

ẢNH HƯỞNG CỦA THỂ TÍCH VÀ ĐIỀU KIỆN THOÁNG KHÍ TRONG NUÔI CÂY *IN VITRO* VÀ ĐỊNH TÍNH ADENOSINE TRONG CÂY LAN KIM TUYẾN (*ANOECTOCHILUS SETACEUS* BLUME)

Vũ Quốc Luận¹, Nguyễn Bá Nam², Vũ Thị Hiền¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Trần Công Luận^{3,4}, Dương Tấn Nhựt¹,✉

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

²Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Nông nghiệp Công nghệ cao, Đại học Đà Lạt

²Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

³Trường Đại học Tây Đô

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 30.3.2017

Ngày nhận đăng: 25.6.2017

TÓM TẮT

Lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus*) là một loại cây thảo dược được sử dụng làm thuốc và chăm sóc sức khỏe ở Trung Quốc và nhiều nước Châu Á. Trong quá trình vi nhân giống thông thường, ảnh hưởng của loại bình, chất liệu và thể tích bình nuôi cấy tạo nên sự khác biệt về độ ẩm và trao đổi khí với môi trường xung quanh. Trong nghiên cứu này, đã tiến hành khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng lên quá trình tái sinh và nhân giống trên đối tượng lan Kim Tuyền nuôi cấy *in vitro*. Kết quả tái sinh chồi từ các đốt thân *ex vitro* thu được cao nhất (52,96%) trên môi trường SH lỏng với giá thể bông gòn có bổ sung 1 mg/l BA, 30 g/l sucrose, pH = 5,8. Trong nghiên cứu về tác động của thể tích bình và điều kiện nuôi cấy thoáng khí, kết quả cho thấy, bình tam giác (3 lít) kết hợp với nắp đậy thoáng khí gia tăng về sinh trưởng và phát triển của chồi cao nhất (chiều cao chồi: 10,75 cm; số lá/chồi: 9,45; khối lượng tươi và khô: 2,45; 0,219 g/chồi; chiều rộng lá: 2,85 cm; chỉ số SPAD: 39,99). Sắc ký đồ của mẫu cây có giá trị R_f, màu sắc tương đồng với giá trị R_f và màu sắc của adenosine chuẩn. Quá trình định tính hoạt chất adenosine bằng sắc ký bản mỏng đã thực hiện trên 4 loại mẫu khác nhau [Chồi nuôi cấy trên môi trường đặc và lỏng (bịch thoáng khí); Chồi nuôi cấy trong bình 3 lít trên môi trường lỏng (không thoáng khí và thoáng khí)] cho thấy, sắc ký đồ của 4 mẫu thử tương đồng nhau về màu sắc và R_f.

Từ khóa: adenosine, lan Kim Tuyền, môi trường SH lỏng, sắc ký bản mỏng, thoáng khí.

MỞ ĐẦU

Lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus*) là một loại cây thảo dược được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền cũng như sản phẩm bổ dưỡng để chăm sóc sức khỏe ở Trung Quốc và nhiều nước Châu Á (Liu *et al.*, 2013). Nhân giống vô tính trên đối tượng lan Kim Tuyền đã được thực hiện bởi nhiều tác giả với một số phương pháp khác nhau nhằm gia tăng hệ số nhân cũng như chất lượng cây giống (Ket *et al.*, 2004; Paek *et al.*, 2005; Nhut *et al.*, 2006; Doris *et al.*, 2007; Sherif *et al.*, 2012; Nguyễn Quang Thạch *et al.*, 2012; Nguyễn Tuấn Anh *et al.*, 2013; Đỗ Mạnh Cường *et al.*, 2015; Trần Thị Hồng Thúy *et al.*, 2015). Trong quá trình vi nhân giống thông thường, ảnh hưởng của loại bình, chất liệu và thể tích bình nuôi cấy tạo nên sự khác biệt về độ ẩm của vi

môi trường và trao đổi khí với môi trường xung quanh đã tác động lớn đến chất lượng cây con *in vitro* cũng như quá trình sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm. Ở một số loài, kích thước bình là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng lớn đến chất lượng, chiều dài chồi và số chồi/mẫu cây (McClelland, Smith, 1990; Kane *et al.*, 1992; Huang, Chen, 2005; Manuel *et al.*, 2009). Một số hoạt chất có tác dụng dược lý quan trọng đã được chiết xuất trong cây lan Kim Tuyền cây có nguồn gốc tự nhiên cũng như nuôi cấy mô đã được xác định, trên giống *Anoectochilus formosanus* đã xác định được 9 hợp chất và giống *Anoectochilus roxburghii* với 8 hợp chất (Du và Shoyama, 2011; He *et al.*, 2006). Adenosine là một chất giúp cải thiện tuần hoàn và điều hòa nhịp tim, khắc phục các hiện tượng loạn nhịp, xúc tác phản ứng chuyển đổi adenosine tới

inosine. Nó cần thiết cho hệ miễn dịch của con người, dẫn truyền thần kinh, ức chế có chọn lọc để chống lại bệnh ung thư (Wilson *et al.*, 2010; Durak *et al.*, 1994; Glazer, 1980). Hiện nay, adenosine đã được tìm thấy trong một số cây trồng (*Curcuma Longa*, *Zanthoxylum macrophylla*, *rhyssomitrelle*, Litchi Fruit) (Zahide *et al.*, 2015; Elekwa *et al.*, 2005; Sona *et al.*, 2011). Hiện nay, chi lan Kim Tuyến đã bị nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2007), cây con có nguồn gốc nhân giống *in vitro* là vật liệu thương mại hóa mà không vấp phải lệnh cấm thương mại của công ước CITES, vì nhân giống thông qua nuôi cấy mô là một yêu cầu bắt buộc cho việc thương mại hóa, phục vụ cho nhu cầu trong nước và xuất khẩu cũng như bảo quản các giống *in vitro* sẽ giúp bảo tồn nhiều loài lan Kim Tuyến hoang dã đã gần như tuyệt chủng trong môi trường sống tự nhiên.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn mẫu *ex vitro* và *in vitro*

Chồi non ngoài vườn ươm của cây lan Kim Tuyến với chiều cao 5 cm được tách phần phiến lá bên ngoài, rửa sạch bề mặt mẫu cây bằng xà phòng và đặt dưới vòi nước chảy trong khoảng 2 - 3 giờ, tiếp theo, mẫu cây được ngâm trong dung dịch kháng khuẩn gồm Penicillin và Streptomycin với nồng độ 0,5 g/l trong 30 phút. Sau đó, các chồi non này được rửa bằng cồn 70° trong 30 giây và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng, mẫu cây được khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong 7 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần. Các chồi đỉnh có chiều cao 2 cm với 3 lá được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của thể tích bình và điều kiện nuôi cấy thoáng khí lên quá trình tăng trưởng chồi *in vitro*.

Nguồn mẫu sử dụng cho nghiên cứu tách chiết hoạt chất là 4 loại mẫu khác nhau gồm: Chồi nuôi cấy trên môi trường đặc và lỏng (bịch thoáng khí); Chồi nuôi cấy trong bình 3 lít trên môi trường lỏng (không thoáng khí và thoáng khí).

Môi trường nuôi cấy đối với nguồn mẫu *ex vitro*

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu tạo mẫu ban đầu là môi trường MS lỏng với giá thể bông gòn, có bổ sung BA, KIN, TDZ ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l), 30 g/l đường, pH = 5,8.

Môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu là môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) có bổ sung

1,0 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA + 30 g/l sucrose và 1,5 g/l than hoạt tính, pH = 5,8 (Vũ Quốc Luận *et al.*, 2015). Tùy từng thí nghiệm mà môi trường có bổ sung (9,0 g/l) agar hoặc bông gòn làm giá thể. Sau đó, môi trường được hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút.

Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có độ ẩm 50 - 60%, nhiệt độ 25 ± 2°C, sử dụng bóng đèn huỳnh quang, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng từ 40 - 45 μmol.m⁻².s⁻¹.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của BA, KIN, TDZ lên quá trình tái sinh chồi lan Kim Tuyến *in vitro*

Các chồi của cây lan Kim Tuyến ngoài vườn ươm có chiều dài khoảng 5 cm sau khi được khử trùng, cắt thành từng đốt và cấy lên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) lỏng với giá thể bông gòn có bổ sung BA, KIN, TDZ ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l), 30 g/l đường, pH = 5,8.

Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu sống, số mẫu nhiễm, chiều dài chồi.

Khảo sát ảnh hưởng của thể tích bịch nylon lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim Tuyến trong nuôi cấy *in vitro*

Các chồi đỉnh có chiều cao trung bình 2 cm với 3 lá được nuôi cấy trong 3 loại bịch nylon khác nhau với đường kính đáy bịch 12, 16 và 20 cm với giá thể agar và bông gòn, đồng thời có kết hợp với màng thoáng khí. Sau 3 tháng nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu: chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), tổng chlorophyll (mg/cm²) được đo bằng máy SPAD 502.

Khảo sát ảnh hưởng của thể tích bình lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim Tuyến trong nuôi cấy *in vitro*

Các đỉnh chồi lan Kim Tuyến có chiều cao 2 cm với 3 lá được nuôi cấy trong 4 loại bình tam giác khác nhau với thể tích 250, 500, 1000 và 3000 ml với giá thể bông gòn, đồng thời có kết hợp với màng thoáng khí. Sau 3 tháng nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu: chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), tổng chlorophyll (mg/cm²) được đo bằng máy SPAD 502.

Định tính Adenosine tổng bằng sắc ký lớp mỏng

Phương pháp tách chiết mẫu: Cân khoảng 2 gam dược liệu, tiến hành chiết siêu âm với 20 ml MeOH trong 15 phút (lặp lại 3 lần). Dịch chiết được cô dung môi trên bếp cách thủy đến khi thu được khoảng 2 ml làm dịch chấm sắc ký.

Hệ dung môi tiến hành sắc ký lớp mỏng: Cloroform - ethyl acetat - isopropanol - nước - amoniac (8 : 2 : 6 : 0,5 : 0,12).

Bình khai triển bằng thủy tinh, hình trụ, đường kính 10 cm, cao 14 cm, có nắp đậy kín. Bào hòa hơi dung môi trong bình bằng cách lót giấy lọc xung quanh thành trong của bình, rót một lượng vừa đủ dung môi vào bình, lắc rồi để yên 1 h ở nhiệt độ 20 - 25°C. Cân 1 mg adenosine và hòa tan trong 1 ml methanol dùng làm chất chuẩn. Bản mỏng TLC Silica gel 60 F254 dài 10 cm, đường xuất phát cách mép dưới 1,5 cm, chất chuẩn và chất phân tích được chấm lên bản mỏng thành từng vết có đường kính 5 mm, cách nhau 5 mm và cách hai bên mép bản mỏng 5 mm. Đặt bản mỏng vào bình triển khai, triển khai ở nhiệt độ 20 - 25°C, khi dung môi cách mép trên 1 cm, lấy bản mỏng ra khỏi bình, làm bay hơi dung môi còn lại trên bản mỏng. Soi dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm để phát hiện vết trên sắc ký đồ và phun thuốc thử anisaldehyd trong ethanol, sấy ở 105°C trong 10 phút, quan sát dưới ánh sáng thường, tính hệ số di chuyển Rf là tỷ lệ giữa khoảng dịch chuyển của chất phân tích và khoảng dịch chuyển của dung môi, so sánh với Rf của chất chuẩn adenosine (Phương pháp sắc ký lớp mỏng, 2009).

Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố, 3 lần lặp lại đối với nghiên cứu tái sinh và 4 lần lặp lại đối với nghiên cứu ảnh hưởng của thể tích. Đối với nghiệm thức tái sinh chồi, mỗi nghiệm thức xử lý 5 mẫu với 1 mẫu/bình, trên các thí nghiệm về sinh trưởng chồi được cấy bạch và bình, mỗi nghiệm thức xử lý từ 10 tới 30 chồi (tùy thuộc vào thể tích). Số liệu được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê SAS 9.1 theo phương pháp Duncan test với $\alpha = 0,05$. Tùy thuộc vào dạng số liệu có thể được chuyển sang dạng $(x + 0,5)^{0,5}$ để xử lý thống kê (Duncan, 1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát ảnh hưởng của BA, KIN, TDZ lên quá trình tái sinh chồi lan Kim Tuyền *in vitro*

Kết quả thu nhận sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy,

chồi hình thành không có sự khác biệt đáng kể trên môi trường có bổ sung BA, KIN, TDZ (Bảng 1). Tuy nhiên, đã có sự khác biệt trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/l BA và 1,5 mg/l KIN cho kết tái sinh chồi từ đốt thân cao nhất (52,96%) với chiều dài chồi 1,50 cm/chồi (Hình 1. b). Kết quả tốt nhất của nghiên cứu này thấp hơn nhiều so với báo cáo của Gangaprasad và đồng tác giả (2000) thu được khi vào mẫu trên hai giống lan Kim Tuyền (*Anoectochilus sikkimensis*) và (*Anoectochilus regalis*) với tỷ lệ chồi tái sinh thành công (95 - 98%). Kết quả cho thấy tỷ lệ tái sinh thấp của nghiên cứu này là do nguồn mẫu cây chúng tôi thu được ngoài tự nhiên đã bị nhiễm 2 loại vi khuẩn nội tại rất nặng (màu hồng và đục sữa) (Hình 1. j, k), sau khi được khử trùng bề mặt và cấy lên môi trường sau 1 tuần đã nhận thấy sự xuất hiện của khuẩn từ trong mẫu lan ra môi trường và làm cho mẫu bị chết sau 3 - 4 tuần nuôi cấy. Nguồn mẫu đốt thân được sử dụng trong quá trình tạo mẫu ban đầu của nghiên cứu này cũng phù hợp với một báo cáo của các tác giả (Ket *et al.*, 2004; Sherif *et al.*, 2012; Nguyễn Quang Thạch *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu này, tái sinh chồi từ các đốt thân *ex vitro* của giống lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus*) thu được kết quả cao nhất (52,96%) trên môi trường SH lỏng với giá thể bông gòn có bổ sung 1 mg/l BA, 30 g/l sucrose, pH = 5,8.

Khảo sát ảnh hưởng của thể tích bịch nylon và điều kiện thoáng khí lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim Tuyền nuôi cấy *in vitro*

Thể tích bịch nuôi cấy kết hợp với điều kiện thoáng khí đã thúc đẩy quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi *in vitro*. Kết quả thu được sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy sự khác biệt về các chỉ tiêu theo dõi có chiều hướng gia tăng theo thể tích của bịch (Bảng 2). Trên môi trường đặc không thoáng khí, ảnh hưởng của thể tích bịch lên quá trình sinh trưởng chồi có sự khác biệt không đáng kể về các chỉ tiêu theo dõi (Hình 2. a, b, c). Sử dụng bịch nylon khi nuôi cấy lan *Aerides* cho kết quả sinh trưởng và phát triển không có sự khác biệt đáng kể so với chai thủy tinh được nuôi trong phòng thí nghiệm chuẩn và nuôi cấy dưới ánh sáng tự nhiên bịch nylon cho kết quả tốt hơn (Nguyễn Thị Mai Hạnh *et al.*, 2014). Trong khi đó, trên môi trường đặc thoáng khí đã có sự khác biệt về chiều cao chồi, số lá/chồi và chỉ số SPAD ở bịch có đường kính đáy 20 cm (Bảng 1) (Hình 2. f). Trên môi trường lỏng, chồi sinh trưởng trong điều kiện thoáng khí và không thoáng khí cho kết quả vượt trội so với môi trường đặc với giá thể agar về các chỉ tiêu theo dõi (Bảng 2) (Hình 2. g, h, i, j, k, l).

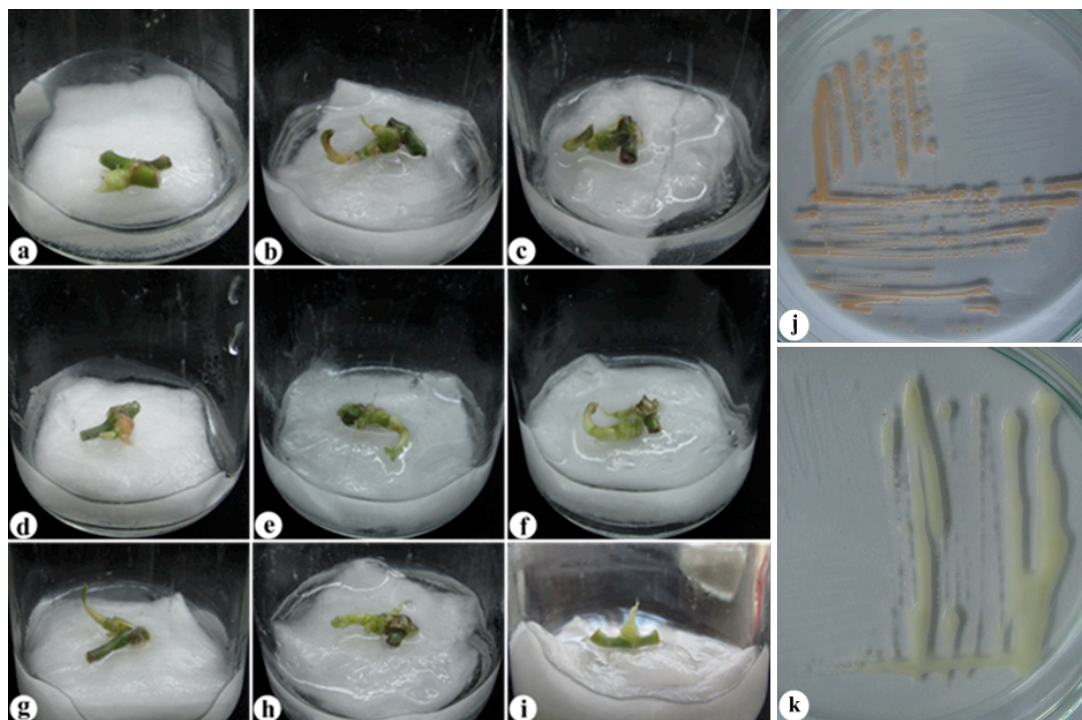
Bịch nuôi cây với màng thoáng khí đã tạo ra sự thông khí giữa bên trong bịch và môi trường bên ngoài, chính vì vậy sự thoát hơi nước qua các lỗ màng làm cho môi trường nuôi cây trở nên khô (Hình 2. m, n), thể tích bịch càng nhỏ thì khả năng mất nước càng cao. Sự thoát hơi nước và làm khô môi trường nuôi cây cũng được quan sát thấy trong bình nuôi cây gắn màng thoáng khí (Lo *et al.*, 2010). Trên cùng thể tích, khối lượng tươi thu được trên môi trường không thoáng khí cao hơn so với môi trường thoáng khí, kết quả này là do các chồi không bị mất nước trong suốt quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên, khối lượng khô, chiều rộng lá và chỉ số SPAD trong nuôi cấy thoáng khí lại thu được cao hơn (Bảng 2). Kết quả tăng chiều cao và sinh khối tươi của cây con trong bình nuôi cấy với nắp đậy kín là đáng kể cao hơn so với các bình thoáng khí sau tám tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trong bình với

nắp đậy kín chiều rộng lá bị giảm đi một nửa, mặc dù khối lượng tươi và khô của toàn bộ chồi đã không giảm, kích thước lá nhỏ hơn là do tác động tích lũy của ethylene (Lo *et al.*, 2010). Trong khi đó, Jackson và đồng tác giả (1991) lại cho thấy, chồi khoai tây (*Solanum tuberosum*) thu được kết quả thấp hơn, thân bò ngang và kích thước của lá thu nhỏ khi nuôi cấy trong bình với nắp đậy kín. Kết quả sử dụng bịch nylon, hộp nhựa kết hợp với thoáng khí đã kích thích sự nhân nhanh và cho chất lượng cây giống tốt nhất trên một số đối tượng cây trồng trong nuôi cấy *in vitro* (Duong Tấn Nhựt *et al.*, 2005; Nguyễn Thanh Phương *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, kết quả tốt nhất về chiều cao chồi (7,60 cm), số lá (7,70), chiều rộng lá (2,50 cm), khối lượng tươi (1,51 g), khô (0,148 g) và giá trị SPAD (37,58) thu được trên bịch thoáng khí có đường kính đáy 20 cm trên môi trường lỏng với giá thể bông gòn.

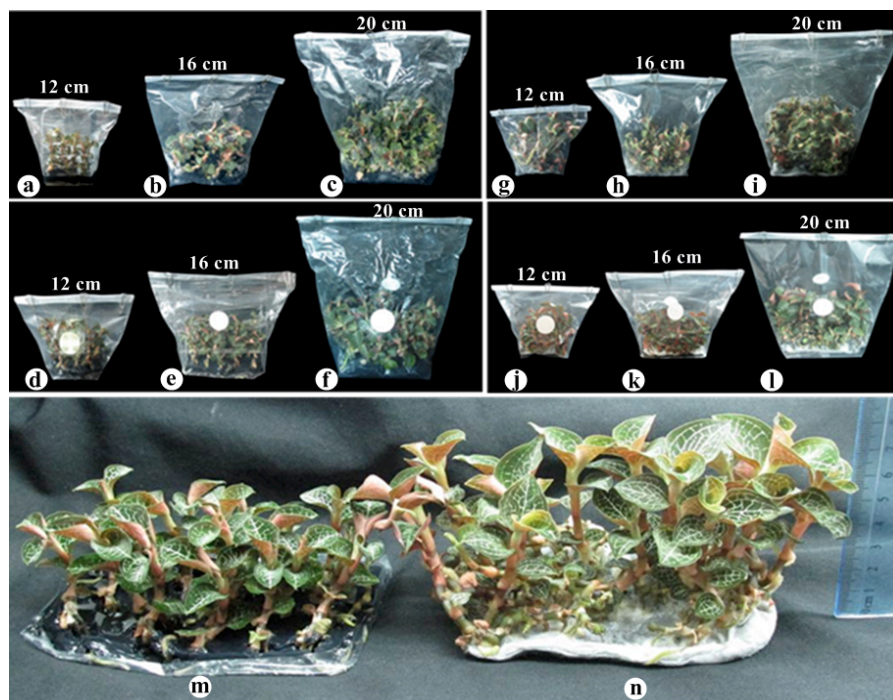
Bảng 1. Ảnh hưởng của BA, KIN, TDZ lên quá trình tái sinh chồi lan Kim Tuyến *in vitro*.

Chất điều hòa sinh trưởng			Số mẫu sống (%) ¹	Số mẫu nhiễm (%) ¹	Chiều dài chồi (cm)	Hình thái chồi
BA (mg/l)	KIN (mg/l)	TDZ (mg/l)				
0,0 (ĐC)	-	-	26,09 ^c	73,05 ^a	0,50 ⁱ	Chồi yếu hình thành yếu
0,5	-	-	46,29 ^{ab}	52,96 ^{ab}	0,90 ^{fg}	Chồi bên hình thành khỏe
1,0	-	-	52,96^a	46,29^b	1,50^a	Chồi bên hình thành khỏe, mập
1,5	-	-	46,29 ^{ab}	52,96 ^{ab}	1,50 ^a	Chồi bên hình thành khỏe, mập
2,0	-	-	39,99 ^{abc}	59,99 ^{ab}	1,46 ^{ab}	Chồi bên hình thành khỏe, mập
-	0,5	-	32,76 ^{bc}	66,38 ^{ab}	0,76 ^{gh}	Chồi bên hình thành yếu
-	1,0	-	46,29 ^{ab}	52,96 ^{ab}	1,20 ^{cd}	Chồi bên hình thành khỏe
-	1,5	-	52,96^a	46,29 ^b	1,33 ^{bc}	Chồi bên hình thành khỏe, mập
-	2,0	-	32,76 ^{bc}	66,38 ^{ab}	1,40 ^{ab}	Chồi bên hình thành khỏe
-	-	0,5	46,29 ^{ab}	52,96 ^{ab}	1,23 ^{cd}	Chồi bên hình thành khỏe
-	-	1,0	39,99 ^{abc}	59,99 ^{ab}	1,13 ^{de}	Chồi bên hình thành khỏe
-	-	1,5	38,60 ^{abc}	59,02 ^{ab}	1,00 ^{ef}	Chồi bên hình thành khỏe, dị dạng
-	-	2,0	39,99 ^{abc}	59,99 ^{ab}	0,66 ^h	Chồi bên hình thành khỏe, dị dạng
CV%			10,94	8,32	7,80	
F-test			*	*	*	

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



Hình 1. Ảnh hưởng của BA, KIN, TDZ lên quá trình tái sinh chồi lan Kim Tuyền *in vitro*. **a.** Đối chứng; **b, c.** chồi tái sinh trên môi trường bổ sung 1,0 và 1,5 mg/l BA; **d, e, f.** chồi tái sinh trên môi trường bổ sung 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l KIN; **g, h, i.** chồi tái sinh trên môi trường bổ sung 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l TDZ; **j.** khuẩn hồng; **k.** khuẩn đục sữa.



Hình 2. Ảnh hưởng của thể tích bình nylon và điều kiện thoáng khí lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim Tuyền nuôi cấy *in vitro*. **a, b, c.** môi trường đặc không thoáng khí; **d, e, f.** môi trường đặc thoáng khí; **g, h, i.** môi trường lỏng không thoáng khí; **j, k, l.** môi trường lỏng thoáng khí; **m, n.** chồi sinh trưởng trên môi trường rắn và lỏng thoáng khí.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thể tích bình nylon và điều kiện thoáng khí lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim Tuyến nuôi cấy *in vitro*.

Đường kính đáy bình (cm)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Giá trị SPAD	
Môi trường đặc (không thoáng khí)	12	5,15 ^f	6,35 ^h	1,75 ^e	1,30 ^e	0,114 ^h	31,56 ^e
	16	5,45 ^e	6,60 ^g	1,80 ^e	1,34 ^d	0,119 ^{gh}	33,10 ^{de}
	20	5,55 ^e	6,80 ^f	1,80 ^e	1,40 ^c	0,131 ^c	34,99 ^c
Môi trường đặc (thoáng khí)	12	5,62 ^e	6,90 ^{ef}	1,82 ^e	1,24 ^g	0,124 ^{def}	35,38 ^{bc}
	16	5,97 ^d	7,02 ^e	1,90 ^{de}	1,25 ^{fg}	0,123 ^{efg}	35,85 ^{bc}
	20	6,25 ^c	7,20 ^d	2,02 ^{cd}	1,29 ^{ef}	0,127 ^{cde}	36,74 ^{ab}
Môi trường lỏng (không thoáng khí)	12	6,45 ^c	7,25 ^d	1,87 ^e	1,31 ^{de}	0,123 ^{efg}	32,03 ^e
	16	6,97 ^b	7,40 ^c	2,05 ^c	1,49 ^b	0,129 ^{cd}	32,90 ^{de}
	20	7,12 ^b	7,52 ^{bc}	2,20 ^b	1,59 ^a	0,141 ^b	34,32 ^{cd}
Môi trường lỏng (thoáng khí)	12	7,20 ^b	7,60 ^{ab}	2,22 ^b	1,28 ^{ef}	0,123 ^{efg}	35,13 ^c
	16	7,52 ^a	7,67 ^a	2,32 ^b	1,41 ^c	0,138 ^b	36,93 ^{ab}
	20	7,60 ^a	7,70 ^a	2,50 ^a	1,51 ^b	0,148 ^a	37,58 ^a
CV%	2,42	1,27	4,64	1,82	2,61	3,17	
F-test	*	*	*	*	*	*	

Ghi chú : *: 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.

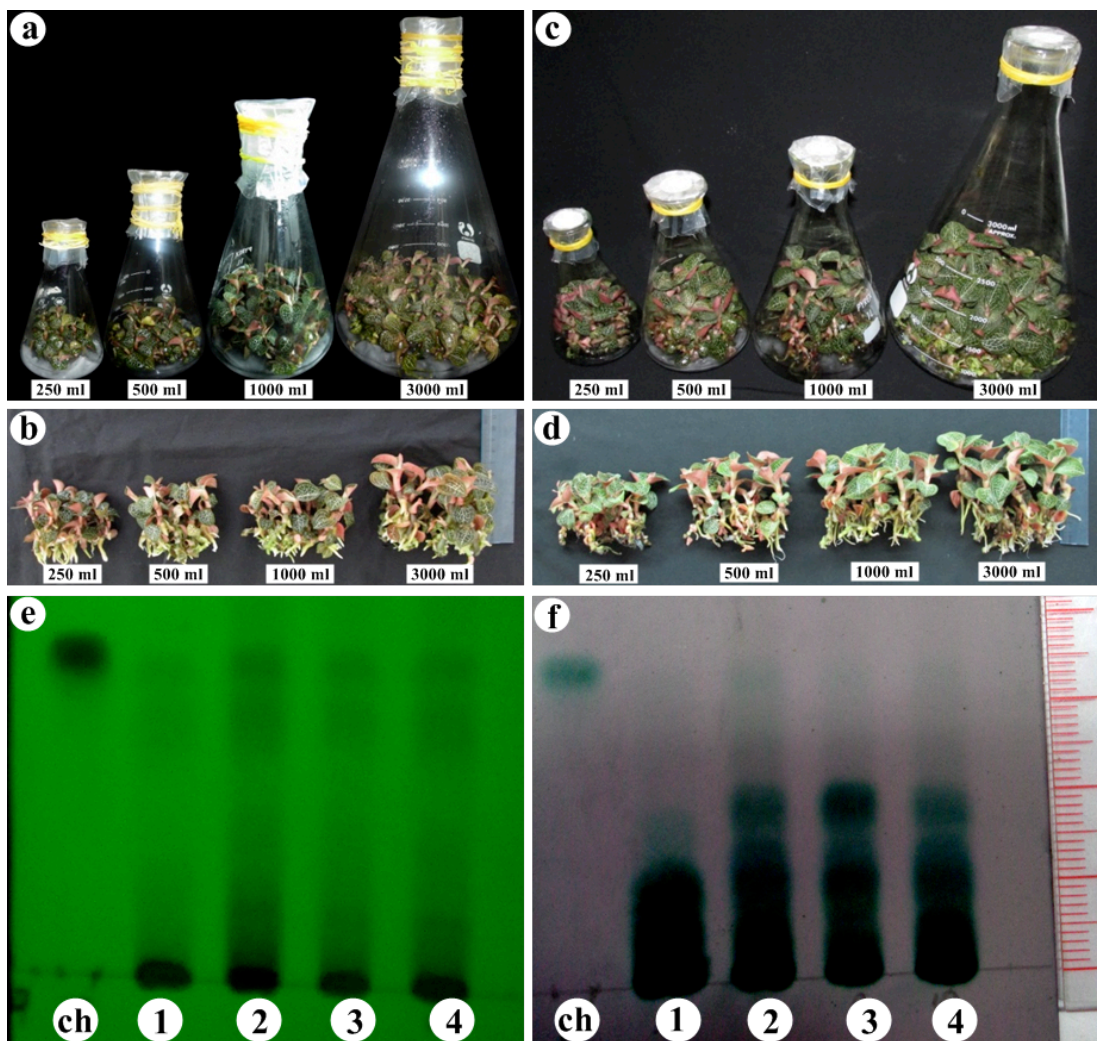
Khảo sát ảnh hưởng của thể tích bình và điều kiện thoáng khí lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim Tuyến nuôi cấy *in vitro*

Kết quả thu nhận ảnh hưởng của thể tích bình sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy, các chỉ tiêu theo dõi đều gia tăng khi thể tích bình tăng trong cả hai điều kiện nuôi cấy thoáng khí và không thoáng khí (Bảng 3). Trong bình tam giác 250 ml, khi nuôi cấy trong điều kiện thoáng khí và không thoáng khí cho kết quả về chiều cao chồi, chỉ số SPAD, khối lượng tươi và khô không có sự khác biệt, tuy nhiên, về số lá và chiều rộng được nuôi trong điều kiện thoáng khí lá có sự khác biệt đáng kể so với nuôi cấy không thoáng khí. Khi nuôi trong bình 500 và 1000 ml, chiều cao chồi, giá trị SPAD, khối lượng tươi và khô không có sự khác trong điều kiện nuôi cấy không thoáng khí, các chỉ tiêu về số lá, chiều rộng lá đã tạo ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó, trên cùng thể tích bình nuôi cấy 500 ml với nắp đậy thoáng khí, chiều cao chồi đã có sự khác biệt và vượt trội với nuôi cấy không thoáng khí (Bảng 3). Chồi sinh trưởng trong bình có thể tích 1000 và 3000 ml với nắp đậy thoáng khí đã cho kết quả khác biệt về tất cả các chỉ tiêu theo dõi và tốt nhất thu được ở bình thể tích 3000 ml (Bảng 3). Ảnh hưởng của loại bình nuôi cấy, thể tích bình và điều

kiện nuôi cấy thoáng khí đã ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và phát triển của một loại cây trồng trong nuôi cấy *in vitro* đã được báo cáo bởi một số tác giả. McClelland và Smith (1990) đã cho thấy: số chồi, chiều cao chồi, diện tích lá trên 5 loài đều tăng khi thể tích bình nuôi cấy tăng. Ảnh hưởng của loại bình nuôi cấy đã làm thay đổi về chiều cao chồi, tỷ lệ nhân chồi và trọng lượng tươi của cây con *in vitro* (Mackay, Kitto, 1988; Monette, 1986) và bình nuôi cấy với nắp đậy kín có ảnh hưởng tới tỷ lệ nhân nhanh, số lượng chồi và hình thái thực vật (Ivanicka, 1987; Webb *et al.*, 1986). Chất lượng của vi nhân giống thực vật có thể bị ảnh hưởng đáng kể bởi khoảng không trong bình nuôi cấy và đậy kín nắp bình (Lentini *et al.*, 1988). Những bất lợi ảnh hưởng của bình với nắp đậy kín có thể sẽ hạn chế trao đổi không khí với không khí bên ngoài và sau đó tích lũy độ ẩm và ethylene dẫn đến chồi mềm yếu và thường bị thủy tinh thể cho một số loài (Bottcher *et al.*, 1988; Lentini *et al.*, 1988; Perl *et al.*, 1988; Thorpe, Patel, 1984; Webb *et al.*, 1986). Tuy nhiên, Kumar và đồng tác giả (1987) chỉ ra rằng đĩa petri dán kín đã có một tác động tích cực lên sự khác biệt khi nuôi cấy lá mầm của *Pinus radiata* và trao đổi khí hạn chế có thể giúp giai đoạn khởi đầu cho loài cây này. Walker và đồng tác giả (1989) đã so sánh ảnh hưởng của tốc độ trao đổi khí

lên khối lượng tươi và số chồi của *P. rhododendrons*, kết quả cho thấy, các bình đầy kín có giá trị cao hơn đáng kể so với bình thoáng khí. Cuello và đồng tác giả (1991) đã so sánh ảnh hưởng của năm cấp độ cung cấp CO₂ lên quá trình sinh trưởng của cây Đinh hương (*Buddleia alternifolia*), kết quả cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể giữa năm phương pháp xử lý CO₂ trong vài chỉ số tăng trưởng. Majada và đồng tác giả (2001) quan sát thấy bề mặt lá của cây con *Dianthus caryophyllus* trong nuôi cấy bình đầy kín hoặc bình nuôi cấy thoáng khí. Cây con sinh trưởng trong bình với tỷ lệ

trao đổi khí cao hơn cho thấy chức năng của khí khổng tốt hơn so với cây sinh trưởng trong bình nuôi cấy kín. Việc truyền và phân bố ánh sáng của bình nuôi cấy với các đáy tròn là đồng đều hơn so với các bình với đáy hình chữ nhật. Bức xạ quang phổ đã bị ảnh hưởng đáng kể bởi đặc tính vật liệu của bình nuôi cấy (Huang, Chen, 2005). Trong nghiên cứu này, kết quả tốt nhất thu được về chiều cao chồi (10,75 cm), số lá/chồi (9,45); chiều rộng lá (2,85 cm); khối lượng tươi (2,45 g); khối lượng khô (0,219 g); chỉ số SPAD (39,99) thu được ở bình có thể tích 3000 ml với nắp đầy thoáng khí.



Hình 3. Chồi lan Kim Tuyến sinh trưởng và phát triển trong bình tam giác với thể tích khác nhau và bước đầu định tính adenosine. **a, b.** chồi sinh trưởng trong điều kiện không thoáng khí; **c, d.** chồi sinh trưởng trong điều kiện thoáng khí; **e, f.** quan sát dưới đèn tử ngoại bước sóng 254 nm và phun thuốc thử anisaldehyd trong ethanol, sấy ở 105°C trong 10 phút và quan sát dưới ánh sáng thường: **ch.** chất chuẩn adenosine; **1.** bịch thoáng khí, môi trường đặc; **2.** bịch thoáng khí, môi trường lỏng; **3, 4.** bình 3 lít trên môi trường lỏng không thoáng khí và thoáng khí.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thể tích bình và điều kiện thoáng khí lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim Tuyến nuôi cấy *in vitro*.

Thể tích bình nuôi cấy (ml)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Giá trị SPAD	
Môi trường lỏng (không thoáng khí)	250	6,95 ^f	7,20 ^d	1,95 ^d	1,27 ^f	0,117 ^e	34,54 ^{cd}
	500	7,15 ^e	7,50 ^d	2,05 ^d	1,47 ^{de}	0,140 ^d	34,32 ^d
	1000	7,42 ^e	7,95 ^c	2,30 ^c	1,60 ^{cd}	0,145 ^d	35,21 ^{cd}
	3000	7,87 ^d	8,00 ^c	2,40 ^c	1,95 ^b	0,170 ^c	35,74 ^c
Môi trường lỏng (thoáng khí)	250	7,02 ^f	8,05 ^c	2,25 ^c	1,32 ^{ef}	0,120 ^e	37,77 ^b
	500	8,52 ^c	8,25 ^c	2,37 ^c	1,67 ^c	0,145 ^d	38,76 ^b
	1000	9,07 ^b	8,74 ^b	2,67 ^b	2,05 ^b	0,183 ^b	38,58 ^b
	3000	10,75^a	9,45^a	2,85^a	2,45^a	0,219^a	39,99^a
CV%	1,93	3,01	4,86	6,26	4,89	2,42	
F-Test	*	*	*	*	*	*	

Ghi chú: *: 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.

Định tính adenosine tổng bằng các phản ứng đặc trưng

Kết quả khảo sát hệ dung môi khi tiến hành sắc ký lớp mỏng cho thấy hệ dung môi Chloroform - ethyl acetate - isopropanol - nước - ammoniac (8 : 2 : 6 : 0,5 : 0,12) là phù hợp để triển khai sắc ký lớp mỏng. Kết quả trên sắc ký đồ của 4 mẫu thử tương đồng nhau về Rf và màu sắc của adenosine chuẩn. Khi phun thuốc thử anisaldehyde trong ethanol, sấy ở 105°C trong 10 phút và quan sát dưới ánh sáng thường. Mẫu thử cũng có vết tương ứng với chuẩn. Rf = tỷ lệ giữa khoảng dịch chuyển của chất phân tích và khoảng dịch chuyển của dung môi (Hình 3. e, f).

KẾT LUẬN

Quá trình tái sinh chồi từ các đốt thân *ex vitro* của giống lan Kim Tuyến (*Anoectochilus setaceus*) thu được kết quả cao nhất (52,96%) trên môi trường SH lỏng với giá thể bông gòn có bổ sung 1 mg/l BA, 30 g/l sucrose, pH = 5,8. Thể tích bình và bình nuôi cấy kết hợp với điều kiện thoáng khí đã thúc đẩy quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi *in vitro*. Kết quả tốt nhất thu được ở bình thoáng khí có đường kính đáy 20 cm trên môi trường lỏng với giá thể bông gòn về chiều cao chồi (7,60 cm), số lá (7,70), chiều rộng lá (2,50 cm), khối lượng tươi (1,51 g), khô (0,148 g) và giá trị SPAD (37,58). Trên bình tam giác có thể tích 3000 ml với nắp đáy thoáng khí, kết quả tốt nhất thu được về chiều cao chồi (10,75 cm),

số lá/chồi (9,45); chiều rộng lá (2,85 cm); khối lượng tươi (2,45 g); khối lượng khô (0,219 g); chỉ số SPAD (39,99). Kết quả khảo sát hệ dung môi khi tiến hành sắc ký lớp mỏng cho thấy hệ dung môi Chloroform - ethyl acetate - isopropanol - nước - ammoniac (8 : 2 : 6 : 0,5 : 0,12) là phù hợp để triển khai sắc ký lớp mỏng. Kết quả trên sắc ký đồ của chồi được nuôi cấy trên môi trường đặc và lỏng (bịch thoáng khí); Chồi nuôi cấy trong bình 3 lít trên môi trường lỏng (không thoáng khí và thoáng khí) cho thấy, sắc ký đồ của 4 mẫu thử tương đồng nhau về Rf và màu sắc của adenosine chuẩn.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Khoa học và Công nghệ (2007) *Sách Đỏ Việt Nam* (phần thực vật), NXB. Khoa học Tự nhiên & Công nghệ, Hà Nội.
- Botcher I, Zoglauer K, Goring H (1988) Induction and reversion of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol Plant* 72: 560-564.
- Cuello JL, Walker PN, Heuser CW, Heinemann PH (1991) Controlled *in vitro* environment for stage II micropropagation of *Buddleia alternifolia* (Butterfly Bush). *Transactions of the ASAE* 34(4): 1912-1918.

- Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Việt Cường, Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Hồng Hoàng, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Xuân Tuấn, Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Kim Loan, Dương Tấn Nhựt (2015) Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan Gấm (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 13(3): 337-344.
- Doris CN, Chang LC, Chou GC, Lee (2007) New cultivation methods for *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Orchid Sci Biotechnol* 1(2): 55-60.
- Du X, Shoyama Y (2011) Study on Bioactive Components of *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Nagasaki Inter Uni*: 119-130.
- Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F test, *Biometrics* 11: 1-42.
- Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Quốc Thiện, Vũ Quốc Luận (2005) Nâng cao chất lượng của các cây giống hoa cúc và hồng nuôi cấy *in vitro* thông qua nuôi cấy thoáng khí. *Tạp chí sinh học* 27(3): 92-95.
- Durak I, Perk H, Kavutcu M, Canbolat O, Akyol O, Beduk Y. (1994) Adenosine deaminase, 5' nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. *Free Radic Biol Med* 16(6): 825-831.
- Elekwa I, Monanu MO, Anosike EO (2005) *In vitro* effects of aqueous extracts of *Zanthoxylum macrophylla* roots on adenosine triphosphatases from human erythrocytes of different genotypes. *Biochemistri* 17(1): 19-25.
- Gangaprasad A, Latha PG, Seeni S (2000) Micropropagation of terrestrial orchids, *Anoectochilus sikkimensis* and *Anoectochilus regalis*. *Ind J Exp Biol* 38(2): 149-54.
- Glazer RI (1980) Adenosine deaminase inhibitors: their role in chemotherapy and immunosuppression. *Cancer ChemotherPharmacol*4(4): 227-235.
- He CN, Wang CL, Guo SX, Yang JS, Xiao PG (2006) A novel flavonoid glucoside from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *J Integrat Plant Biol* 48(3): 359-363.
- Huang C, Chen C (2005) Physical Properties of Culture Vessels for Plant Tissue Culture. *Biosyst Eng* 91(4): 501-511.
- Ivanicka J (1987) *In vitro* micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. *Sci Hort* 32: 33-39.
- Jackson MB, Abbott AJ, Belcher AR, Hall KC, Butler R, Cameron J (1991) Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *AnnBot* 67: 229-237.
- Kane ME, Philman NL (1992) Effect of culture vessel type on *in vitro* multiplication of *Pontederia cordata*. *Proc Fla State Hort Soc* 105: 213-215.
- Ket NV, Hahn EJ, Park SY, Chakrabarty D Paek KY (2004) Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biol Plant* 48(3): 339-344.
- Kumar P, Reid D, Thorpe T (1987) The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata in vitro*. *Physiol Plant*, 69(1): 244-251.
- Lentini Z, Mussell H, Mutschler MA, Earle ED (1988). Ethylene generation and reversal of ethylene effects durine development *in vitro* of rapid-cycling *Brassica campestris* L. *Plant Sci* 54: 75-81.
- Liu ZL, Liu Q, Xiao B, Zhou J, Zhang JG, Li Y (2013) The vascular protective properties of kinsenoside isolated from *Anoectochilus roxburghii* under high glucose condition. *Fitoterapia* 86: 163-170.
- Lo KY, Ku N, Jin CS, Izzati N, Arvind B, Ning SP, Chan LK (2010) Effect of perforations of culture vessel cap on growth and leaf microstructure of *in vitro* plantlets of *Artemisia annua* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(21): 2273-2282.
- Mackay WA, Kitto SL (1988) Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of French tarragon. *J Amer Soc Hort Sci* 113: 282-287.
- Majada JP, Sierra MI, Sanchez TR (2001) Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Sci Hort* 87(1): 121-130
- Manuel M, Seemann P, Jara G, Riegel R (2009) Influence of vessel type, physical state of medium and temporary immersion on the micropropagation of three. *Rhodophiala specieschilean. j agric res* 69(4): 281-287.
- McClelland MT, Smith MAL (1990) Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *Hort Sci* 25(7): 797-800.
- Monette P (1986) Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell Tiss Org Cult* 6: 73-82.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15: 473-496.
- Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miện (2012) Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* bảo tồn nguồn dược liệu quý. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 10(4): 597-603.
- Nguyễn Thanh Phương, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Hồng Thắm (2014) Ảnh hưởng của một số loại đèn chiếu sáng và bình nuôi cấy đến sự sinh trưởng, phát triển của giống cấy chướng hồng hạc cấy mô. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(7): 1015-1022.

- Nguyễn Thị Mai Hạnh, Nguyễn Bảo Toàn (2014) Cải tiến giai đoạn 2 và 3 trong vi nhân giống lan *aerides* sp. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ* 4: 52-56.
- Nguyễn Tuấn Anh, Phan Ngọc Khoa, Trương Thị Bích Phượng (2013) Nghiên cứu nuôi cấy lớp mỏng trong nhân nhanh *in vitro* cây lan Kim Tuyền (*Anoectochilus roxburghii* Lindl). *Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*: 690-694.
- Nhut DT, Don NT, Vu N, Thien NQ, Thuy DTT, Duy N, Jaime ATD S (2006) *Advanced technology in micropropagation of some important plants*. In Jaime A. Teixeira Da Silva, ed. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Global Science Books, United Kingdom, 2: 325-335.
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81: 287-300.
- Perl A, Aviv D, Galun E (1988). Ethylene and *in vitro* culture of potato: Suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Rept* 7: 403-406.
- Phương pháp sắc ký lớp mỏng (2009) Dược điển Việt Nam IV, Bộ Y tế, Hà Nội: 129-131.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.
- Sherif N, Ahamed, Franklin BJH, Muthukrishnan S, Senthil KT, Rao MV (2012) Regeneration of plantlets from nodal and shoot tip explants of *Anoectochilus elatus* Lindley, an endangered terrestrial orchid. *Afr J Biotechnol* 11(29): 7549-7553.
- Sona M, Svetlana S, Alvard A, Narine Z (2011) Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase inhibition by armenian plants and antidiabetic drugs. *Int J Diabetes Metab* 19: 69-74.
- Thorpe TA, Patel KR (1984) Clonal propagation: adventitious buds. In: I.K. Vasil (ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic, New York. 1: 49-60.
- Trần Thị Hồng Thúy, Đỗ Thị Gấm, Nguyễn Khắc Hưng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2015) Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* loài lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* blume) thông qua cảm ứng tạo protocorm like bodies. *Tạp chí Sinh học* 37(1): 76-83.
- Vũ Quốc Luận, Trần Đình Phương, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2015) Vi nhân giống và định tính hoạt chất β -sitosterol trên cây lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* blume). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(4): 1113-1125.
- Walker P, Heuser C, Heinemann P (1989) Micropropagation: effects of ventilation and carbon dioxide level on *Rhododendron 'P.J.M'*. *Transactions of the ASAE* 32(2): 348-352.
- Webb DT, Arias W, Hostos E (1986). Callus formation by Ginkgo biloba embryos on hormone-free media controlled by closures and media components. *Phytomorphology* 36: 121-127.
- Wilson DK, Rudolph FB, Quioco FA (2010) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 252: 1278-1284.
- Zahide ED, Suleyman B, Erdinc D, Hilmi K, Ilker D (2015) Aqueous extract from turmeric (*curcuma longa*) inhibits adenosine deaminase activity significantly in cancerous and non cancerous human gastric and colon tissues. *F Nutr Report* 1(1): 24-26.

INFLUENCE OF CULTURE VESSEL VOLUME AND VENTILATION ON *IN VITRO* CULTURE AND ADENOSINE ACCUMULATION OF *Anoectochilus setaceus* Blume

Vu Quoc Luan¹, Nguyen Ba Nam², Vu Thi Hien¹, Nguyen Phuc Huy¹, Hoang Thanh Tung¹, Tran Cong Luan^{3,4}, Duong Tan Nhut¹

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, VAST

²Institute of Research and Hi-Tech Application in Agriculture – Dalat University

³Center of Ginseng and Medicinal Materials in Ho Chi Minh City, National Institute of Medicinal Materials

⁴Tay Do University

SUMMARY

Anoectochilus setaceus is a medicinal plant used as a traditional medicine as well as nutritious products for health care in China and many Asian countries. In conventional propagation, the the vessel type, material and

volume lead to differences in the moisture content between the internal and external conditions which result in great impact on the quality of *in vitro* plantlets as well as subsequent growth at nursery. In this study, several factors affecting the multiplication and regeneration of *A. setaceus* cultured *in vitro* were investigated. The highest percentage of shoot regeneration (52.88%) from *ex vitro* stem nodes was obtained when explants were cultured on SH medium supplemented with 1 mg/l BA, 30 g/l sucrose with cotton wool plug as the substrate and pH of the medium was adjusted to 5.8 prior to autoclaving. In the present study, culture vessel volume and ventilation culture conditions indicated to have effect on shoot quality. Results showed that 3-liter Erlenmeyer flasks in combination with ventilation caps resulted in better shoot growth and development (shoot height: 10.75 cm; 9.45 leaves per shoot; fresh- and dry- weight of 2.45 and 0.219 g per shoot, respectively; leaf diameter: 2.85 cm and SPAD: 39.99). Results of chromatography (TLC) analysis indicated that explants gave the same Rf value as that of authentic Adenosine. Qualifying Adenosine using TLC showed that extracts of shoots cultured on solid and liquid medium (ventilation plastic bag), and that of shoots cultured in 3-liter vessel with liquid medium (with and without ventilation) gave the same pattern in the respects of color and Rf value.

Keywords: *adenosine, anoectochilus, filter membrane, in vitro plantlets, SH liquid medium, TLC diagram*