

NHÂN NHANH IN VITRO LAN THẠCH HỌC (DENDROBIUM NOBILE LINDL.)

NGUYỄN THỊ LÀI, PHẠM HƯƠNG SƠN
ĐẶNG XUYẾN NHƯ, PHAN XUÂN BÌNH MINH

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm
Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN

Lan Thạch học (*Dendrobium nobile* Lindl.) là một loài lan rừng đẹp của Việt Nam, có giá trị y học và kinh tế cao. Do bị khai thác mang tính tận diệt để buôn bán trái phép và những khó khăn về kỹ thuật nhân giống nên loài lan này đang phải đối mặt với nguy cơ bị tuyệt chủng.

Các kết quả nghiên cứu nhân giống lan Thạch học bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào nhằm bảo tồn và phát triển loài lan quý hiếm này của Việt Nam đã cho thấy: ở giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu, môi trường thích hợp nhất là VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch + 1,0 mg/L BA + 0,4 mg/L IAA. Môi trường VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch + 0,5 mg/L α NAA + 3,5 mg/L BA + 100 g/L dịch chuối + 2 g/L pepton là môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi in vitro, đạt hệ số nhân cao nhất là 15,2 lần sau 8 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất, chất lượng bộ rễ tốt nhất trong môi trường VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch + 1 g/L than hoạt tính + 1 mg/L α NAA.

Từ khóa: cây thuốc, *Dendrobium nobile* Lindl., nuôi cấy mô tế bào, lan rừng.

IN VITRO PROPAGATION OF ORCHID (DENDROBIUM NOBILE LINDL.)

Summary

Dendrobium nobile Lindl. is one of beautiful wild orchids of Vietnam. Besides economic value, it is used as a traditional medicine. For the illegal exploitation of orchids for trading and weak technique skills, this orchid is being wiped out.

In this research, we investigated the multiplication of *D. nobile* Lindl. by plant tissue culture technique to conservation and develop this orchids in Vietnam. The results indicated that: In the initial culture stage, the shoot creation of orchid *D. nobile* Lindl. is cultured on the VW medium supplemented with 20 g/L sucrose + 8 g/L agar + 100 ml/L coconut water + 1.0 mg/L BA + 0.4 mg/L IAA.

The most appropriate medium for fast in vitro propagation of shoots was VW medium supplemented with 20 g/L sucrose + 8 g/L agar + 100 ml/L coconut water + 0.5 mg/L α NAA + 3.5 mg/L BA + 100 g/L banana juice + 2 g/L pepton for multiple shoot induction, the coefficient achieve the highest percentage (15.2) after 8 weeks being cultured. Root formation of shoots were carried out on VW medium supplemented with 20 g/L sucrose + 8 g/L agar + 100 ml/L coconut water + 1 mg/L α NAA + 1 g/L activated charcoal gave the best.

Đặt vấn đề

Lan Thạch học thuộc họ lan Orchidaceae, không những là một loài lan rừng có giá trị thẩm mỹ, kinh tế cao mà nó còn là một loài dược liệu quý hiếm của Việt Nam. Lan Thạch học phân bố tương đối rộng ở nhiều nước châu Á như Thái Lan, Mianma, Trung Quốc, Malaysia, Ấn Độ, Lào, Butan, Nepal... Ở Việt Nam, lan Thạch học có ở các tỉnh miền núi phía Bắc, từ Nghệ An trở ra. Ở miền Nam, cây thường mọc ở một số vùng núi cao từ 1.000 m trở lên như Ngọc Linh, Bi Đúp, Langbian...[1].

Theo y học cổ truyền Trung Quốc, lan Thạch học có tác dụng tốt cho dạ dày, làm tăng tiết dịch, dưỡng âm, trừ nhiệt, làm thuốc bổ và tăng lực toàn thân, chữa liệt

dương, khát nước do âm hư hoặc suy giảm dịch cơ thể, ăn không ngon, buồn nôn, suy nhược cơ thể sau khi bị bệnh nặng, thị lực giảm. Liều dùng 6-12 g cây khô, hoặc 15-30 g cây tươi [1]. Theo nghiên cứu của Liu và Zhao (2003), lan Thạch học có tác dụng dưỡng âm, làm tăng tiết dịch, hạ nhiệt [5].

Theo nghiên cứu của Lee và cộng sự (1999), cây lan Thạch học có chứa 4,7-dihydroxy-2-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene và denbinobin. Theo Zhao và cộng sự (2001), cây lan Thạch học chứa hoạt chất sesquiterpene glycosides, dendroside A và dendronobilosides. Hoạt chất moscatilin cũng được Miyazawa và cộng sự chiết xuất từ cây lan Thạch học [6]. Chen và cộng sự (1995) đã phát hiện ra hoạt chất aquous từ dịch chiết lá của lan Thạch học. Các chất Sesquiterpene glycosides với alloaromadendrane, nemmotin và loại aglycones picrotoxane cũng được phân lập từ thân cây lan Thạch học [10].

Hiện nay, loài cây này đang bị khai thác ráo riết để xuất sang Trung Quốc làm thuốc và có nguy cơ bị tuyệt chủng. Do vậy, cần có các biện pháp kỹ thuật để nhân giống, phục hồi và phát triển loài dược liệu có giá trị này của Việt Nam. Hiện tại, các nghiên cứu về nuôi cấy mô lan Thạch học vẫn còn rất ít. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu nhân nhanh lan Thạch học bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, nhằm góp phần bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý hiếm của Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu

Vật liệu

- Nguyên liệu được dùng trong nhân giống là các chồi từ cây lan Thạch học có chiều cao khoảng 5-7 cm được thu thập ở Hà Giang.

- Chất khử trùng dùng trong thí nghiệm là NaOCl.

- Môi trường nuôi cấy có khoáng đa lượng Vacin & Went 1949 như sau (mg/L): KNO_3 525, $(NH_4)_2SO_4$ 500, KH_2PO_4 250, $Ca_3(PO_4)_2 \cdot 2H_2O$ 200, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 122. Vi lượng và Fe-EDTA theo môi trường MS, thiamin HCl 1 mg/L, nước dừa 100 ml/L, đường 20 g/L, thạch 8 g/L.

- Môi trường tạo chồi có bổ sung chất kích thích sinh trưởng và phụ gia hữu cơ là: 6-BenzylAdenin (BA), α -Naphthalene Acetic Acid (α NAA), Kinetin (KI), b-indol acetic acid (IAA), pepton, dịch chuối.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng $25 \pm 2^\circ C$, ẩm

độ 60-70%, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

Phương pháp

Tạo vật liệu khởi đầu

Các chồi thu hái về được rửa sạch, khử trùng bằng NaOCl 30% (15 phút), sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng và bóc lá bao bên ngoài cắt lấy các mầm ngủ của chồi cấy trên môi trường Vacin Went (VW) + 20 g/L đường + 100 ml/L nước dừa + 8 g/L thạch và bổ sung chất kích thích sinh trưởng IAA, BA ở các nồng độ khác nhau.

Giai đoạn nhân nhanh

Các chồi in vitro thu được trong nuôi cấy ban đầu chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi VW + 20 g/L đường + 100 ml/L nước dừa + 8 g/L thạch, pH 5,8. Tiến hành các thí nghiệm xác định ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau gồm: KI (0,0-1,0 mg/L), BA (0,0-4,0 mg/L) + α NAA (0,5 mg/L), các chất bổ sung gồm pepton (0-4 g/L) và dịch chuối (0-200 g/L) tới giai đoạn nhân nhanh của lan Thạch học.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Khi các chồi đạt chiều cao khoảng 3-5 cm với khoảng 3-4 lá thì chuyển sang giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh. Các thí nghiệm được đặt trên môi trường (VW + 20 g/L đường + 100 ml/L nước dừa + 8 g/L thạch, pH 5,8). Tiến hành các thí nghiệm xác định ảnh hưởng của than hoạt tính có hàm lượng (0-2 g/L), chất điều tiết sinh trưởng α NAA (0-2 mg/L) tới giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.

Các thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 3 lần lặp lại.

Theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu như: khả năng sinh trưởng của cây, hệ số nhân chồi (lần), chiều cao trung bình (cm), số lá trung bình (lá/cây), số rễ trung bình (rễ/cây)... sau 8 tuần nuôi cấy.

Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng nuôi cấy mô - Trung tâm Sinh học Thực nghiệm (Viện Ứng dụng Công nghệ).

Xử lý thống kê

Các số liệu thu thập được phân tích thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và ANOVA.

Kết quả và thảo luận

Tạo vật liệu khởi đầu

Ảnh hưởng của BA đến quá trình tạo chồi của

NGHIÊN CỨU - TRAO ĐỔI

mẫu nuôi cấy ban đầu

BA thuộc nhóm cytokinin, chúng được bổ sung vào môi trường chủ yếu để kích thích sự phân chia tế bào và phân hóa chồi bất định, tăng cường khả năng tổng hợp chất diệp lục của cây. Để theo dõi ảnh hưởng của BA lên quá trình hình thành cụm chồi, chúng tôi bổ sung BA với nồng độ từ 0,5 mg/L đến 4,0 mg/L vào môi trường và kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BA được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: Ảnh hưởng của BA và BA + IAA đến quá trình tạo chồi của mẫu nuôi cấy ban đầu

Chất kích thích sinh trưởng (mg/L)		Hệ số nhân chồi (lần)
BA	IAA	
0 (Đ/C)	-	1,10 b
0,5	-	1,45 ab
1,0	-	1,60 ab
1,5	-	1,75 ab
2,0	-	1,90 ab
2,5	-	2,20 a
3,0	-	2,34 a
3,5	-	2,05 a
4,0	-	1,65 ab
LSD 0,05		0,91
CV%		3,0
0 (Đ/C)	0,4	1,10 f
0,5	0,4	2,60 b
1,0	0,4	2,95 a
1,5	0,4	2,70 b
2,0	0,4	2,25 c
2,5	0,4	1,90 d
3,0	0,4	1,50 e
LSD 0,05		0,11
CV%		3,0

Ghi chú: các thí nghiệm được bố trí trên môi trường (VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, bổ sung BA có tác dụng không nhiều trong việc làm gia tăng số chồi của lan Thạch học. Như vậy, nếu bổ sung đơn lẻ BA thì không có tác dụng rõ rệt đối với giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu của lan Thạch học.

Ảnh hưởng của tổ hợp BA + IAA đến quá trình tạo chồi của mẫu nuôi cấy ban đầu

Theo nghiên cứu của Prabhat Singh (2009), khi bổ sung 2,5 mg/L BA + 0,4 mg/L IAA có tác dụng rất hiệu quả đến việc nhân chồi của cây Rauwolfia

serpentina L. Trên cơ sở đó, các tác giả đã bổ sung vào môi trường nuôi cấy IAA ở nồng độ 0,4 mg/L kết hợp với BA nồng độ 0,5-3,0 mg/L vào môi trường tạo chồi lan Thạch học. Kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Khi bổ sung tổ hợp BA + IAA vào môi trường nuôi cấy có tác dụng rất hiệu quả đến việc tạo chồi từ mẫu cấy ban đầu sau 8 tuần nuôi cấy. Trong đó, ở nồng độ 1,0 mg/L BA + 0,4 mg/L IAA cho tỷ lệ mẫu bật chồi cao hơn cả (đạt 2,95 lần). Tuy nhiên, nồng độ BA càng cao càng làm ảnh hưởng tới sức sống của mẫu cấy, mẫu còi, yếu.

Nhân nhanh chồi

Ảnh hưởng của Ki đến nhân nhanh chồi lan Thạch học in vitro

Kết quả ảnh hưởng của Ki lên hệ số nhân chồi lan Thạch học được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của Ki và α NAA + BA đến khả năng nhân nhanh chồi lan Thạch học in vitro

Chất kích thích sinh trưởng (mg/L)			Hệ số nhân chồi (lần)
Ki	α NAA	BA	
0 (Đ/C)	-	-	1,00 e
0,2	-	-	1,50 d
0,4	-	-	2,20 c
0,6	-	-	2,50 b
0,8	-	-	3,10 a
1,0	-	-	2,60 b
LSD 0,05			0,12
CV%			3,7
-	0,5	0 (Đ/C)	1,20 h
-	0,5	0,5	2,84 g
-	0,5	1,0	4,25 f
-	0,5	1,5	5,20 e
-	0,5	2,0	6,10 d
-	0,5	2,5	6,30 d
-	0,5	3,0	8,30 b
-	0,5	3,5	9,20 a
-	0,5	4,0	7,15 c
LSD 0,05			0,51
CV%			7,5

Ghi chú: các thí nghiệm được bố trí trên môi trường (VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch)

Số chồi đạt tỷ lệ cao nhất ở nồng độ Ki 0,8 mg/L. Tại các công thức thí nghiệm có nồng độ Ki lớn hơn 0,8 mg/L thì hệ số chồi giảm. Theo Pierik (1997), ở nồng độ Ki cao (1,0 mg/L) có tác dụng kích thích hình thành chồi nách, ức chế sự phát triển rễ. Tuy nhiên, đối với lan Thạch học khi tăng nồng độ lên

1,0 mg/L hệ số nhân chồi có xu hướng giảm dần và chồi có hiện tượng bị vàng.

Ảnh hưởng của tổ hợp BA + αNAA đến nhân nhanh chồi lan Thạch học in vitro

Theo Bijaya Pant (2012), ở nồng độ 0,5 mg/L αNAA + 1,5 mg/L BA có tác dụng rất tốt đến hệ số nhân chồi lan *D. primulinum* Lindl. Trên cơ sở đó, các tác giả đã bổ sung vào môi trường nuôi cấy BA với nồng độ 0,5-4,0 mg/L kết hợp với αNAA ở nồng độ 0,5 mg/L vào môi trường nhân chồi lan Thạch học. Kết quả được trình bày ở bảng 2. Theo đó, tất cả các công thức có bổ sung BA và αNAA đều cho tỷ lệ tạo chồi là 100%. Ở môi trường có 0,5 mg/L αNAA kết hợp với 3,5 mg/L BA là thích hợp nhất cho khả năng tạo chồi, hệ số nhân đạt cao nhất (9,2 lần).

Ảnh hưởng của pepton đến nhân nhanh chồi lan Thạch học in vitro

Kết quả trong bảng 3 cho thấy, ở môi trường có nồng độ 0,5 mg/L αNAA kết hợp với 3,5 mg/L BA là thích hợp nhất cho khả năng tạo chồi, hệ số nhân cao nên các tác giả chọn nồng độ này để tiếp tục cho việc nghiên cứu ảnh hưởng của pepton đến nhân nhanh chồi lan Thạch học in vitro.

Bảng 3: ảnh hưởng của pepton và dịch chuối đến khả năng nhân nhanh chồi lan Thạch học in vitro

Hàm lượng các chất bổ sung (g/L)		Hệ số nhân chồi (lần)
Pepton	Dịch chuối	
0 (Đ/C)	-	9,14 d
1,0	-	10,50 c
2,0	-	13,32 a
3,0	-	12,50 b
4,0	-	9,35 d
LSD 0,05		0,40
CV%		2,2
2,0	0 (Đ/C)	12,50 c
2,0	50	12,95 b
2,0	100	15,20 a
2,0	150	13,10 b
2,0	200	13,00 b
LSD 0,05		0,14
CV%		1,5

Ghi chú: các thí nghiệm được bố trí trên môi trường (VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch + 0,5 mg/L αNAA + 3,5 mg/L BA)

Các kết quả bảng 3 cho thấy, hệ số nhân lan Thạch học đạt cao nhất khi bổ sung pepton ở nồng độ 2 g/L là 13,32 lần. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của Mohammad (2012), ông cho rằng pepton có tác dụng kích thích nảy chồi và sinh trưởng của *Dendrobium*, và ở mức sai số đáng tin cậy so với đối chứng.

Ảnh hưởng của dịch chuối đến nhân nhanh chồi lan Thạch học in vitro

Từ kết quả trên, các tác giả chọn 2 g/L pepton và bổ sung dịch chuối vào môi trường nuôi cấy ở hàm lượng khác nhau để tiếp tục nhân các cụm chồi. Kết quả ở bảng 3 cũng cho thấy, bổ sung dịch chuối ở nồng độ 100 g/L cho hệ số nhân đạt cao nhất so với các nồng độ khác ở mức sai số đáng tin cậy, đạt tới hệ số nhân là 15,2 lần. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu của Zhou Han-song (2009) cho rằng, bổ sung dịch chuối có tác dụng kích thích sự tạo chồi và sinh trưởng cây con của *Dendrobium*.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Ảnh hưởng của than hoạt tính

Theo Misson và cộng sự (1983), Kelin và Bopp (1971), bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy có tác dụng rất tốt với một số loài lan vì than hoạt tính có khả năng hấp thụ chất thải độc màu nâu đen, tạo điều kiện cho quá trình phân hóa và sinh trưởng của rễ cây in vitro.

Bảng 4: ảnh hưởng của than hoạt tính và αNAA tới giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Hàm lượng than hoạt tính (g/L)	Nồng độ αNAA (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Số rễ/cây
0 (Đ/C)	-	4,31 e	4,00 c	1,50 c
0,5	-	4,63 d	4,30 bc	2,15 b
1,0	-	6,50 a	5,18 a	4,20 a
1,5	-	5,80 b	4,70 b	4,18 a
2,0	-	5,50 c	4,40 bc	4,10 a
LSD 0,05		0,12	0,44	0,29
CV%		1,2	1,5	1,5
1,0	0 (Đ/C)	4,30 e	4,00 c	4,37 c
1,0	0,5	5,65 c	4,50 b	5,15 b
1,0	1,0	7,30 a	5,90 a	6,50 a
1,0	1,5	6,32 b	5,80 a	6,10 a
1,0	2,0	5,05 d	4,60 b	5,20 b
LSD 0,05		0,41	0,47	0,48
CV%		2,4	4,9	4,7

Ghi chú: các thí nghiệm được bố trí trên môi trường (VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch)

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy có tác dụng tốt đến sự sinh trưởng và phát triển của cây lan Thạch học, trong đó ở hàm lượng 1,0 g/L các chỉ số chiều cao, số lá, số rễ đạt cao hơn so với các công thức khác, bao gồm cả đối chứng.

Ảnh hưởng của α NAA

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy, tại 1,0 g/L than hoạt tính có tác dụng rất tích cực tới việc tạo cây hoàn chỉnh của cây lan, nhưng số rễ của cây vẫn chưa được khỏe và nhiều. Vì vậy, các tác giả chọn than hoạt tính có hàm lượng 1,0 g/L kết hợp với các nồng độ α NAA khác nhau vào môi trường nuôi cấy để tiếp tục các thí nghiệm nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả nghiên cứu sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy, ở các công thức bổ sung α NAA với nồng độ từ 0,5-2,0 mg/L cho kết quả tốt hơn so với không bổ sung α NAA. Tại nồng độ 1,0 mg/L α NAA sau 8 tuần nuôi cấy cây đạt các chỉ tiêu sinh trưởng tốt nhất. Chiều cao cây đạt 7,30 cm, số lá đạt 5,90 lá/cây, số rễ đạt 6,50 rễ/cây. Khi tăng nồng độ α NAA lên 1,5 mg/L thì cây có hiện tượng bị vàng lá hơn hẳn so với đối chứng.

Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi đi đến một số kết luận như sau:

Môi trường thích hợp cho tạo vật liệu khởi đầu là VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L

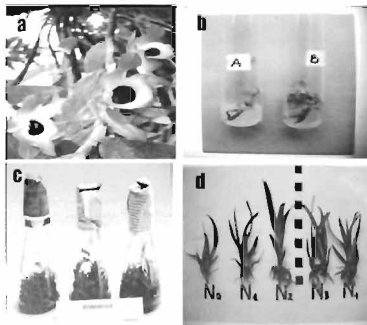
thạch + 1,0 mg/L BA + 0,4 mg/L IAA.

Môi trường thích hợp nhất cho giai đoạn nhân nhanh là VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch + 0,5 mg/L α NAA + 3,5 mg/L BA + 100,0 g/L dịch chuối + 2,0 g/L pepton có tác dụng làm tăng hệ số nhân của lan Thạch học.

Môi trường VW + 100 ml/L nước dừa + 20 g/L đường + 8 g/L thạch + 1,0 mg/L α NAA + 1,0 g/L than hoạt tính có tác dụng tích cực đến một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây con ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh ■

Tài liệu tham khảo

- Đỗ Huy Bích và cộng sự, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam - Tập II, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, 2006.
- Bijaya Pant, Deepa Thapa, In vitro mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium pmlinum* Lindl through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology* Vol 11(42), 2012.
- Chen S, Li Y, Wu Y, Zhou Z, Sun L, Effect of *Dendrobium nobile* Lindl. on gastric acid secretion, serum gastrin and plasma somatostatin concentration. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 20: 181-121, 1995.
- Lee Y.S., Ha J.H., Yong C.S., Lee D.U., Huh K., Kang Y.S., Lee S.H., Jung M.W., Kim J.A. Inhibitory effects of constituents of *Gastrodia elata* Bl. on glutamate-induced apoptosis in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Archives Pharm. Res.* 22, 404-409, 1999.
- Liu Q.F., Zhao W.M., A new dedonbrine-type alkaloid from *Dendrobium nobile* Chin. *Chemical Lett* 14:278-279, 2003.
- Miyazawa M., Shimamura H., Nakamura S., Sugiura W., Kosaka H., Kameoka H., Moscatilin from *Dendrobium nobile*, a naturally occurring bibenzyl compound with potential antimutagenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2163-2167, 1999.
- Mohammad Musherof Hossain, Madhu Sharma, Promila Pathak, In vitro propagation of *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae)-seed germination to flowering. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* DOI.10.1007/s 13562-012-0124-3, 2012.
- Prenk R.L.M., In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 149-158, 1987.
- Prabhat Singh, Anand Singh, Arvind K. Shukla, Lalit Singh, Vaena Pande and Tapan K., Somatic Embryogenesis And In Vitro Regeneration Of An Endangered Medicinal Plant Sarpagandha (*Rauvolfia serpentina*, L.). *Researcher* 1(3):46-53, 2009.
- Yeet Q, Qin G, Zhao W, Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile*. *Phytochemistry* 61: 885-890, 2002.
- Zhao Han-song Huang Xian-zhou, Study on tissue culture and micropropagation of *Dendrobium pierardii* Journal of Ningde Teachers College (Natural Science). DOI: 0.2009-02-022, 2009.
- Zhao W, Ye Q, Tan X, Jiang H, Li X, Chen K, Kinghom A.D, Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. *Journal Natural Products*.64:1196-2000, 2001.



Lan Thạch học và các giai đoạn nhân giống: a - cây lan Thạch học, b - giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu, c - giai đoạn nhân nhanh, d - giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh