



DOI:10.22144/ctujos.2024.374

NHÂN *in vitro* LAN HOÀNG THẢO KÈN (*Dendrobium lituiflorum*) TỪ THỂ TIỀN CHỐI

Trần Ngọc Quý^{1*}, Đỗ Tấn Khang¹, Trần Thanh Mến² và Nguyễn Văn Ây³¹Viện CNSH và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ³Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): tnquy@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 01/06/2024

Sửa bài (Revised): 11/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 02/08/2024

Title: *In vitro* propagation of *Dendrobium lituiflorum* from protocorm like bodies

Author(s): Tran Ngoc Quy*, Ho Ngoc Nhu, Do Tan Khang, Tran Thanh Men and Nguyen Van Ay

Affiliation(s): Can Tho University

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm nhân nhanh giống lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum*) từ thể tiền chồi. Kết quả nghiên cứu cho thấy: (i) Số lượng PLB khi nuôi trong môi trường MS bổ sung TDZ nồng độ từ 0,5-1,5 mg/L kết hợp với NAA 0,05 mg/L gia tăng nhanh sinh khối cao nhất (5,01 – 6,11g/PLBs) so với nghiệm thức Đối chứng (2,11 g/PLBs) sau 12 tuần nuôi cấy. Các PLB này phát triển thành chồi, sau đó được dùng để tạo rễ *in vitro* trên môi trường MS, trong đó nghiệm thức MS bổ sung NAA nồng độ 1 mg/L, chuối chín 150 g/L, kết hợp với than hoạt tính 3 g/L, cho hiệu quả tạo rễ cao (tỷ lệ tạo rễ 100%, số rễ đạt 12,8 rễ/cây sau 6 tuần nuôi cấy). Giai đoạn thuần dưỡng, hỗn hợp giá thể than và dớn mềm (tỷ lệ 1:1) kết hợp với trùm nylon cho tỷ lệ cây lan Hoàng thảo kèn sống cao (90,2% sau 4 tuần thuần dưỡng). Các cây lan Hoàng thảo kèn con sinh trưởng và phát triển tốt và có thể trồng qua chậu.

Từ khóa: Lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum*), NAA, nuôi cấy *in vitro*, TDZ, thuần dưỡng

ABSTRACT

The study was conducted to propagate *Dendrobium lituiflorum* orchids from protocorm like bodies. The results showed that: (i) The number of PLBs could be quickly multiplied on MS medium supplemented with TDZ (0.5-1.5 mg/L) and NAA 0.05 mg/L, with the highest amount of biomass (5.01 - 6.11g/PLBs), compared to the control treatment (2.11 g/PLBs) after 12 weeks of culture. These PLBs could be turned into shoots and used to create *in vitro* root induction on MS medium supplemented with NAA 1 mg/L, ripen banana at 150 g/L and activated charcoal 3 g/L, showing high rooting efficiency (100% rooting rate, 12.8 roots/plantlet after 6 weeks of cultured). Furthermore, in the acclimatization stage, the substrate of charcoal and sphagnum moss (ratio 1:1) combined with nylon cover indicated a high survival rate (90.2% after 4 weeks of hardening). The orchids grew well and could be transferred into pots for normal farming conditions.

Keywords: *Dendrobium lituiflorum*, NAA, *in vitro* culture, TDZ, acclimatization

1. GIỚI THIỆU

Việt Nam là quốc gia có khí hậu nhiệt đới gió mùa, thích hợp cho sự phát triển của nhiều loài thực vật, đặc biệt là phong lan. Phong lan ở nước ta rất phong phú với nhiều chủng loại. Tuy không sắc sỡ màu sắc như những lan ngoại nhưng lại có vẻ đẹp tự nhiên thanh thoát và phần lớn có hương thơm vì vậy luôn gây hứng thú đối với người chơi lan. *Dendrobium* là một ví dụ điển hình và có giá trị về nhiều mặt (Vân & Nga, 2008). Tại Việt Nam, có khoảng 107 loài *Dendrobium* đã được xác định. Nhóm lan này rất đa dạng về hình thái, hoa của chúng cũng có nhiều hình dạng kỳ lạ và vô cùng phong phú về màu sắc và kích thước (Toàn, 2006). Giống này được đánh giá cao trong ngành công nghiệp hoa (Khosravi et al., 2008).

Lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium litiiflorum*) là một trong những loài trong chi *Dendrobium* tự nhiên, phân bố ở các tỉnh phía Bắc (Sơn La, Lai Châu,...) và khu vực Tây Nguyên (Lâm Đồng, Kon Tum,...) của Việt Nam, Trung Quốc, dãy Hy Lạp và miền bắc Đông Dương. Đây là một trong những loài lan đẹp và quý hiếm. Hiện nay, *Dendrobium litiiflorum* đang mất dần trong tự nhiên. Một phần do môi trường sống của chúng khá đặc biệt là chúng mọc trên thân của cây khác với độ cao khá cao nên khả năng tồn tại của chúng không được đảm bảo. Mặt khác, do nạn phá rừng và khai thác quá mức khiến giá thành của Hoàng thảo kèn bị đẩy lên rất cao và trở thành loài bị săn lùng nhiều hơn. Vì thế nếu không có những biện pháp bảo vệ và nhân giống kịp thời, loài lan này có nguy cơ bị tuyệt chủng (Chowdhery, 2001).

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học hiện đại, phương pháp nhân giống ngày càng được cải thiện. Ngày nay, công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật rất phát triển và được áp dụng rộng rãi. Công nghệ này so với phương pháp nhân giống truyền thống (gieo hạt, tách bụi,...) mất ít thời gian, hiệu quả hơn. Để giải quyết vấn đề nêu trên, có thể kết hợp phương pháp này vào việc nhân giống *Dendrobium litiiflorum* với số lượng lớn để bảo tồn nguồn gen. Một số kết quả tiêu biểu trong nhân giống lan Hoàng thảo kèn bằng kỹ thuật nuôi cấy mầm ngủ, dinh dưỡng hay khảo sát thành phần môi trường nuôi đến sự sinh trưởng của loại lan này là kết quả nghiên cứu của Việt (2017), Lộc và Nguyễn (2020),...

Trong nghiên cứu này, ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô thông qua nuôi cấy thể tiền chồi (protocorm like bodies - PLBs) trong nhân giống cây hoa lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium litiiflorum*) được

thực hiện nhằm tìm ra loại môi trường nuôi cấy thích hợp cho nhân nhanh sinh khối PLBs, tạo rễ và điều kiện thuận dưỡng cho loài lan này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và thời gian nghiên cứu

Dinh sinh trưởng của cây lan hoàng thảo kèn được phân lập và nuôi cấy trên môi trường Murashige và Skoog (MS, 1962), bổ sung NAA 0,01 mg/L + TDZ 0,5 mg/L để tạo các thể tiền chồi (PLBs). Các cụm PLBs của lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium litiiflorum*) *in vitro* 6 tuần tuổi được nuôi cấy tại Phòng thí nghiệm Công nghệ mô và tế bào, Khoa Sinh lý - Sinh hóa, Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Thời gian thực hiện từ tháng 1 năm 2023 đến tháng 4 năm 2024.

2.2. Dụng cụ và thiết bị

Dụng cụ: kẹp cấy, dao cấy, ca nhựa, đĩa thủy tinh, keo thủy tinh, ống đong, beaker, micropipette, bao tay, bông gòn,...

Thiết bị: tủ cấy vô trùng, nồi hấp khử trùng (nhiệt ướt), hộp nhiệt, cân điện tử, máy đo pH, tủ lạnh, tủ sấy giấy, bếp từ,...

2.3. Hóa chất

- Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS có hàm lượng khoáng đa vi lượng theo công thức của Murashige and Skoog (MS, 1962).

- Chất điều hòa sinh trưởng NAA (α -Naphthalene acid acetic) và TDZ (Thidiazuron).

- Vitamin gồm Thiamine (B₁), Nicotinic acid (B₃) và Pyridoxine (B₆).

- Các thành phần khác: Sucrose, agar, Na-EDTA, nước cất, nước dừa tươi, chuối xiêm chín.

2.4. Điều kiện nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện *in vitro* với ẩm độ 68% - 72%, nhiệt độ 24±2°C với cường độ chiếu sáng 2500 lux và thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

2.5. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS (1962), đồng thời bổ sung agar 9 g/L, sucrose 30 g/L. Ngoài ra, tùy theo thí nghiệm bổ sung thêm than hoạt tính, chuối chín và loại chất điều hòa sinh trưởng.

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi thanh trùng. Các keo thủy tinh chứa 40 mL môi trường và được khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút.

2.6. Tiến hành nghiên cứu

2.6.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng nồng độ TDZ và NAA lên sự hình thành thể tiền chồi

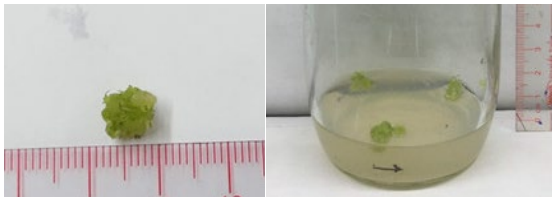
– Mục tiêu: xác định nồng độ thích hợp và sự kết hợp hiệu quả nhất của NAA và TDZ cho sự phát triển PLBs

– Vật liệu: Chọn các cụm PLBs sinh trưởng tốt, có kích thước tương đương nhau được ghi nhận qua thông số của kính lúp (chiều dài: $0,5 \pm 0,03$ cm; chiều rộng: $0,45 \pm 0,03$ cm), sinh trưởng tốt để tiến hành thí nghiệm.

– Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố với 11 nghiệm thức, 10 lần lặp lại/nghiệm thức, mỗi lần lặp lại là 1 keo chứa 3 cụm PLBs. Thí nghiệm bao gồm các nghiệm thức như sau:

– Đối chứng (không bổ chất điều hòa sinh trưởng);

- MS + NAA 0,05 mg/L;
- MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 0,5 mg/L;
- MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 1 mg/L;
- MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 1,5 mg/L;
- MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 2 mg/L;
- MS + NAA 0,1 mg/L;
- MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 0,5 mg/L;
- MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 1 mg/L;
- MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 1,5 mg/L;
- MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L;



Hình 1. Mẫu và cách bố trí của thí nghiệm 1

– Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: chiều cao (cm), chiều rộng (cm), chiều dài (cm) của PBLs được đo vào thời điểm 4 và 8 tuần sau khi nuôi cấy; khối lượng (g) và số protocorm được cân vào thời điểm sau 12 tuần sau khi nuôi cấy.

– Trong giai đoạn tái sinh chồi, các PLBs (12 tuần sau khi nuôi cấy) được chuyển sang môi trường MS bổ sung chuối chín 150 g/L cho đến khi hình thành chồi. Sau đó các chồi này được sử dụng cho thí nghiệm tạo rễ.

2.6.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của than hoạt tính và nồng độ NAA lên sự tạo rễ của chồi lan Hoàng thảo kèn

– Mục tiêu: xác định nồng độ than hoạt tính và NAA tác động thích hợp lên sự tạo rễ của cây lan Hoàng thảo kèn trong điều kiện *in vitro*.

– Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố với 8 nghiệm thức như ở Bảng 1 và 10 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo cây 3 chồi. Thí nghiệm sử dụng môi trường nuôi cấy MS cơ bản theo Murashige và Skoog (1962) bổ sung thêm chuối chín 150 g/L.



Hình 2. Mẫu và cách bố trí của thí nghiệm 2

– Các chỉ tiêu theo dõi và ghi nhận kết quả tại thời điểm 2 và 6 tuần sau khi nuôi cấy, bao gồm: số lá, số rễ, chiều dài rễ (cm) và tỷ lệ (%) tạo rễ sau 6 tuần nuôi cấy.

Bảng 1. Các nghiệm thức được bố trí

Than hoạt tính (g/L)	NAA (mg/L)			
	0	0,5	1	2
0	NT1	NT2	NT3	NT4
3	NT5	NT6	NT7	NT8

Ghi chú: NT: nghiệm thức

– Các chỉ tiêu theo dõi và ghi nhận kết quả tại thời điểm 2 và 6 tuần sau khi nuôi cấy bao gồm: số lá, số rễ, chiều dài rễ (cm) và tỷ lệ (%) tạo rễ sau 6 tuần nuôi cấy.

2.6.3. Thí nghiệm 3: khảo sát khả năng sống của cây lan Hoàng thảo kèn *in vitro* trong điều kiện thuần dưỡng

– Mẫu thí nghiệm là cây lan Hoàng thảo kèn *in vitro* từ thí nghiệm 2 được loại bỏ agar và xử lý bằng dung dịch trừ nấm Ridomil (lượng dùng theo khuyến cáo). Sau đó tiến hành trồng trên giá thể có tỷ lệ 50% than và 50% dớn mềm. Thí nghiệm gồm 2 nghiệm thức: trùn và không trùn nylon, mỗi nghiệm thức gồm 3 lần lặp lại, mỗi lần là 50 cây. Cây được phun giữ ẩm (khoảng 90%) sao cho vừa đủ ẩm giá thể và mặt lá không quá khô. Theo dõi và ghi nhận tỷ lệ sống ở các nghiệm thức sau 2 tuần thuần dưỡng.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010 và phân tích thống kê số liệu trên phần mềm Minitab.

Các chỉ tiêu được xử lý như sau:

- Chiều dài rễ: đo chiều dài rễ dài nhất (cm).
- Kích thước (cm) của cụm PLBs (dài, rộng và cao): đo chiều dài, rộng và cao của các cụm PLBs vào các thời điểm khảo sát.
- Số lượng protocorm: đếm protocorm của từng cụm PLBs bằng kính lúp soi nổi trong điều kiện vô trùng.
- Số rễ: ghi nhận rễ có chiều dài ≥0,5 cm.
- Khối lượng gia tăng: cân khối lượng của từng mẫu ghi nhận lúc sau trừ khối lượng ghi nhận trước đó.
- Tỷ lệ (%) tạo rễ: số cây ra rễ mới/tổng số cây.
- Tỷ lệ (%) cây sống: (Số cây sống/tổng số cây)x100%

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng nồng độ NAA và TDZ lên sự hình thành PBLs

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy ảnh hưởng của NAA và TDZ lên kích thước của PLBs. Vào thời điểm 4 tuần sau khi nuôi cấy, chiều cao của PLBs ở các

thực nghiệm khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%, trong đó, PLBs ở thực nghiệm MS + NAA 0,1 mg/L cho chiều cao cao nhất nhưng chỉ khác biệt với thực nghiệm MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 0,5 mg/L và Đối chứng, chiều cao gia tăng là 0,73 cm. Thực nghiệm Đối chứng cho chiều cao thấp nhất, không khác biệt với thực nghiệm MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ (0,5-2 mg/L), chiều cao gia tăng là 0,45 cm. Sau 8 TSKNC, chiều cao giữa các thực nghiệm khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 1%. Thực nghiệm MS + NAA 0,1 mg/L vẫn cho chiều cao cao nhất và không khác biệt đối với MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ (1-1,5 mg/L), chiều cao gia tăng là 0,9 cm. Thực nghiệm cho chiều cao thấp là thực nghiệm MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ (0,2 mg/L), chiều cao gia tăng lần lượt là 0,13 cm; 0,19 cm; 0,26 cm; 0,04 cm.

Đồng thời kết quả cũng cho thấy sự ảnh hưởng của TDZ và NAA lên chiều rộng của PLBs. Sau 4 TSKNC, chiều rộng giữa các thực nghiệm có sự khác biệt về mặt thống kê với mức ý nghĩa ở mức 1%. Thực nghiệm cho chiều rộng cao nhất là thực nghiệm MS + NAA 0,1 mg/L và không khác biệt với thực nghiệm MS + NAA 0,1 mg/L + (TDZ 0,5-2 mg/L), chiều rộng gia tăng 0,7 cm. Thực nghiệm cho chiều rộng thấp nhất là thực nghiệm MS + NAA 0,05 mg/L và không khác biệt đối với Đối chứng và thực nghiệm MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ (0,5-2 mg/L), chiều rộng gia tăng là 0,35 cm.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và TDZ lên kích thước (cao, rộng, dài) của PLBs (cm) theo thời gian nuôi cấy (tuần sau khi cấy)

Thực nghiệm (mg/L)	Kích thước PLBs (cm)					
	4 tuần sau khi nuôi cấy			8 tuần sau khi nuôi cấy		
	Cao	Rộng	Dài	Cao	Rộng	Dài
MS (Đối chứng)	1,05 ^c	0,89 ^{cd}	0,86 ^b	1,92 ^b	1,39 ^d	1,25 ^f
MS + NAA 0,05	1,25 ^{ab}	0,85 ^d	1,15 ^a	2,06 ^{ab}	1,72 ^{bcd}	1,81 ^{bcd}
MS + NAA 0,05 + TDZ 0,5	1,13 ^{bc}	0,91 ^{cd}	1,05 ^{ab}	1,89 ^b	2,03 ^{ab}	2,17 ^{ab}
MS + NAA 0,05 + TDZ 1	1,23 ^{abc}	1,01 ^{bcd}	1,08 ^a	2,03 ^{ab}	2,25 ^a	2,25 ^a
MS + NAA 0,05 + TDZ 1,5	1,26 ^{ab}	0,97 ^{bcd}	1,07 ^a	2,08 ^{ab}	1,98 ^{abc}	1,97 ^{abc}
MS + NAA 0,05 + TDZ 2	1,21 ^{abc}	0,97 ^{bcd}	1,14 ^a	1,93 ^b	2,06 ^{ab}	1,75 ^{cde}
MS + NAA 0,1	1,39 ^a	1,20 ^a	1,15 ^a	2,29 ^a	2,06 ^{ab}	1,97 ^{abc}
MS + NAA 0,1 + TDZ 0,5	1,28 ^{ab}	1,18 ^a	1,13 ^a	1,41 ^c	1,51 ^{cd}	1,47 ^{def}
MS + NAA 0,1 + TDZ 1	1,29 ^{ab}	1,04 ^{abc}	1,16 ^a	1,48 ^c	1,72 ^{bcd}	1,95 ^{abc}
MS + NAA 0,1 + TDZ 1,5	1,35 ^a	1,11 ^{ab}	1,19 ^a	1,61 ^c	1,60 ^{bcd}	1,35 ^f
MS + NAA 0,1 + TDZ 2	1,37 ^a	1,12 ^{ab}	1,18 ^a	1,41 ^c	1,39 ^d	1,41 ^{ef}
F	**	**	**	**	**	*
CV (%)	6,8	7,53	8,51	6,85	12,26	9,83

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

Thời điểm sau 8 TSKNC, chiều rộng giữa các nghiệm thức có sự khác biệt về mặt thống kê với mức ý nghĩa 1%. Nghiệm thức cho chiều rộng cao nhất là nghiệm thức MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 1 mg/L và không khác biệt với nghiệm thức MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ (1,5-2 mg/L), MS + NAA 0,1 mg/L, chiều rộng gia tăng là 1,24 cm. Nghiệm thức cho chiều rộng thấp nhất là MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L và Đối chứng, khác biệt với MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ (0,5-2 mg/L), MS + NAA 0,1 mg/L, chiều rộng gia tăng lần lượt là 0,27 cm và 0,5 cm.

Qua kết quả nghiên cứu như trên, có thể nói ở giai đoạn đầu (4 TSKNC), môi trường bổ sung auxin và cytokinin, các PLBs gia tăng nhanh về kích thước. Nhưng qua 8 TSKNC, PLBs ở các nghiệm thức tiếp tục phát triển, riêng ở nghiệm thức MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L, các PLBs có hiện tượng chậm phát triển về kích thước mà hình thành chồi (Hình 3). Sự kết hợp hài hòa giữa cytokinin và auxin để hình thành cây hoàn chỉnh, tạo mô sẹo (Toàn, 2006). Theo Vụ (1999), cytokinin hoạt hóa sự phân chia tế bào bằng cách kích thích tổng hợp mạnh mẽ các chất cần thiết cho quá trình phân chia tế bào với điều kiện có sự hiện diện của auxin.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và TDZ lên khối lượng PLBs thời điểm 12 tuần sau khi nuôi cấy

Nghiệm thức (mg/L)	Khối lượng gia tăng (g)
MS (Đối chứng)	2,11 ^{cd}
MS + NAA 0,05	4,27 ^{ab}
MS + NAA 0,05 + TDZ 0,5	5,01 ^{ab}
MS + NAA 0,05 + TDZ 1	5,34 ^{ab}
MS + NAA 0,05 + TDZ 1,5	6,11 ^a
MS + NAA 0,05 + TDZ 2	4,42 ^{ab}
MS + NAA 0,1	5,65 ^a
MS + NAA 0,1 + TDZ 0,5	4,69 ^{ab}
MS + NAA 0,1 + TDZ 1	4,72 ^{ab}
MS + NAA 0,1 + TDZ 1,5	3,58 ^{bc}
MS + NAA 0,1 + TDZ 2	1,11 ^d
F	**
CV (%)	16,35

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

Thông qua việc đo kích thước PLBs bằng các thông số chiều dài, rộng và cao sẽ gián tiếp biết được sự gia tăng sinh khối hoặc khối lượng của cá PLBs này, bởi sự tăng sinh khối của các cụm PLBs cũng tỷ lệ thuận với số lượng PLB cũng như số

lượng chồi lan Hoàng thảo kèn được tái sinh sau này. Sau 12 TSKNC, vì sự gia tăng kích thước rất lớn của 3 cụm PLBs nên không thể xác định được ở một số nghiệm thức, do đó khi không thể ghi nhận số liệu về kích thước ở thời điểm này, vì vậy cân khối lượng của PLBs được sử dụng để đánh giá kết quả của các nghiệm thức.

Khối lượng của các cụm PLBs tỷ lệ thuận với số chồi hình thành sau này từ các PLB. Hình 3 cho thấy chồi con hình thành từ các cụm PLBs vào thời điểm 12 tuần sau khi nuôi cấy. Kết quả Bảng 3 cho thấy sự ảnh hưởng của nồng độ NAA và TDZ lên sự gia tăng khối lượng của PLBs sau 12 TSKNC với mức ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 1%. Trong đó, nghiệm thức cho khối lượng lớn nhất là nghiệm thức MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 1,5 mg/L, chỉ khác biệt với 3 nghiệm thức MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 1,5 mg/L, MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L và Đối chứng. Nghiệm thức có khối lượng thấp nhất là MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L và không khác biệt với Đối chứng.



Hình 3. Sự hình thành chồi con từ các protocorm vào thời điểm 12 tuần sau khi nuôi cấy trên môi trường MS + NAA (0,05 – 0,1 mg/L) + TDZ (0 – 1 mg/L) ở vật kính 20X (mỗi vạch tương ứng 0,048 mm)

Vào thời điểm 12 tuần sau khi nuôi cấy, trong môi trường MS bổ sung NAA (0,05-0,1 mg/L) + TDZ (0-1 mg/L), ở nồng độ thích hợp, cụm PLBs tiếp tục phát triển nên khối lượng lớn hơn. Trong giai đoạn này, các cụm PLBs có xu hướng phát triển chồi (Hình 3). Mặc dù vai trò chính của auxin là tạo rễ nhưng bên cạnh đó auxin có liên quan trong sự điều hòa của một số tiến trình sinh lý như là ưu thế chồi đỉnh, gây ra hiện tượng vươn dài tế bào (Pierik, 1987).

Ở nghiệm thức MS + NAA 0,05 mg/L hay MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L, cụm PLBs chậm phát triển và có hiện tượng hóa nâu, thậm chí có một số PLB chết theo thời gian nuôi cấy. Theo Debergh và Maene (1981), trong các nghiên cứu nhân chồi *in vitro*, nếu tăng nồng độ cytokinin sẽ nhận được nhiều chồi, tuy nhiên sẽ dẫn đến hiện

tượng cây sinh trưởng bất thường, lá nhỏ, cong queo, mất diệp lục tố,... Vì vậy, việc sử dụng cytokinin ở nồng độ cao sẽ hình thành chồi vô hiệu, thường không thể sử dụng tiếp cho những mục đích tiếp theo (tạo rễ, thuần dưỡng). Do đó, môi trường thích hợp cho sự nhân nhanh PLBs là MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 1 mg/L (nồng độ thích hợp giữa auxin và cytokinin, tránh việc sử dụng cytokinin ở nồng độ cao).

Kết quả này có thể khác so với kết quả của của Chung (2015), môi trường MS + 20 g sucrose + 100 ml nước dừa + 7 g agar + 0,5 mg BA trên 1 lít môi trường, là môi trường nhân nhanh PLBs tốt nhất đối với mẫu lan Hoàng thảo kèn. Ở cả hai kết quả, trong môi trường nuôi cấy chỉ sử dụng chất điều hòa sinh trưởng là cytokinin (TDZ, BA kết hợp với nước dừa tươi) nên PLBs có thể phát triển ở nồng độ cao. Nhưng khi kết hợp giữa auxin và cytokinin cần phải sử dụng ở nồng độ phù hợp và cân nhắc khi sử dụng nồng độ cao.

Nghiên cứu cũng cho thấy mối quan hệ tương tác giữa khối lượng, kích thước và số lượng protocorm. Kết quả thấy sự ảnh hưởng của nồng độ NAA và TDZ lên số lượng protocorm với sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% (Bảng 4).

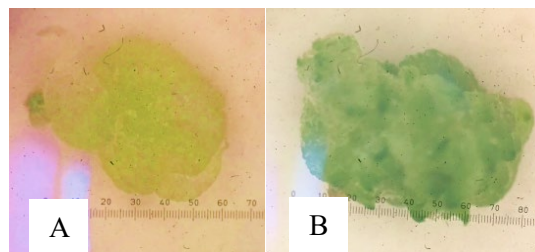
Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và TDZ lên số lượng PLBs vào thời điểm 12 TSKNC

Nghiệm thức (mg/L)	Số lượng PLBs
MS (Đối chứng)	103,3 ^{b-c}
MS + NAA 0,05	150,0 ^{a-d}
MS + NAA 0,05 + TDZ 0,5	133,3 ^{a-c}
MS + NAA 0,05 + TDZ 1	213,3 ^a
MS + NAA 0,05 + TDZ 1,5	183,3 ^{ab}
MS + NAA 0,05 + TDZ 2	63,3 ^{de}
MS + NAA 0,1	163,3 ^{abc}
MS + NAA 0,1 + TDZ 0,5	60,0 ^{de}
MS + NAA 0,1 + TDZ 1	83,3 ^{cde}
MS + NAA 0,1 + TDZ 1,5	106,7 ^{b-e}
MS + NAA 0,1 + TDZ 2	50,0 ^e
F	**
CV (%)	12,2

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

Nghiệm thức cho số lượng protocorm nhiều nhất là MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 1 mg/L, không có sự khác biệt với nghiệm thức MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ (0-1,5 mg/L), MS + NAA 0,1 mg/L. Nghiệm thức MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L cho số protocorm ít nhất, không khác biệt

với Đối chứng, MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 0,5 mg/L, MS + NAA 0,05 mg/L + TDZ 2 mg/L, MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ (0,5-1,5 mg/L). Tuy nhiên, từ 1 cụm PLBs ban đầu (10-12 PLB), sau 12 TSKNC, các nghiệm thức đều có sự gia tăng số lượng PLBs (trên 50 PLB).



Hình 4. Protocorm thời điểm 12 tuần sau khi nuôi cấy.

(A: MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L; B: MS + NAA 0,05-0,1 mg/L + TDZ 0-1 mg/L; ở vật kính 20X mỗi vạch tương ứng 0,048 mm)

Ở các nghiệm thức cho thấy, nghiệm thức có khối lượng thấp, số protocorm nhiều hoặc ngược lại, nghiệm thức có số protocorm ít, khối lượng cao (ngoại trừ nghiệm thức MS + NAA 0,1 mg/L + TDZ 2 mg/L cho số protocorm thấp, khối lượng thấp, là do các protocorm chậm phát triển), điều đó do kích thước của protocorm quyết định (Hình 4). Trong một cụm PLBs, kích thước của protocorm có thể cùng lớn hoặc cùng nhỏ hoặc đan xen nhau tùy vào sự phát triển của chúng.

3.2. Ảnh hưởng của than hoạt tính và nồng độ NAA lên sự tạo rễ của chồi lan Hoàng thảo kèn

Thông thường giai đoạn này môi trường tạo rễ thường phải bổ sung auxin để kích thích sự tạo rễ, tuy nhiên đôi khi một số mẫu cây thực vật có hàm lượng auxin nội sinh cao. Giai đoạn tạo rễ có thể kéo dài khoảng 2 đến 8 tuần hoặc nhiều hơn tùy vào mẫu cây thực vật. Theo Ấy và ctv. (2019) mục đích của giai đoạn này là tạo cây phát triển hoàn chỉnh và có khả năng thực hiện quang hợp và sống sót mà không cần cung cấp nguồn carbohydrate nhân tạo. Sự tạo thành rễ quyết định đến sự thành công của cả giai đoạn tạo rễ và thuần dưỡng. Ngoài sự hoàn chỉnh về thân, lá thì rễ cũng đóng vai trò quan trọng giúp cây thích nghi và sống sót khi chuyển sang điều kiện thuần dưỡng bằng cách có thể hấp thu nước, khoáng và các dinh dưỡng qua rễ, thân, lá.

Kết quả Bảng 5 và Hình 5 cho thấy sự ảnh hưởng của than hoạt tính và NAA lên sự hình

thành rễ mới của cây lan. Tất cả các mẫu chồi lan Hoàng thảo kèn đều tạo rễ (đạt 100%). Sau 6 TSKNC, sự hình thành rễ có sự khác biệt với mức ý nghĩa 1%. Nghiệm thức tạo nhiều rễ nhất là nghiệm thức MS + NAA 1 mg/L với 13 rễ mới được hình thành, khác biệt với nghiệm thức Đối chứng, MS + NAA 0,5 mg/L, MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA (0- 0,5 mg/L). Nghiệm thức tạo ít rễ nhất là nghiệm thức MS + Than hoạt tính 3 g/L với 7,67 rễ mới được tạo ra, khác biệt với nghiệm thức MS + NAA 1 mg/L và MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L.

Qua kết quả này cũng có thể thấy sự ảnh hưởng của than hoạt tính và nồng độ NAA lên chiều dài rễ. Sau 6 TSKNC, sự gia tăng chiều dài rễ có sự khác biệt về thống kê với ý nghĩa ở mức 1%. Nghiệm thức có chiều dài rễ dài nhất là nghiệm thức MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L với chiều dài 3,4 cm, khác biệt với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức cho chiều dài rễ thấp nhất là nghiệm thức MS + NAA 1 mg/L với chiều dài 0,8 cm, khác biệt với nghiệm thức MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA (0,5 – 2 mg/L).

Bảng 5. Ảnh hưởng của than hoạt tính và NAA lên số rễ và chiều dài rễ (cm) thời điểm 6 tuần sau khi nuôi cấy

Nghiệm thức	Chiều dài rễ Số rễ	
MS (Đối chứng)	1,3 ^{cd}	9,0 ^b
MS + NAA 0,5 mg/L	1,4 ^{cd}	8,3 ^b
MS + NAA 1 mg/L	0,8 ^d	13,0 ^a
MS + NAA 2 mg/L	0,9 ^d	11,1 ^{ab}
MS + Than hoạt tính 3 g/L	1,1 ^{cd}	7,7 ^b
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 0,5 mg/L	1,7 ^c	9,2 ^b
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L	3,4 ^a	12,8 ^a
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 2 mg/L	2,7 ^b	10,5 ^{ab}
F	**	**
CV (%)	23,15	17,16

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

Đồng thời, chiều cao cây và số lá cũng là 2 yếu tố quan trọng đánh giá sự sinh trưởng phát triển trong giai đoạn này, nói lên sự hoàn thiện của chồi in vitro. Cụ thể, ở Bảng 6 cho thấy sự ảnh hưởng của than hoạt tính và NAA lên sự gia tăng chiều cao cây. Sau 2 TSKNC, sự gia tăng chiều cao cây giữa các nghiệm thức có sự khác biệt về mặt thống kê với mức ý nghĩa 1%. Nghiệm thức cho chiều

cao cây cao nhất là MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/l, khác biệt với MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA (0-0,5 mg/L), chiều cao cây gia tăng là 0,67 cm. Nghiệm thức cho chiều cao cây thấp nhất là nghiệm thức MS + Than hoạt tính 3 g/L và khác biệt với MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA (1-2 mg/L), chiều cao cây gia tăng là 0,05 cm. Than hoạt tính có thể làm chậm quá trình nhân nhanh cây do hấp thụ một số chất điều hòa sinh trưởng và dinh dưỡng cần thiết, do đó trong nghiệm thức MS + Than hoạt tính 3 g/L, có thể than hoạt tính đã hấp thụ chất có trong chuỗi nên chiều cao cây chậm phát triển.

Sau 6 TSKNC, sự gia tăng chiều cao cây giữa các nghiệm thức có sự khác biệt về mặt thống kê với mức ý nghĩa 5%. Nghiệm thức cho chiều cao cây cao nhất là MS + NAA 2 mg/L và chỉ khác biệt với nghiệm thức MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 2 mg/L, chiều cao cây gia tăng là 1,03 cm. Nghiệm thức cho chiều cao cây thấp nhất là MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 2 mg/L, chỉ khác biệt với MS + NAA 2 mg/L, chiều cao cây giảm 0,09 cm.

Bảng 6. Ảnh hưởng của than hoạt tính và NAA lên chiều cao cây (cm) theo thời gian

Nghiệm thức	Tuần sau khi nuôi cấy	
	2	6
MS (Đối chứng)	3,2 ^{abc}	4,4 ^{ab}
MS + NAA 0,5 mg/L	3,4 ^{abc}	4,2 ^{ab}
MS + NAA 1 mg/L	3,2 ^{abc}	3,2 ^{ab}
MS + NAA 2 mg/L	3,4 ^{abc}	4,5 ^a
MS + Than hoạt tính 3 g/L	3,1 ^c	4,3 ^{ab}
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 0,5 mg/L	3,2 ^{bc}	4,3 ^{ab}
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L	3,7 ^a	3,9 ^{ab}
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 2 mg/L	3,6 ^{ab}	3,5 ^b
F	**	*
CV (%)	7,32	10,92

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; (**): khác biệt có ý nghĩa 1%; (*): khác biệt có ý nghĩa 5%.

Đối với số lá cho kết quả khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Bảng 7). Cụ thể, sau 2 TSKNC, nghiệm thức cho số lá nhiều nhất là nghiệm thức MS + Chuối 150 g/L + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 0,5 mg/L (5,73 lá), thấp nhất là MS + Chuối

150 g/L + NAA 0,5 mg/L (5,17 lá), không có sự khác biệt với các nghiệm thức khác.

Bảng 7. Ảnh hưởng của than hoạt tính và NAA lên số lá theo thời gian

Nghiệm thức	Tuần sau khi nuôi cấy	
	2	6
MS (Đối chứng)	5,4±0,2	5,2±0,2
MS + NAA 0,5 mg/L	5,2±0,1	5,0±0,2
MS + NAA 1 mg/L	5,4±0,2	4,5±0,3
MS + NAA 2 mg/L	5,5±0,3	4,3±0,3
MS + Than hoạt tính 3 g/L	5,4±0,2	4,7±0,3
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 0,5 mg/L	5,7±0,3	4,3±0,3
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L	5,5±0,3	4,7±0,3
MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 2 mg/L	5,6±0,2	5,2±0,2
F	ns	ns
CV (%)	9,4	11,6

ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê

Sau 6 TSKNC, nghiệm thức cho số lá trung bình cao nhất là MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 2 mg/L và Đối chứng, thấp nhất là MS + NAA 2 mg/L và MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 0,5 mg/L, tất cả các nghiệm thức không có sự khác biệt thống kê, tuy rằng tỷ lệ tạo rễ của các nghiệm thức ở giai đoạn này cũng cho kết quả 100% tạo rễ sau 6 tuần nuôi cấy và không có khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức.



Hình 5. Cây lan Hoàng thảo kèn in vitro vào thời điểm 6 tuần sau khi tạo rễ

(A: MS + Than hoạt tính 3 g/L; B: MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 0,5 mg/L; C: MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L; D: MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 2 mg/L; E: Đối chứng; F: MS + NAA 0,5 mg/L; G: MS + NAA 1 mg/L; H: MS + NAA 2 mg/L)

Từ các kết quả trên có thể nói, giai đoạn đầu (2 TSKNC), lan đang dần hấp thu chất dinh dưỡng nên chủ yếu phát triển về chiều cao, còn số lá tuy có sinh trưởng nhưng không đáng kể, có thể lá cũ rụng để thay lá mới nên số lá không có sự thay đổi so với ban đầu. Qua giai đoạn sau (6 TSKNC), khi

đã hấp thụ đủ auxin, chồi sẽ chuyển sang giai đoạn hình thành rễ (Ây và ctv., 2019). Vì thế chiều cao cây giữa đa số nghiệm thức không có sự khác biệt. Việc áp dụng auxin ngoại sinh có thể kích thích sự sinh trưởng rễ và sự phát triển sớm của rễ, trái lại sự vươn dài của rễ nói chung bị ức chế (Chon, 2005). Than hoạt tính cho vào môi trường nhằm mục đích làm tối môi trường từ đó kích thích sự hình thành và sinh trưởng của rễ, nhưng yếu tố chính quyết định đến sự phát triển của rễ là auxin.

Kết quả của những thí nghiệm trên giải thích tại sao ở một số nghiệm thức, đặc biệt ở nghiệm thức MS + NAA 2 mg/L, nếu số rễ nhiều sẽ cho chiều dài rễ ngắn hoặc ngược lại. Riêng ở nghiệm thức MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L cho số rễ con nhiều và chiều dài rễ cũng cao (Hình 6). Ở một số nghiệm thức khác (Đối chứng), khi môi trường không bổ sung auxin hoặc auxin ở nồng độ thấp, sự tạo rễ diễn ra chậm. Qua các nghiệm thức, chồi mới được hình thành và sinh trưởng tương tự nhau (2,19 ± 0,69 chồi). Vì vậy, môi trường thích hợp cho sự tạo rễ là MS + Than hoạt tính 3 g/L + NAA 1 mg/L. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Chang (2004), Chung (2015) hay Việt (2017), cho thấy trong giai đoạn tạo rễ, nồng độ NAA từ 0,5-1 mg/L là thích hợp.

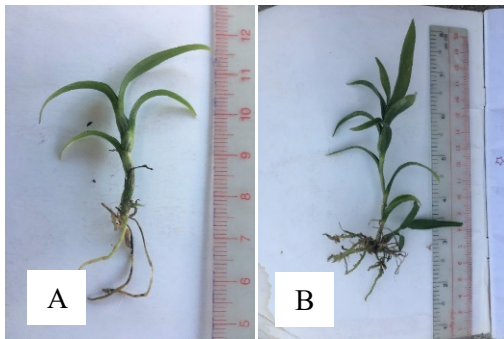
3.3. Khảo sát khả năng sống sót của cây lan Hoàng thảo kèn in vitro trong điều kiện thuần dưỡng

Sau 2 và 4 tuần thuần dưỡng, số cây còn sống ở hai nghiệm thức trùm nylon (lần lượt là 95,7% và 90,2%) và không trùm nylon (lần lượt là 80,3% và 76,7%) khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%. Các cây này đã bắt đầu hình thành rễ mới. Theo như kết quả của Chung (2015), rong biển khô (dón mềm) và than, cả hai giá thể này có ưu điểm giữ ẩm tốt và rất thích hợp cho hệ rễ lan phát triển nhưng dễ mọc rêu, không thoáng, úng nước trong mùa mưa nên khi chọn làm giá thể phải chú ý đến số lần tưới nước, nếu không cây bị thối vì quá ẩm. Do đó, ở giai đoạn thuần dưỡng này, có sự kết hợp giữa hai giá thể than và đón mềm (1:1) để than có thể hút ẩm, tạo độ thông thoáng cho cây. Qua đó, có thể thấy hai giá thể này thích hợp cho sự sống của Hoàng thảo kèn qua 4 tuần trong giai đoạn thuần dưỡng ở nhà lưới. Sau 6 tuần thuần dưỡng, cây lan Hoàng thảo kèn cây mô có thể sinh trưởng tốt trên giá thể thí nghiệm (Hình 6). Kết quả của nghiên cứu này cũng tương tự kết quả của Việt (2017), tỷ lệ số đạt 89,0% sau 5 tuần thuần dưỡng loại lan này trong điều kiện nhà lưới.

Bảng 8. Tỷ lệ sống của lan Hoàng thảo kèn theo thời gian thuần dưỡng trong nhà lưới

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống	
	2 tuần thuần dưỡng	4 tuần thuần dưỡng
Trùm nylon	95,7 ^a	90,2 ^a
Không trùm nylon	80,3 ^b	76,7 ^b
	*	*
CV (%)	9,4	9,6

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử t-test; (*): khác biệt có ý nghĩa 5%.



Hình 6. Hình thái cây lan trong giai đoạn thuần dưỡng: sau 4 tuần (A) và 6 tuần (B)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ây, N. V., Bé, L. V. & Mên, T. T. (2019). *Nuôi cấy mô thực vật: Nguyên lý và thực hành*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.

Chang, J., Ding, X. Y., Bao, S. L., Liu, D. Y., He, J., Tang, F., & Ding, B. Z. (2004). Studies on tissue culture of *Dendrobium lituiflorum*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 29(4), 313-317.

Chon, N. M. (2005). *Giáo trình chất điều hòa sinh trưởng thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.

Chowdhery, H. J. (2001). Orchid diversity in north-east India. *J. Orchid Soc. India*, 15(1-2), 1-17.

Chung, B. D (2015). *Nghiên cứu nhân giống in vitro lan Hoàng thảo kèn (Dendrobium lituiflorum)* (Luận văn thạc sĩ). Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Debergh, P. C., & Maene, L. J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia horticultrae*, 14(4), 335-345. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(81\)90047-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(81)90047-9)

Khosravi, A. R., Kadir, M. A., Kazemin, S. B., Zaman, F. Q., & De Silva, A. E. (2008).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong giai đoạn nhân nhanh PLBs, môi trường thích hợp cho sự tăng sinh khối của cụm PLBs là môi trường MS bổ sung TDZ nồng độ từ 0,5–1,5 mg/L (5,01–6,11g/PLBs), kết hợp với NAA nồng độ 0,05 mg/L so với nghiệm thức không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (Đôi chứng, 2,11 g/PLBs) sau 12 tuần nuôi cấy.

Ở giai đoạn tạo rễ, môi trường tốt nhất cho sự tạo rễ chồi lan Hoàng thảo kèn là môi trường MS bổ sung chuối chín 150 g/L, than hoạt tính 3 g/L và NAA 1 mg/L (số rễ từ 12,8 rễ/cây sau 6 tuần nuôi cấy).

Giá thể than và dớn mềm (1:1) cho thấy có hiệu quả cao (tỷ lệ cây sống là 90,2% sau 4 tuần thuần dưỡng). Cây lan Hoàng thảo kèn sinh trưởng và phát triển tốt trong giai đoạn thuần dưỡng ở vườn ươm.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục theo dõi sự sinh trưởng, kích thước, độ bền hoa và phẩm chất hoa của cây lan Hoàng thảo kèn nhân giống bằng nuôi cấy mô so với cây nhân bằng phương pháp truyền thống.

Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv. Serdang Beauty. *African Journal of Biotechnology*, 7(22).

Lộc, P. V., & Nguyễn, N. P. H. (2020). Ảnh hưởng của một số yếu tố nuôi cấy lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum* Lindl.) trong điều kiện thoáng khí. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 56, 67-71. DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.113

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497

Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. In *International Symposium on Propagation of Ornamental Plants 226*, 25-40. DOI: 10.17660/ActaHortic.1988.226.1

Toàn, B. (2006). *Kỹ thuật cơ bản trồng và chăm sóc hoa lan*. Nhà xuất bản Đà Nẵng.

Van Staden, J. & Stewart, J. (1975). Cytokinins in banana fruit. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 76(3), 280-283. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(75\)80024-9](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(75)80024-9)

Vân, Đ. T. & Nga, Đ. T. T. (2008). *Giáo trình hoa lan*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Việt, N. V. (2017). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống lan Hoàng thảo kèn

(*Dendrobium lituiflorum* Lindley). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, (4), 039-045.

Vũ, V. V. (1999). Sinh lí thực vật ứng dụng. *Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội*.