

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT VI NHÂN GIỐNG LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus* sp.)

Nguyễn Thị Lệ Hà¹, Phạm Thị Mận¹, Cao Minh Thủy Nguyễn¹, Phạm Thụy Nhật Truyền¹,
Nguyễn Xuân Cường², Nguyễn Văn Thiết²

¹Trung tâm Ứng dụng Khoa học Kỹ thuật Lâm nghiệp Nam Bộ

²Viện NCKH Lâm nghiệp Nam Bộ

Từ khóa: Vi nhân,
Lan kim tuyến, BA, NAA,
sự nảy mầm

TÓM TẮT

Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại và nồng độ hóa chất và chất điều hòa sinh trưởng tới khử trùng mẫu, nhân chồi, kéo dài chồi và ra rễ cho 3 loài Lan kim tuyến cho thấy: mẫu chồi được khử trùng đạt kết quả tốt nhất ở nồng độ Javel 30% trong thời gian 20 phút cho tỷ lệ mẫu sống sạch là 50%. Mẫu cấy sau đó được chuyển sang môi trường MS có bổ sung BA để cảm ứng tạo chồi. Tỷ lệ nhân chồi cao nhất trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA với số chồi và chiều cao chồi tương ứng là 23,9 chồi/mẫu, 1,1 cm/chồi. Môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BA và 0,3 mg/l NAA cho kết quả vươn chồi tốt nhất với chiều cao trung bình chồi là 3,9 cm/chồi. Chồi được ra rễ trong môi trường MS có bổ sung 1 mg/l IBA chiều dài trung bình là 4,4 rễ/cây và 2,8 cm/chồi.

Micropropagation of *Anoectochilus* sp. by tissue culture technique

Keywords:
Micropropagation,
Anoectochilus sp., BA,
NAA, shooting

The effects of different types and concentrations of mechanical and hormones on shoot sterilization, shoot multiplication, shoot elongation and rooting were studied in tissue culture of *Anoectochilus formosanus*, *Anoectochilus roxburgii* and *Anoectochilus setaceus*. Our results showed that the process was started with explant sterilization using commercial Javel solution (NaClO) at 30% and soaked segments of axillary shoots in 20 minutes, with 50% of shoot proliferation. The explants were then transferred to MS medium with adding different concentrations of growth regulation substances BA. The highest shoot multiplication were obtained on MS medium containing BA (1 mg/l) with maximum 23.9 shoots per explant and 1.1 cm per shoot. The best shoot elongation response was observed on MS supplemented with 0.3 mg/l BA and 0.3 mg/l NAA with 3.9 cm per shoot in height. Elongated shoots when maintained on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA produced optimal rooting with 4.4 roots per shoot and 2.8cm per root.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan kim tuyến là một loại thảo dược có giá trị cao trong y học. Toàn thân cây có chứa hoạt chất Kinsenoside có khả năng bảo vệ gan. Ngoài ra, nó còn chứa rất nhiều hợp chất glycoside và flavonoids khác có khả năng chữa các bệnh thời đại như tiểu đường, cao huyết áp, viêm thận, ung thư... (Hsun - Lang Fang *et al.*, 2008; Xiao - Ming Du *et al.*, 2003). Bên cạnh những giá trị y học nó còn có giá trị to lớn về kinh tế. Hiện nay, giá Lan kim tuyến trên thị trường là hơn 2 triệu đồng/kg. Do có giá thành cao nên ngoài tự nhiên cây đã bị khai thác quá mức dẫn đến cạn kiệt. Năm 2007, trong Nghị định số 32/2006/CP và Sách Đỏ Việt Nam, Lan kim tuyến đã được xếp vào nhóm IA, là nhóm thực vật rừng đang nguy cấp EN và là nhóm thực vật nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại. Vì vậy, việc nghiên cứu phương pháp nhân giống và gây trồng Lan kim tuyến trong môi trường nhân tạo là rất cần thiết, góp phần bảo tồn, khai thác và phát triển loài cây cho dược liệu quý này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: 3 loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus formosanus*, *Anoectochilus roxburgii* và *Anoectochilus setaceus*).
- Môi trường dinh dưỡng cơ bản được sử dụng cho nghiên cứu là môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có cải tiến.
- Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng là BA (6 - Benzyl adenine), NAA (Naphthalene acetic acid), tùy theo yêu cầu của thí nghiệm.
- Các thành phần khác: Đường sucrose (30g/l), Agar (8 g/l).
- Môi trường được điều chỉnh về pH = 5,8 (bằng NaOH 1N hay HCl 1N) trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 1atm (121°C) trong 30 phút.

- Điều kiện nuôi cấy: Các mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, ánh sáng 2500 lux và thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xử lý mẫu

Những đoạn thân khỏe mạnh có mang chồi ngủ của cây Lan kim tuyến ở Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Lâm nghiệp Nam Bộ - Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Bộ được sử dụng làm mẫu cấy. Mẫu cấy được cắt dài khoảng 2 - 3cm, cắt bỏ lá non, rửa dưới vòi nước 30 phút, rửa trong dung dịch nước xà phòng (hiệu Viso) trong 15 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước máy.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thí nghiệm đơn nhân tố và bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên như sau: ở thí nghiệm 1 gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức cấy 6 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu và lặp lại 3 lần, tổng số mẫu phân tích 90 mẫu; Thí nghiệm 2 gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được cấy 1 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu, được lặp lại 3 lần, tổng số 36 mẫu; Thí nghiệm 3 gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được cấy 1 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu, được lặp lại 3 lần, tổng số 36 mẫu; Thí nghiệm 4 gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được cấy 1 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu, được lặp lại 3 lần, tổng số 36 mẫu. Sử dụng phần mềm Excel 2010 để tổng hợp các số liệu thô thu thập từ các nghiệm thức và phần mềm Statgraphics Plus 3.0 để xử lý, phân tích dữ liệu.

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ hóa chất và thời gian xử lý tới tỷ lệ sống của mẫu chồi

Sau khi được xử lý vô trùng, mẫu cấy được tráng bằng nước cất vô trùng 3 lần, lắc trong cồn 70° trong 1 phút, sau đó khử trùng bằng các nồng độ Javel (20%, 30%, 40%) (hiệu Mỹ Hào) ở các mức thời gian (10 phút, 20 phút). Sau đó,

các đoạn chồi có chiều dài 1 - 1,5cm được cấy vào các bình chứa môi trường thí nghiệm.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng BA lên sự nhân chồi của mẫu nuôi cấy

Các chồi Lan kim tuyến *in vitro* tạo được ở thí nghiệm 1 sẽ được chuyển sang môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA ở các nồng độ khác nhau (0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l) và một công thức đối chứng (không bổ sung BA).

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của sự kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng NAA và BA lên sự kéo dài chồi mẫu nuôi cấy.

Môi trường được sử dụng là môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng NAA (0 mg/l; 0,1 mg/l; 0,3 mg/l; 0,5mg/l) và BA (0,3 mg/l) (Phê et al., 2010).

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng NAA lên sự hình thành rễ của mẫu nuôi cấy.

Môi trường được sử dụng là môi trường MS có bổ sung NAA ở các nồng độ (0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l) và một công thức đối chứng (không bổ sung NAA).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu chồi

Kết quả bảng 1 cho thấy: Sau 3 tuần nuôi cấy, khả năng khử trùng bằng Javel với các khoảng thời gian (10 phút, 20 phút) và nồng độ khử trùng (20%, 30%, 40%) cho hiệu quả khử trùng là không giống nhau. Khi tăng nồng độ Javel từ 20 - 30% khả năng diệt trùng cũng tăng theo, tỷ lệ mẫu sống tăng từ 11% - 50%, đồng thời tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 89% xuống 50% và không có mẫu nào bị chết (Bảng 1). Trong đó, tỷ lệ mẫu sống cao nhất ở NT3 (50%) và thấp nhất ở NT1 (11%), đồng thời tỷ lệ mẫu nhiễm khá lớn ở NT1 (89%) và NT2 (83%). Chứng tỏ, khi dùng Javel ở nồng độ và thời gian là (20 - 20 phút, 30 - 10 phút) thì chưa đủ để tạo ra mẫu cấy vô trùng. Nhưng khi tăng nồng độ lên đến 40% thì nhận thấy tỷ lệ mẫu nhiễm giảm chỉ còn 22% (NT5), nhưng tỷ lệ mẫu chết tăng đến 67% (NT5) do tác dụng gây độc của Javel. Như vậy, thời gian khử trùng thích hợp nhất đối với mẫu cấy Lan kim tuyến là 20 phút khi dùng Javel 30%, với tỷ lệ mẫu sống sót là 50% (hình 1).

Bảng 1. Khảo sát thời gian và nồng độ khử trùng

Thí nghiệm	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Kết quả thí nghiệm		
			Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
NT1	20	20	11 ^a	89 ^e	0 ^a
NT2	30	10	17 ^b	83 ^d	0 ^a
NT3	30	20	50 ^d	50 ^c	0 ^a
NT4	40	10	22 ^c	39 ^b	39 ^b
NT5	40	20	11 ^a	22 ^a	67 ^c

* Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 5%.



Hình 1. Mẫu chồi Lan kim tuyến sau 3 tuần khử trùng

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng BA lên sự nhân chồi của Lan kim tuyến *in vitro*

Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng chất thuộc nhóm cytokinin là BA với các nồng độ

khác nhau (0 mg/l, 0, 5mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l), đây cũng là mức giới hạn mà nghiên cứu trước của Kiet và Hahn (2004) công bố. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2, hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA đến sự nhân chồi Lan kim tuyến

Nghiệm thức	BA (mg/l)	Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm chồi
NT1	0	1,7 ^a	0,6 ^a	Chồi xanh nhạt, lá khỏe
NT2	0,5	6,9 ^b	0,67 ^{ab}	Chồi xanh nhạt, lá khỏe
NT3	1	23,9 ^d	1,1 ^c	Chồi xanh đậm, lá rất khỏe
NT4	1,5	13,3 ^c	0,72 ^b	Chồi xanh nhạt, lá tương đối khỏe

* Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 5%

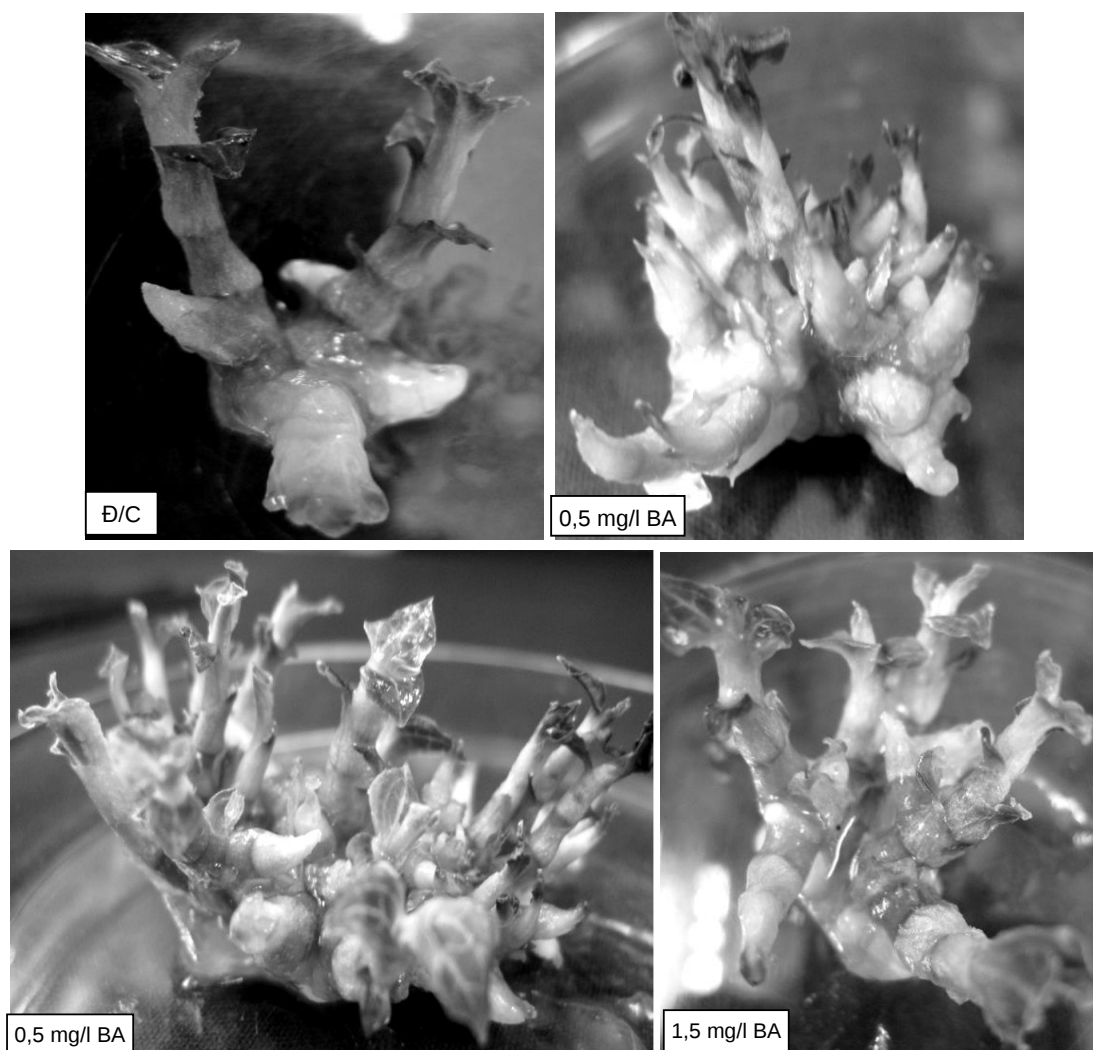
Từ số liệu ở bảng 2 cho thấy, sau 8 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức nuôi cấy, trên môi trường MS bổ sung nồng độ BA từ 0 - 1,5 mg/l có số chồi và chiều cao chồi hình thành là không giống nhau ở các nghiệm thức và có ý nghĩa thống kê 5% so với nghiệm thức đối chứng (NT1). Như vậy, BA có ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự nhân chồi của mẫu cây. Theo George và đồng tác giả (2008) BA là hiệu quả nhất trong quá trình nhân chồi.

Khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy nồng độ BA từ 0 - 1 mg/l kết quả cho thấy số chồi và chiều cao chồi từ NT1, là nghiệm thức không được bổ sung BA, đạt 1,7 chồi/mẫu; 0,6 cm/chồi. Số chồi và chiều cao chồi tăng dần đến NT2 (0,5 mg/l BA), với 6,9 chồi/mẫu; 0,67 cm/chồi và đạt kết quả cao nhất ở NT3 (1 mg/l BA), với 23,9 chồi/mẫu; 1,1 cm/chồi. Ngoài ra, chất lượng chồi ở nghiệm thức NT3 là tốt nhất, có màu xanh đậm và lá rất khỏe. Tuy nhiên, khi

tiếp tục tăng nồng độ BA cao hơn nữa (1,5 mg/l) thì số lượng chồi giảm (13,3 chồi/mẫu) đồng thời chiều cao chồi cũng giảm (0,72 cm). Với nồng độ cao, các chồi thu được có màu xanh nhạt và lá tương đối khỏe, nồng độ BA cao gây ức chế và làm giảm khả năng phát sinh chồi của mẫu cấy (Kiet và Hahn, 2004).

Cũng từ bảng kết quả 2 cho thấy nghiệm thức NT3 có sự khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại về mặt thống kê ($p < 0,05$). Như vậy nghiệm thức NT3 (1mg/l BA) là sự lựa chọn tốt nhất để nhân nhanh chồi Lan kim tuyến tạo số lượng mẫu lớn và chất lượng chồi tốt nhất. Kết quả này là phù hợp với kết quả

của Kiet và Hahn (2004) khi chồi của Lan kim tuyến được nuôi trong môi trường có bổ sung 1mg/l BA. Qua kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng BA này, chứng tỏ rằng nồng độ BA thấp có thể làm chồi sinh trưởng yếu và làm giảm sự tăng sinh số chồi bên. Khi ở một nồng độ thích hợp, BA kích thích chồi phát sinh đồng đều, hình thái phát triển bình thường, không có hiện tượng biến dị. Tuy nhiên khi nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng BA vượt quá ngưỡng tối ưu thì lại ức chế quá trình phát sinh của chồi, làm giảm số lượng cũng như chất lượng chồi hình thành (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA ở các nồng độ khác nhau đến số chồi và chiều dài chồi Lan kim tuyến sau 8 tuần cấy

3.3. Ảnh hưởng của sự kết hợp nồng độ chất điều hòa sinh trưởng NAA và BA lên sự kéo dài chồi Lan kim tuyến in vitro

Ở thí nghiệm này, cụm chồi được hình thành từ sự nhân chồi ở thí nghiệm 2 được tách thành các chồi riêng rẽ. Chọn các chồi mập,

khỏe, lá xanh khỏe, để tiến hành kéo dài chồi, giúp chồi vươn cao, tạo điều kiện thuận lợi để tiến hành ra rễ ở thí nghiệm tiếp theo. Các chồi này được đưa vào môi trường MS có bổ sung NAA kết hợp BA để nuôi cấy. Sau 3 tuần, kết quả được ghi nhận ở bảng 3.

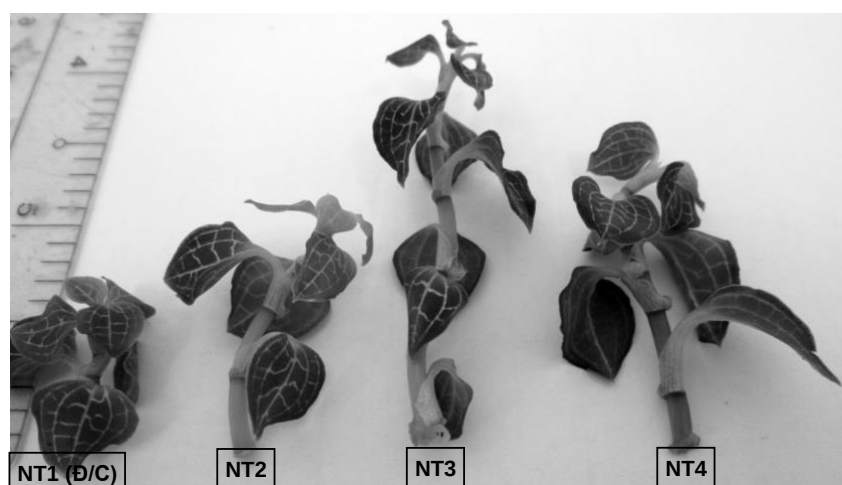
Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA đến sự kéo dài chồi Lan kim tuyến

Nghiệm thức	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Chiều cao vươn chồi (cm)	Đặc điểm chồi
NT1	0	0	0,7 ^a	Đốt thân ngắn, lá xanh nhạt
NT2	0,3	0,1	2,2 ^b	Đốt thân vừa, lá xanh nhạt
NT3		0,3	3,9 ^d	Đốt thân dài, lá xanh đậm
NT4		0,5	3,1 ^c	Đốt thân vừa, lá xanh đậm

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 5%.

Từ số liệu ở bảng 3 cho thấy sau 3 tuần nuôi cấy các nghiệm thức có sự kết hợp giữa nồng độ BA và NAA có khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng (NT1). Chiều cao chồi tăng dần theo nồng độ BA + NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy, chiều cao chồi từ NT1, là nghiệm thức đối chứng (0 mg/l BA + 0 mg/l NAA), chỉ đạt 0,7 cm/chồi, đồng thời chất lượng chồi kém, đốt thân ngắn, lá xanh nhạt. Chiều cao và chất lượng chồi tăng dần từ nghiệm thức NT2 (0,3 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA) với giá trị trung bình đạt 2,2 cm/chồi tới nghiệm thức NT3 (0,3 mg/l BA + 0,3mg/l

NAA) với giá trị trung bình đạt 3,9 cm/chồi. Nhưng khi tăng nồng độ NAA lên và cố định nồng độ BA vẫn ở mức 0,3 mg/l thì lại làm giảm sự kéo dài chồi chỉ đạt 3,1 cm/chồi ở NT4 (0,3 mg/l + 0,5 mg/l NAA), chồi chậm phát triển, đốt thân vừa. Mặt khác các chồi nuôi cấy ở cả 2 nghiệm thức NT2 và NT3 đều phát triển tốt, số đốt dài, lá có màu xanh đậm. Như vậy, kết quả cho thấy rõ ràng rằng sự kết hợp giữa 0,3 mg/l BA và 0,3 mg/l NAA là một sự lựa chọn tốt cho sự kéo dài chồi Lan kim tuyến.



Hình 3. Ảnh hưởng của sự kết hợp NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự kéo dài chồi Lan kim tuyến sau 3 tuần.

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng NAA lên sự hình thành rễ Lan kim tuyến *in vitro*

Từ số liệu ở bảng 4 cho thấy sau 5 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức của mẫu chồi nuôi cấy

trên môi trường MS bổ sung nồng độ NAA từ 0 - 1,5 mg/l có số rễ và chiều cao rễ hình thành là không giống nhau ở các nghiệm thức và có ý nghĩa thống kê 5% so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đến sự hình thành rễ của cây Lan kim tuyến *in vitro*

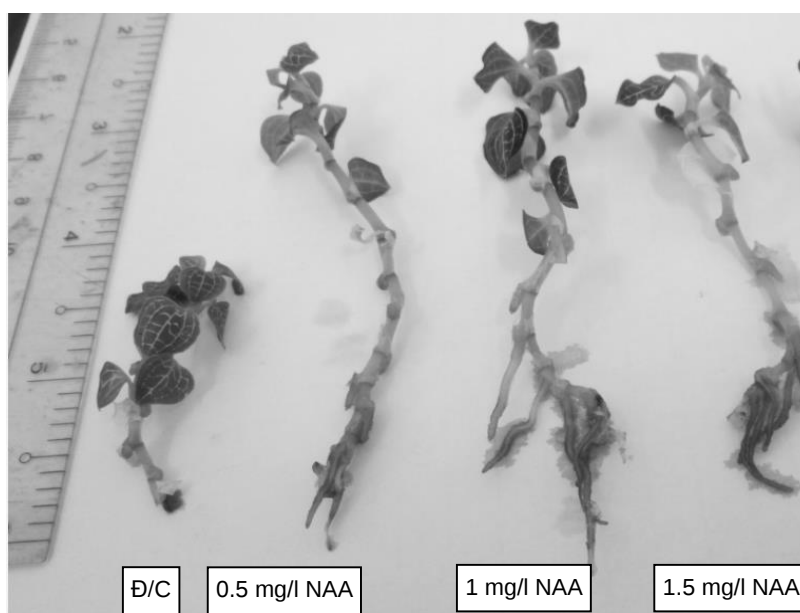
Nghiệm thức	NAA (mg/l)	Số rễ (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm/rễ)
NT1	0	0 ^a	0 ^a
NT2	0,5	1,7 ^b	0,3 ^b
NT3	1	4,4 ^d	2,8 ^d
NT4	1,5	3,6 ^c	2,1 ^c

* Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 5%.

Ở NT1, môi trường không bổ sung nồng độ NAA, rễ không được hình thành, trong khi ở các nghiệm thức còn lại (môi trường có bổ sung NAA) thì chồi Lan kim tuyến đều ra rễ với tỷ lệ 100%. Điều này có thể khẳng định NAA là chất quyết định sự hình thành và phát triển rễ của mẫu Lan kim tuyến *in vitro*.

Sau 5 tuần nuôi cấy trong môi trường có bổ sung nồng độ NAA từ 0,5 mg/l - 1 mg/l cho số rễ đạt từ 1,7 - 4,4 rễ/cây và chiều dài rễ đạt từ

0,3 - 2,8 cm/rễ. Trong đó, môi trường có bổ sung 1mg/l NAA (NT3) cho chất lượng rễ cao nhất, sau 4 tuần số rễ đạt 4,4 rễ/cây và chiều dài rễ là 2,8 cm/rễ, cây phát triển tốt, lá xanh, thân mập và có sự khác biệt so với các nghiệm thức còn lại (hình 3). Kết quả là phù hợp với kết quả của Nguyễn Quang Thạch (2012) khi nuôi cấy Lan kim tuyến trong môi trường Ms bổ sung 1 mg/l NAA, với số rễ đạt 4,21 rễ/cây.



Hình 4. Ảnh hưởng của sự kết hợp NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự kéo dài chồi Lan kim tuyến sau 3 tuần

Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ NAA cao hơn nữa (1,5 mg/l) thì số rễ giảm (3,6 rễ/cây) đồng thời chiều dài rễ cũng giảm (2,1 cm/rễ). Chứng tỏ việc sử dụng NAA nồng độ cao gây ức chế hình thành rễ cũng như sự kéo dài rễ.

Từ bảng kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của NAA đến sự hình thành rễ của cây Lan kim tuyến có thể khẳng định chồi Lan kim tuyến được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 1 mg/l NAA (cho kết quả tốt nhất cả về số rễ và chiều dài rễ và khả năng hình thành và kéo dài rễ của chồi Lan kim tuyến phụ thuộc rất nhiều vào sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

V. KẾT LUẬN

Kỹ thuật nhân giống Lan kim tuyến từ đoạn thân mang chồi ngủ khử trùng với tỷ lệ mẫu sống và không nhiễm đạt 50% ở nồng độ 30% trong thời gian 20 phút.

Môi trường phù hợp để nhân chồi là môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA.

Môi trường thích hợp để kéo dài chồi là môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BA + 0,3mg/l NAA.

Số rễ hình thành nhiều nhất và chiều dài rễ dài nhất là ở nghiệm thức sử dụng môi trường MS có bổ sung 1mg/l NAA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ khoa học công nghệ, 2007. Sách Đỏ Việt Nam (Phần thực vật). Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
2. Hsun - Lang Fang, Jin - Bin Wu, Wei - Lii Lin, Hui - Ya Ho, Wen - Chuan Lin, 2008. Further studies on the hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosamus*. *Phytotherapy research* 22:3, 291 - 296. Online publication date: 1 - Mar - 2008.
3. Nguyễn Tiến Bân, 2005. Danh lục các loài thực vật Việt Nam. Tập III. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
4. Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miên, 2012. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* bảo tồn nguồn dược liệu quý. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 2012, Tập 10, số 4: 597 - 603.
5. Phạm Hoàng Hộ, 2000. Cây cỏ Việt Nam. Quyển 3, Nhà xuất bản Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh.
6. Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm và Nguyễn Trung Thành, 2010. Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* loài Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 26 (4): 248 - 253.
7. Van Kiet Nguyen, 2004. Effect of Environmental Conditions on *in vitro* and *ex vitro* growth of Jewel Orchid *Anoectochilus formosanus* Hayata, Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Agriculture, The Graduate School of Chungbuk National University.
8. Xiao - Ming Du, Ning - Yi Sun, Jun Hayashi, Yang Chen, Minoru Sugiura, Yukihiro Shoyama, 2003. Hepatoprotective and antihyperliposis activities of *in vitro* cultured *Anoectochilus formosanus*. *Phytotherapy research*. Volume 17, Issue 1January, Pages 30 - 33.

Người thẩm định: TS. Phí Hồng Hải