

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG, SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY HỢP CHẤT KINSENOSE CỦA CÂY LAN KIM TUYẾN ANOECTOCHILUS ROXBURGHII (WALL.) LINDL. Ở ĐIỀU KIỆN EX VITRO

Võ Tấn Hưng¹, Phan Xuân Huyền²

Ngày nhận bài: 26/12/2022; Ngày phản biện thông qua: 15/03/2023; Ngày duyệt đăng: 30/07/2023

TÓM TẮT

Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl.) là một trong những loài thảo dược quý và tốt cho sức khỏe của con người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu khả năng nhân giống *ex vitro*, sự sinh trưởng của cây và đánh giá sự tích lũy hợp chất kinsenoside của cây Lan kim tuyến cấy mô trong điều kiện nuôi trồng nhân tạo. Kết quả cho thấy, nồng độ của NAA từ 0 - 1.000 ppm đều phù hợp lên khả năng tạo rễ *ex vitro* và sinh trưởng của cây, với tỷ lệ mẫu tạo rễ và tỷ lệ sống đạt 100%. Các vị trí đốt thân của cây đều có khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi ở điều kiện *ex vitro* và thích hợp làm nguồn nguyên liệu để nhân giống *ex vitro* cây Lan kim tuyến, với tỷ lệ tái sinh chồi và tỷ lệ sống đạt 100%. Giá thể đất sạch vụn xơ dừa phù hợp nhất để chuyển cây cấy mô ra điều kiện ngoài vườn ươm, với chiều cao cây 9,19 cm, chiều dài rễ 7,11 cm, chiều dài lá 2,68 cm, chiều rộng lá 1,86 cm, khối lượng tươi 0,92 g/cây và tỷ lệ sống 100%. Phân bón Nitrophoska kết hợp với phân Sinh học Vinh Thanh tốt nhất đến sự sinh trưởng của cây, với chiều cao cây 13,29 cm, chiều dài rễ 11,26 cm, chiều dài lá 3,54 cm, chiều rộng lá 2,78 cm, khối lượng tươi 2,62 g/cây và tỷ lệ sống 86,67%. Cây Lan kim tuyến được trồng trong điều kiện vườn ươm sau 8 tháng tuổi có khả năng tích lũy hợp chất kinsenoside đạt 7,19% theo khối lượng khô.

Từ khóa: cây Lan kim tuyến, chiều cao cây, chiều dài rễ, kinsenoside, sự sinh trưởng, tỷ lệ sống.

1. MỞ ĐẦU

Tây Nguyên nói chung, Kbang - Gia Lai nói riêng có điều kiện tự nhiên phù hợp cho nhiều loại cây dược liệu sinh trưởng phát triển. Trong đó, cây Lan kim tuyến là một loại thảo dược quý và có giá trị kinh tế. Y học cổ truyền và y học hiện đại đã nghiên cứu cho thấy, Lan kim tuyến có những tác dụng như: bồi bổ và tăng cường sức khỏe, bảo vệ gan, phòng ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư, bệnh tiểu đường, béo phì, điều trị bệnh tim mạch, chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch, kháng viêm,... (Hộ, 2000; Chang et al., 2007; Du et al., 2008a; Hsieh et al., 2011). Chính vì những giá trị trên mà hiện nay cây Lan kim tuyến trong tự nhiên bị khai thác một cách triệt để, dẫn đến cây Lan kim tuyến được xếp vào danh mục là cây nguy cấp và quý hiếm (Chính phủ, 2021). Vì vậy, việc nghiên cứu bảo tồn và phát triển cây Lan kim tuyến tạo ra nguồn nguyên liệu dược liệu phục vụ trong lĩnh vực y học, thực phẩm và mỹ phẩm là vấn đề cần thiết.

Hiện nay trên thế giới đã có nhiều công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng cây Lan kim tuyến chủ yếu trên hai loài có giá trị dược liệu như: loài *Anoectochilus formosanus* Hayata và loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (Chang et al., 2007; Lin et al., 2018; Ling et al., 2019). Trong nước cũng đã có nhiều công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng các loài Lan kim tuyến

có giá trị dược liệu như: loài *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downie, *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., *Anoectochilus formosanus* Hayata và loài *Anoectochilus setaceus* Blume (Ket et al., 2004; Phê và cs., 2010; Luận và cs., 2015, Huyền và cs., 2018; Huyền và cs., 2020). Đối với loài Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., hiện nay ở nước ta đã có nhiều công bố nghiên cứu nhân giống vô tính *in vitro* (Phượng & Khoa, 2013; Phê và cs., 2010; Minh và cs., 2018; Mai & Trường, 2019), nhưng chưa có công bố nghiên cứu nhân giống vô tính *ex vitro*. Bên cạnh đó, về nghiên cứu nuôi trồng và đánh giá hoạt chất chính kinsenoside của loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. đã có công bố (Xiêm và cs., 2019; Huyền và cs., 2021), nhưng chưa có công bố nghiên cứu nuôi trồng và đánh giá hoạt chất kinsenoside của cây Lan kim tuyến nuôi trồng tại Kbang - Gia Lai. Do đó, trong bài báo này chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá khả năng nhân giống vô tính *ex vitro* và sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến tại Kbang - Gia Lai. Kết quả nghiên cứu góp phần cung cấp dữ liệu khoa học về nhân giống vô tính *ex vitro*, sự sinh trưởng và hợp chất kinsenoside của cây Lan kim tuyến nuôi trồng tại Kbang - Gia Lai.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

¹Công ty cổ phần Việt Nga Gia Lai, huyện Kbang, tỉnh Gia Lai;

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;

Tác giả liên hệ: Phan Xuân Huyền; ĐT: 0919066566; Email: phanxuanhuyen1974@gmail.com.

- Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng tạo rễ và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân lên sự tái sinh và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi cây Lan kim tuyến cây mô ở điều kiện *ex vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của phân bón lá lên sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*.

- Phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến nuôi trồng 8 tháng tuổi và cây ngoài tự nhiên đã ra hoa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây Lan kim tuyến loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. phân bố ngoài tự nhiên thuộc xã Đắk Rong và xã Sơn Lang, huyện Kbang tỉnh Gia Lai được thu nhận và nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô thực vật, tạo cây Lan kim tuyến cây mô. Những cây Lan kim tuyến cây mô này được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm (Hình 1d).

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm nghiên cứu được tiến hành tại Công ty cổ phần Việt Nga Gia Lai, địa chỉ: 22 Lê Thánh Tông, thị trấn Kbang, huyện Kbang, tỉnh Gia Lai.

2.2.3. Vật liệu nghiên cứu

- **Giá thể:** Giá thể đất sạch vụn xơ dừa (ECO N1), đất sạch hữu cơ (Tribat) và giá thể 50% đất sạch vụn xơ dừa kết hợp 50% đất sạch hữu cơ.

- **Phân bón lá:** Phân Nitrophoska (N: 25%; P₂O₅: 10%; K₂O: 17,5%; Fe: 0,050%; Zn: 0,019%; Mn: 0,050%; B: 0,011%; Cu: 0,019%; Mo: 0,001%) và phân Sinh học Vinh Thanh (Axit humic: 54%, độ ẩm: 10%, pH_(nước): 5).

- **Thuốc phòng trừ sâu bệnh:** Thuốc trừ nấm và vi khuẩn New Kasuran (3 g/l) và thuốc trừ sâu sinh học Radiant (1 ml/l).

2.2.4. Điều kiện nuôi trồng

Vườn ươm có mái che mưa và che lưới đen chắn 80 - 85% ánh sáng, nhiệt độ 20 - 25°C, độ ẩm 80 - 90%.

2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 16.0) trong Duncan's test (Duncan, 1955) với P ≤ 0,05.

2.2.6. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nồng

độ NAA lên khả năng tạo rễ và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*.

Những chồi ngọn của cây Lan kim tuyến cây mô mang 1 đốt thân (Hình 1b) chắm vào các dung dịch NAA với các nồng độ 0, 1.000, 2.000, 3.000 ppm và lấy ra liền, sau đó giâm trên giá thể đất sạch vụn xơ dừa (Hình 1a₁). Phun thuốc phòng trừ nấm và vi khuẩn New Kasuran (3 g/l), và phun thuốc trừ sâu sinh học Radiant (1 ml/l) theo định kỳ 10 ngày 1 lần. Mỗi nghiệm thức giâm 15 ngọn với 3 lần lặp lại, sau 3 tháng nuôi trồng và chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), số rễ/mẫu, chiều dài rễ (cm), tỷ lệ mẫu tạo rễ (%) và tỷ lệ sống của mẫu (%).

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân lên sự tái sinh và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*.

Các vị trí đốt của cùng một cây Lan kim tuyến (Hình 1c) được đánh số theo thứ tự từ ngọn đến gốc, tương ứng từ 1 đến 5 và giâm trên giá thể đất sạch vụn xơ dừa (Hình 1a₁). Phun thuốc phòng trừ nấm và vi khuẩn New Kasuran (3 g/l) và phun thuốc trừ sâu sinh học Radiant (1 ml/l) theo định kỳ 10 ngày 1 lần. Mỗi nghiệm thức giâm 9 mẫu, với 3 lần lặp lại, sau 2 tháng nuôi trồng và chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), số chồi/mẫu, số rễ/mẫu, chiều dài rễ (cm), tỷ lệ mẫu tạo chồi (%) và tỷ lệ sống của mẫu (%).

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi cây Lan kim tuyến cây mô ở điều kiện *ex vitro*.

Cây Lan kim tuyến cây mô đồng đều về chiều cao và chiều dài rễ (Hình 1d) được trồng trên giá thể 100% đất sạch vụn xơ dừa (Hình 1a₁), 100% giá thể đất sạch hữu cơ (Hình 1a₂) và giá thể 50% đất sạch vụn xơ dừa phối trộn 50% đất sạch hữu cơ (Hình 1a₃). Phun thuốc phòng trừ nấm và vi khuẩn New Kasuran (3 g/l), và phun thuốc trừ sâu sinh học Radiant (1 ml/l) theo định kỳ 10 ngày 1 lần. Mỗi nghiệm thức trồng 30 cây với 3 lần lặp lại, sau 2 tháng nuôi trồng và chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi/cây (g) và tỉ lệ sống của cây (%).

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của phân bón lá lên sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*.

Cây Lan kim tuyến cây mô đồng đều về chiều cao và chiều dài rễ (Hình 1d) được trồng trên giá thể 100% đất sạch vụn xơ dừa (Hình 1a₁). Cây con được phun phân bón lá Nitrophoska (2 g/l), phân Sinh học Vinh Thanh (2 g/l) và phun phân

Nitrophoska (2 g/l) kết hợp với phân Sinh học Vinh Thanh (2 g/l) theo định kỳ 1 tuần 1 lần. Đối với nghiệm thức phun kết hợp phân Nitrophoska và phân Sinh học Vinh Thanh thì phun thay đổi mỗi tuần một loại phân. Phun thuốc phòng trừ nấm và vi khuẩn New Kasuran (3 g/l), và phun thuốc trừ sâu sinh học Radiant (1 ml/l) theo định kỳ 10 ngày 1 lần. Mỗi nghiệm thức trồng 30 cây, sau 8 tháng nuôi trồng và chăm sóc tiến hành thu thập số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi/cây (g) và tỉ lệ sống của cây (%).

Thí nghiệm 5: Phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến nuôi

trồng 8 tháng tuổi và cây ngoài tự nhiên đã ra hoa.

Thí nghiệm được tiến hành phân tích định lượng hoạt chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến 8 tháng tuổi (Hình 2e₁) và cây ngoài tự nhiên đã ra hoa (Hình 2e₂). Các bước tiến hành phân tích: loại bỏ phần vụn xơ dừa và đất bám bên ngoài rễ, cắt nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 50°C; mẫu sấy khô được chiết 3 - 4 lần với dung môi methanol (MeOH) ở nhiệt độ phòng; gộp chung các dịch chiết, cô loại dung môi trên máy cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C thu được cặn khô; hòa tan cặn với 10 ml nước, lấy 2 ml dung dịch lọc qua màng lọc 0,45 µm để tiến hành phân tích bằng HPLC (thực hiện tại phòng Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên).



Hình 1. Nghiên cứu đánh giá khả năng nhân giống *ex vitro* và sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (wall.) lindl.

Chú thích: a₁, Giá thể đất sạch vụn xơ dừa, a₂, Giá thể đất sạch hữu cơ, a₃, Giá thể 50% đất sạch vụn xơ dừa kết hợp với 50% đất sạch hữu cơ; b, Chồi ngọn của cây nuôi cấy mô; c, Các vị trí đốt thân từ ngọn đến gốc; d, Cây nuôi cấy mô.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng tạo rễ và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*

Khả năng tạo rễ và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro* sau 3 tháng nuôi trồng và chăm sóc được thể hiện trên Bảng 3.1. Kết quả cho thấy, các mẫu chắm vào dung dịch NAA ở các nồng độ 0, 1.000, 2.000 và 3.000 ppm đều tạo rễ, tỷ lệ tạo rễ đạt 100%. Điều này cho thấy cây Lan kim tuyến là một đối tượng dễ tạo rễ ở điều kiện *ex vitro*. Một số kết quả nghiên cứu đã công bố cho thấy, cây Lan kim tuyến cũng dễ tái sinh rễ ở điều kiện in vitro, tỷ lệ tạo rễ đạt 100% trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (Phê và cs., 2010; Luận và cs., 2015; Huyền và cs., 2016). Kết quả cũng cho thấy, các chồi ở những nghiệm thức đều tạo 1 rễ/mẫu và chồi cây đều có

khả năng sinh trưởng, tuy nhiên sự sinh trưởng của rễ và chồi ở những nghiệm thức khác nhau thì có sự khác nhau (Hình 2a₁, 2a₂, 2a₃, 2a₄). Ở nồng độ NAA từ 0 - 1.000 ppm là tốt nhất đến sự tăng trưởng chiều cao cây và chiều dài rễ, với chiều cao cây 4,14 - 4,19 cm và chiều dài rễ 4,46 - 4,49 cm. Sự tăng trưởng chiều cao cây và chiều dài rễ ở nồng độ NAA 3.000 ppm là kém nhất. Chiều dài rễ ở nồng độ NAA 2.000 ppm tốt hơn ở nồng độ 3.000 ppm nhưng kém hơn ở nồng độ NAA 0 - 1.000 ppm, sự tăng trưởng chiều cao cây ở nồng độ NAA 2.000 ppm so với nồng độ NAA 0 - 1.000 ppm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả cũng chỉ ra rằng, khi tăng cao nồng độ của NAA thì sự tăng trưởng chiều cao cây và chiều dài rễ giảm xuống, điều này có thể giải thích NAA ở nồng độ thấp thì kích thích tăng trưởng chiều cao cây và chiều dài rễ, khi tăng cao nồng độ NAA thì xảy

ra quá trình ngược lại ức chế tăng trưởng chiều cao cây và chiều dài rễ. NAA là một chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin, nó có tác dụng kích thích tạo rễ và được sử dụng phổ biến trong giâm hom giâm cành. Hiện nay chưa có công bố sử dụng NAA trong nghiên cứu tạo rễ *ex vitro* cây Lan kim tuyến, nhưng ở các đối tượng cây trồng khác thì đã có nhiều công bố: nghiên cứu nhân giống cây Tom trong bằng hom (Nguyễn & Ân, 2015), nghiên cứu nhân giống cây Dạ hợp bằng

phương pháp giâm hom (Hà & Yên, 2017), nhân giống Cẩm tú cầu bằng phương pháp giâm hom (Hà, 2016), nhân giống sinh dưỡng cây ăn quả loài *Grewia asiatica* L. thông qua giâm cành (Ghosh et al., 2017), nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến giâm cành của gỗ *Dalbergia* (Khudhur and Omer, 2015).

Như vậy, nồng độ của NAA 0 hoặc 1.000 ppm là phù hợp nhất lên khả năng tạo rễ *ex vitro* và sinh trưởng của cây Lan kim tuyến.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng tạo rễ và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro* sau 3 tháng nuôi trồng

Nồng độ NAA (ppm)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Tỷ lệ sống (%)
0	4,14 ^a *	1 ^a	4,49 ^a	100	100
1.000	4,19 ^a	1 ^a	4,46 ^a	100	100
2.000	4,17 ^a	1 ^a	3,85 ^b	100	100
3.000	3,48 ^b	1 ^a	2,33 ^c	100	100

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

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân lên sự tái sinh và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*

Từ kết quả của thí nghiệm trên chọn nghiệm thức xử lý nồng độ NAA 0 ppm để thực hiện thí nghiệm này, các chồi ngọn và đốt thân giâm trên giá thể đất sạch vụn xơ dừa. Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi của các vị trí đốt thân sau 2 tháng nuôi trồng và chăm sóc được thể hiện trên Bảng 3.2. Kết quả cho thấy, tất cả các vị trí đốt thân trên cùng một cây đều tái sinh 1 chồi/mẫu và hình thành 1 rễ/mẫu, tuy nhiên ở những vị trí đốt khác nhau thì có sự tái sinh chồi và hình thành rễ khác nhau (Hình 2b₁, 2b₂, 2b₃, 2b₄, 2b₅). Ở vị trí đốt thứ nhất hình thành chồi và rễ tốt nhất, với chiều cao chồi 2,99 cm và chiều dài rễ 2,35 cm. Điều này có thể giải thích do đốt thứ nhất có ưu thế ngọn nên tăng trưởng chiều cao chồi và chiều dài rễ tốt hơn. Chiều cao chồi và chiều dài rễ ở đốt thứ 2 và thứ 3 kém nhất và khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Chiều cao chồi và chiều dài rễ ở đốt thứ 4 và thứ 5 tốt hơn đốt thứ 2 và 3. Điều này có thể lý giải ở những đốt già hơn thì tạo chồi và tạo rễ tốt hơn, ngoài trừ đốt thứ nhất. Hiện nay chưa có công bố nghiên cứu tái sinh và sinh trưởng chồi của cây Lan kim tuyến từ các vị trí đốt thân ở điều kiện *ex vitro*, nhưng đã công bố nghiên cứu sự tái sinh và sinh trưởng chồi từ các vị trí đốt thân của cây Lan kim tuyến ở điều kiện *in vitro*. Vũ Quốc Luận và cộng sự (Luận và cs., 2015) khi nghiên cứu các vị trí đốt thân

cây Lan kim tuyến loài *Anoectochilus setaceus* Blume cho thấy, vị trí đốt thân thứ 1 đến thứ 6 đều thích hợp làm nguyên liệu để nhân giống. Phan Xuân Huyền và Nguyễn Thị Phương Hoàng (Huyền và cs., 2018) cũng nghiên cứu sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây Lan kim tuyến loài *Anoectochilus formosanus* Hayata từ các vị trí đốt thân đã chỉ ra vị trí đốt thứ 1 đến thứ 6 đều thích hợp làm nguyên liệu để nhân giống. Điều này cho thấy, khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi của cây Lan kim tuyến từ các vị trí đốt thân ở điều kiện *ex vitro* cũng tương đồng với sự tái sinh và sinh trưởng chồi từ các vị trí đốt thân ở điều kiện *in vitro*. Ngoài ra, hiện nay cũng đã có nhiều công bố nghiên cứu tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* từ các vị trí đốt thân của các cây trồng khác như: cây sâm bố chính *Hibicus sagittifolius* Kurz (Huyền và cs., 2017), cây tầm bóp Nam Mỹ (Huyền và cs., 2022a), cây việt quất (Huyền và cs., 2022b).

Như vậy, các vị trí đốt thân của cây Lan kim tuyến đều có khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi ở điều kiện *ex vitro* và thích hợp làm nguồn nguyên liệu để nhân giống.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của vị trí đốt thân lên sự tái sinh và sinh trưởng chồi Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro* sau 2 tháng nuôi trồng

Vị trí đốt	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ sống (%)
Chồi ngọn (đốt thứ nhất)	2,99 ^{a*}	1 ^a	1 ^a	2,35 ^a	100	100
Đốt thứ 2	1,48 ^d	1 ^a	1 ^a	0,29 ^c	100	100
Đốt thứ 3	1,53 ^d	1 ^a	1 ^a	0,31 ^c	100	100
Đốt thứ 4	1,84 ^c	1 ^a	1 ^a	0,58 ^b	100	100
Đốt thứ 5	1,98 ^b	1 ^a	1 ^a	0,62 ^b	100	100

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



Hình 2. Nghiên cứu đánh giá khả năng nhân giống *ex vitro* và sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (wall.) lindl.

Chú thích: a₁, a₂, a₃, a₄. Sự tạo rễ và sinh trưởng chồi khi mẫu được xử lý các nồng độ: 0, 1.000, 2.000, 3.000 ppm NAA; b. Sự tái sinh và sinh trưởng chồi của vị trí đốt thứ 1 (chồi ngọn) đến đốt thứ 5; c₁, c₂, c₃. Sự thích nghi và sinh trưởng của cây cấy mô trên giá thể đất sạch vụn xơ dừa, giá thể đất sạch hữu cơ, giá thể 50% đất sạch vụn xơ dừa kết hợp với 50% đất sạch hữu cơ; d₁, d₂, d₃. Sự sinh trưởng của cây khi phun phân Nitrophoska, phun phân Sinh học Vinh Thanh, phun phân Nitrophoska kết hợp với phân Sinh học Vinh Thanh; e₁, e₂. Định lượng hoạt chất chính kinsenoside của cây nuôi trồng 8 tháng tuổi và cây ngoài tự nhiên đã ra hoa; f₁. Nuôi trồng cây Lan kim tuyến trên chậu nhựa, f₂, f₃. Nuôi trồng cây Lan kim tuyến trên thùng xốp.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi cây Lan kim tuyến cấy mô ở điều kiện *ex vitro*

Chuyển cây cấy mô ra giai đoạn vườn ươm là một công đoạn rất quan trọng, cây cấy mô nuôi cấy trên môi trường thạch khi chuyển ra điều kiện vườn ươm trồng trên giá thể mới, độ ẩm ở vườn ươm thấp và có sự giao động trong ngày, dẫn đến

cây con dễ bị héo và chết. Do đó, trong thời gian đầu cần phải che chắn và phun sương giữ ẩm cho cây. Khả năng thích nghi của cây Lan kim tuyến cấy mô sau 2 tháng nuôi trồng được thể hiện trên Bảng 3.3. Kết quả cho thấy, cây con có khả năng thích nghi và sinh trưởng tốt khi chuyển ra điều kiện ngoài vườn ươm, tuy nhiên ở những giá thể khác nhau thì có sự thích nghi và sinh trưởng khác

nhau (Hình 2c₁, 2c₂, 2c₃). Cây con trồng trên giá thể đất sạch vụn xơ dừa có sự thích nghi và sinh trưởng tốt nhất, với tỷ lệ sống đạt 100%, chiều cao cây 9,19 cm, chiều dài rễ 7,11 cm, chiều dài lá 2,68 cm, chiều rộng lá 1,86 cm và khối lượng tươi 0,92 g/cây. Điều này có thể giải thích, giá thể đất sạch vụn xơ dừa có độ thông thoáng và giữ ẩm phù hợp cho sự thích nghi của cây con khi chuyển ra ngoài vườn ươm. Cây trồng trên giá thể đất sạch hữu cơ kém nhất, với tỷ lệ sống 83,33%, chiều cao cây 8,16 cm, chiều dài rễ 3,68 cm, chiều dài lá 2,31 cm, chiều rộng lá 1,44 cm và khối lượng tươi 0,69 g/cây. Cây con trồng trên giá thể 50% đất sạch vụn xơ dừa phối trộn với 50% đất sạch hữu cơ tốt hơn cây trồng trên giá thể đất sạch hữu cơ nhưng kém hơn giá thể đất sạch vụn xơ dừa, với tỷ lệ sống 93,33%, chiều cao cây 8,76 cm, chiều dài rễ 5,65 cm, chiều dài lá 2,59 cm, chiều rộng lá

1,77 cm và khối lượng tươi 0,81 g/cây. Hiện nay đã có nhiều công bố nghiên cứu chuyển cây cấy mô loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. ra ngoài vườn ươm. Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Phan Xuân Huyền và cộng sự (Huyền và cs., 2021) khi chuyển cây con ra ngoài vườn ươm trồng trên giá thể vụn xơ dừa có tỷ lệ sống đạt 100%, nhưng tốt hơn một số công bố khác nghiên cứu chuyển cây con loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. ra ngoài vườn ươm: Trương Thị Bích Phượng và Phan Ngọc Khoa (Phượng & Khoa, 2013) cho thấy tỷ lệ sống 70%, Nguyễn Tuấn Anh và cộng sự (Anh và cs., 2013) có tỷ lệ sống 80%, Zhang et al. (2015) chỉ ra tỷ lệ sống 90,2%.

Như vậy, giá thể đất sạch vụn xơ dừa là tốt nhất để chuyển cây Lan kim tuyến cấy mô ra điều kiện ngoài vườn ươm.

Bảng 3.3. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi cây Lan kim tuyến cấy mô ở điều kiện *ex vitro* sau 2 tháng nuôi trồng

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi/cây (g)	Tỷ lệ sống (%)
100% đất sạch vụn xơ dừa	9,19 ^{a*}	7,11 ^a	2,68 ^a	1,86 ^a	0,92 ^a	100
100% đất sạch hữu cơ	8,16 ^b	3,68 ^c	2,31 ^c	1,44 ^c	0,69 ^c	83,33
50% đất sạch vụn xơ dừa + 50% đất sạch hữu cơ	8,76 ^{ab}	5,65 ^b	2,59 ^b	1,77 ^b	0,81 ^b	93,33

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

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của phân bón lá lên sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến ở điều kiện *ex vitro*

Khả năng sinh trưởng của cây sau 8 tháng nuôi trồng được thể hiện ở Bảng 3.4. Kết quả cho thấy, các loại phân bón lá đều ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây, tuy nhiên phun những loại phân khác nhau thì có sự ảnh hưởng khác nhau đến sự sinh trưởng của cây (Hình 2d₁, 2d₂, 2d₃). Cây phun kết hợp hai loại phân Nitrophoska và Sinh học Vinh Thanh là tốt nhất, với chiều cao cây 13,29 cm, chiều dài rễ 11,26 cm, chiều dài lá 3,54 cm, chiều rộng lá 2,78 cm và khối lượng tươi 2,62 g/cây và tỷ lệ sống đạt 86%. Cây phun phân Sinh học Vinh Thanh sinh trưởng kém nhất, với chiều cao cây 11,14 cm, chiều dài rễ 8,35 cm, chiều dài lá 3,13 cm, chiều rộng lá 2,26 cm, khối lượng tươi 1,95 g/cây và tỷ lệ sống đạt 80%. Cây phun phân Nitrophoska tốt hơn cây phun phân Sinh học Vinh Thanh nhưng kém hơn cây phun kết hợp 2 loại phân, với chiều cao cây 12,14 cm, chiều dài rễ 10,58 cm, chiều dài lá 3,31 cm, chiều rộng lá 2,59 cm, khối lượng tươi 2,28 g/cây và tỷ lệ sống

đạt 83,33%. Điều này có thể lý giải khi phun kết hợp 2 loại phân thì thành phần khoáng đa, vi lượng phong phú hơn, thích hợp hơn cho cây sinh trưởng. Ứng dụng kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã trồng cây Lan kim tuyến ở quy mô lớn, phương pháp trồng trên chậu nhựa Hình 2f₁, phương pháp trên trên thùng xốp Hình 2f₂ và 2f₃. Hiện nay đã có công bố nghiên cứu nuôi trồng loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. nhưng vẫn còn rất ít. Nguyễn Thị Hương Xiêm và cộng sự (Xiêm và cs., 2019) nghiên cứu loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. thu được kết quả 25,2 g/10 cây sau 150 ngày nuôi trồng. Phan Xuân Huyền và cộng sự (Huyền và cs., 2021) cũng nghiên cứu trồng loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. cho thấy khối lượng tươi của cây 3,84 g/cây sau 14 tháng nuôi trồng. Chang et al. (2007) nuôi trồng loài *Anoectochilus formosanus* trên giá thể lên men vỏ cây cùng với phân trộn theo phương pháp mới là đất chậu Lan kim tuyến trong túi nylon, kết quả sau 4 tháng nuôi trồng cho thấy, cây nuôi trồng theo phương pháp mới trong túi nylon có khối lượng tươi 1,8 g/cây, trong khi đó, cây nuôi trồng theo

phương pháp thông thường thì có khối lượng tươi 1,6 g/cây; Cheng và Chang (2009) cũng nghiên cứu nuôi trồng loài *Anoectochilus formosanus* ở độ cao 1.000 m so với mực nước biển, sau 7 tháng nuôi trồng, khối lượng tươi từ 5 - 6 g/cây. Bên cạnh đó, Shiau et al. (2002) cũng nghiên cứu nuôi trồng loài *Anoectochilus formosanus* trong buồng

sinh trưởng, Gangaprasad et al. (2000) nghiên cứu nuôi trồng loài *Anoectochilus regalis* ở môi trường rừng tự nhiên.

Như vậy, phun phân Nitrophoska kết hợp với phân Sinh học Vinh Thanh là tốt nhất đến sự sinh trưởng của cây Lan kim tuyến.

Bảng 3.4. Khảo sát ảnh hưởng của phân bón lá lên sự sinh trưởng cây Lan kim tuyến ở điều kiện ex vitro sau 8 tháng nuôi trồng

Phân bón lá	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi/cây (g)	Tỷ lệ sống (%)
Nitrophoska + Sinh học Vinh Thanh	13,29 ^{a*}	11,26 ^a	3,54 ^a	2,78 ^a	2,62 ^a	86,67
Nitrophoska	12,17 ^b	10,58 ^a	3,31 ^a	2,59 ^{ab}	2,28 ^{ab}	83,33
Sinh học Vinh Thanh	11,14 ^c	8,35 ^b	3,13 ^a	2,26 ^b	1,95 ^b	80,00

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

3.5. Phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến nuôi trồng 8 tháng tuổi và cây ngoài tự nhiên đã ra hoa

Thí nghiệm tiến hành phân tích định lượng hoạt chất chính kinsenoside trong cây Lan kim tuyến của loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. sau 8 tháng nuôi trồng nhân tạo trong điều kiện nhà màng và so sánh với cây ngoài tự nhiên đã ra hoa (Hình 2e₁, 2e₂). Kết quả phân tích định lượng hợp chất chính kinsenoside được thể hiện trên Bảng 3.5. Kết quả cho thấy, cây nuôi trồng nhân tạo trong điều kiện nhà màng và cây mọc ngoài tự nhiên đều có hợp chất kinsenoside, tuy nhiên cây mọc ngoài tự nhiên có hàm lượng cao hơn (7,38%) cây nuôi trồng nhân tạo (7,19%). Hiện nay đã có công bố đánh giá hợp chất kinsenoside trong cây Lan kim tuyến loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. nhưng còn rất ít. Phan Xuân Huyền và cộng sự (Huyền và cs., 2021) cho thấy hợp chất kinsenoside của loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. nuôi trồng đã ra hoa đạt 10,92%, cũng công bố này cho thấy hàm lượng kinsenoside của loài *Anoectochilus formosanus* nuôi trồng đạt 8,53%. Một công bố khác của Phan Xuân Huyền và cộng sự (Huyền và cs., 2020) cho thấy hàm lượng kinsenoside của loài *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downies nuôi trồng 8 tháng tuổi đạt 5,89%, 14 tháng tuổi đạt 10,67%. Một số công bố khác cho thấy: kết quả phân tích 3 loài Lan kim tuyến thu hợp chất kinsenoside từ 6,37 - 22,66% và hàm lượng trung bình là 15% (Chao et al., 2017), tinh chế 180 mg kinsenoside từ 1,0 g dược liệu khô Lan kim tuyến (Du et al., 2008b).

Như vậy, cây Lan kim tuyến cấy mô nuôi trồng nhân tạo trong điều kiện nhà màng có khả năng tích lũy hợp chất chính kinsenoside.

Bảng 3.5. Định lượng hợp chất chính kinsenoside của cây Lan kim tuyến nuôi trồng 8 tháng tuổi và cây ngoài tự nhiên đã ra hoa

Độ tuổi của cây	Hàm lượng kinsenoside (% theo khối lượng khô)
Cây nuôi trồng 8 tháng tuổi	7,19* ± 0,23
Cây ngoài tự nhiên đã ra hoa	7,38 ± 0,90

Chú thích: *Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nhận được khi tiến hành nghiên cứu khả năng nhân giống ex vitro và sinh trưởng cây Lan kim tuyến loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl., chúng tôi rút ra kết luận: nồng độ của NAA 0 ppm hoặc 1.000 ppm đều phù hợp lên khả năng tạo rễ ex vitro và sinh trưởng của cây; các vị trí đốt thân của cây đều có khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi ở điều kiện ex vitro và thích hợp làm nguồn nguyên liệu để nhân giống; giá thể đất sạch vụn xơ dừa là tốt nhất để chuyên cây cấy mô ra điều kiện ngoài vườn ươm; phun phân Nitrophoska kết hợp với phân Sinh học Vinh Thanh là tốt nhất đến sự sinh trưởng của cây; cây Lan kim tuyến cấy mô nuôi trồng nhân tạo trong điều kiện nhà màng có khả năng tích lũy hợp chất chính kinsenoside.

STUDY ON THE PROPAGATION, GROWTH, AND ACCUMULATION OF KINSENOSE COMPOUNDS OF THE ANOECTOCHILUS ROXBURGHII (WALL.) LINDL. ORCHID UNDER EX VITRO CONDITIONS

Vo Tan Hung¹, Phan Xuan Huyen²

Received Date: 26/12/2022; Revised Date: 15/3/2023; Accepted for Publication: 30/7/2023

ABSTRACT

Anoectochilus roxburghii (Wall) Lindl. is one of the precious and good herbs for human health. In this study, we investigated the ability of ex vitro propagation, plant growth and the accumulation of the kinsenoside compound of tissue-cultured *A. roxburghii* (Wall) Lindl. under greenhouse conditions. The results showed that the concentration of NAA ranging from 0 to 1000 ppm were suitable for ex vitro rooting ability and plant growth, with survival rate and rooting explant rate of 100%. The nodes of the plant were capable of regeneration and shoot growth under ex vitro conditions and proved to be suitable materials for ex vitro propagation of *A. roxburghii* (Wall) Lindl. with 100% shoot regrowth and survival rates. Clean soil substrate of coconut fiber powder was the most suitable medium for transferring tissue-cultured plants to outdoor greenhouse conditions, with a plant height of 9.19 cm, root length of 7.11 cm, leaf length of 2.68 cm, leaf width of 1.86 cm, fresh weight of 0.92 g/plant and 100% survival rate. The combination of Nitrophoska fertilizer and Vinh Thanh Biological fertilizer exhibited the best effects on plant growth, with a plant height of 13.29 cm, root length of 11.26 cm, leaf length of 3.54 cm, leaf width of 2.78 cm, fresh weight of 2.62 g/plant and a survival rate of 86.67%. *A. roxburghii* grew under greenhouse condition at 8 months old showed the ability to accumulate kinsenoside up to 7.19% by dry weight.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii*, plant height, root length, kinsenoside, growth, survival rate.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anh, N.T., Khoa, P.N. & Phụng, T.T.B. (2013). Nghiên cứu nuôi cấy lát mỏng trong nhân giống in vitro cây Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.. Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013, 690-694.
- Chao, Z., Jian-guo, W., Ju, Y., Jin-zhong, W., Cheng-jian, Z. & Yan-bin, W. (2017). Content determination of kinsenoside in Jin-Xian-Lian from three *Anoectochilus* species by HPLC-ELSD. *Science and Technology of Food Industry*, 65(44), 9685-9692.
- Chang, D.C.L., Chou, L.C. & Lee, G.C. (2007). New cultivation methods for *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Orchid Science Biotechnology*, 1(2), 56-60.
- Cheng, S.F. & Chang, D.C.N. (2009). Growth responses and changes of active components as influenced by elevations and orchid mycorrhizae on *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Botanical Studies* 50: 459-466.
- Chính Phủ (2021). Nghị định của Chính phủ số 84/2021/NĐ-CP, 2021. Sửa đổi, bổ sung một số điều của Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22/01/2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp.
- Du, X.M., Irino, N., Uto, T., Morinaga, O. & Shoyama, Y. (2008a). Micropropagation of *Anoectochilus formosanus* Hayata in vitro and pharmacological and chemical investigations. *Phytochemistry*, 9, 79-87.
- Du, X.M., Irino, N., Furusho, N., Hayashi, J. & Shoyama, Y. (2008b). Pharmacologically active compounds in the *Anoectochilus* sp. and *Goodyera* species L.. *Journal of Natural Medicines*, 62, 132-148.
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and F tests. *Biometrics*, 11, 1-42.

¹Gia Lai Viet Nga joint-stock Company, Kbang district, Gia Lai province;

²Tây Nguyên Institute of Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology;

Corresponding author: Phan Xuan Huyen; Tel: 0919066566; Email: phanxuanhuyen1974@gmail.com.

- Gangaprasad, A. Latha, P.G. & Seeni, S. (2000). Micropropagation of terrestrial orchids, *Anoectochilus sikkimensis* and *Anoectochilus regalis*. *Indian J Exp biol* 38(2): 149-154.
- Ghosh, A., Dey, K., Mani, A, Bauri, F. K, & Mishra, D. K. (2017). Efficacy of different levels of IBA and NAA on rooting of Phalsa (*Grewia asiatica* L.) cuttings. *International Journal of Chemical Studies*, 5(6): 567-571.
- Hà, Đ.V. (2016). Nhân giống Cẩm tú cầu (*Hydrangea macrophylla*) bằng phương pháp giâm hom. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 2, 3-11.
- Hà, Đ.V. & Yên, N.T. (2017). Nghiên cứu nhân giống cây Dạ hợp (*Magnolia coco* Lour.) bằng phương pháp giâm hom. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ lâm nghiệp*, 4, 3-9.
- Hộ, P.H. (2000). Cây cỏ Việt Nam, quyển III. NXB TP. Hồ Chí Minh.
- Hsieh, W.T., Tsai, C.T., Wu, J.B., Hsiao, H.B., Yang, L.C. & Lin, W.C. (2011). Kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoectochilus formosanus*, inhibits carbon tetrachloride induced Kupffer cells mediated liver damage. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2): 440-449.
- Huyền, P.X., Hoàng, N.T.P., Hằng, N.T.T., Khiêm, Đ.V., Hải, T.Đ., Anh, T.T.H. & Hân, N.H. (2016). Nghiên cứu đánh giá sự sinh trưởng phát triển cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downies) nuôi trồng trong nhà màng và phân tích định lượng hợp chất kinsenoside. *Tạp chí Đại học Khoa học Tây Nguyên*, 43, 40-47.
- Huyền, P.X., Ngoan, H.T. & Hoàng, N.T.P. (2017). Nghiên cứu nhân giống in vitro cây sâm bố chính (*Hibicus sagittifolius* Kurz) thông qua nuôi cấy chồi ngủ đốt thân. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15(5), 664-672.
- Huyền, P.X., Anh, T.T.H., Hoàng, N.T.P., Hằng, N.T.T., Khiêm, Đ.V. & Cương, H.V. (2018). Nghiên cứu nhân giống in vitro và ảnh hưởng của phân bón lá đến sinh trưởng cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus formosanus* Hayata) tại Lâm Đồng. *Tạp chí Dược liệu*, 23(1), 52-59.
- Huyền, P.X., Hoàng, N.T.P., Hằng, N.T.T., Khiêm, Đ.V., Hải, T.Đ., Anh, T.T.H. & Hân, N.H. (2020). Đánh giá sự sinh trưởng phát triển cây lan gấm (*Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downies) được nuôi trồng trong nhà màng và phân tích định lượng hợp chất kinsenoside. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Tây Nguyên*, 43, 40-47.
- Huyền, P.X., Hằng, N.T.T., Hoàng, N.T.P. & Khiêm, Đ.V. (2021). Đánh giá sự sinh trưởng phát triển và hợp chất kinsenoside của các loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus* sp.) nuôi trồng trên giá thể trong điều kiện nhà màng. Báo cáo khoa học hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2021, 177-181.
- Huyền, P.X., Hằng, N.T.T. & Khiêm, Đ.V. (2022a). Nghiên cứu nhân giống in vitro cây tầm bóp Nam Mỹ (*Physalis peruviana* Linnaeus). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, chuyên đề công nghệ sinh học tháng 10*, 52-59.
- Huyền, P.X., Hằng, N.T.T., Hoàng, N.T.P. & Khiêm, Đ.V. (2022b). Nghiên cứu khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi in vitro cây việt quất (*Vaccinium myrtillus* Linn.) thông qua nuôi cấy đốt thân. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Kỳ 1+2 tháng 2/2022, 42-50.
- Ket, N.V., Hahn, E.J., Park, S.Y., Chakrabarty, D. & Paek, K.Y. (2004). Micropropagation of an Endangered Orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia Plantarum* 48, 339–344 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000041084.77832.11>
- Khudhur, S.A. & Omer, T.J. (2015). Effect of NAA and IAA on stem cuttings of *Dalbergia*. *Journal of Biology and Life Science*, 6(2), 208-220.
- Lin, X., Jiang, X., Yang, Z., Ma, X., Yan, X. & Yang, L. (2018) Tissue culture rapid propagation and transplantation techniques of *Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl.. *Medicinal Plant*, 9(1), 43-46.
- Ling, S., Yang, C.H., Ming, P.Q., Rong, H.R. and Bin, B.Y. (2019). Growth effects of *Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl. under two cultivation modes. *Journal of Southern Agriculture*, 50(10), 2263-2270.
- Luận, V.Q., Phương, T.Đ., Luận, T.C. & Nhật, D.T. (2015). Vi nhân giống và định tính hoạt chất β -Sitosterol trên cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(4), 1113-1125.
- Mai, N.T. & Trường, M. (2019). Nghiên cứu nuôi cấy lỏng thu sinh khối Lan kim tuyến bản địa *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in vitro. *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*

Minh, 14(1), 97-107.

- Minh, P.X.B., Phương, B.T.T., Sơn, P.H., Hoi, T.M., Lan, N.T.P. & Thảo, V.T. (2018). Ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng bằng đèn LED lên khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi hai loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus annamensis* Aver. và *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Sinh học*, 40(1), 32-38.
- Nguyễn, N.T. & Én, L.H. (2015). Nghiên cứu nhân giống cây Tom trong băng hom. *Tạp chí Dược liệu*, 6, 388-393.
- Phê, P.V., Gấm, N.T.H. & Thành, N.T. (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, 248-253.
- Phượng, T.T.B. & Khoa, P.N. (2013). Nhân giống *in vitro* cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.). *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, 79(1), 41-46.
- Shiau, Y.J., Sagare, A.P., Chen, U.C., Yang, S.R. & Tsay, H.S. (2002). Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. *Bot Bull Acad Sin* 43: 123-130.
- Xiêm, N.T.H., Lợi, L.S. & Hào, L.T. (2019). Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể trồng đến sinh trưởng của cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) tại Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 197(04), 9-14.
- Zhang, A., Wang, H., Shao, Q., Xu, M., Zhang, W., & Li, M. (2015). Large scale *in vitro* propagation of *Anoectochilus roxburghii* for commercial application: Pharmaceutically important and ornamental plant. *Industrial Crops and Products*, 70, 158-162.