

Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu *in vitro* cây Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.)

Trần Thị Triệu Hà*, Phan Thị Phương Nhi, Lê Thị Thu Hằng

Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế

Ngày nhận bài 28/8/2017; ngày chuyển phản biện 1/9/2017; ngày nhận phản biện 26/9/2017; ngày chấp nhận đăng 29/9/2017

Tóm tắt:

Có nhiều phương pháp để tạo nguồn vật liệu khởi đầu phục vụ công tác nhân giống *in vitro*. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã sử dụng các loại mô của cây Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) làm vật liệu nghiên cứu nhằm tìm ra loại mô, môi trường thích hợp tạo vật liệu khởi đầu *in vitro* và phương pháp khử trùng tối ưu nhất. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 9 phút cho hiệu quả tốt nhất. Môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung 3 mg/l BAP cho kết quả tạo chồi tốt nhất khi nuôi cấy chồi đỉnh và chồi nách với số chồi trên mẫu lần lượt là 2,13 chồi và 2,5 chồi. Mô phân sinh rễ là loại mô thích hợp nhất để tạo callus (mô sẹo) trên môi trường cơ bản MS có 3 mg/l 2,4-D với tỷ lệ mô tạo callus là 60%, chất lượng callus tốt. Môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung 4 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA và 0,5 mg/l kinetin thích hợp nhất cho quá trình phân hóa các tế bào callus thành các PLB (Protocorm-like body) với tỷ lệ callus tạo PLB là 33,33%, các PLB phát triển xanh tốt.

Từ khóa: Mẫu cấy, Vanilla, vật liệu khởi đầu.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Vanilla là một giống lan nhiệt đới thuộc họ Orchidaceae. Tinh dầu vani tách chiết từ quả Vanilla được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm... Mặc dù hương liệu vani có thể tổng hợp nhân tạo nhưng vani tự nhiên vẫn rất được ưa chuộng và có giá trị cao hơn 100 lần so với vani nhân tạo [1]. Loài cây này được trồng nhiều ở Madagasca, Mexico, Indonesia... với sản lượng hàng năm trên thế giới đạt khoảng 3.500 tấn [2]. Hiện nay, cây Vanilla đã được đưa vào trồng thử nghiệm ở một số tỉnh của Việt Nam như Bình Thuận, Đắk Lắk, Thừa Thiên - Huế. Việc trồng khảo nghiệm loài lan Vanilla ở Việt Nam rất có ý nghĩa, vì nhóm cây trồng này thích hợp với khí hậu nhiệt đới nhiều mưa, có giá trị kinh tế rất cao và có thể sử dụng hiệu quả nguồn lao động nông nhân ở các nhà vườn, trang trại.

Ở ngoài tự nhiên, cây Vanilla được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp giâm cành nên có hệ số nhân thấp. Hơn nữa, việc cắt cành có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và phát triển cũng như năng suất của cây mẹ [3]. Kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* với ưu điểm là hệ số nhân lớn và cây có độ đồng đều cao nên đã được ứng dụng để nhân giống nhiều loài cây có giá trị kinh tế. Ngoài phương pháp tạo chồi trực tiếp, kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* còn có thể thực hiện thông qua phương pháp gián tiếp là tạo callus, tạo phôi, tạo protocorm, hoặc PLBs. Để đáp ứng nhu cầu ngày càng cao về cây giống Vanilla, các nhà khoa học trên thế giới và ở Việt Nam đã tập trung vào nghiên cứu ứng

dụng kỹ thuật nhân giống *in vitro* cây Vanilla và đã đạt được nhiều thành công. Nghiên cứu của các tác giả K. Kalimuthu, R. Senthilkumar, N. Murugalatha (2006); P.S. George, G.A. Ravishankar (1997); S. Geetha, S.A. Shetty (2000); H.E. Lee-Espinosa, et al. (2008); A.R. Zuraida, K. Izzati1, O.A. Nazreena1, W. Zaliha (2013); Z. Abebe, A. Mengesha, A.Teresa, W. Tefera (2009); Vũ Thị Mỹ Liên (1993); Vũ Ngọc Phượng và cộng sự (2007) chủ yếu tập trung nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Vanilla từ nuôi cấy chồi đỉnh và đoạn thân mang mắt ngủ [3-10].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu *in vitro* cây Vanilla từ nuôi cấy các cơ quan khác nhau nhằm mục đích tạo số lượng lớn các cấu trúc có thể phát triển thành cây hoàn chỉnh như chồi, PLBs...

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được sử dụng cho các thí nghiệm là chồi đỉnh, chồi nách, mô lá, mô thân, mô phân sinh rễ của cây Vanilla khỏe mạnh không bị sâu bệnh.

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy cơ bản (MS) là môi trường Murashige và Skoog [11] có bổ sung 20 g/l saccharose, 6,5 g/l agar. Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

*Tác giả liên hệ: Email: tranthitrieuha@huanf.edu.vn

Creating *in vitro* initial material sources of *Vanilla planifolia* Andr.

Thi Trieu Ha Tran*, Thi Phuong Nhi Phan,
Thi Thu Hang La

College of Agriculture and Forestry, Hue University

Received 28 August 2017; accepted 29 September 2017

Abstract:

There are many methods to create *in vitro* initial material. However, in this study, we used a variety explant of *Vanilla* as research material to find the appropriate tissue type and medium for initial materials and the optimal disinfection method. The results showed that the sample which was sterilized with 0.1% $HgCl_2$ for 9 minutes expressed the best effect. The culture medium supplemented with 3 mg/l BAP gave the best shoot regeneration in both shoot apex and axillary bud with 2.13 shoots/samples and 2.50 shoots/samples, respectively. The root tip is the most suitable type of tissue for callus formation on the MS medium with 3 mg/l 2,4-D with the highest percentage of callus tissue regeneration (60%). The medium supplemented with 4 mg/l BAP, 0.5 mg/l IBA, and 0.5 mg/l kinetin most suited for the differentiation of callus cells into PLBs with a PLB-induced callus ratio of 33.33%, and the PLB grew well.

Keywords: Explants, initial material, *Vanilla*.

Classification number: 4.6

Vô trùng mẫu cấy: Vật liệu nuôi cấy được rửa sạch bằng xà phòng dưới vòi nước chảy. Sau đó xử lý mẫu bằng EtOH 70% trong 30 giây, tiếp theo khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% với các khoảng thời gian khác nhau để xác định thời gian khử trùng mẫu thích hợp. Sau khi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần.

Hiệu quả khử trùng của phương pháp được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu chết, mẫu nhiễm, mẫu sống và sạch sau 2 tuần theo dõi.

Nghiên cứu khả năng tạo callus: Mẫu sau khi được khử trùng được cấy lên môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung chất kích thích sinh trưởng là 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) để thăm dò khả năng tạo callus. Số liệu nghiên cứu được thu sau 8 tuần nuôi cấy với các chỉ tiêu: Tỷ lệ mẫu tạo callus, chất lượng callus.

Nghiên cứu khả năng tạo chồi:

- Nghiên cứu khả năng tạo chồi từ chồi đỉnh, chồi nách: Chồi đỉnh, chồi nách (kích thước 1 cm) được cấy vào môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung benzylamino purin (BAP) ở các nồng độ khác nhau để nghiên cứu khả năng tạo chồi. Số liệu được thu sau 8 tuần nuôi.

- Nghiên cứu khả năng tạo PLBs từ callus: Khối callus (kích thước 0,5 cm) được cấy chuyển sang môi trường có bổ sung kết hợp với kinetin và indolebutyric acid (IBA) ở các nồng độ khác nhau để nghiên cứu khả năng tạo PLB. Số liệu được thu sau 8 tuần nuôi.

Xử liệu số liệu: Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi lần theo dõi 10 mẫu. Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm thống kê Statistics 10.0.

Kết quả và thảo luận

Hiệu quả phương pháp khử trùng

Trong nuôi cấy *in vitro*, vấn đề quan trọng đầu tiên là tạo được nguồn mẫu ban đầu hoàn toàn sạch nấm và vi khuẩn, đồng thời có khả năng sinh trưởng tốt. Do đó công việc đầu tiên là cần phải lựa chọn loại hóa chất, nồng độ, thời gian khử trùng thích hợp để đảm bảo tỷ lệ mẫu sống vô trùng cao nhất và mẫu có khả năng tái sinh cao. Có nhiều loại hóa chất được sử dụng để khử trùng mẫu trong nuôi cấy *in vitro*. Hiệu quả của phương pháp khử trùng phụ thuộc vào loại hóa chất, nồng độ và thời gian khử trùng. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng chất khử trùng là $HgCl_2$ (0,1%) với các thời gian khác nhau để xác định thời gian khử trùng tối ưu nhất. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu quả của phương pháp khử trùng bằng $HgCl_2$ (0,1%).

Bộ phận nuôi cấy	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống và sạch (%)
Chồi đỉnh	5	0,00	100,00	0,00
	7	13,33	73,33	13,33
	9	33,33	13,33	53,33
	11	66,67	13,33	20,00
Chồi nách	5	0,00	100,00	0,00
	7	6,67	80,00	13,33
	9	26,67	20,00	53,33
	11	60,00	6,67	33,33
Mảnh lá	5	0,00	100,00	0,00
	7	26,67	46,67	26,67
	9	33,33	20,00	46,67
	11	80,00	0,00	20,00
Đầu rễ	5	0,00	100,00	0,00
	7	20,00	66,67	13,33
	9	33,33	20,00	46,67
	11	53,33	13,33	33,33
Đoạn thân	5	0,00	100,00	0,00
	7	20,00	66,67	13,33
	9	26,67	13,33	60,00
	11	46,67	20,00	33,33

Khi sử dụng chất khử trùng là $HgCl_2$ (0,1%), tỷ lệ mẫu sống và sạch tăng cùng với việc tăng thời gian khử trùng từ 5 phút lên 9 phút. Tuy nhiên, khi tăng thời gian khử trùng lên 11 phút thì tỷ lệ mẫu sống và sạch giảm do thời gian khử trùng tăng làm chết mẫu. Ở thời gian khử trùng 9 phút, khi sử dụng mẫu nuôi cấy là đoạn thân, hiệu quả khử trùng đạt cao nhất với tỷ lệ mẫu sống và sạch đạt 60%. Tiếp đến là chồi đỉnh và chồi nách (53,33%). Đối với mảnh lá và đầu rễ thì tỷ lệ mẫu sống và sạch đạt thấp nhất (46,67%) do tỷ lệ mẫu chết cao. Điều này có thể giải thích là do trong quá trình xử lý khử trùng, mẫu lá và đầu rễ dễ bị dập nát làm chất khử trùng dễ xâm nhập vào mô, gây chết mẫu. Các tác giả S. Ruby, B. Sunil (2016), khi nghiên cứu phương pháp khử trùng chồi đỉnh và chồi nách cây Vanilla cũng đã xác định rằng $HgCl_2$ 0,1% thích hợp cho quá trình khử trùng mẫu trước khi đưa vào nuôi cấy *in vitro* với tỷ lệ mẫu sống và sạch khá cao [12].

Đánh giá khả năng tạo callus

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật (phytohormone) là thành phần quan trọng nhất của môi trường nuôi cấy. Nhờ những chất này, các nhà nghiên cứu có thể chủ động điều khiển quá trình phát sinh hình thái của thực vật *in vitro*. Có 2 nhóm chất điều hoà sinh trưởng thường được sử dụng trong nhân giống *in vitro* là nhóm auxin và cytokinin, trong đó nhóm auxin gồm những chất như 2,4-D, IBA, NAA (Naphthlene acetic acid) là những chất có tác dụng kích thích tạo callus, tạo phôi vô tính, tạo rễ [13].

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng các loại mô lá, mô thân, mô phân sinh rễ đã được khử trùng cấy lên môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung chất kích thích sinh trưởng là 2,4-D với các nồng độ khác nhau để thăm dò khả năng tạo callus. Kết quả sau 8 tuần nuôi được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D đến khả năng tạo callus của các loại mô.

Chất KTST	Mô lá		Mô thân		Mô phân sinh rễ	
2,4 D (mg/l)	Tỷ lệ tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ tạo callus (%)	Chất lượng callus
0	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	20,00	+
3	16,67	+	10,00	+	60,00	+++
4	13.33	+	10.00	+	56.67	++

Chú thích: +: Callus có màu trắng trong, xốp, ướt; ++: Callus có màu trắng đục, khô; +++: Callus có màu trắng đục, chắc, khô.

Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng, môi trường không bổ sung 2,4-D và môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D không có tác dụng kích thích sự hình thành callus đối với tất cả các mô nuôi cấy. Khi tăng dần nồng độ 2,4-D từ 2-4 mg/l thì tỷ lệ tạo callus cũng như chất lượng callus đều tăng ở cả 3 loại mô nuôi cấy và đạt tốt nhất ở môi trường có bổ sung 3 mg/l 2,4-D. So sánh 3 loại mô nuôi cấy, mô phân sinh rễ cho tỷ lệ tạo callus

đạt cao nhất với 60% mẫu tạo callus và chất lượng callus rất tốt.

Kết quả nghiên cứu của tác giả B. Janarthanam và S. Seshadri (2006) [14], khi nuôi cấy mảnh lá cây Vanilla cho thấy rằng, môi trường nuôi cấy có bổ sung 2,4-D và BAP với nồng độ lần lượt là 4,52 mM và 2,22 mM thì mô lá có phản ứng tạo mô sẹo tốt nhất. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi lại chỉ ra rằng, trên môi trường nuôi cấy cơ bản bổ sung 3 mg/l 2,4-D thì khả năng tạo callus của mô lá kém hơn mô phân sinh rễ.

Nghiên cứu khả năng tạo chồi

Khả năng tạo chồi từ chồi đỉnh và chồi nách:

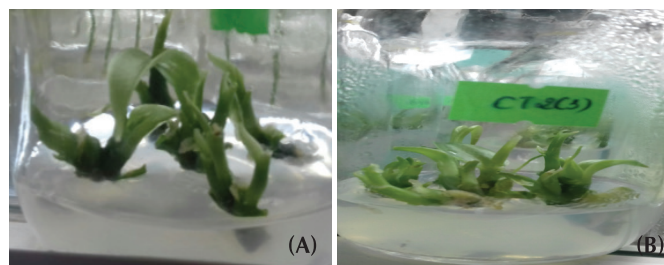
Các chồi đỉnh và chồi nách có kích thước khoảng 1 cm được cấy lên môi trường nuôi cấy cơ bản bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau để thăm dò khả năng tạo chồi. Kết quả sau 8 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi của chồi đỉnh và chồi nách.

Chất KTST	Chồi đỉnh		Chồi nách	
BAP (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0	1,03 ^c	1,50 ^d	1,13 ^d	1,27 ^c
1,0	1,17 ^c	1,73 ^d	1,27 ^d	2,30 ^b
2,0	1,77 ^b	2,20 ^c	1,67 ^c	2,50 ^b
3,0	2,13 ^a	2,83 ^b	2,50 ^a	3,13 ^a
4,0	1,80 ^b	3,23 ^a	2,10 ^b	3,10 ^a
LSD _{0,05}	0,24	0,24	0,23	0,22

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có cùng ký hiệu chữ cái biểu thị sự sai khác không có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3 cho thấy rằng BAP có tác dụng thúc đẩy khả năng tạo chồi Vanilla *in vitro*. Ở môi trường không bổ sung BAP, mẫu vật nuôi cấy hầu như chỉ tăng về chiều cao mà không tăng số chồi. Khi bổ sung BAP vào môi trường nuôi cấy thì số chồi/mẫu tăng lên và đạt cao nhất ở môi trường có nồng độ 3 mg/l BAP đối với cả chồi đỉnh và chồi nách. Đối với chồi đỉnh, số chồi trung bình trên mẫu sau 8 tuần nuôi đạt 2,13 chồi, còn đối với chồi nách số chồi trung bình trên mẫu là 2,50 (hình 1).



Hình 1. Chồi đỉnh (A) và chồi nách (B) Vanilla sau 8 tuần nuôi trên môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung 3 mg/l BAP.

Khả năng tạo PLBs từ callus:

PLBs là các cấu trúc tương tự như protocorm nhưng có nguồn gốc không phải từ hạt mà từ các loại mô khác. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng các khối callus có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh rễ, đường kính khoảng 0,3 cm được cấy trên môi trường nuôi cấy cơ bản bổ sung BAP kết hợp với kinetin và IBA ở các nồng độ khác nhau để nghiên cứu khả năng tạo PLBs. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 4.

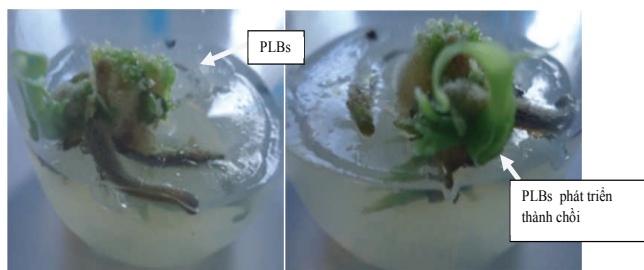
Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP kết hợp với kinetin và IBA lên khả năng tái sinh PLBs từ callus.

Chất KTST (mg/l)			Tỷ lệ callus tạo PLB (%)	Chất lượng mẫu
BAP	IBA	KIN		
0	0	0	-	-
3	0,5	0,5	-	-
3	1,0	0,5	23,33	+
4	0,5	0,5	33,33	++
4	1,0	0,5	16,67	++

Chú thích: +: PLB nhỏ, có màu hơi vàng; ++: PLB to, có màu xanh.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, sự kết hợp giữa BAP, kinetin và IBA với tỷ lệ thích hợp có tác dụng phân hóa các tế bào callus thành các PLBs. Môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung 4 mg/l BAP, 1 mg/l IBA và 0,5 mg/l kinetin thích hợp nhất cho quá trình phân hóa các tế bào callus thành các PLB với tỷ lệ callus tạo PLB là 33,33%, các PLB phát triển xanh tốt.

Kết quả nghiên cứu của các tác giả B. Janarthanam và S. Seshadri (2006) [14] xác định rằng, callus có nguồn gốc từ mô lá nuôi cấy trên môi trường cơ bản có bổ sung 13,32 μ M BAP và 13,43 μ M NAA cho kết quả tạo chồi tốt nhất. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng trên môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung BAP, kinetin và IBA callus có sự hình thành PLBs. Trong kỹ thuật nhân giống *in vitro*, đặc biệt là nhân giống các loài lan, việc tạo được PLBs có ý nghĩa quan trọng vì nó sẽ tạo ra được một số lượng lớn cá thể để đáp ứng nhu cầu cây giống (hình 2).



Hình 2. PLBs phát triển từ callus.

Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu nêu trên có thể thấy rằng, khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 9 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất với tỷ lệ mẫu sống và sạch vi sinh vật cao nhất đối với tất cả các loại mô.

- Mô phân sinh rễ là loại mô thích hợp nhất để tạo callus trên môi trường cơ bản MS có bổ sung 3 mg/l 2,4-D với tỷ lệ mô tạo callus là 60%, chất lượng callus tốt.

- Môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung 3 mg/l BAP cho kết quả tạo chồi tốt nhất khi nuôi cấy chồi đỉnh và chồi nách với số chồi trung bình tạo thành trên mẫu lần lượt là 2,13 chồi và 2,5 chồi.

- Môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung 4 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA và 0,5 mg/l kinetin thích hợp nhất cho quá trình phân hóa các tế bào callus thành các PLB với tỷ lệ callus tạo PLB là 33,33%, các PLB phát triển xanh tốt.

Với các kết quả nghiên cứu như trên, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu các phương pháp nhân nhanh chồi, PLBs và tạo cây hoàn chỉnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Giridhar, G.A. Ravishankar (2004), "Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under the influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk", *Indian J. Biotech.*, **3**, pp.113-118.
- [2] S. Menon, N. Nayeem (2013), "*Vanilla planifolia*: A review of a plant commonly used as flavouring agent", *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **20**(2), pp.225-228.
- [3] K. Kalimuthu, R. Senthilkumar, N. Murugalatha (2006), "Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr: a tropical orchid", *Curr. Sci.*, **91**(10), pp.1401-1403.
- [4] P.S. George, G.A. Ravishankar (1997), "In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants", *Plant Cell Rep.*, **16**, pp.490-494.
- [5] S. Geetha, S.A. Shetty (2000), "In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid", *Curr. Sci.*, **79**(6), pp.886-889.
- [6] H.E. Lee-Espinosa, et al. (2008), "In vitro Clonal Propagation of *Vanilla planifolia* 'Andrews'", *Hort. Sci.*, **43**(2), pp.454-458.
- [7] A.R. Zuraida, K. Izzati1, O.A. Nazreena1, W.S.W. Zaliha (2013), "A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of *Vanilla planifolia*", *American Journal of Plant Sciences*, **4**, pp.1685-1692.
- [8] Z. Abebe, A. Mengesha, A. Teressa, W. Tefera (2009), "Efficient in vitro multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia", *Afr. J. Biotechnol.*, **8**, pp.6817-6821.
- [9] Vũ Thị Mỹ Liên, Nguyễn Văn Uyển và cộng sự (1993), *Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh, tr.103-104.
- [10] Vũ Ngọc Phượng, Lê Hoàn Hảo, Thái Xuân Du (2007), *Nhân giống vô tính cây Vani bằng nuôi cấy mô*, Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới.
- [11] Nguyễn Hoàng Lộc (2011), *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật - Các khái niệm và ứng dụng*, Nhà xuất bản Đại học Huế, tr.28-32.
- [12] S. Ruby, B. Sunil (2016), "In vitro sterilization protocol of *Vanilla planifolia* explants for micropropagation", *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences ISSN(E): 2321-8851*, **4**(11), pp.135-142.
- [13] Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch, Vũ Quang Sáng (2006), *Giáo trình Sinh lý thực vật*, Trường Đại học Nông nghiệp 1, Hà Nội.
- [14] B. Janarthanam, S. Seshadri (2006), "Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **44**(2), pp.84-89.