chồi xanh nhạt
	1,5		2,48 <sup>bc</sup>	<b>1,29<sup>a</sup></b>	Chồi xanh nhạt, mập
	2,0		2,12 <sup>cd</sup>	1,03 <sup>bc</sup>	Chồi xanh nhạt, nhỏ
		0,5	2,13 <sup>cd</sup>	1,07 <sup>bc</sup>	Chồi xanh nhạt, nhỏ
		1,0	2,24 <sup>cd</sup>	1,18 <sup>ab</sup>	Chồi chậm phát triển
		1,5	2,57 <sup>abc</sup>	<b>1,39<sup>a</sup></b>	Chồi xanh nhạt
		2,0	1,77 <sup>d</sup>	<b>1,28<sup>a</sup></b>	Chồi xanh nhạt, nhỏ

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Kiểm định Duncan).

### 3.3 Ảnh hưởng kết hợp của BAP, KIN và dịch chiết VKL đến khả năng nhân chồi

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BAP và KIN (0–2 mg·L<sup>-1</sup>) kết hợp dịch chiết VKL 20 và 30 mL·L<sup>-1</sup> đến khả năng nhân nhanh chồi sau bốn tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 4 và Hình 1. Kết quả cho thấy môi trường bổ sung BAP và KIN kết hợp với dịch chiết VKL có tác động tốt đến khả

năng nhân chồi *in vitro*, thể hiện ở sự gia tăng số chồi/mẫu, chiều cao chồi và hình thái chồi. Đối với số lượng chồi thì nồng độ dịch chiết VKL 20 mL·L<sup>-1</sup> kết hợp với BAP 1 mg·L<sup>-1</sup> cho số chồi/mẫu cao nhất (4,7 chồi/mẫu) (Hình 1d), tăng 1,74 lần so với môi trường chỉ bổ sung 1 mg·L<sup>-1</sup> BAP (chỉ đạt 2,7 chồi/mẫu). Chồi có màu xanh; đường kính chồi tăng với 3–4 lá. Về chiều cao chồi thì nồng độ VKL 30 mL·L<sup>-1</sup> kết hợp với KIN 1 mg·L<sup>-1</sup> cho kết quả tốt nhất (1,69 cm).

**Bảng 4.** Ảnh hưởng kết hợp của dịch chiết VKL với BAP hoặc KIN đến khả năng nhân nhanh chồi sau bốn tuần nuôi cấy

Dịch chiết VKL (mL·L <sup>-1</sup> )	Chất ĐHST (mg·L <sup>-1</sup> )		Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm hình thái
	BAP	KIN			
20		0,0	3,00 <sup>c</sup>	1,32 <sup>ab</sup>	Chồi xanh, mập
		0,5	3,76 <sup>abc</sup>	<b>1,48<sup>a</sup></b>	Chồi xanh, nhỏ
		<b>1,0</b>	<b>4,70<sup>a</sup></b>	<b>1,37<sup>ab</sup></b>	<b>Chồi xanh, mập</b>
		1,5	4,11 <sup>ab</sup>	1,31 <sup>ab</sup>	Chồi xanh nhạt
		2,0	3,37 <sup>bc</sup>	1,06 <sup>b</sup>	Chồi xanh nhạt, nhỏ
30		0,0	3,07 <sup>bc</sup>	1,38 <sup>ab</sup>	Chồi xanh, mập
		0,5	3,68 <sup>abc</sup>	<b>1,58<sup>a</sup></b>	Chồi xanh, nhỏ
		1,0	3,96 <sup>abc</sup>	<b>1,51<sup>a</sup></b>	Chồi xanh, nhỏ
		1,5	3,67 <sup>abc</sup>	1,30 <sup>ab</sup>	Chồi xanh nhạt, nhỏ
		2,0	3,04 <sup>bc</sup>	1,12 <sup>b</sup>	Chồi chậm phát triển
20			0,0	3,00 <sup>c</sup>	Chồi xanh nhạt, nhỏ
			0,5	3,48 <sup>ab</sup>	Chồi xanh nhạt, mập
		<b>1,0</b>	<b>4,14<sup>a</sup></b>	<b>1,61<sup>a</sup></b>	<b>Chồi xanh, mập</b>
		<b>1,5</b>	<b>4,39<sup>a</sup></b>	1,49 <sup>ab</sup>	Chồi xanh, mập
		2,0	3,77 <sup>ab</sup>	1,31 <sup>ab</sup>	Chồi xanh nhạt, mập
30			0,0	3,07 <sup>b</sup>	Chồi xanh nhạt, nhỏ
			0,5	3,68 <sup>ab</sup>	Chồi xanh nhạt, mập
		1,0	3,93 <sup>ab</sup>	<b>1,69<sup>a</sup></b>	Chồi xanh, mập
		1,5	3,47 <sup>ab</sup>	1,42 <sup>ab</sup>	Chồi xanh nhạt, mập
		2,0	2,96 <sup>c</sup>	1,19 <sup>b</sup>	Chồi xanh, nhỏ

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Kiểm định Duncan).

### 3.4 Ảnh hưởng của NAA, IBA và dịch chiết VKL đến tạo rễ

Các chồi *in vitro* (cao 1,5–2 cm) được tách riêng và cấy trên môi trường cơ bản MS bổ sung

NAA, IBA (0,5–2 mg·L<sup>-1</sup>) và dịch chiết VKL (10–40 mL·L<sup>-1</sup>) để khảo ảnh hưởng của các chất ĐHST đến khả năng hình thành và phát triển rễ từ chồi *in vitro*. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng riêng rẽ của NAA, IBA và dịch chiết VKL đến khả năng hình thành và phát triển rễ từ chồi *in vitro* sau sáu tuần nuôi cấy

Dịch chiết VKL (mL·L <sup>-1</sup> )	Chất ĐHST (mg·L <sup>-1</sup> )		Số rễ/chồi	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài rễ (cm)
	NAA	IBA			
10			2,33 <sup>d</sup>	1,97 <sup>ef</sup>	0,56 <sup>ef</sup>
20			2,63 <sup>cd</sup>	2,18 <sup>de</sup>	<b>1,12<sup>a</sup></b>
30			2,33 <sup>d</sup>	1,81 <sup>f</sup>	0,57 <sup>ef</sup>
40			1,67 <sup>e</sup>	1,76 <sup>f</sup>	0,64 <sup>cdef</sup>
	0,5		2,89 <sup>bcd</sup>	1,99 <sup>ef</sup>	0,70 <sup>bcd</sup>
	1,0		3,40 <sup>b</sup>	2,51 <sup>bc</sup>	0,78 <sup>bcd</sup>
	<b>1,5</b>		<b>4,11<sup>a</sup></b>	<b>2,67<sup>ab</sup></b>	<b>0,87<sup>b</sup></b>
	2,0		3,27 <sup>bc</sup>	<b>2,77<sup>a</sup></b>	0,60 <sup>def</sup>
		0,5	3,07 <sup>bc</sup>	2,43 <sup>bcd</sup>	0,82 <sup>bc</sup>
		1,0	3,20 <sup>bc</sup>	2,35 <sup>cd</sup>	0,57 <sup>ef</sup>
		1,5	3,13 <sup>bc</sup>	2,31 <sup>cd</sup>	0,55 <sup>ef</sup>
		2,0	2,60 <sup>cd</sup>	1,92 <sup>ef</sup>	0,51 <sup>f</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Kiểm định Duncan).

Môi trường bổ sung dịch chiết VKL riêng rẽ tác động kém hiệu quả đối với sự ra rễ. Số rễ/chồi, chiều cao chồi và chiều dài rễ nhỏ hơn so với các nghiệm thức bổ sung NAA và IBA. NAA có tác động tốt nhất đến khả năng tạo rễ của chồi *in vitro*. Môi trường bổ sung NAA 1,5 mg·L<sup>-1</sup> là thích hợp nhất cho quá trình hình thành rễ, đạt 4,11 số rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 0,87 cm (Hình 1g). Ở nồng độ 2 mg·L<sup>-1</sup> NAA, chiều cao chồi cao nhất đạt 2,77 cm.

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của NAA 1,5

mg·L<sup>-1</sup> kết hợp với dịch chiết VKL với nồng độ 0–40 mL·L<sup>-1</sup>. Kết quả trình bày ở Bảng 6 cho thấy NAA nồng độ 1,5 mg·L<sup>-1</sup> kết hợp với dịch chiết VKL nồng độ 30 mL·L<sup>-1</sup> cho số rễ lớn nhất (4,87 số rễ/chồi, tăng 1,18 lần so với môi trường chỉ bổ sung NAA 1,5 mg·L<sup>-1</sup>) và chiều dài rễ là 0,74 cm (Hình 1i). So với nhân protocorm và nhân chồi, dịch chiết tảo lam ít ảnh hưởng đến quá trình tạo rễ. Nhìn chung, sự khác biệt về số rễ giữa các công thức không lớn.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của 1,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA kết hợp với dịch chiết VKL đến tạo rễ sau sáu tuần nuôi cấy

NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	Dịch chiết VKL (mL·L <sup>-1</sup> )	Số rễ/chồi	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài rễ (cm)
	0	4,11 <sup>c</sup>	2,67 <sup>b</sup>	<b>0,87<sup>a</sup></b>
	10	4,15 <sup>bc</sup>	2,48 <sup>b</sup>	0,71 <sup>a</sup>
1,5	20	4,47 <sup>b</sup>	2,50 <sup>b</sup>	0,72 <sup>a</sup>
	<b>30</b>	<b>4,87<sup>a</sup></b>	<b>2,76<sup>a</sup></b>	0,74 <sup>a</sup>
	40	3,93 <sup>c</sup>	2,45 <sup>b</sup>	0,71 <sup>a</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Kiểm định Duncan).



## 4 Thảo luận

Các chất hữu cơ thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để kích thích sinh trưởng của mẫu vật. Một số vật chất hữu cơ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy lan như chuối, khoai tây, nước dừa, pepton, tripton, bột nấm men và tảo spirulina [8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn lam lên quá trình sinh trưởng và phát triển của lan Hoàng thảo Giả hạc nuôi cấy *in vitro*.

Vi khuẩn lam quang hợp tạo ra nhiều loại chất, bao gồm chất kháng sinh, vitamin và chất điều hòa sinh trưởng thực vật [10]. Trong số các chất điều hòa sinh trưởng, gibberellin, auxin, cytokinin, ethylene, acid abscisic và acid jasmonic đã được phát hiện trong VKL [11].

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ dịch chiết VKL 20 mL·L<sup>-1</sup> kết hợp với KIN 1 mg·L<sup>-1</sup> cho số chồi/mẫu cao nhất (4,7 chồi/mẫu). Về chiều cao chồi thì nồng độ VKL 30 mL·L<sup>-1</sup> kết hợp với KIN 1 mg·L<sup>-1</sup> cho kết quả tốt nhất (1,69 cm). Theo Benerjee và Sarkar, hiệu quả kết hợp của vi khuẩn lam và môi trường MS (70 + 30 mL) được công bố là tối ưu cho sự tăng sinh chồi *Stevia rebaudiana in vitro*, cho 20 chồi/ mẫu cấy với chiều dài chồi 9,5 cm [12]. Kết quả tương tự cũng thu được với một loại dược liệu khác là *Becopa monneri*. Phản ứng tốt nhất thu được trên môi trường có vi khuẩn lam bổ sung KIN 2 mg·L<sup>-1</sup> cho tần số tái sinh 80% với tối đa 5 chồi/ mẫu [13]. Trong một công bố khác sử dụng môi trường nuôi cấy VKL để chuẩn hóa quy trình tái sinh của *Becopa monneri*, chồi được tái sinh từ các mẫu đoạn thân có mất lá thông qua sự tăng sinh chồi bên [14, 15]. Ở Việt Nam, Nguyễn Thị Cúc và cs. cho thấy việc bổ sung tảo *Spirulina* có tác động tốt đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi lan Hải hồng *in vitro* [8]. Số lá, số chồi, chiều cao chồi và tỷ lệ sống của mẫu cấy đạt tốt nhất khi bổ sung 50 mg·L<sup>-1</sup> bột tảo. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy dịch chiết của vi khuẩn lam cũng có tác động tốt đến nhân protocorm, nhân chồi và tạo rễ của lan

Hoàng thảo Giả hạc khi bổ sung riêng rẽ hoặc kết hợp với chất điều hòa sinh trưởng.

## 5 Kết luận

Dịch chiết vi khuẩn lam có tác dụng tăng cường sự nhân chồi và ra rễ của cây lan Hoàng thảo Giả hạc nuôi cấy *in vitro*. Môi trường MS cơ bản, bổ sung 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> saccharose và 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP kết hợp với 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết vi khuẩn lam, thích hợp cho sự nhân nhanh protocorm với đường kính cụm protocorm là 2,43 cm. Môi trường MS cơ bản, bổ sung 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> saccharose và 1 mg·L<sup>-1</sup> BAP kết hợp với 20 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết VKL, thích hợp cho nhân chồi; số chồi/mẫu đạt 4,70; chồi cao 1,37 cm. Môi trường MS cơ bản, bổ sung 6 g·L<sup>-1</sup> agar, 30 g·L<sup>-1</sup> saccharose và 1,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA kết hợp với 30 mL·L<sup>-1</sup> dịch chiết tảo, thích hợp nhất cho tạo rễ từ chồi *in vitro* với 4,87 rễ/chồi; chiều dài rễ là 0,74 cm và chiều cao chồi là 2,76 cm.

## Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này do Đại học Huế tài trợ trong đề tài mã số DHH 2019-15-14.

## Tài liệu tham khảo

1. Özgen M, Türet M, Altınok S, Sancak C. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*. 1998;18(3):331-5.
2. Savangikar VA. Role of low cost options in tissue culture. International Atomic Energy Agency (IAEA); 2004. Report No.: 1011-4289 92-0-115903-X Contract No.: IAEA-TECDOC--1384.
3. Hussain A, Hasnain S. Comparative assessment of the efficacy of bacterial and cyanobacterial phytohormones in plant tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;28(4):1459-66.
4. Stirk WA, Ördög V, Van Staden J, Jäger K. Cytokinin-and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied phycology*. 2002;14(3):215-21.

5. Singh DP, Prabha R, Yandigeri MS, Arora DK. Cyanobacteria-mediated phenylpropanoids and phytohormones in rice (*Oryza sativa*) enhance plant growth and stress tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011;100(4):557-68.
6. Shanab S, Saker MM, Abdel-Rahman MHM. Crude extracts of some fresh water Cyanobacteria have auxin like activity on potato tissue culture. *Arab J Biotechnol*. 2003;6(2):297-312.
7. Boopathi T, Balamurugan V, Gopinath S, Sundararaman M. Characterization of IAA production by the mangrove cyanobacterium *Phormidium* sp. MI405019 and its influence on tobacco seed germination and organogenesis. *Journal of plant growth regulation*. 2013;32(4):758-66.
8. Cúc NT, Kết NV, Nhật DT, Lý NTK. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển cây lan hải hồng (*Paphiopedilum delenatii*) *in vitro*. *Tạp chí Sinh học*. 2014;36(1se):250-6.
9. Kotai J. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research, Oslo. 1972;11(69):5.
10. Metting B, Pyne JW. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*. 1986;8(7):386-94.
11. Zaccaro MC, Kato A, Zulpa G, Storni MM, Steyerthal N, Lobasso K, et al. Bioactivity of *Scytonema hofmanni* (Cyanobacteria) in *Lilium alexandrae* *in vitro* propagation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006;9(3):211-214.
12. Banerjee M, Sarkar P. *In vitro* callusing in *Stevia rebaudiana* Bertoni using cyanobacterial media—a novel approach to tissue culture. *International Journal of Integrative Biology*. 2008;3(3):163-8.
13. Mehta J, Kumar V, Syedy M, Upadhyay D, Ansari R, Bisht V, et al. *In vitro* shoot regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) using cyanobacterial media—a novel approach and effect of phyto regulators on *in vitro* micropropagation. *Asian J Plant Sci Res*. 2012;2:699-706.
14. Ghasolia B, Shandilya D, Maheshwari R. Multiple shoot regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) using cyanobacterial media—a novel approach and effect of phyto regulators on *in vitro* micropropagation. *Int J Recent Biotechnol*. 2013;1(2):27-33.
15. Banerjee M, Modi P. Micropropagation of *Bacopa monnieri* using cyanobacterial liquid medium. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 2010;20(2):225-31.