

NGHIÊN CỨU VI NHÂN GIỐNG LAN THANH TUYỀN (*Grammatophyllum speciosum* Blume) ỨNG DỤNG HỆ THỐNG NGẬP CHÌM TẠM THỜI

Phan Thị Hồng Thuý¹, Dương Phú Tiến¹, Phạm Trần Thuỷ Tiên¹, Trần Thị Yến Nhi¹,
Nguyễn Trần Phước Huy^{1*}, Nguyễn Văn Toàn¹, Huỳnh Quang Tuấn¹,
Vương Thị Hồng Loan¹, Trịnh Thị Hương², Trần Trọng Tuấn³, Võ Đoàn Thực⁴

¹Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao TP. Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường Trung học Phổ thông Tân Thông Hội

*Email: ntp_huy.ahbi@gmail.com

Ngày nhận bài: 09/8/2023; Ngày chấp nhận đăng: 08/12/2023

TÓM TẮT

Lan thanh tuyền (*Grammatophyllum speciosum* Blume), còn được gọi là lan hổ, là một loại phụ sinh - sử dụng vật chủ làm giá thể - bản địa ở Đông Nam Á. Trong dịch chiết của loài lan này có chứa hoạt chất Gastrodin, đây là một loại polyphenol có khả năng loại bỏ chất oxy hoá có hại cho cơ thể, bảo vệ thành mạch máu, chống bệnh Alzheimer, chống bệnh Parkinson, v.v. Hiện nay, lan thanh tuyền ít được tìm thấy trong tự nhiên, cây bị khai thác triệt để vì mục đích thương mại. Nhu cầu thị trường Việt Nam về hoa lan là rất lớn, tuy nhiên lan thanh tuyền chưa được phổ biến. Việc nhân giống lan thanh tuyền ngoài tự nhiên gặp không ít khó khăn do hệ số nhân giống thấp. Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá tác động của nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng thực vật khác nhau (benzyladenine, indol - 3 - butyric acid, naphthalene acetic acid) và điều kiện nuôi cấy trên hệ thống ngập chìm tạm thời lên sự sinh trưởng và tạo cây hoàn chỉnh của cây lan thanh tuyền *in vitro*. Chồi lan thanh tuyền được khử trùng kép với dung dịch NaClO 2,5% trong 13 phút và NaClO 1,25% trong 5 phút cho hiệu quả tạo nguồn vật liệu ban đầu đạt tối ưu. Môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L benzyladenine cho hiệu quả tái sinh chồi đạt tốt nhất. Môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L benzyladenine kết hợp 0,2 mg/L naphthalene acetic acid và mẫu được nuôi cấy trên hệ thống ngập chìm tạm thời với 6 lần ngập chìm trong 24 giờ, mỗi lần ngập chìm 10 phút cho hệ số nhân chồi đạt cao nhất. Chồi đơn *in vitro* được tạo rễ trên môi trường MS ½ bổ sung 0,5 mg/L naphthalene acetic acid. Kết quả nghiên cứu góp phần xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* lan thanh tuyền hoàn chỉnh, đồng thời cung cấp cây giống chất lượng, ổn định về mặt di truyền, góp phần bảo tồn và phát triển loài lan quý này.

Từ khóa: Chất điều hoà sinh trưởng thực vật, hệ thống ngập chìm tạm thời, khử trùng kép, lan thanh tuyền, môi trường MS.

1. MỞ ĐẦU

Lan thanh tuyền (*Grammatophyllum speciosum*), họ Orchidaceae, là loài lan bản địa ở Thái Lan và có thể được tìm thấy ở các khu rừng mưa nhiệt đới ở các quốc gia khác thuộc Đông Nam Á như Lào, Malaysia, Philippines [1]. Ngoài giá trị trang trí và thương mại, lan thanh tuyền còn được sử dụng như một chất giảm đau trong y học dân gian [1]. Trong y học cổ truyền Thái Lan, nước sắc từ lan thanh tuyền được dùng để chữa các bệnh viêm phế quản và đau họng, rễ được sử dụng để điều trị vết cắn, phần thân có thể được sử dụng để điều trị phát ban da, áp xe, sốt và thiếu máu [1]. Chiết xuất từ phần thân giả hành của lan thanh tuyền được sử dụng để giảm đau do bị châm bởi bọ cạp và gân dây đã được báo cáo có tác dụng chống lão hoá [2]. Trong y học hiện đại, chiết xuất ethanol thân giả hành của *lan thanh tuyền* (GSE) đã được phát hiện có khả năng bảo vệ các keratinocyte khỏi sự tử vong tế bào gây ra bởi các anion siêu oxy [3]. Thành phần hóa học của GSE đã được phân tích và được tìm thấy bao

gồm isovitexin, grammatophyllosides, glucosyloxybenzyl dẫn xuất, vandateroside II, cronupapine, vanilloloside, gastodin và orcinolglucoside [4]. Bên cạnh đó, lan thanh tuyến còn có thành phần chất Gastrodin - một loại Polyphenol có chức năng loại bỏ chất oxy hóa có hại cho cơ thể, bảo vệ thành mạch máu, một chất tăng cường trí nhớ, cũng như chống co giật, chống chết tế bào, chống bệnh Alzheimer, chống bệnh Parkinson, cũng như tác dụng bảo vệ chống lại bệnh loãng xương [3].

Trong tự nhiên, cây được nhân giống bằng cách tách bụi và tách các giả hành, hệ số nhân giống theo phương pháp truyền thống này là rất thấp [5, 6]. Trong những năm gần đây, các nước như Singapore, Indonesia, Thái Lan... đã nỗ lực tìm cách nhân giống bảo tồn và phát triển loài lan này trở lại. Ở Việt Nam, việc nhân giống và cung cấp cây giống với số lượng lớn và ổn định cho các cá nhân hay doanh nghiệp có nhu cầu về loài cây này đang là một vấn đề đáng lo ngại, vì việc nghiên cứu quy trình nhân giống lan thanh tuyến vẫn còn hạn chế.

Nhân giống *in vitro* là một kỹ thuật để sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học như một cách thay thế cho việc khai thác trong môi trường sống tự nhiên [5, 6]. Tuy nhiên, vì nhân giống cây trồng tốn nhiều thời gian, công sức và tốn kém và chỉ có thể thương mại hoá khi quy trình sản xuất có khả năng mang lại lợi nhuận về kinh tế [7]. Vì vậy, theo thời gian, để tăng sản lượng sinh khối của thực vật và giảm nhẹ chi phí sản xuất, một số hệ thống thay thế cho vi nhân giống truyền thống trên môi trường bán rắn đã được phát triển.

Trong số đó, nuôi cấy trên hệ thống ngập chìm tạm thời (TIS - temporary immersion system) gần đây đã nhận được sự quan tâm lớn, cung cấp các điều kiện sinh trưởng phù hợp dưới các yếu tố môi trường được kiểm soát để thu được chất lượng và số lượng tối đa của thực vật [8]. So với nuôi cấy trong môi trường bán rắn, việc sử dụng hệ thống TIS cho phép toàn bộ mô tiếp xúc nhiều hơn với môi trường dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật [9]. Hệ thống TIS cho phép làm ngập mô thực vật trong khoảng thời gian ngắn để đảm bảo cung cấp đủ chất dinh dưỡng, đồng thời làm giảm căng thẳng cơ học [9].

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định các điều kiện thích hợp cho nhân giống *in vitro* lan thanh tuyến, trong đó ứng dụng hệ thống ngập chìm tạm thời ở giai đoạn nhân nhanh chồi, để áp dụng cho sản xuất quy mô lớn cây giống lan thanh tuyến chất lượng cao và góp phần giúp kiểm soát và nâng cao chất lượng nguồn dược liệu này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn mẫu ban đầu

Mẫu là các chồi lan thanh tuyến khỏe mạnh, có kích thước 5-6 cm từ cây mẹ 6 tháng tuổi có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Phú Quốc, đang được trồng và chăm sóc tại vườn hậu nuôi cấy mô thuộc Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS (Duchefa biochemie, Hà Lan) [10] có bổ sung 8 g/L agar (Việt Nam) và không bổ sung agar (đối với thí nghiệm trên hệ thống ngập chìm tạm thời), bổ sung 30 g/L sucrose và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật phù hợp cho từng mục đích thí nghiệm. Sau đó môi trường được điều chỉnh pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121 °C với áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút.

2.3. Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện phòng nuôi cấy bao gồm thời gian chiếu sáng: 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 ± 200 lux, nhiệt độ 26 ± 2 °C, ẩm độ 50 ± 5%.

2.4. Phương pháp

2.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaClO và thời gian khử trùng thích hợp cho tạo nguồn mẫu *in vitro* lan thanh tuyến

Mẫu cấy được khử trùng kép theo quy trình của Hassan và cộng sự [11]. Theo đó, chồi đỉnh cây lan thanh tuyến *ex vitro* có kích thước 5-6 cm được rửa dưới vòi nước chảy trong 10 phút nhằm làm sạch phần bụi bám bên ngoài bề mặt. Sau đó mẫu được ngâm rửa với xà phòng trong 15 phút, rửa với nước máy đến khi sạch hết xà phòng và rửa lại với nước vô trùng 3 lần. Tiếp theo, mẫu được chuyển vào tủ cấy vô trùng và xử lý với cồn 70° trong 1 phút, rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần và tiếp tục tiến hành xử lý khử trùng

đơn lẻ NaClO 2,5% trong thời gian 7-13 phút; hoặc kết hợp khử trùng lần 2 với NaClO 1,25% ở thời gian 5 phút. Rửa mẫu lại bằng nước cất vô trùng, loại bỏ các phần bị tổn thương do chất khử trùng gây ra và cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy MS cơ bản không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Sau 2 tuần nuôi cấy, chỉ tiêu tỷ lệ mẫu không nhiễm (%) và tỷ lệ mẫu nhiễm được ghi nhận.

2.4.2. Ảnh hưởng của nồng độ benzyladenine (BA) đến khả năng tái sinh chồi in vitro cây lan thanh tuyền

Các mẫu sống không nhiễm sau khử trùng được cấy vào môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 và 3,5 mg/L). Các mẫu được cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi (%), số chồi/mẫu (chồi) và hình thái chồi được ghi nhận.

2.4.3. Ảnh hưởng của BA kết hợp naphthalene acetic acid (NAA) đến khả năng nhân nhanh chồi in vitro cây lan thanh tuyền

Các chồi được phát sinh từ chồi ngủ có kích thước 2 cm, sinh trưởng phát triển tốt, được cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi MS có bổ sung BA riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau (0; 1,0; 2,0 và 3,0 mg/L) hoặc kết hợp với NAA (0; 0,2 và 0,4 mg/L). Các mẫu được cấy trên môi trường MS thạch rắn không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu hệ số nhân chồi (lần), số chồi/mẫu (chồi), chiều cao chồi (cm) và hình thái chồi được ghi nhận.

2.4.4. Ảnh hưởng của thời gian ngập chìm và tần suất bơm đến khả năng nhân nhanh chồi in vitro cây lan thanh tuyền trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời

Cụm chồi *in vitro* lan thanh tuyền thu nhận từ thí nghiệm nhân nhanh chồi có kích thước 2 - 3 cm tương đồng được nuôi cấy trên hệ thống ngập chìm tạm thời Plantima (Plantima, Đà Loan). Thành phần môi trường khoáng MS và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật được bổ sung theo kết quả từ nghiệm thức tốt nhất ở thí nghiệm nhân nhanh chồi *in vitro*. Thể tích bình nuôi cấy sử dụng 400 mL môi trường.

Khi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian ngập chìm tạm thời, hệ thống được thiết lập với chu kỳ bơm 3 lần/ngày, tương ứng sau mỗi 8 giờ ngập chìm một lần với các thời gian ngập chìm khác nhau (5; 10 và 15 phút). Khi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tần suất bơm, hệ thống nuôi cấy được thiết lập với các tần suất bơm khác nhau (4; 6 và 8 lần trong 24 giờ) và thời gian ngập chìm theo kết quả tốt nhất đã được khảo sát. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu hệ số nhân chồi (lần), số chồi/mẫu (chồi), chiều cao chồi (cm) và hình thái chồi được ghi nhận.

2.4.5. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến sự tạo rễ của chồi lan thanh tuyền in vitro

Cụm chồi *in vitro* lan thanh tuyền được tách thành những chồi đơn, chọn các chồi có chiều cao 2 - 3 cm, có 1 - 2 lá mở và cấy vào môi trường khảo sát. Môi trường khoáng MS ½ (thành phần môi trường giảm ½ về hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin) được bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau (0; 0,5 và 1,0 mg/L) hoặc bổ sung IBA (0; 0,5 và 1,0 mg/L), 30 g/L sucrose và 8 g/L agar. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%), số rễ/mẫu (rễ); chiều dài rễ (cm), số lá/mẫu (lá) và chiều cao cây (cm) được ghi nhận.

2.4.6. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, cấy 3 mẫu/bình và mỗi lần lặp lại cấy 5 bình/nghiệm thức. Đối với hệ thống ngập chìm tạm thời, cấy 10 mẫu/ bình nuôi cấy và mỗi lần lặp lại 3 bình nuôi cấy/nghiệm thức. Các chỉ tiêu được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV với $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaClO và thời gian khử trùng đến tạo nguồn mẫu *in vitro* lan thanh tuyền

Khử trùng mẫu trong nuôi cấy *in vitro* đóng vai trò quan trọng bậc nhất vì nó đảm bảo rằng các mô và tế bào được nuôi cấy trong môi trường không có sự hiện diện của vi khuẩn, nấm và virus có thể gây hại cho quá trình nuôi cấy. Kết quả khử trùng mẫu chồi lan thanh tuyền được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ NaClO và thời gian khử trùng đến tạo nguồn mẫu *in vitro* lan thanh tuyến sau 2 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Thời gian khử trùng lần 1 với NaClO 2,5% (phút)	Thời gian khử trùng lần 2 với NaClO 1,25% (phút)	Tỷ lệ mẫu vô trùng (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
CT1	7	0	0,0 ^d	100,0 ^a
CT2	7	5	26,7 ^c	73,3 ^b
CT3	10	0	26,7 ^c	73,3 ^b
CT4	10	5	40,0 ^{bc}	60,0 ^{bc}
CT5	13	0	53,3 ^b	46,7 ^c
CT6	13	5	86,7 ^a	13,3 ^d
CV (%)			8,7	9,2

*: Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Theo kết quả Bảng 1, việc sử dụng dung dịch NaClO để thực hiện khử trùng kép ở các khoảng thời gian khác nhau có ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu vô trùng và mẫu nhiễm của lan thanh tuyến. Sau 2 tuần nuôi cấy, đối với các nghiệm thức chỉ khử trùng 1 lần với NaClO 2,5% cho kết quả tỷ lệ mẫu sống tăng từ 0 đến 53,3%, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 100% đến 46,7% ứng với thời gian khử trùng từ 7 đến 13 phút. Điều đó cho thấy khi tăng thời gian khử trùng của dung dịch NaClO 2,5%, hiệu quả khử trùng tăng dần. Đối với các nghiệm thức sử dụng phương pháp khử trùng kép, khử trùng lần 1 bằng dung dịch NaClO 2,5%, sau đó tiến hành khử trùng lần 2 bằng dung dịch NaClO 1,25% trong 5 phút, cho kết quả tỷ lệ mẫu không nhiễm tăng cao, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm rõ rệt và hiệu quả khử trùng đạt tốt nhất ở nghiệm thức CT6 với tỷ lệ mẫu không nhiễm đạt 86,7% và tỷ lệ mẫu nhiễm đạt 13,3%. Điều đó cho thấy phương pháp khử trùng kép đối với mẫu chồi lan thanh tuyến cho kết quả tỷ lệ mẫu sống cao hơn so với phương pháp khử trùng đơn. Tuy nhiên khi tăng thời gian khử trùng sẽ làm tăng khả năng chết của mẫu, do sự ăn mòn mẫu của dung dịch khử trùng tăng khi kéo dài thời gian tiếp xúc với mẫu. Theo Blanco *et al.* (2004) và Hassan *et al.* (2016), việc sử dụng quy trình khử trùng kép cho hiệu quả cao hơn so với phương pháp khử trùng đơn [11, 12]. Tóm lại, trong nghiên cứu này, khử trùng kép bằng dung dịch NaClO 2,5% trong 13 phút ở lần khử trùng lần 1 kết hợp với khử trùng lần 2 bằng dung dịch NaClO 1,25% trong 5 phút cho hiệu quả khử trùng chồi lan thanh tuyến đạt hiệu quả cao nhất.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến khả năng tái sinh chồi *in vitro* cây lan thanh tuyến

Tái sinh chồi là giai đoạn đầu tiên trong quá trình nuôi cấy để tạo nguồn nguyên liệu *in vitro* từ các mẫu tự nhiên đã được làm sạch để sử dụng trong các bước nuôi cấy tiếp theo [13]. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 2 cho thấy giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

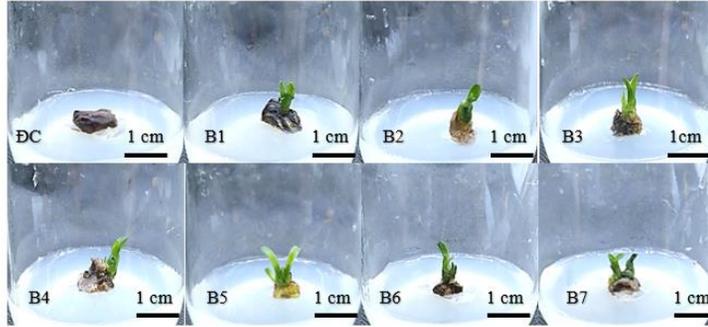
Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến sự phát sinh chồi *in vitro* lan thanh tuyến sau 8 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Hình thái chồi
ĐC	0	0,0 ^c	0,0 ^g	Mẫu không bật chồi
B1	0,5	66,7 ^b	0,7 ^f	Chồi có màu xanh đậm, chậm phát triển
B2	1	93,3 ^a	1,1 ^e	Chồi có màu xanh đậm, chậm phát triển
B3	1,5	93,3 ^a	1,9 ^d	Chồi phát triển tốt, có màu xanh, không bị dày lá
B4	2	100,0 ^a	2,1 ^{cd}	Chồi phát triển tốt, có màu xanh, không bị dày lá
B5	2,5	100,0 ^a	2,9 ^a	Chồi phát triển tốt, có màu xanh, không bị dày lá
B6	3	100,0 ^a	2,5 ^b	Chồi bị dày lá, bất thường, có màu xanh đậm
B7	3,5	100,0 ^a	2,4 ^{bc}	Chồi bị dày lá, bất thường, có màu xanh đậm
CV (%)		7,6	4,1	

*: Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Tại nghiệm thức B5 có bổ sung 2,5 mg/L BA cho kết quả tỷ lệ mẫu tạo chồi, số chồi cao nhất lần lượt đạt 100%, 2,9 chồi/mẫu, chồi phát triển tốt, không bị bất thường, có màu xanh đặc trưng; các chỉ tiêu theo dõi đạt thấp nhất tại nghiệm thức đối chứng không bổ sung BA, tại nghiệm thức này sau 8 tuần

nuôi cấy, có hiện tượng chết mẫu. Về hình thái chồi, nhìn chung tại nghiệm thức bổ sung 2,5 mg/L BA (B5) cho hình thái chồi tốt nhất, chồi màu xanh tốt, khỏe, lá mảnh và có màu sắc đặc trưng có khả năng phát triển. Tại nghiệm thức đối chứng không bổ sung nồng độ BA (ĐC), sau 8 tuần nuôi cấy, mẫu có hiện tượng bị chết và không có khả năng bật chồi. Ở các nghiệm thức còn lại các chồi có lá dày, có hiện tượng thủy tinh thể tại góc hoặc chồi tăng trưởng chậm. Như vậy, môi trường thích hợp cho sự phát sinh chồi lan thanh tuyền là môi trường MS có bổ sung 2,5 mg/L BA. So sánh với kết quả nghiên cứu của Rahman và cộng sự (2021) cho thấy nồng độ BA được sử dụng cho nhân giống từ mẫu chồi thấp hơn nhiều so với khi nhân giống từ quả lan thanh tuyền [14].



Hình 1. Chồi lan thanh tuyền *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA với các nồng độ khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

ĐC: 0 mg/L BA; B1: 0,5 mg/L BA; B2: 1,0 mg/L BA; B3: 1,5 mg/L BA;
B4: 2,0 mg/L BA; B5: 2,5 mg/L BA; B6: 3,0 mg/L BA; B7: 3,5 mg/L BA.

3.3. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây lan thanh tuyền

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm cytokinin vào giai đoạn tạo chồi rất cần thiết vì tác dụng chủ yếu của cytokinin là kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt cytokinin có tác động rõ rệt lên sự hình thành và phân hóa chồi [15]. Sự kết hợp giữa nhóm cytokinin và auxin với nồng độ và tỷ lệ thích hợp thường có tác dụng kích thích sự phát sinh chồi mạnh [15]. Trong thí nghiệm này, BA và NAA được bổ sung với các nồng độ khác nhau trên môi trường MS. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.

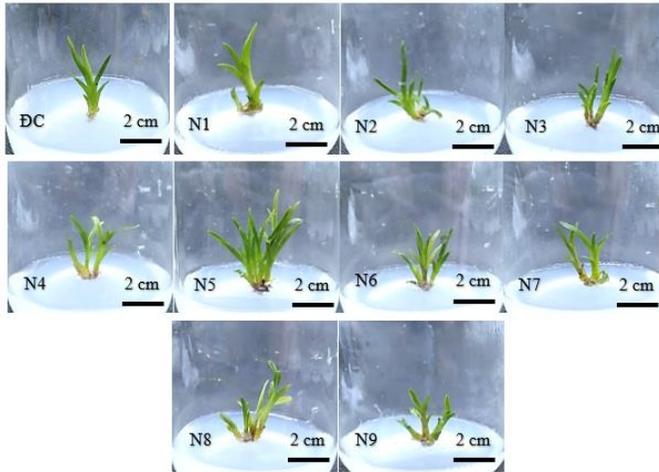
Bảng 3. Ảnh hưởng BA kết hợp NAA đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* lan thanh tuyền sau 8 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Hệ số nhân (lần)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
ĐC	0	0	1,0 ⁱ	0 ^h	3,1 ^b	Mẫu không bật chồi
N1	1	0	1,6 ^h	0,6 ^g	3,3 ^{ab}	Mẫu không bật chồi
N2	1	0,2	2,6 ^e	1,6 ^e	3,2 ^{ab}	Chồi bị dày lá, bất thường, màu xanh đậm
N3	1	0,4	2,3 ^g	1,3 ^f	3,5 ^a	Chồi bị dày lá, bất thường, màu xanh đậm
N4	2	0	2,5 ^f	1,5 ^e	3,2 ^b	Chồi bị dày lá, bất thường, màu xanh đậm
N5	2	0,2	4,1 ^a	3,1 ^a	3,1 ^b	Chồi phát triển tốt, có màu xanh, không bị dày lá
N6	2	0,4	2,6 ^e	1,6 ^e	2,6 ^c	Chồi bị dày lá, bất thường, màu xanh đậm
N7	3	0	2,8 ^d	1,8 ^d	2,6 ^c	Chồi có màu xanh đậm, chậm phát triển
N8	3	0,2	3,4 ^b	2,4 ^b	2,7 ^c	Chồi có màu xanh đậm, chậm phát triển
N9	3	0,4	3,0 ^c	2,0 ^c	2,2 ^d	Chồi có màu xanh đậm, chậm phát triển
CV (%)			2,45	1,31	5,32	

*: Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả Bảng 3 cho thấy, hệ số nhân chồi đạt cao nhất tại nghiệm thức N5 bổ sung 2,0 mg/L BA và 0,2 mg/L NAA đạt 4,1 lần, 3,1 chồi/mẫu, chồi cao 3,1 cm. Hệ số nhân chồi thấp nhất tại nghiệm thức đối chứng không bổ sung nồng độ BA và NAA. Việc kết hợp nồng độ BA và nồng độ NAA làm tăng khả năng nhân chồi lan thanh tuyền so với các nghiệm thức sử dụng nồng độ BA riêng lẻ, điều này cho

thấy sự phối hợp của auxin và cytokinin thúc đẩy sự biệt hóa chồi tốt hơn khi sử dụng đơn lẻ được báo cáo trong nghiên cứu của Zhao và cộng sự trên *Dendrobium wangliangii* [16]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Tâm và cộng sự trên đối tượng lan *Dendrobium hybrid*, cho thấy nồng độ 2,0 mg/L BA kết hợp với nồng độ 0,3 mg/L NAA cho hệ số nhân chồi cao hơn so với khi sử dụng nồng độ BA riêng lẻ [17]. Như vậy, môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp với 0,2 mg/L NAA sau 8 tuần nuôi cấy cho hệ số nhân chồi đạt 4,1 lần, 3,1 chồi/mẫu, chiều cao trung bình chồi đạt 3,1 cm, chồi sinh trưởng và phát triển tốt.



Hình 2. Cụm chồi lan thanh tuyền *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy trên các môi trường nhân chồi khác nhau

ĐC: 0 mg/L BA + 0 mg/L NAA

N1: 1,0 mg/L BA + 0 mg/L NAA N2: 1,0 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA N3: 1,0 mg/L BA + 0,4 mg/L NAA
 N4: 2,0 mg/L BA + 0 mg/L NAA N5: 2,0 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA N6: 2,0 mg/L BA + 0,4 mg/L NAA
 N7: 3,0 mg/L BA + 0 mg/L NAA N8: 3,0 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA N9: 3,0 mg/L BA + 0,4 mg/L NAA

3.4. Ảnh hưởng của thời gian ngập chìm và tần suất bơm đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây lan thanh tuyền trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời

3.4.1. Ảnh hưởng của thời gian ngập chìm tạm thời

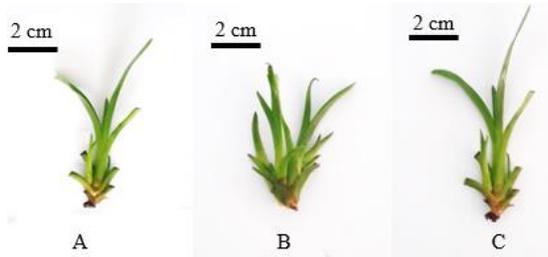
Bảng 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian ngập chìm đến khả năng nhân nhanh cụm chồi *in vitro* lan thanh tuyền sau 8 tuần nuôi cấy

Thời gian ngập chìm (sau mỗi 8 giờ) (phút)	Chỉ tiêu theo dõi		
	Hệ số nhân chồi (lần)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
5	2,66 ^a	2,57 ^a	4,75 ^b
10	4,49 ^c	4,51 ^c	5,98 ^c
15	3,42 ^b	2,74 ^b	4,47 ^a
CV (%)	13,75	8,69	11,22

*: Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả Bảng 4 cho thấy, thời gian ngập chìm có ảnh hưởng đáng kể đến sự nhân nhanh chồi *in vitro* của lan thanh tuyền. Khi thời gian ngập chìm tăng từ 5 phút lên 10 phút, ta thấy sự tăng trưởng của cây trồng được kích thích mạnh mẽ hơn. Hệ số nhân chồi tăng từ 2,66 lần lên 4,49 lần, tức là cây trồng nhân nhanh gấp đôi số lượng chồi trong cùng một thời gian. Đồng thời, số lượng chồi trên mỗi mẫu cũng tăng từ 2,57 chồi/mẫu lên 4,51 chồi/mẫu. Tuy nhiên, khi thời gian ngập chìm tiếp tục tăng lên 15 phút, hiệu quả nhân nhanh chồi *in vitro* của lan thanh tuyền lại giảm đi. Hệ số nhân chồi giảm xuống còn 3,42 lần và số lượng chồi trên mỗi mẫu giảm xuống còn 2,74 chồi/mẫu. Điều này cho thấy việc ngập chìm quá lâu có thể làm giảm hiệu suất nhân nhanh chồi *in vitro* và gây ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển của cây trồng.

Tóm lại, trong thí nghiệm này, thời gian ngập chìm 10 phút sau mỗi 8 giờ là thích hợp cho nhân nhanh chồi *in vitro* lan thanh tuyền trên hệ thống ngập chìm tạm thời.



Hình 3. Khả năng nhân nhanh cụm chồi *in vitro* lan thanh tuyền sau 8 tuần nuôi cấy trên hệ thống ngập chìm tạm thời với các thời gian ngập chìm khác nhau.

A – Thời gian ngập chìm 5 phút; B – Thời gian ngập chìm 10 phút; C – Thời gian ngập chìm 15 phút

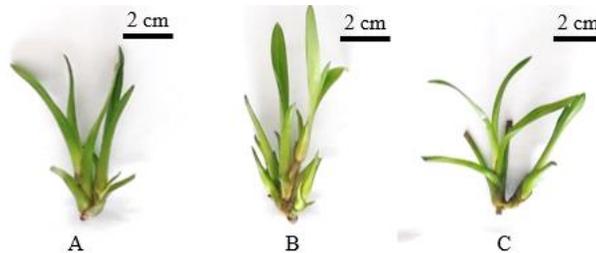
3.4.2. Ảnh hưởng của tần suất bom

Bảng 5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tần suất bom đến khả năng nhân nhanh cụm chồi *in vitro* lan thanh tuyền sau 8 tuần nuôi cấy

Tần suất bom (lần/24 giờ)	Chỉ tiêu theo dõi		
	Hệ số nhân chồi (lần)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
4	3,96 ^b	3,71 ^a	3,83 ^b
6	5,36 ^c	5,24 ^c	5,30 ^c
8	3,04 ^a	3,95 ^b	3,49 ^a
CV (%)	5,58	6,99	5,82

*: Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả Bảng 5 cho thấy, khi tăng tần suất bom từ 4 lần lên 6 lần trong khoảng thời gian 24 giờ cho thấy sự nhân nhanh chồi *in vitro* tăng đáng kể. Khi số lần ngập chìm là 4 lần, kết quả cho thấy hệ số nhân chồi đạt 3,96 lần, trung bình 3,71 chồi trên mỗi mẫu, và chiều cao chồi là 3,83 cm. Tuy nhiên, khi tăng tần suất bom lên 6 lần, kết quả cho thấy hệ số nhân chồi tăng lên và đạt cao nhất 5,36 lần, trung bình 5,24 chồi trên mỗi mẫu, và chiều cao chồi là 5,3 cm. Điều này cho thấy rằng sự nhân nhanh chồi *in vitro* có xu hướng gia tăng khi số lần ngập chìm tăng. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tần suất bom lên 8 lần, kết quả cho thấy hệ số nhân chồi giảm xuống 3,04 lần, trung bình 3,95 chồi trên mỗi mẫu, và chiều cao chồi là 3,49 cm. Điều này cho thấy sự nhân nhanh chồi *in vitro* bị ảnh hưởng tiêu cực khi số lần ngập chìm tăng quá mức. Như vậy, trong thí nghiệm này, tần suất bom 6 lần/ 24 giờ là thích hợp cho nhân nhanh chồi *in vitro* lan thanh tuyền trên hệ thống ngập chìm tạm thời.



Hình 4. Cụm chồi *in vitro* lan thanh tuyền được nuôi trên hệ thống ngập chìm tạm thời trong 8 tuần với tần suất bom khác nhau trong 24 giờ

A – Tần suất bom 4 lần; B – Tần suất bom 6 lần; C – Tần suất bom 8 lần

Tổng quan, trong phạm vi nghiên cứu này, sau 8 tuần nuôi cấy, thời gian ngập chìm 10 phút và tần suất bom 6 lần/24 giờ là tối ưu cho nhân nhanh chồi *in vitro* lan thanh tuyền trên hệ thống ngập chìm tạm thời. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Preil và Hempfling (2005) khi tiến hành nhân nhanh chồi lan hồ điệp trên hệ thống ngập chìm tạm thời với thời gian ngập chìm 10 phút, tuy nhiên có sự khác biệt về tần suất ngập chìm; tần suất ngập chìm của lan hồ điệp (8 lần/24 giờ) cho hiệu quả nhân nhanh chồi cao gấp nhiều lần so với tần suất ngập chìm của lan thanh tuyền (6 lần/24 giờ) [18].

3.5. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến sự tạo rễ của chồi lan thanh tuyền *in vitro*

Ra rễ là một trong những giai đoạn quan trọng trong quy trình vi nhân giống, có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của cây giống *in vitro* cũng như tỷ lệ sống sót khi cây bước sang giai đoạn hậu nuôi cấy mô. Trong đó, các chỉ tiêu về tỷ lệ ra rễ, số lượng rễ và chiều dài rễ là những

tiêu chí quan trọng đánh giá hiệu quả tác động của các yếu tố lý hóa đến sự ra rễ của mẫu cấy. Kết quả khảo sát khả năng tạo rễ lan thanh tuyến trên môi trường khoáng có bổ sung NAA hoặc IBA được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của NAA và IBA đến sự tạo rễ của chồi lan thanh tuyến *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ NAA (mg/L)	Nồng độ IBA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)	Số rễ/mẫu (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Số lá/mẫu (lá)	Chiều cao cây (cm)
ĐC	0	0	55,56	1,0 ^a	1,39 ^a	2,66 ^b	2,31 ^a
CT1	0,5	0	100,00	3,8 ^c	2,52 ^c	2,93 ^c	3,04 ^c
CT2	1,0	0	93,33	2,78 ^d	2,36 ^d	2,73 ^b	2,71 ^b
CT3	0	0,5	75,67	1,78 ^c	1,98 ^c	2,65 ^b	2,73 ^b
CT4	0	1,0	68,69	1,47 ^c	1,79 ^b	2,53 ^a	2,68 ^b
CV (%)				8,71	4,07	5,57	6,90

*: Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Phân tích thống kê các kết quả thu được cho thấy sự tác động trực tiếp của hai chất này đến khả năng ra rễ và tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh của chồi lan thanh tuyến, không có sự tương tác giữa NAA và IBA. Ở tất cả các nghiệm thức đều ghi nhận có sự phát sinh chồi. Tỷ lệ mẫu chồi tạo rễ, số lượng và chiều dài rễ tốt nhất (tương ứng là 100%; 3,8 rễ; 2,52 cm) khi chồi được nuôi cấy trên nền môi trường MS ½ bổ sung 0,5 mg/L NAA trong 8 tuần, ngược lại chồi phát sinh rễ thấp nhất khi nuôi cấy chồi trên môi trường MS ½ không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vẫn ghi nhận được sự hình thành rễ chứng tỏ có thể trong mẫu có sẵn hàm lượng auxin nội sinh có khả năng kích thích sự tạo rễ, tuy nhiên hiệu quả tạo rễ đạt thấp nhất trong các nghiệm thức khảo sát với 55,56%. Khi bổ sung 0,5-1 mg/L NAA, tỷ lệ mẫu tạo rễ khá cao (> 90%), cao nhất đạt mức 100% ở môi trường bổ sung 0,5 mg/L NAA; khi bổ sung 0,5-1 mg/L IBA, tỷ lệ mẫu tạo rễ thấp hơn, chỉ đạt lần lượt 75,56% và 68,69%. Theo Nguyễn Minh Chon, auxin ngoại sinh có thể kích thích hình thành rễ sớm, nhưng ở nồng độ cao có thể ức chế sự vươn dài của rễ [19]. Nghiên cứu của Nguyễn Thế Nhuận và cộng sự (2015) cũng chứng minh điều tương tự khi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng ra rễ của cây cà chua, việc tăng nồng độ auxin chiều dài rễ của cây cà chua giảm rõ rệt [20].

Như vậy, trong nghiên cứu này, môi trường MS ½ bổ sung 0,5 mg/L NAA là thích hợp cho tạo rễ *in vitro* cây lan thanh tuyến. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sopalun và cộng sự khi tác giả cũng sử dụng NAA bổ sung vào môi trường tạo rễ [1], tuy nhiên do thành phần môi trường khoáng khác nhau nên có thể hàm lượng NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy là khác nhau.



Hình 5. Sự tạo rễ của chồi lan thanh tuyến *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau
 ĐC: 0 mg/L NAA + 0 mg/L IBA CT2: 1,0 mg/L NAA + 0 mg/L IBA CT4: 0 mg/L NAA + 1,0 mg/L IBA
 CT1: 0,5 mg/L NAA + 0 mg/L IBA CT3: 0 mg/L NAA + 0,5 mg/L IBA

4. KẾT LUẬN

Kết quả bước đầu cho thấy mẫu chồi lan thanh tuyến được khử trùng kép với NaClO₂ 5% ở lần khử trùng thứ nhất trong 13 phút và NaClO 1,25% trong 5 phút ở lần khử trùng thứ hai cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng cao nhất đạt 86,7% sau 2 tuần nuôi cấy. Môi trường MS cơ bản bổ sung 2,5 mg/L BA thích hợp nhất cho sự phát sinh chồi *in vitro* từ mẫu nuôi cấy khởi đầu. Trên hệ thống ngập chìm tạm thời, môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA kết hợp 0,2 mg/L NAA và được nuôi cấy với thời gian ngập

chìm 10 phút, tần suất bơm 6 lần trong 24 giờ cho hiệu quả nhân nhanh chồi *in vitro* lan thanh tuyền tốt nhất. Môi trường MS ½ bổ sung 0,5 mg/L NAA thích hợp cho tạo rễ *in vitro* lan thanh tuyền.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sopalun, K., Thammasiri, K., & Ishikawa, K. - Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* Blume. Plant cell, Tissue, and Organ culture (PCTOC) **101** (2010) 143-150. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9671-2>
2. Chowjarean, V., Phiboonchaiyanan, P. P., Harikarnpakdee, S., & Tengamnuay, P. - A natural skin anti-ageing serum containing pseudobulb ethanolic extract of *Grammatophyllum speciosum*: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. International Journal of Cosmetic Science **41** (6) (2019) 548-557. <https://doi.org/10.1111/ics.12571>
3. Chowjarean, V., Nimmannit, U., Chaotham, C., Eaknai, W., Sucontphunt, A., Plaimee, P.P., Tengamnuay, P. & Chanvorachote, P. - *Grammatophyllum speciosum* extract potentiates stemness in keratinocyte cells. Chiang Mai Journal of Science **45** (1) (2018) 237-248.
4. Sahakitpichan, P., Mahidol, C., Disadee, W., Chimnoi, N., Ruchirawat, S., & Kanchanapoom, T. - Glucopyranosyloxybenzyl derivatives of (R)-2-benzylmalic acid and (R)-eucomic acid, and an aromatic glucoside from the pseudobulbs of *Grammatophyllum speciosum*. Tetrahedron **69** (3) (2013) 1031-1037. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.11.082>
5. Murthy, H.N., Lee, E.J., & Paek, K.Y. - Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture (PCTOC) **118** (2014) 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>
6. Savona, M., Barberini, S., Bassolino, L., Mozzanini, E., Pistelli, L., Pistelli, L., & Ruffoni, B. - Strategies for optimization of the production of rosmarinic acid in *Salvia officinalis* L. and *Salvia dolomitica* Codd biomass with several biotechnological approaches. Salvia Biotechnology (2017) 209-239. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73900-7_6
7. Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S., & Hessami, S. - Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology **15** (2) (2017) 309-315. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.005>
8. Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. - Temporary immersion systems in plant biotechnology. Engineering in Life Science **14** (6) (2014) 607-621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
9. Lambardi, M. - Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea [Micropropagation in liquid culture with temporary immersion system]. Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura **12** (2012) 32-38.
10. Murashige T. & Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant **15** (1962) 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
11. Hassan, H. M. S., Ali, M. A. M. & Soliman, D. A. - Effect of low-cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*. J. Plant Production **7** (2) (2016) 169 - 176. <https://doi.org/10.21608/JPP.2016.45250>
12. Blanco, M. & Valverde, R. - Micropropagación de *Philodendron* sp. (Posiblemente *P. corcovadense*). Agronomía Costarricense **28** (1) (2004) 39-46.
13. Phạm Thị Diễm Thị, Hồ Thị Thuý Nhi, Nguyễn Minh Trí, Nguyễn Thị Mỹ Lệ, Trương Thị Bích Phượng & Hoàng Tấn Quang - Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi *in vitro* cây Hà thủ ô trắng (*Streptocaulon juvenas* Merr.). Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, NXB Đại học Thái Nguyên (2021) 142-147.
14. Rahman, ZA, Othman, AN, Amran, ABA, & Basiron, NNA (2021). Optimization parameter for production of protocorm-like body and growth of *Grammatophyllum speciosum*. International Journal of Research - Granthaalayah **9** (7) 145-154. <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v9.i7.2021.4099>

15. Nguyễn Như Khanh & Nguyễn Văn Đính - Giáo trình các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. NXB Giáo dục Việt Nam (2010).
16. Zhao, D., Hu, G., Chen, Z., Shi, Y., Zheng, L., Tang, A., & Long, C. - Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii*: a critically endangered medicinal orchid. *J Med Plants Res* **7** (28) (2013) 2098-2110. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1777>
17. Nguyễn Thị Tâm, Vũ Thị Lan, & Nguyễn Thành Luân - Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường và giá thể đến sinh trưởng của cây lan *Dendrobium hybrid in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **3** (43) (2007) 106-110.
18. Hempfling, T., Preil, W. - Application of a temporary immersion system in mass propagation of Phalaenopsis. In: Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht (2005) 231-242. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_15
19. Nguyễn Minh Chon - Giáo trình chất điều hòa sinh trưởng thực vật. NXB Trường Đại học Cần Thơ (2004).
20. Nguyễn Thế Nhuận, Võ Thị Ngọc & Trần Anh Thông - Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* cây cà chua từ hạt xanh. *Tạp chí STINFO* **6** (2016) 23-26.

ABSTRACT

RESEARCH ON MICROPROPAGATION OF *Grammatophyllum speciosum* Blume USING A TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

Phan Thi Hong Thuy¹, Duong Phu Tien¹, Pham Tran Thuy Tien¹, Tran Thi Yen Nhi¹, Nguyen Tran Phuoc Huy^{1*}, Nguyen Van Toan¹, Huynh Quang Tuan¹, Vuong Thi Hong Loan¹, Trinh Thi Huong², Tran Trong Tuan³, Vo Doan Thuc⁴

¹Center for Business Incubation of Agricultural High Technology

²Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

³Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

⁴Tan Thong Hoi High School

*Email: ntp Huy.ahbi@gmail.com

Grammatophyllum speciosum Blume, also known as tiger orchid, is a type of epiphytic orchid native to Southeast Asia. It utilizes a host plant as its substrate and is widely distributed in the region. The extract of *G. speciosum* contains Gastrodin, a polyphenol compound with the ability to eliminate harmful oxidative substances in the body, protect blood vessels, and combat diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. Currently, *G. speciosum* is scarce in its natural habitat due to extensive commercial exploitation. Despite the high demand for orchids in the Vietnamese market, *G. speciosum* is not widely available. Artificial propagation of *G. speciosum* faces numerous difficulties due to its low multiplication coefficient. This study was conducted to evaluate the impact of different concentrations of plant growth regulators (benzyladenine, indole-3-butyric acid, naphthalene acetic acid) and culturing conditions in a temporary immersion system on the growth and development of *in vitro* *G. speciosum* plants. The *G. speciosum* shoots were double sterilized by immersion in 2.5% NaClO solution for 13 minutes and 1.25% NaClO solution for 5 minutes to obtain optimal initial plant materials. The MS medium was supplemented with 2.5 mg.L⁻¹ benzyladenine achieved the best efficiency in shoot regeneration. The MS medium was supplemented with 2.0 mg.L⁻¹ benzyladenine combined with 0.2 mg.L⁻¹ naphthalene acetic acid and the temporary immersion system with six immersion cycles of 10 minutes each in 24 hours resulted in the highest multiplication coefficient of shoots. *In vitro* single shoots were rooted on MS ½ medium was supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ naphthalene acetic acid. The research results contribute to the establishment of a complete *in vitro* propagation protocol for *G. speciosum*, providing high-quality and genetically stable seedlings, thereby contributing to the conservation and development of this valuable orchid species.

Keywords: Double sterilized, *Grammatophyllum speciosum*, MS medium, plant growth regulators, temporary immersion system.