



NHÂN CHỒI *IN VITRO* LAN THIÊN NGA ĐEN (*FREDCLAKEARA AFTER DARK*)

Lâm Thị Ngọc Thúy¹, Nguyễn Đức Tuấn¹, Trương Kiều Ngân², Trương Thị Bích Phương^{1,*}

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Ngoại Ngữ, Đại học Huế, 57 Nguyễn Khoa Chiêm, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Trương Thị Bích Phương <ttbphuong@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 9-9-2020; Ngày chấp nhận đăng: 21-9-2020)

Tóm tắt. Lan thiên nga đen (*Fredclakeara After Dark*) là một loài lan nhân tạo có hoa màu đen. Nhân giống *in vitro* Fdk. After Dark góp phần tạo ra cây giống số lượng lớn, mang đặc điểm giống cây mẹ. Bài báo này trình bày kết quả bước đầu nhân giống *in vitro* lan thiên nga đen từ giả hành và rễ cây tự nhiên một năm tuổi. Kết quả cho thấy khử trùng đạt hiệu quả cao với 1% NaClO trong 5 phút ở lần 1 và 7 phút ở lần 2 cho tỉ lệ mẫu chóp rễ sống không nhiễm cao nhất (47,30%). Trong khi khử trùng giả hành bằng 1% NaClO trong 15 phút ở lần 1 và 10 phút ở lần 2 cho tỉ lệ mẫu lát cắt giả hành sống không nhiễm cao nhất (55,88%). Sau bốn tuần nuôi cấy, môi trường ½ MS bổ sung 0,6 mg/L BAP thích hợp nhất cho khả năng tạo chồi từ chóp rễ với tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 42,31% sau 18,55 ngày. Môi trường ½ MS bổ sung 0,4 mg/L BAP thích hợp nhất, cho kết quả giả hành tái sinh đạt 60,87% sau 18 ngày. Số chồi cao nhất đạt được trên môi trường ½ MS bổ sung 0,4 mg/L BAP là 2,15 sau 16 tuần nuôi cấy. Môi trường này kích thích sự hình thành và phát triển rễ với 3,95 rễ/mẫu; rễ dài 2,96 cm.

Từ khóa: chóp rễ, lan Thiên nga đen, lát cắt giả hành, nhân chồi, tái sinh chồi

In vitro shoot multiplication of *Fredclakeara After Dark*

Lam Thi Ngoc Thuy¹, Nguyen Duc Tuan¹, Truong Kieu Ngan², Truong Thi Bich Phuong^{1*}

¹ University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

² University of Foreign Languages, Hue University, 57 Nguyen Khoa Chiem St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Truong Thi Bich Phuong <ttbphuong@hueuni.edu.vn>

(Received: September 9, 2020; Accepted: September 21, 2020)

Abstract. *Fredclakeara After Dark* is an artificial orchid species with black flowers. Micropropagation of *Fredclakeara After Dark* allows the production of many plantlets with the same genetic characteristics as mother plants. This paper presents the results of *in vitro* shoot multiplication of *Fredclakeara After Dark* from pseudobulbs and roots of one-year-old natural plants. The results indicate that highly effective sterilization occurs with 1% NaClO in five minutes in step 1 and seven minutes in step 2 with a root segments survival rate of 47.30%. The viability of pseudobulb slices after being immersed in 1% NaClO for 15 minutes in step 1 and 10 minutes in step 2 is 55.88%. The half-strength MS medium supplemented with 0.6 mg/L BAP is the optimal medium for shoot regeneration from roots, with an induction rate of 60.87% after 18.55

days. The half-strength MS medium supplemented with 0.4 mg/L BAP is suitable for shoot regeneration from pseudobulbs, with an induction rate of 60.87% after 18 days. The highest number of shoots per explant (2.15) was obtained on the ½ MS medium supplemented with 0.4 mg/L BAP after 16 weeks of culture. This medium provides the most roots at 3.95/sample, with an average root length of 2.96 cm.

Keywords: *Fredclarkera* After Dark, pseudobulb slice, shoot multiplication, shoot regeneration

1 Đặt vấn đề

Fredclarkera After Dark là một loài lan thuộc chi nhân tạo *Fredclarkera*, do Fred William Clarke tạo ra vào năm 2002 bằng cách lai giữa hai loài lan nhân tạo khác là *Mormodia* Painted Desert và *Catasetum* Donna Wisse. Nó mang đặc điểm di truyền của ba chi *Catasetum*, *Clowesia* và *Mormodes*, thuộc phân bộ *Catasetinae*. *Fdk.* After Dark là loài có hoa đen nhất, khi trưởng thành tạo ra 2–4 phát hoa trên mỗi giả hành, trung bình khoảng 15–22 hoa mỗi cây, hoa kéo dài 6–7 tuần [4].

Việc nhân rộng quy mô lớn các giống lai quý hiếm bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã giúp hoa lan chiếm vị trí là một trong mười loài hoa cắt cành hàng đầu. Lan là loài lai tạo nên việc nhân giống của chúng bằng cách sử dụng hạt giống dẫn đến việc tạo ra các cây dị hợp tử. Do đó, tái sinh từ các bộ phận sinh dưỡng khác nhau của cây là cần thiết [3].

Đã có những nghiên cứu vi nhân giống trên các đối tượng thuộc các chi bố mẹ của *Fdk.* After Dark. Chẳng hạn như *Catasetum fimbriatum* [1, 10, 11], *Cyrtopodium paranaensis* [13], *Catasetum x apolloi* [9], *Catasetum macrocarpum* [6], *Mormodes histrio* [7], *Mormodes maculata* var. *unicolor* [2] và *Clowesia warszewiczii* [8].

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện với mục tiêu bước đầu tái sinh chồi *in vitro* để làm tiền đề cho nhân giống loài lan này ở quy mô lớn.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu cho nghiên cứu là lan *Fredclarkera* After Dark. Vật liệu sử dụng cho nuôi cấy là giả hành và rễ của cây một năm tuổi do vườn ươm Huế (14/63, Phạm Thị Liên, Kim Long, Huế) cung cấp.

2.2 Điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường $\frac{1}{2}$ MS [12] có nồng độ 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và bổ sung các tổ hợp chất kích thích sinh trưởng (KTST) với nồng độ thăm dò khác nhau. Môi trường nuôi cấy có pH 5,8 và được khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong 15 phút. Mẫu được giữ trong phòng nuôi ở 25 ± 2 °C; cường độ ánh sáng là 2000 ± 500 lux; thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày.

2.3 Khử trùng mẫu

Các giả hành và rễ của cây lan tự nhiên sau khi được rửa sạch với nước được chuyển vào túi cây vô trùng. Mẫu được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong một phút, sau đó khử trùng mẫu bằng 1% NaClO bằng phương pháp ngắt quãng. Khử trùng lần 1 trong 5–15 phút; rửa mẫu bằng nước cất vô trùng trong 5 phút; khử trùng lần 2 trong 5–15 phút. Cuối cùng mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng 6–7 lần, mỗi lần 5 phút.

Sau khi loại bỏ phần mô bị tổn thương, giả hành được cắt lát, mỗi lát mang một đốt; chóp rễ có đỉnh sinh trưởng dài 2 cm; chuyển mẫu vào các bình chứa môi trường nuôi cấy. Khả năng khử trùng mẫu được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu chết, mẫu nhiễm và mẫu sống sau hai tuần theo dõi.

2.4 Tái sinh chồi

Mẫu sống và không bị nhiễm được chuyển sang các môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung riêng lẻ BAP hoặc KIN (0,2–1,0 mg/L) để thăm dò ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng tái sinh chồi *in vitro*. Kết quả được đánh giá sau bốn tuần nuôi cấy. Chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ mẫu nảy chồi (%) và thời gian bắt đầu nảy chồi (ngày).

2.5 Nhân chồi

Chồi *in vitro* (kích thước khoảng 1,0–1,5 cm) bốn tuần tuổi được cắt lát 0,3–0,5 cm, sau đó được cấy chuyển lên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung BAP hoặc KIN (0,2–0,8 mg/L). Hiệu quả tạo chồi *in vitro* được đánh giá sau 8 và 16 tuần với các chỉ tiêu theo dõi số chồi/mẫu và chiều cao chồi (cm), số rễ/mẫu và chiều dài rễ (cm).

2.6 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và lặp lại ba lần; mỗi lần quan sát mười mẫu.

2.7 Xử lý thống kê

Kết quả thí nghiệm được đánh giá theo kiểm định Duncan bằng phần mềm SPSS 22.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

3 Kết quả

3.1 Khử trùng mẫu

Khử trùng mẫu giả hành và rễ bằng 1% NaClO ở các khoảng thời gian khác nhau ảnh hưởng đến tỉ lệ mẫu nhiễm, tỉ lệ mẫu chết và tỉ lệ mẫu sống của cây lan.

Bảng 1 cho thấy khử trùng bằng 1% NaClO 2 lần 5 và 7 phút cho tỷ lệ mẫu rễ sống cao nhất (47,30%).

Bảng 2 cho thấy khử trùng bằng 1% NaClO 2 lần 15 và 10 phút cho tỷ lệ mẫu giả hành sống cao nhất (55,88%). Như vậy, giả hành và chóp rễ khi được khử trùng bằng công thức giống nhau, giả hành cho tỷ lệ mẫu nhiễm cao hơn và mẫu chết thấp hơn. Giả hành của lan khó loại bỏ nhiễm hơn so với rễ nhưng ít nhạy cảm với chất khử trùng hơn.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng 1% NaClO đến mẫu nuôi từ chóp rễ sau hai tuần nuôi cấy

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)		Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
	Lần 1	Lần 2			
T1	5	5	55,22	10,45	34,33
T2	5	7	32,43	20,27	47,30
T3	10	5	20,63	60,32	19,05
T4	10	10	14,71	80,88	4,41

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng 1% NaClO đến mẫu nuôi từ giả hành sau hai tuần nuôi cấy

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)		Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
	Lần 1	Lần 2			
T3	10	5	93,75	0,00	6,25
T4	10	10	66,20	9,86	23,94
T5	15	10	27,94	16,18	55,88
T6	15	15	16,67	39,39	43,94

Hölters và Zimmer đã nghiên cứu khử trùng giả hành lan *Mormodes histrio* bằng NaClO và nhận thấy khử trùng hiệu quả nhất với nồng độ 25–35 g/L trong 5 phút [7].

3.2 Tái sinh chồi

Mẫu giả hành và chóp rễ lan sau khi khử trùng và nuôi cấy hai tuần trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS được chuyển sang môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung BAP hoặc KIN (0,2–1,0 mg/L) để tái sinh chồi. Kết quả cho thấy việc bổ sung BAP hoặc KIN nồng độ thấp có hiệu quả tích cực đến khả năng tái sinh chồi.

Bảng 3 cho thấy bổ sung BAP nồng độ 0,6 mg/L có hiệu quả nhất đến khả năng tái sinh chồi mới từ chóp rễ với tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 42,31%. Môi trường bổ sung 0,2 mg/L BAP hoặc 0,6 mg/L KIN kích thích chồi hình thành sớm sau 14,67 và 15,20 ngày. Sau bốn tuần nuôi cấy, chồi mới phát triển chậm; trên một số chồi hình thành rễ ngắn (Hình 1a).

Trên môi trường bổ sung 0,4 mg/L BAP, tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt cao nhất (60,87%). Giả hành tái sinh chồi sớm nhất trên môi trường bổ sung 0,6 mg/L KIN (17,09 ngày). Tăng nồng độ chất KTST lên đến 1,0 mg/L làm giảm tốc độ tái sinh chồi. Giả hành cho hiệu quả tái sinh chồi và chất lượng chồi mới tốt hơn so với chóp rễ. Giả hành tái sinh 1–2 chồi/mẫu; 100% chóp rễ tái sinh 1 chồi/mẫu. Những chồi mới thông thường phát triển 1–2 rễ ngắn (Hình 1b).

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng tái sinh chồi từ chóp rễ sau bốn tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Ngày bắt đầu tạo chồi (ngày)
0,0	–	24,14	17,14 ^{ab}
0,2	–	40,00	14,67 ^a
0,4	–	41,94	17,67 ^{abc}
0,6	–	42,31	18,55 ^{abc}
0,8	–	33,33	18,67 ^{abc}
1,0	–	20,00	20,00 ^{abc}
–	0,2	24,14	17,71 ^{abc}
–	0,4	35,48	17,45 ^{abc}
–	0,6	35,71	15,20 ^a
–	0,8	16,67	22,00 ^{bc}
–	1,0	17,39	23,00 ^c

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Kiểm định Duncan). Chú thích này được áp dụng từ Bảng 3 đến Bảng 6.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng tái sinh chồi từ giả hành sau bốn tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Ngày bắt đầu tạo chồi (ngày)
0,0	–	31,82	18,29 ^{abc}
0,2	–	44,83	18,46 ^{abc}
0,4	–	60,87	18,00 ^{ab}
0,6	–	57,69	21,57 ^{abc}
0,8	–	44,44	20,00 ^{abc}
1,0	–	40,00	23,20 ^c
–	0,2	33,33	18,40 ^{abc}
–	0,4	48,39	18,13 ^{ab}
–	0,6	41,38	17,09 ^a
–	0,8	40,00	22,00 ^{abc}
–	1,0	38,46	22,80 ^{bc}

Colli và Kerbauy đã xác minh được rằng sự hình thành chồi từ rễ của *Catasetum fimbriatum* có thể được thúc đẩy bằng cytokinin ngoại sinh; trong khi đó, auxin ức chế quá trình này [5]. Trong nghiên cứu của Hölters và Zimmer, các chồi lan *Mormodes histrio* tái sinh từ lát cắt giả hành trên môi trường Knudson C bổ sung 0,5 mg/L BA bắt đầu phình ra và hình thành lá sau khoảng 7 ngày. Sau 2 tuần tăng trưởng, chồi đạt chiều dài khoảng 20 mm và phát triển 1–3 rễ ngắn. Gần 100% đầu rễ nuôi cấy độc lập trên môi trường trường Knudson C bổ sung 0,2 mg/L kali naphthaleneacetate và 0,2 mg/L BA hình thành chồi. Thông thường, các đầu rễ tạo ra 1–2 thể tiền chồi (protocorm-like body, PLB), nhưng chỉ một trong số chúng phát triển thành cây con [7]. Trong nghiên cứu của chúng tôi trên đối tượng lan Thiên nga đen, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp hơn, chỉ đạt tối đa 42,31% từ chóp rễ và 60,87% từ giả hành.

3.3 Nhân chồi

Lát cắt ngang chồi *in vitro* được cấy trên môi trường ½ MS bổ sung BAP hoặc KIN (0,2–0,8 mg/L) để khảo sát ảnh hưởng của chất KTST lên khả năng nhân chồi. Kết quả cho thấy phần lớn mẫu bắt đầu nhân chồi từ tuần thứ 3 đến tuần thứ 5.

Môi trường bổ sung BAP nồng độ 0,2–0,4 mg/L hoặc KIN nồng độ 0,2–0,6 mg/L kích thích quá trình hình thành chồi từ lát cắt ngang với số chồi/mẫu đạt 1,31–1,60 (Bảng 5). Mẫu trên môi trường bổ sung 0,4 mg/L BAP cho khả năng tạo rễ tốt nhất với số rễ/mẫu đạt 2,70. Môi trường bổ sung BAP hoặc KIN 0,2–0,8 mg/L cho kết quả chiều cao chồi và chiều dài rễ không khác biệt so với môi trường không bổ sung chất KTST.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng nhân chồi sau 8 tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
0,0	–	1,07 ^b	0,85 ^{abc}	1,13 ^{bc}	0,58 ^{nt}
0,2	–	1,60 ^a	1,03 ^a	1,75 ^b	0,73
0,4	–	1,35 ^{ab}	1,01 ^a	2,70 ^a	0,70
0,6	–	1,19 ^b	0,83 ^{abc}	1,43 ^{bc}	0,63
0,8	–	1,13 ^b	0,75 ^{bc}	0,81 ^c	0,65
–	0,2	1,31 ^{ab}	0,91 ^{abc}	1,38 ^{bc}	0,72
–	0,4	1,41 ^{ab}	0,86 ^{abc}	1,41 ^{bc}	0,69
–	0,6	1,35 ^{ab}	0,83 ^{abc}	0,82 ^c	0,62
–	0,8	1,14 ^b	0,66 ^c	0,69 ^c	0,54

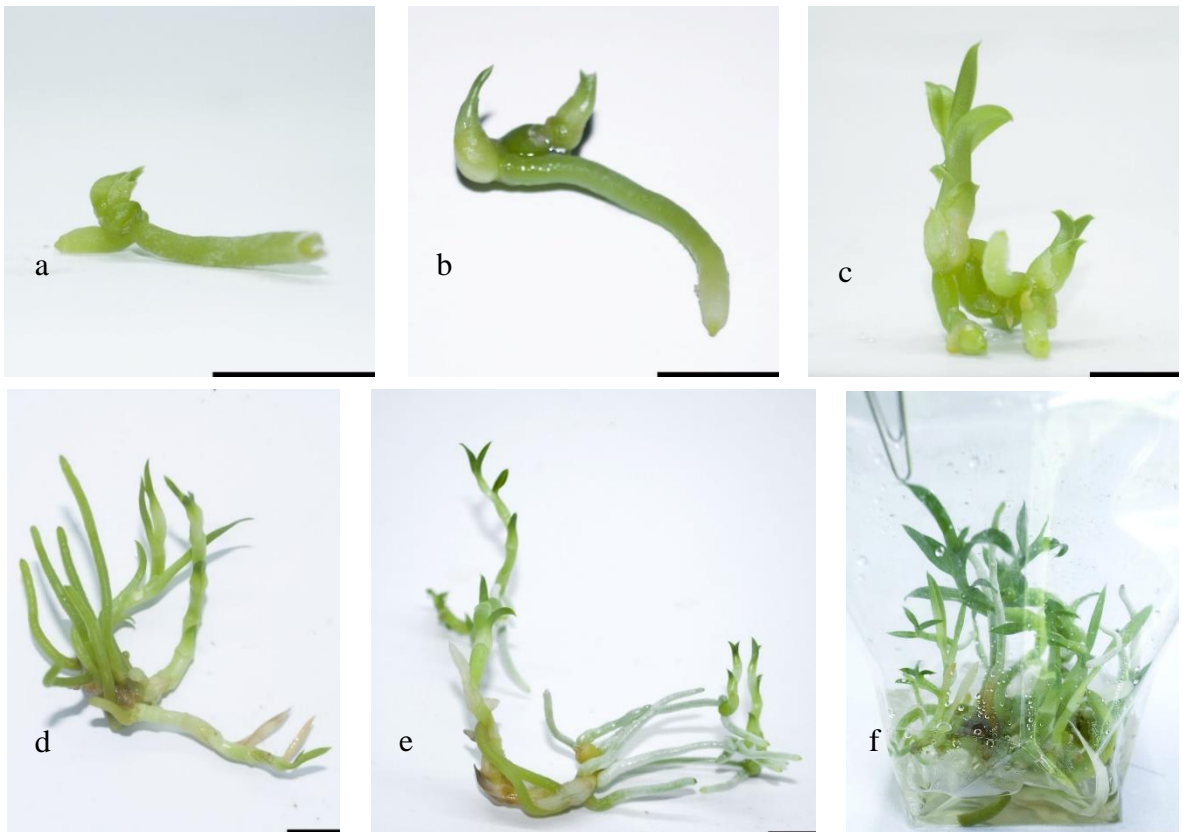
Bảng 6. Ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng nhân chồi sau 16 tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
0,0	–	1,18 ^b	4,28 ^{cde}	2,00 ^{bc}	1,67 ^c
0,2	–	1,92 ^a	7,01 ^a	2,33 ^{bc}	2,09 ^{bc}
0,4	–	2,15 ^a	5,19 ^{bc}	3,95 ^a	2,96 ^a
0,6	–	1,50 ^b	3,67 ^{ef}	2,13 ^{bc}	2,29 ^{bc}
0,8	–	1,11 ^b	3,03 ^f	1,22 ^c	1,79 ^{bc}
–	0,2	1,30 ^b	5,96 ^b	2,10 ^{bc}	2,13 ^{bc}
–	0,4	1,86 ^a	4,96 ^{bcd}	2,76 ^b	2,42 ^{ab}
–	0,6	1,41 ^b	4,18 ^{cde}	2,27 ^{bc}	2,24 ^{bc}
–	0,8	1,21 ^b	3,94 ^{def}	1,79 ^{bc}	1,91 ^{bc}

Sau 16 tuần nuôi cấy, môi trường bổ sung 0,2–0,4 mg/L BAP hay 0,4 mg/L KIN có hiệu quả tích cực đến khả năng nhân chồi với số chồi/mẫu lần lượt là 1,92, 2,15 và 1,86 (Bảng 6). Mẫu trên môi trường bổ sung 0,2 mg/L BAP có chiều cao trung bình lớn nhất (7,01 cm). Mẫu trên môi trường bổ sung 0,4 mg/L BAP ảnh hưởng tối ưu đến sự hình thành và phát triển rễ với số rễ/mẫu là 3,95 và chiều dài rễ trung bình là 2,96 cm (Hình 1d). Việc tăng nồng độ chất KTST đến 0,8 mg/L làm giảm hiệu quả nhân chồi của mẫu nhưng không có sự khác biệt đáng kể so với môi trường không bổ sung chất KTST.

Trong giai đoạn nhân chồi, chồi mới có thể hình thành trực tiếp từ lát cắt ngang hoặc từ thân hay chóp rễ của chồi hình thành trước đó (Hình 1e).

Baker và cs. trong nghiên cứu vi nhân giống lan *Catasetum* đã kết luận chồi *in vitro* tái sinh từ PLB có số lá cao nhất (10,10 lá/chồi) và chiều cao chồi lớn nhất (114,20 mm) trên môi trường MS bổ sung kết hợp 0,5 mg/L BA với 0,5 mg/L NAA [1]. Ferreira và cs. ghi nhận 1 mg/L BA là công thức tốt nhất cho sự tăng sinh chồi và sản xuất lá của lan *Catasetum macrocarpum in vitro* [6]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy lan Thiên nga đen nhân chồi tốt nhất trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 0,4 mg/L BAP và phát triển chiều cao chồi tốt nhất trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 0,2 mg/L BAP.



Hình 1. Nhân giống *in vitro* lan thiên nga đen

Chú thích: a. Chồi phát sinh từ chóp rễ tự nhiên sau 4 tuần nuôi cấy; b. Chồi phát sinh từ giả hành tự nhiên sau 4 tuần nuôi cấy; c. Nhân chồi từ lát cắt ngang sau 8 tuần nuôi cấy; d. Nhân chồi từ lát cắt ngang sau 16 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,4 mg/L BAP; e. Chồi mới hình thành từ chóp rễ và thân chồi *in vitro* sau 16 tuần nuôi cấy; f. Nhân chồi trong bì môi trường sau 16 tuần nuôi cấy.

4 Kết luận

Mẫu giả hành và rễ Lan Thiên nga đen được khử trùng ngắt quãng bằng 1% NaClO. Đối với chóp rễ, khử trùng bằng 1% NaClO trong thời gian 5 phút ở lần 1 và 7 phút ở lần 2 cho tỉ lệ mẫu chóp rễ sống không nhiễm cao nhất đạt 47,30%. Đối với giả hành, khử trùng bằng 1% NaClO trong 15 phút ở lần 1 và 10 phút ở lần 2 cho tỉ lệ mẫu lát cắt giả hành sống không nhiễm cao nhất, đạt 55,88%. Môi trường ½ MS bổ sung 0,6 mg/L BAP là thích hợp nhất cho khả năng tạo chồi từ chóp rễ với tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 42,31% sau 18,55 ngày. Môi trường ½ MS bổ sung 0,4 mg/L BAP là thích hợp nhất cho cho kết quả giả hành tái sinh đạt 60,87% sau 18 ngày. Môi trường ½ MS bổ sung 0,4 mg/L BAP thích hợp nhất cho nhân chồi, đạt 2,15 chồi/mẫu sau 16 tuần nuôi cấy.

Tài liệu tham khảo

1. Baker A., Kaviani B., Nematzadeh G., Negahdar N. (2014), Micropropagation of orchids *Catasetum* – a rare and endangered orchid, *Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus*, 13(2), 197–205.
2. Carrasco S. R., Martínez D. M., García R. A. M. (2007), Cultivo de protocormos de *Mormodes maculata* var. *unicolor* L. O. Williams (orchidaceae), *Foresta Veracruzana*, 9(1), 55–59.
3. Chugh S., Guha S., Rao I. U. (2009), Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507–520.
4. Clarke F. (2009), Plant Archive – Sunset Valley Orchids *Cynoches* and *Catasetum* Hybrids. http://sunsetvalleyorchids.com/htm/archive_catasetinae100623.html.
5. Colli S., Kerbauy G. B. (1993), Direct root tip conversion of *Catasetum* into protocorm-like bodies. Effects of auxin and cytokinin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 33(1), 39–44.
6. Ferreira W. D. M., Oliveira S. P. D., Suzuki R. M., Silva, K. L. F., Soares Júnior J. W. P. (2018), Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. *Rodriguesia*, 69(4), 2137–2151.
7. Hölter J., Zimmer K. (1990), Shoot regeneration from root tips of orchids *in vitro* III, Model plant *Mormodes histrio* Linden et. Rchb f. *Gartenbauwissenschaft*, 5(5), 201–205.
8. Kerbauy G., Estelita M. E. M. (1996), Formation of protocorm-like bodies from sliced root apexes of *Clowesia warscewiczii*, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 8(2), 157–159.
9. Miranda D. P., Vieira A., Karsburg I. V. (2014), Crescimento *in vitro* de *Catasetum x apolloi* BENELLI & GRADE (ORCHIDACEAE) em meio de cultura com adição de licor pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), *Enciclopédia biosfera*, Goiânia 10(18), 1140–1148.

10. Mohamadi E., Chalavi V., Moradi H. (2019), Effect of explants type, light and polysaccharides on micropropagation of *Catasetum* orchid (*Catasetum fimbriatum*, L.), *Journal of Plant Process and Function Iranin Society Of Plant Physiology*, 8(30), 171–184.
11. Morales S., Milaneze M. A. G., Machado M. d. F. P. S. (2006), Effect of Activated Charcoal for Seedlings Development of *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae), *Journal of Plant Sciences*, 1(4), 388–391.
12. Murashige T., Skoog F. (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
13. Valle Rego-Oliveira L., de-Faria R. T. (2005), *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations, *Acta Scientiarum Agronomy*, 27(1), 1–4.