

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG IN VITRO ĐỊA LAN HƯƠNG CÁT CÁT (*CYMBIDIUM GOLDEN ELF*)

PHẠM ĐỊNH DŨNG*, KHA NỮ TÚ UYÊN**,
NGUYỄN THỊ HỒNG TÚ**, VƯƠNG THỊ HỒNG LOAN*, NGUYỄN THỊ ĐIỆP*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chồi non có chiều dài 7-8cm được sử dụng làm vật liệu khởi đầu. Sau khi khử trùng, mẫu được nuôi trên môi trường MS có bổ sung BA 1,5mg/l để tạo chồi ngủ. Khi chồi ngủ đạt kích thước 2cm, tách lấy đỉnh chồi để bố trí thí nghiệm. Kết quả cho thấy, tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs cao nhất khi nuôi cấy đỉnh chồi trên môi trường MS bổ sung BA 2,5 mg/l và NAA 0,2 mg/l. Môi trường MS có bổ sung BA 1mg/l cho tỉ lệ PLBs tái sinh chồi cao. Môi trường khoáng KC bổ sung 20g/l chuối, 1 g/l than hoạt tính thích hợp cho sự phát triển của cây. Khi cây đạt chiều cao 4 – 5cm, có 3 – 4 rễ được chuyển ra vườn ươm, cây thích ứng với môi trường tự nhiên tốt và có tỉ lệ sống 100% sau 30 ngày theo dõi.

Từ khóa: *Cymbidium*, protocorm-like-bodies (PLBs), nhân giống in vitro.

ABSTRACT

A study of the micropropagation of Cymbidium Golden Elf

Seven to eight cm long young shoots from mother plants were used as explants in this study. After being surface sterilization, explants were cultured on MS medium containing 1.5 mg/l BA to help buds emerge. When dormant buds reached 2 cm, their tops were cut and used as experiment materials. The results showed that on MS medium containing BA 2.5 mg/l and NAA 0.2 mg/l, the percentage of PLBs regeneration from the top of buds was the highest. Suitable medium for shoot regeneration from PLBs was MS medium supplemented BA 1 mg/l. KC medium supplemented 20 g/l banana, 1 g/l activated carbon was suitable for plant growth and development. When plants reached 4-5 cm height, 3-4 roots, survival rate of plantlets in nursery garden was 100 %.

Keywords: *Cymbidium*, protocorm-like-bodies (PLBs), in vitro micropropagation.

1. Mở đầu

Cymbidium là một trong những loài lan được mệnh danh là “Nữ hoàng của các loài lan”, với những đặc điểm nổi bật về giá trị mỹ thuật gắn liền với đời sống của con người Á Đông. Với đặc điểm: hoa to, màu sắc đẹp, cành hoa dài, siêng ra hoa và lâu tàn, *Cymbidium* là giống

hoa lan cắt cành có giá trị rất cao và luôn được ưa chuộng trên thị trường trong nước và thế giới. Tuy nhiên, do đặc tính sinh lí của loài hoa này là chỉ thích hợp với những nơi có khí hậu mát mẻ nên ở nước ta *Cymbidium* được trồng chủ yếu ở Đà Lạt, Đức Trọng, Lâm Đồng.

Tại Thành phố Hồ Chí Minh, nghề

* ThS, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

** CN, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

trồng hoa lan, cây cảnh được định hướng sẽ là ngành kinh tế quan trọng và sẽ xây dựng quy hoạch tổng thể phát triển các làng, phố hoa như những làng, phố văn hóa, sinh thái để thu hút du khách. Do vậy, việc tìm kiếm những giống địa lan có thể khắc phục được nhược điểm về giới hạn địa lí nhằm mở rộng diện tích trồng loài hoa này ở các vùng khí hậu nóng ẩm hơn là hết sức cần thiết.

Địa lan Hương cát cát (*Cymbidium Golden Elf*) là loài lai giữa *Cymbidium ensifolium* và *Cymbidium Enid Haupt*, là địa lan chịu được khí hậu nhiệt đới, hoa có màu vàng và hương thơm nhẹ. Hương cát cát có thể sống trong nhiệt độ ẩm áp hơn các loại địa lan khác. Hiện nay, giống địa lan Hương cát cát đã được một số hộ nông dân trồng thử nghiệm và cho ra hoa ở huyện Củ Chi thuộc TP Hồ Chí Minh và kết quả rất khả quan, phát hoa dài 60 – 70cm có từ 7 - 8 hoa, đường kính hoa khoảng 7 - 8cm. Do đó, việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm nhân nhanh một số lượng lớn cây giống trong thời gian ngắn, đáp ứng thị trường tiêu thụ là rất cần thiết

2. Vật liệu – phương pháp

2.1. Vật liệu

Vật liệu ban đầu sử dụng trong thí nghiệm là chồi non có chiều dài 7 – 8cm, giống được nhập từ Thái Lan và đang được trồng tại Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh. Những chồi này được lấy từ những cây khỏe mạnh, cho hoa đẹp.

2.2. Phương pháp

Pha môi trường nuôi cấy

Môi trường nền sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường khoáng MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30g/l sucrose, 8g/l agar, 150ml/l nước dừa, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau tùy vào mục đích thí nghiệm. Các môi trường được điều chỉnh pH đến 5,8 (bằng KOH 1M hoặc HCl 1M) trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1atm trong 20 phút.

Môi trường tái sinh PLBs từ đỉnh chồi

Sử dụng môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng N⁶-benzyladenin (BA) (1; 1,5; 2; 2,5; 3 mg/l) và α -naphthalene acetic acid (NAA) (0,2; 0,5 mg/l).

Môi trường tái sinh chồi từ PLBs

Sử dụng môi trường MS có bổ sung BA (0; 0,5; 1; 1,5; 2mg/l).

Môi trường tăng trưởng chồi

Sử dụng môi trường MS, môi trường 1/2 khoáng đa lượng, môi trường khoáng Knudson, 1946 (KC), môi trường khoáng Vacin, Went 1949 (VW).

Giá thể

Giá thể được sử dụng để trồng cây con *in vitro* trong giai đoạn chuyển ra vườn ươm theo tỉ lệ mụn dừa: tro trấu = 1:1.

Phương pháp khử trùng mẫu

Thao tác ngoài tủ cấy: Chồi non Hương cát cát được rửa sạch lớp đất bám trên bề mặt, tách bỏ 1-2 phác thể lá bên ngoài, sau đó lắ với dung dịch xà phòng loãng trong 15 phút, rửa lại dưới vòi nước 30 phút.

Thao tác trong tủ cấy vô trùng: Sử

dụng nước hấp vô trùng rửa mẫu 3 - 4 lần, sau đó lắc mẫu với cồn 70 độ trong 1 - 2 phút, rửa sạch mẫu với nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Khử trùng bằng dung dịch Javel Mỹ Hảo thương mại (5% NaClO) với tỉ lệ Javel: nước là 2:1 có bổ sung 2 - 3 giọt Tween 20, sau 30 phút khử trùng tiến hành rửa sạch lại với nước hấp vô trùng 3 - 4 lần. Tách bớt bao lá, lắc lại với dung dịch Javel: nước tỉ lệ 1:5 có bổ sung 2 - 3 giọt Tween 20, sau 2 phút tiến hành rửa mẫu bằng nước hấp vô trùng 3 - 4 lần. Sau đó tách bỏ hoàn toàn bao lá và phần mẫu bị Javel làm trắng và cấy vào môi trường MS bổ sung 30g/l sucrose, 8g/l agar và 1,5 mg/l BA.

Sau 4 tuần nuôi cấy, loại bỏ mẫu nhiễm. Mẫu sạch được nuôi cấy để phát triển các chồi ngủ. Khi chồi bên đạt kích thước 1,5cm tiến hành tách bỏ hết bao lá, sau đó tách phần đỉnh chồi có kích thước khoảng 1mm để bố trí thí nghiệm.

Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện:

Điều kiện *in vitro*: Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ phòng sáng $26 \pm 2^\circ\text{C}$; độ ẩm trung bình $\leq 60\%$.

Điều kiện *ex vitro*: Ánh sáng tự nhiên 20 - 25%, nhiệt độ 24 - 29°C, độ ẩm trung bình 70 - 80%.

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần trong cùng điều kiện. Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System

(SPSS) phiên bản 16.0.

3. Kết quả thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên khả năng tái sinh PLBs từ đỉnh chồi

Sự thành công trong nuôi cấy đỉnh chồi thay đổi tùy theo mẫu cấy sử dụng và việc áp dụng kích thích tố riêng biệt. Kích thước đỉnh chồi nhỏ (0,1mm - 0,5mm) thường khó cắt và cho tỉ lệ sống thấp. Những kích thước đỉnh chồi từ 0,5mm - 2mm thì thông dụng hơn và thích hợp trong việc nhân giống (Hartmann & Kester, 1983 [8]).

Có nhiều nghiên cứu cho thấy ảnh hưởng của BA và NAA đến sự tái sinh PLBs địa lan (Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2006) [1], Phan Xuân Huyền và cộng sự (2004) [2], Akatari và cộng sự (1994)... [5]). Nồng độ BA và NAA trong môi trường thay đổi tùy thuộc vào mỗi đối tượng nuôi cấy. Theo Bảng 1, ta thấy nồng độ chất điều hòa sinh trưởng khác nhau ảnh hưởng trực tiếp đến sự hình thành PLBs từ đỉnh chồi. Sau 60 ngày nuôi cấy, các nghiệm thức có sự kết hợp của BA với NAA 0,2mg/l cho tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs cao hơn nghiệm thức BA kết hợp với NAA 0,5mg/l.

Trong đó, tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs ở nghiệm thức có bổ sung BA 2,5mg/l và NAA 0,2mg/l là tốt nhất với 86,7% mẫu tạo thành PLBs và số lượng PLBs tái sinh trên mỗi mẫu là 16,3 nghiệm thức này PLBs to, màu xanh, có lông hút và rời nhau. Nghiệm thức này có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức có bổ

sung BA 2mg/l và NAA 0,2mg/l cũng cho tỉ lệ tái sinh PLBs cao là 66,2% với 9,9 PLBs tái sinh trên mỗi mẫu, PLBs dính liền và không rời nhau. Nghiệm thức đối chứng đỉnh chồi không tái sinh PLBs mà phát triển thành chồi.

Sự kết hợp của các mức BA với NAA 0,5mg/l cho tỉ lệ tái sinh PLBs thấp; trong đó, nghiệm thức bổ sung BA 1mg/l và NAA 0,5mg/l thì tỉ lệ tái sinh PLBs 33,3% với số PLBs ở mỗi mẫu là 4,7 và nghiệm thức này có sự xuất hiện rễ

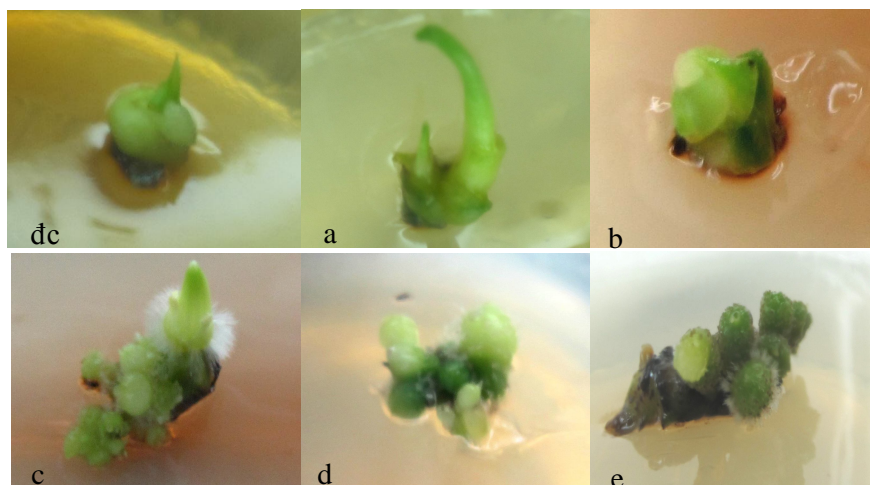
ở một số mẫu. Nồng độ BA 1,5mg/l kết hợp với NAA 0,5mg/l cho tỉ lệ tái sinh PLB là 13,3% với số PLBs tái sinh trên mỗi mẫu là 6,7 và ở nghiệm thức này PLBs phát triển giống dạng thân rễ (rhizome). Ở mức NAA 0,5 mg/l thì sự kết hợp với BA ở nồng độ càng cao thì tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs càng thấp (hình 1).

Như vậy, môi trường MS có bổ sung BA 2,5mg/l và NAA 0,2mg/l thích hợp cho sự tái sinh PLBs từ đỉnh chồi địa lan Hương cát cát.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và NAA lên sự tái sinh PLBs từ đỉnh chồi

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs (%)	Số PLBs tái sinh/mẫu
NAA	BA		
-	-	0,0 ± 0,0 ^f	0,0 ± 0,0 ^g
0,2	1	3,3 ± 0,3	0,8 ± 0,1 ^{fg}
0,2	1,5	22,2 ± 0,8 ^d	1,3 ± 0,2 ^f
0,2	2	62,2 ± 0,2 ^b	9,9 ± 0,7 ^b
0,2	2,5	86,7 ± 1,2 ^a	16,3 ± 0,4 ^a
0,2	3	37,8 ± 0,3 ^c	7,8 ± 0,5 ^c
0,5	1	33,3 ± 3,8 ^c	4,7 ± 0,3 ^{de}
0,5	1,5	13,3 ± 3,8 ^{de}	6,7 ± 0,7 ^c
0,5	2	17,8 ± 2,2 ^d	5,3 ± 0,2 ^d
0,5	2,5	15,5 ± 2,2 ^d	4,5 ± 0,4 ^{de}
0,5	3	13,3 ± 0,5 ^{de}	3,7 ± 0,3 ^e

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 1. Ảnh hưởng của BA và NAA đến sự tái sinh PLBs từ đỉnh chồi
 (đc). BA 0mg/l + NAA 0mg/l (a). BA 1,5mg/l + NAA 0,2mg/l
 (b). BA 2mg/l + NAA 0,2mg/l (c). BA 2,5mg/l + NAA 0,2mg/l
 (d). BA 3mg/l + NAA 0,2mg/l (e). BA 1,5mg/l + 0,5mg/l

3.2. Ảnh hưởng của BA lên khả năng tái sinh chồi từ PLBs

Theo Nguyễn Đức Lượng (2006) [3] thì cytokinin là chất điều hòa sinh trưởng thực vật cần thiết cho sự phát triển chồi và tái sinh ở hầu hết các loại thực vật. Trong đó, BA là một loại cytokinin có hiệu quả cao trong cảm ứng tạo chồi ở nhiều loại thực vật và được sử dụng rộng rãi hơn các loại cytokinin khác. Kết quả ghi nhận ở Bảng 2 cho thấy, nghiệm thức có bổ sung BA vào môi trường với nồng độ 1mg/l cho tỉ lệ tái sinh chồi từ PLBs cao, số chồi tái sinh trên mỗi cụm PLBs là cao nhất với 6,4 chồi/cụm, các cụm PLBs nảy chồi mạnh, chồi xanh tốt và có xuất hiện thêm một vài chồi mới, trong môi trường này chồi cũng phát triển cao hơn và đồng đều hơn so với các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra, theo ghi nhận của chúng tôi thì thời gian tái sinh chồi ở nghiệm thức này là sớm nhất.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA lên khả năng tái sinh chồi từ PLBs

BA (mg/l)	Tỉ lệ PLBs tái sinh chồi (%)	Số chồi tái sinh(chồi/ cụm)	Trọng lượng tươi (g)
0	100 ±0,0 ^a	2,8±0,1 ^c	0,41±0,01 ^c
0,5	100 ±0,0 ^a	4,8±0,1 ^b	0,52±0,02 ^b
1	100 ±0,0 ^a	6,4±0,4 ^a	0,71±0,01 ^a
1,5	67,8 ±1,1 ^b	1,9±0,4 ^d	0,32±0,01 ^d
2	34,4 ±0,64 ^c	1,6±0,4 ^e	0,4 ±0,01 ^c

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

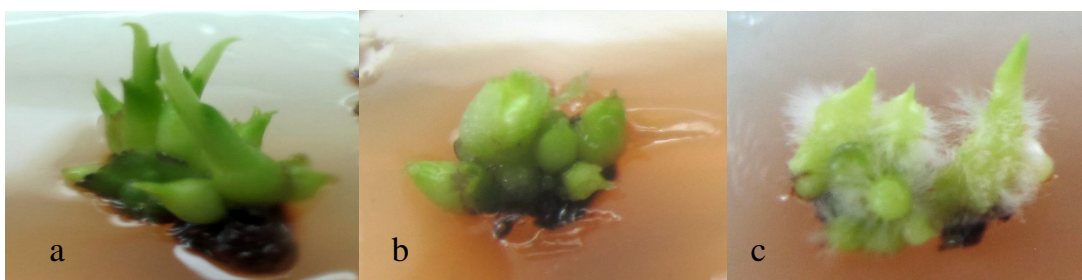
Nghiệm thức có bổ sung BA 2mg/l cho tỉ lệ tái sinh chồi thấp nhất là 34,4% với số chồi tái sinh trên mỗi cụm là 1,6 chồi, ở nghiệm thức này sự tái sinh chồi thấp nhưng sự tăng sinh PLBs lại cao nhất, các cụm PLBs phát triển khá tốt, PLBs lớn, rời nhau và có nhiều lông hút (hình 2).

Nghiệm thức có bổ sung BA 1,5mg/l chồi có tái sinh nhưng không kéo dài. Nghiệm thức có bổ sung BA 0,5mg/l cho tỉ lệ PLBs tái sinh chồi 100% với 4,8 chồi/cụm, chồi to nhưng phát triển không

đồng đều và ở nghiệm thức này có một số PLBs mới hình thành, các PLBs này dính liền nhau và không có lông hút.

Nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật thì các cụm PLBs có tái sinh chồi, tuy nhiên số chồi tái sinh trên mỗi cụm thấp với 2,8 chồi/cụm và chồi phát triển không đồng đều.

Như vậy, nồng độ BA 1mg/l thích hợp cho sự tái sinh chồi từ PLBs địa lan Hương cát cát.



Hình 2. Tái sinh chồi từ PLBs ở các nồng độ khác nhau
(a). BA 1mg/l (b). BA 1,5mg/l (c). BA 2mg/l

3.3. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng chồi

Kết quả thu được ở Bảng 3 với chỉ tiêu về chiều cao cây thì môi trường khoáng KC cho kết quả tốt nhất, chiều cao cây đạt 5,5cm, cây to khỏe và có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với các môi trường nuôi cấy còn lại. Nghiên cứu trên đối tượng *Cymbidium* sp. tác giả Sagawa và cộng sự (1966) [6] cũng đã sử dụng môi trường KC để tăng trưởng cây và cây phát triển khá tốt. Tiếp theo là môi trường VW với chiều cao cây đạt 3,9cm, cây nhỏ và phát triển chậm. Môi trường khoáng MS cây kém phát triển nhất, chiều cao cây đạt 3cm, cây yếu.

Môi trường KC cho số lá trung bình

đạt cao nhất với 3,2 lá, phiến lá mở rộng, dày, có màu xanh đậm và thân mập, to hơn so với cây ở các môi trường còn lại. Môi trường MS có số lá thấp nhất, đa số chỉ có 1 đến 2 lá mở, phiến lá hẹp, mỏng. Môi trường MS ½ cho lá rộng và dày hơn ở môi trường MS nhưng lại kém hơn so với cây trong môi trường VW (hình 3).

Môi trường KC cho số rễ và chiều dài rễ trung bình cao nhất với 3,4 rễ và 3,3cm. Trong môi trường này, rễ phát triển to, khỏe mặc dầu không có bổ sung chất kích thích sinh trưởng. Kết quả cũng trùng khớp với nghiên cứu của Nguyễn Quang Thạch và cộng sự (2004) [4] đã báo cáo rằng địa lan *in vitro* có thể ra rễ ngay trên môi trường không cần bổ sung

chất điều hòa sinh trưởng thực vật, tuy nhiên thời gian ra rễ lại kéo dài hơn so với việc bổ sung thêm nồng độ rất thấp chất điều hòa sinh trưởng thực vật (0,3 ppm NAA) hay 1g than hoạt tính. Theo George và Sherrington (1984) [7] thì rễ của một số loài cây có thể được hình thành dễ dàng hơn khi bổ sung thêm than hoạt tính vào môi trường, đôi khi có bổ sung thêm auxin. Sự phát triển của rễ tốt hơn khi trong môi trường có chất hút các chất ức chế ra rễ hoặc làm giảm mức độ chiếu sáng bằng cách bổ sung than hoạt tính

Các môi trường còn lại rễ phát triển kém hơn, môi trường VW có số rễ nhiều

hơn (3,1 rễ) môi trường MS ½ nhưng chiều dài rễ lại ngắn hơn (0,7cm) so với môi trường MS ½ (2,1 rễ và chiều dài rễ 1,8cm). Trong môi trường MS rễ phát triển yếu nhất cả về số lượng rễ lẫn chiều dài rễ.

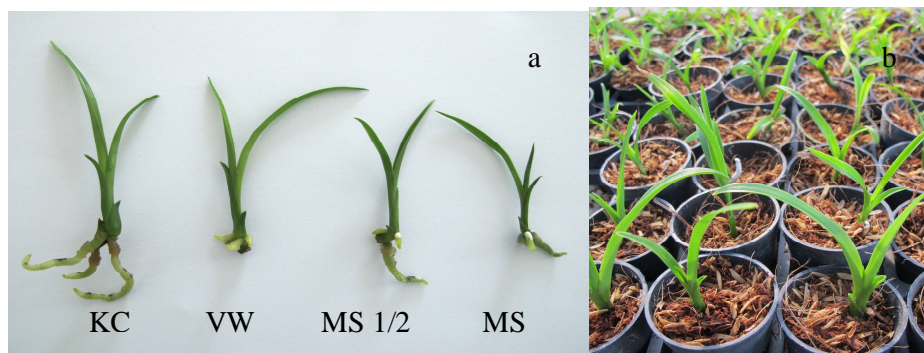
Với chỉ tiêu về trọng lượng tươi thì môi trường KC cho trọng lượng tươi của cây cao nhất với 0,57g/cây và thấp nhất là môi trường MS với trọng lượng tươi 0,23g/cây.

Như vậy, môi trường khoáng tốt nhất cho địa lan Hương cát cát tăng trưởng trong thí nghiệm này là môi trường KC, cây to khỏe, đạt chỉ tiêu về chiều cao cây, số lá cũng như số rễ.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự tăng trưởng chồi

Môi trường	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/mẫu)	Chiều dài lá (cm)	Số rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng tươi (g/cây)
MS	3±0,01 ^d	2,8±0,00 ^b	2,7±0,03 ^d	0,9±0,04 ^d	0,3±0,01 ^d	0,23±0,00 ^d
MS 1/2	3,6±0,05 ^c	2,9±0,13 ^b	3,3±0,01 ^c	2,1±0,04 ^c	1,8±0,01 ^b	0,31±0,01 ^c
KC	5,5±0,03 ^a	3,2±0,06 ^a	5,1±0,03 ^a	3,4±0,04 ^a	3,3±0,07 ^a	0,57±0,01 ^a
VW	3,9±0,08 ^b	3±00,04 ^{ab}	3,6±0,15 ^b	3,1±0,04 ^b	0,7±0,04 ^c	0,4±0,01 ^b

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 3. (a). Tăng trưởng cây ở các môi trường khoáng
(b). Cây con ex vitro 30 ngày tuổi

3.4. *Khảo sát tỉ lệ sống ngoài vườn ươm*

Các cây Hương cát cát *in vitro* thu được của thí nghiệm 3 có rễ phát triển đầy đủ, rễ khỏe, cây cao từ 4 – 5cm đem ra trồng tại vườn ươm thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh nhằm khảo sát khả năng thích ứng của cây với điều kiện ngoài vườn ươm. Kết quả được ghi nhận sau 30 ngày trồng tại vườn ươm với tỉ lệ sống đạt 100%, cây con *ex vitro* địa lan Hương cát cát phát triển tốt, cây sinh trưởng bình thường, không có biến

dị hình thái, cây có xuất hiện rễ mới (hình 3).

4. **Kết luận**

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy:

- Sự tái sinh PLBs từ đỉnh chồi cao nhất của địa lan Hương cát cát trên môi trường MS có bổ sung BA 2,5mg/l và NAA 0,2mg/l.
- Nồng độ BA 1mg/l thích hợp cho sự tái sinh chồi từ PLBs;
- Môi trường khoáng KC bổ sung 20g/l chuối, 1g/l than hoạt tính thích hợp cho sự tăng trưởng cây địa lan Hương cát cát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phan Xuân Huyền, Nguyễn Trung Ái, Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Thị Diệu Hương, Đinh Văn Khiêm và Dương Tấn Nhựt (2004), “Phục tráng và nhân nhanh các giống Địa lan *Cymbidium* cv. bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng”, *Tạp chí Sinh học*, 26(1), tr.48-54.
2. Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2006), *Công nghệ tế bào*, Nxb Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
3. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Hồ Ngọc Lan, Tống Nhật Tường, Vũ Quốc Luận, Bùi Văn Thế Vinh, Phan Xuân Huyền (2006), “Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự hình thành thể tròn tương tự chồi non (protocorm-like body) và nghiên cứu rút ngắn thời gian sinh trưởng của cây hoa địa lan *Cymbidium* sp. nuôi cấy *in vitro*”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 4(3), tr.353-362.
4. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Lý Anh, Lê Thị Muội (2004), “Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* giống địa lan thương mại miss Kim”, *Tạp chí Nông nghiệp – Nông thôn – Môi trường*, 11, tr.1503-1505.
5. Akatari Asma Begun, Masahiko Tamaki and Shunji Kaho (1994), “Formation of protocorm – like body (PLB) and Shoot Development through *In vitro* Culture of Outer Tissue of *Cymbidium* PLB”, *Japan Soc Hort Sci C3* (3), pp.663-673.
6. George, E.F. and P.D. Sherrington (1984), “*Plant Propagation by Tissue Culture*”, Exegetics Ltd., Eversley England, pp.324-366.
7. Hartman, H. T., and D. E. Kester (1983), “*Plant propagation, principles and practices*”, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
8. Sagawa, Y. and T. Shoji (1966), “Clonal propagation of *Cymbidiums* through shoot meristem culture”, *Amer Orchid Soc Bull*, 35, pp.118-122.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 17-6-2014; ngày phản biện đánh giá: 30-7-2014; ngày chấp nhận đăng: 21-11-2014)