

MỞ ĐẦU

Mỗi vùng miền của Việt Nam có một vài dòng/giống lan Giả hạc đặc trưng có sự khác biệt về hình thái thân, lá, mặt hoa và thời điểm nở. Thừa Thiên Huế là dải đất nằm giữa hai miền Bắc Nam, có hệ thực vật phong phú trong đó có cả một số giống lan Giả hạc, điển hình là giống lan Giả hạc tím Huế. Giả hạc tím Huế ngoài các đặc điểm chung của lan Giả hạc còn mang những nét đặc trưng riêng như khuôn hoa lớn, cánh sắp có viền, mùi thơm dịu, với màu tím Huế đặc trưng, đặc biệt thời gian nở hoa vào tháng 5-6 khác với các loại giả hạc khác là nở vào tháng 2-3, nhưng nguồn giống còn hạn chế, chưa có những đột biến điển hình được tìm thấy, giá trị kinh tế chưa cao. Đồng thời, lan Giả hạc tím Huế ngoài tự nhiên hiện nay rất khan hiếm do bị khai thác quá mức, việc khai thác không kiểm soát *D. anosmum* Lindl. nói riêng và các loài lan rừng khác nói chung đang xảy ra ở nhiều nơi. Hầu hết các loài lan rừng ở Việt Nam đều có tên trong Sách đỏ Việt Nam và nhiều loài trong số đó đang ở mức đặc biệt nguy cấp.

Vì vậy để góp phần phát triển giống lan này chúng tôi thực hiện đề tài **“Nghiên cứu tạo một số dòng lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm”** nhằm tạo ra một số dòng đột biến có giá trị từ nguồn giống lan bản địa này, cũng như phục vụ nhu cầu của người sưu tầm lan, và góp phần bảo tồn nguồn gen của giống lan bản địa.

Mục tiêu nghiên cứu

Tạo được dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm.

Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* từ lan Giả hạc tím Huế. - Nghiên cứu tạo dòng Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm. - Đánh giá đặc điểm hình thái/di truyền của các dòng lan đột biến. - Nghiên cứu xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm và ảnh hưởng chế phẩm vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu trên đối tượng lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) được thu thập tại thành phố Huế, thực hiện nuôi cấy mô và tác động của colchicine, dimethyl sulphate tới đối tượng này. Nghiên cứu được thực hiện tại Viện công nghệ sinh học, Đại học Huế trong thời gian từ 5/2021 đến 5/2024.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

- Bổ sung vào khoá phân loại loài lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) những đặc điểm đặc trưng để nhận dạng. - Hoàn thiện quy trình nhân giống lan Giả hạc tím Huế bằng phương pháp nuôi cấy *in-vitro*. - Xây dựng quy trình tạo giống lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm. - Đánh giá các biến đổi cây đột biến bằng các chỉ thị hình thái, tế bào và phân tử từ - Ứng dụng tạo chế phẩm vi sinh từ vi sinh vật nội sinh để chăm sóc cây lan con. - Kết quả nghiên cứu còn tạo ra nguồn cây giống lan Giả hạc tím Huế góp phần bảo tồn và phát triển.

Những điểm mới của luận án

- Đây là nghiên cứu đầu tiên mô tả chi tiết các đặc điểm nhận dạng của lan Giả hạc tím Huế. - Lần đầu tiên xây dựng quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên lan Giả hạc tím Huế tại TP. Huế. Đánh giá được đa dạng di truyền của các dòng lan đột biến được tạo ra. Tạo được chế phẩm vi sinh từ một số chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập trên cây lan rừng và ứng dụng chế phẩm này vào việc chăm sóc lại cho cây lan con ở vườn ươm.

- CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1. Tổng quan chi lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*) và loài lan Giả hạc tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.)

1.1. Chi lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*)

Chi lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*) bao gồm 1600 loài lan biểu sinh. Các chi này có đặc điểm là thân giả hành dài hay thân giả có lá mềm dọc theo chiều dài thân, ở một số loài lan có giả hành ngắn hoặc phình to [113]. Theo hệ thống phân loại APG III năm 2009 [75] thì lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*

Lindl.) thuộc ngành: *Magnoliophyta*, lớp: *Liliopsida*, bộ: *Asparagales*, họ: *Orchidaceae*, Chi: *Dendrobium*.



Hình 1.2. Hoa lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) (Nguyễn Hữu Thọ (2021), hình được chụp trong quá trình nghiên cứu).

1.2. Lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.)

- Thân: thân giả hành, - Lá: lá có hình thoi thuôn dài, mọc cách so le, - Hoa: tập hợp thành chùm hoặc đơn lẻ, - Mùi hương: hoa lan Giả hạc luôn có mùi hương, dịu nhẹ, thơm ngát, - Thời điểm ra hoa: hoa thường nở rộ vào thời điểm cuối xuân - đầu hè. Quả lan thuộc loại quả nang, quả có dạng thuôn dài, - Rễ: rễ lan Giả hạc nhỏ có đường kính 1 - 1,5 mm, bám dính.

2. Tổng quan nghiên cứu các phương pháp nhân giống lan Giả hạc

2.1. Nhân giống truyền thống

2.2 Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc

3. Các yếu tố ảnh hưởng đến cây con sinh trưởng ở vườn

- Các yếu tố ảnh hưởng đến cây con sinh trưởng ở vườn là ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, nước, giá thể trồng.

4. Vi sinh vật nội sinh thực vật

Vi sinh vật nội sinh phân lập từ lan có khả năng hỗ trợ thực vật phát triển hiệu quả do có khả năng phân giải lân, khả năng tổng hợp chất kích thích sinh trưởng và đặc biệt là khả năng kháng lại một số tác nhân gây bệnh, từ đó ứng dụng vào làm các chế phẩm vi sinh.

5. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến

Mục đích của gây đột biến là làm thay đổi vật chất di truyền để tạo ra giống đột biến có phẩm chất và năng suất tốt. [166]. Hiện nay, những hoá chất gây đột biến được sử dụng phổ biến để tạo ra những biến đổi trong vật chất di

truyền như colchicine, acenaphthene, oryzalin, dimethyl sulphate (DMS),... [123]. Trong số đó colchicine là hoá chất được dùng phổ biến nhất trong tạo đột biến đa bội ở thực vật [101]. Đối với dimethyl sulphate (DMS) là một methyl hóa mạnh, có khả năng gây biến đổi trong cấu di truyền, gây ra đột biến điểm, [122].

6. Một số phương pháp phân tích đa dạng di truyền ở thực vật

Để đánh giá đa dạng di truyền có một số phương pháp như dựa vào chỉ thị hình thái, chỉ thị sinh lý-sinh hoá và quan trọng nhất là dựa vào các chỉ thị phân tử DNA như chỉ thị RFLP, AFLP, RAPD, SSR hay ISSR [78].

7. Một số kết quả nghiên cứu có liên quan đến đề tài

Trên thế giới, hoa lan được giới nhà khoa học quan tâm từ rất sớm bắt đầu từ trong thế chiến thứ II [131]. Để đáp ứng nhu cầu chơi lan đã có nhiều nghiên cứu nhân giống trong phòng thí nghiệm bằng phương pháp nuôi cấy *in-vitro* về các loại lan tại Việt Nam được thực hiện [18], [37]. Một số dòng đột biến của *D. anosmum* cũng được nghiên cứu và nhân giống thành công bằng phương pháp nhân giống *in-vitro*, như Giả hạc 5 cánh trắng Phú Thọ từ chồi ngủ của thân [252], hoặc từ hạt của lan *D. anosmum* Lindl. ở Quảng Trị [51], hay ở An Giang [11].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 5/2021 đến tháng 5/2024.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Quả lan đã chín sinh lý và những đoạn thân có chứa chồi ngủ. Vật liệu ban đầu sử dụng cho các thí nghiệm xử lý hoá chất đột biến là mô sẹo sơ cấp và protocorm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* từ lan Giả hạc tím Huế

2.3.1.1 Nhận dạng và thu thập mẫu nghiên cứu

Theo phương pháp mô tả đặc điểm hình thái hoa lan của De (2020) [93].

Định loại: Sử dụng phương pháp hình thái so sánh và định danh phân tử.

2.3.1.2 Nhân giống *in-vitro* từ lan Giả hạc tím Huế

a. Vào mẫu Lan Giả hạc tím Huế

Thí nghiệm 1: Gieo hạt *in-vitro*

Hạt lan được gieo vào môi trường MS bố trí thí nghiệm với thời gian chiếu sáng khác nhau (0 giờ, 4 giờ, 8 giờ và 12 giờ).

Thí nghiệm 2: Vào mẫu từ đoạn thân có chứa chồi ngủ

Quá trình khử trùng được thực hiện trong tủ cấy bằng (Bảng 2.2).

Bảng 2.2. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng tới tỷ lệ nhiễm của mẫu

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)		
	NaClO (2%)	H ₂ O ₂ (3%)	HgCl ₂ (0,1%)
CT1	10	-	-
CT2	10	10	-
CT3	10	15	-
CT4	10	20	-
CT5	10	-	5
CT6	10	-	10
CT7	10	-	15

b. Ảnh hưởng của môi trường và chất điều hòa sinh trưởng đến các giai đoạn nuôi cấy mô lan Giả hạc tím Huế

- Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo protocorm/mô sẹo từ lan Giả hạc tím Huế

* Thí nghiệm nghiên cứu môi trường phù hợp để vào mẫu.

Cụ thể dùng các môi trường: thử nghiệm với các loại môi trường MS, ½ MS, VW, Hyp, Knusond C, các môi trường có bổ sung thêm một số chất tùy vào từng công thức thí nghiệm.

c. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm/mô sẹo từ lan Giả hạc tím Huế

Thí nghiệm được bố trí theo các công thức bảng 2.3 và 2.4.

Bảng 2.3. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành protocorm.

Công thức	Môi trường	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)
CT1	MT tối ưu	0,0	0,00
CT2	MT tối ưu	0,0	0,25
CT3	MT tối ưu	0,25	0,25
CT4	MT tối ưu	0,50	0,25
CT5	MT tối ưu	0,75	0,25
CT6	MT tối ưu	1,00	0,25
CT7	MT tối ưu	0,0	0,5
CT8	MT tối ưu	0,25	0,5
CT9	MT tối ưu	0,50	0,5
CT10	MT tối ưu	0,75	0,5
CT11	MT tối ưu	1,00	0,5

Bảng 2.4. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành mô sẹo

Công thức	Môi trường	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)
CT1	MT tối ưu	0,0	0,0	0,0
CT2	MT tối ưu	0,5	0,0	0,5
CT3	MT tối ưu	1,0	0,0	0,5
CT4	MT tối ưu	1,5	0,0	0,5
CT5	MT tối ưu	2,0	0,0	0,5
CT6	MT tối ưu	0,0	0,5	0,5
CT7	MT tối ưu	0,0	1,0	0,5
CT8	MT tối ưu	0,0	1,5	0,5
CT9	MT tối ưu	0,0	2,0	0,5

d. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi

Công thức nghiên cứu được thể hiện qua bảng 2.5.

Bảng 2.5. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi.

Công thức	Môi trường	BA (mg/L)	NAA (mg/L)
CT1	MT tối ưu	0,0	0,0
CT2	MT tối ưu	0,5	0,0
CT3	MT tối ưu	1,0	0,0
CT4	MT tối ưu	1,5	0,0
CT5	MT tối ưu	2,0	0,0
CT6	MT tối ưu	0,0	0,5
CT7	MT tối ưu	0,5	0,5
CT8	MT tối ưu	1,0	0,5
CT9	MT tối ưu	1,5	0,5
CT10	MT tối ưu	2,0	0,5
CT11	MT tối ưu	0,0	1,0
CT12	MT tối ưu	0,5	1,0
CT13	MT tối ưu	1,0	1,0
CT14	MT tối ưu	1,5	1,0
CT15	MT tối ưu	2,0	1,0

e. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi

Công thức thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.6.

Bảng 2.6. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi

Công thức	Môi trường	BAP (mg/L)	IAA(mg/L)
CT1	MT tối ưu	0,0	0,0
CT2	MT tối ưu	1,5	0,0
CT3	MT tối ưu	1,5	0,1
CT4	MT tối ưu	1,5	0,3
CT5	MT tối ưu	1,5	0,5
CT6	MT tối ưu	1,5	0,7

f. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ

Công thức thí nghiệm cho ra rễ được thể hiện ở bảng 2.7.

Bảng 2.7. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ.

Công thức	Môi trường	IAA (mg/L)	NAA(mg/L)
CT1	MT tối ưu	0,0	0,0
CT2	MT tối ưu	0,1	0,0
CT3	MT tối ưu	0,3	0,0
CT4	MT tối ưu	0,5	0,0
CT5	MT tối ưu	0,7	0,0
CT6	MT tối ưu	1,0	0,0
CT7	MT tối ưu	0,0	0,1
CT8	MT tối ưu	0,0	0,3
CT9	MT tối ưu	0,0	0,5
CT11	MT tối ưu	0,0	0,7
CT12	MT tối ưu	0,0	1,0

2.3.2. Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

Quá trình xử lý hoá chất đột biến và tạo dòng lan đột biến Giả hạc tím Huế được thực hiện theo các bước như mô tả ở phụ lục 4.

2.3.2.1. Phương pháp gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng colchicine và dimethyl sulphate

Mẫu được ngâm trực tiếp vào môi trường có chứa hoá chất, các công thức thí nghiệm thể hiện qua bảng 2.8. và bảng 2.9

Bảng 2.8. Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng colchicine trên protocorm/mô sẹo

CT	Nồng độ colc/DMS (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)	CT	Nồng độ colc/DMS (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)
----	------------------------	-----------------------	----	------------------------	-----------------------

ĐC	0	-	CT13	200	6
CT1	50	2	CT14	400	
CT2	100		CT15	800	
CT3	200		CT16	50	8
CT4	400		CT17	100	
CT5	800		CT18	200	
CT6	50	4	CT19	400	
CT7	100		CT20	800	10
CT8	200		CT21	50	
CT9	400		CT22	100	
CT10	800	6	CT23	200	
CT11	50		CT24	400	
CT12	100		CT25	800	

Bảng 2.9. Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng DMS trên protocorm/ mô sẹo

CT	Nồng độ colc/DMS (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)	CT	Nồng độ colc/DMS (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)
ĐC	0	-	CT13	200	6
CT1	50	2	CT14	400	
CT2	100		CT15	800	
CT3	200		CT16	50	8
CT4	400		CT17	100	
CT5	800		CT18	200	
CT6	50	4	CT19	400	
CT7	100		CT20	800	10
CT8	200		CT21	50	
CT9	400		CT22	100	
CT10	800	6	CT23	200	
CT11	50		CT24	400	
CT12	100		CT25	800	

2.3.2.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng tới các giai đoạn nuôi cấy mô của mẫu lan Giả hạc tím Huế đã xử lý hoá chất

Các công thức thí nghiệm được bố trí giống các bảng 2.5; 2.6; 2.7

2.3.3. Đánh giá đặc điểm hình thái và di truyền của các dòng lan đột biến

-Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái của cây đột biến (Thân, rễ, lá, hoa);-Phương pháp nghiên cứu đặc điểm tế bào của các dòng đột biến;-Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hoá sinh của cây đột biến

-Phương pháp nghiên cứu đa dạng di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử RAPD

2.3.4. Quy trình tái sinh một số dòng đột biến được chọn lọc

Thực hiện theo công thức thí nghiệm tốt nhất ở bảng 2.4; 2.5 và bảng 2.6; 27 dùng cho chồi đột biến.

2.3.5. Xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm

- Nghiên cứu giá thể phù hợp để ra bầu cây con; - Nghiên cứu điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, độ sáng) ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây con ra vườn.;- Nghiên cứu ảnh hưởng của vi sinh vật nội sinh tới sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến; - Xây dựng quy trình nhân giống và huấn luyện cây con in-vitro Giả hạc tím Huế

2.3.6 Một số công thức và cách xác định chỉ tiêu đánh giá

2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu

- số liệu xử lý bằng SPSS và Office excel 2019, NTSYSpc v2.1, BioEdit 7.0.5.3., MEGA X, ImageJ 1.8.0.

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu in-vitro từ mẫu lan Giả hạc tím Huế (D. anosmum Lindl.)

3.1.1 Nhận diện và thu thập dòng lan Giả hạc tím Huế làm cây đầu dòng

- Nhận diện hình thái

Đặc điểm mô tả hình thái như thân, rễ, lá, hoa của giống lan Giả hạc tím Huế (2 năm tuổi trở lên) thu thập tại một số nhà vườn ở khu vực TP.Huế chúng tôi đã xây dựng bảng đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế được trình bày ở bảng 3.1, hình 3.1.



Hình 3.1. Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.)

- Nhận diện chỉ thị phân tử

Dựa trên 4 vùng gene (gồm *ITS*; *trnL*; *matK* và *rbcL*) chúng tôi đã xác định được tên khoa học của loài lan Giả hạc tím Huế là loài *D. anosmum* và được chúng tôi đặt tên là *Dendrobium anosmum* voucher GHTH (*D. anosmum* voucher GHTH).

3.1.2 Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế

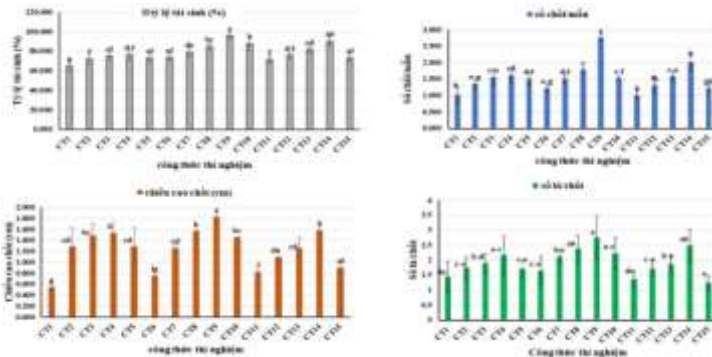
3.1.2.1 Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế từ hạt

Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

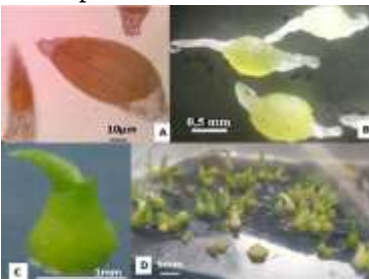
Bảng 3.1: Điều kiện tối ưu cho nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế từ hạt

T T	Giai đoạn nhân giống		Điều kiện tối ưu	Kết quả thử nghiệm
1	Vào mẫu hạt	Khử trùng mẫu	Khử trùng quả bằng cồn 96° và đốt qua ngọn lửa đèn cồn, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày.	- Đạt hiệu quả cao, với tỉ lệ vô trùng trên 95%, và không có sự khác biệt thống kê giữa các công thức thí nghiệm. - Thời gian nảy mầm là 41,33 ngày, tỷ lệ hạt chết thấp nhất là 20,36%, tỷ lệ nảy mầm và hình thành protocorm lần lượt là 64,76% và 60,89%.
		Môi trường	- CT1: Môi trường MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai	- Ở CT1 (MS): Thời gian này mầm 41,33 ngày, tỷ lệ nảy mầm 64,76 %, tỷ lệ hình thành protocorm 60,89 %, và tỷ lệ hạt chết của hạt 20,36 %.

		tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa, pH 5,8. - CT4: Môi trường Hyp loại 20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L loại 6,5N-6P-19K) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8	- Ở CT4 (Hyp) Thời gian này mầm 42,87 ngày, tỷ lệ nảy mầm 63,08 %, tỷ lệ hình thành protocorm 59,62 %, tỷ lệ hạt chết của hạt 20,36 % 22,71 %.
2	Tạo Protocorm	- Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,75 mg/L NAA+ 0,5 mg/L BA	- Thời gian nảy mầm của hạt 23,27 ngày, tỷ lệ nảy mầm 93,46 %, tỷ lệ hình thành protocorm 88,75 % và tỷ lệ hạt chết 4,43 %.
3	Tái sinh chồi từ protocorm	- Môi trường dinh dưỡng bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA	- Tỷ lệ tái sinh chồi đạt 96,00 %, số chồi là 2,76 chồi/mẫu, chồi cao 1,83 cm và số lá của chồi là 2,76 lá



Hình 3.3. Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy



Hình 3.2. Các giai đoạn phát triển của hạt lan Giả hạc tím Huế được gieo trên môi trường MS + 0,75 mg/L NAA+ 0,5 mg/L BA, được chiếu sáng 8 giờ/ngày.

(A. hạt lan mới lấy ra khỏi quả; B. Hạt lan gieo được 15 ngày; C. Hạt lan gieo được 25 ngày; D. Hạt lan gieo được 35 ngày.)

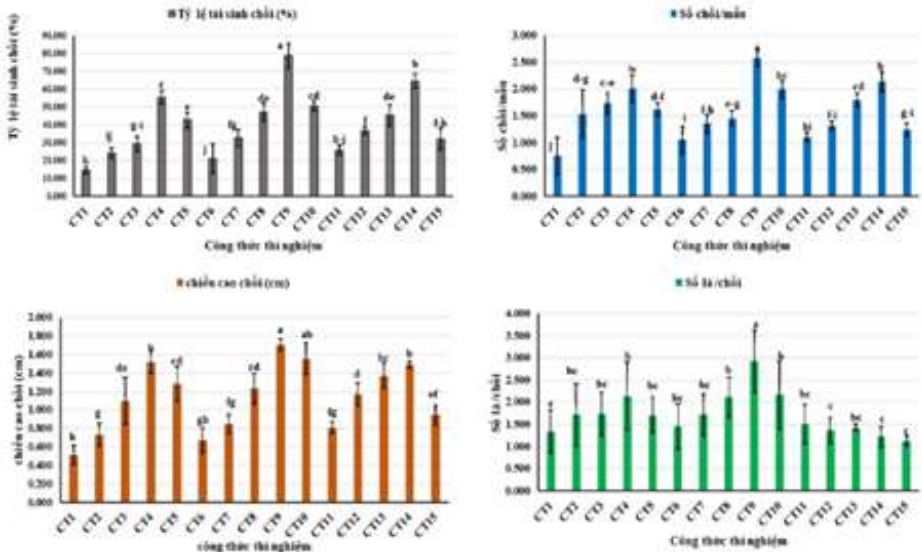
3.1.2.2 Nhân giống in-vitro lan Giả hạc tím Huế từ đoạn thân có mắt ngủ

Kết quả được trình bày ở bảng 3.2.

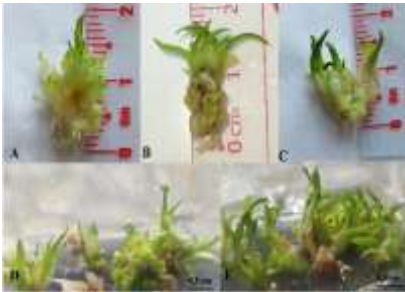
Bảng 3.2. Điều kiện tối ưu cho nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím huế từ đoạn thân có mắt ngủ

T T	Giai đoạn nhân giống		Điều kiện tối ưu	Kết quả thử nghiệm
1	Vào mẫu bằng đoạn thân	Khử trùng mẫu	-Xử lý mẫu bằng NaClO 2% và HgCl ₂ 0,1% trong 10 phút (CT6).	-Mẫu sạch đạt tỷ lệ 66,67%, tỷ lệ mẫu chết 22,22%, tỷ lệ nhiễm của mẫu thấp 11,11%.
		Môi trường	- CT1: Môi trường MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa, pH 5,8. - CT4: Môi trường Hyp loại 20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L loại 6,5N-6P-19K) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8	-Tỷ lệ sống của mẫu 66,33 %, tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu 17,67 % và kích thước mô sẹo là 0,65 cm (CT1). -Tỷ lệ sống của mẫu là 71,00 %; tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu 14,67 % và kích thước mô sẹo là 0,67 cm (CT4).
2	Tạo mô sẹo		- Môi trường dinh dưỡng bổ sung kết hợp 1,5 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA	-Thời gian hình thành mô sẹo 32,07 ngày, tỷ lệ sống của mẫu 86,67 %, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo là 64,33 % và kích thước mô sẹo đạt được là 0,97 cm
3	Tái sinh chồi	Từ đoạn thân	- Môi trường dinh dưỡng bổ sung 1,5 mg/L BA	-Tỷ lệ tái sinh chồi 88,89 %, số chồi trên một mẫu đạt 2,33 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi đạt 1,57 cm, có 3,24 lá/chồi.
		Mô sẹo	Môi trường dinh dưỡng bổ sung 1,5 mg/L BA với 0,5 mg/L NAA	-Tỷ lệ tái sinh chồi 78,67 %, số lượng chồi đạt 2,58 chồi/mẫu, chiều cao chồi là 1,71 cm và có số lá là 2,92.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở biểu đồ hình 3.6 sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 3.5: Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy. (A. Đối chứng, môi trường không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng; B. Môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA; C. Môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA; D. Chồi trong bì môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA; E. Chồi trong bì môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA.)

3.1.2.3 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi

Kết quả thu được sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của BA và IAA đến khả năng nhân chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.

Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ IAA (mg/L)	Hệ số nhân	Chiều cao chồi (cm)	Đường kính chồi (cm)	Số lá/chồi	Đặc điểm chồi
-------------------	--------------------	------------	---------------------	----------------------	------------	---------------

0,0	0,0	$1,13 \pm 0,1^e$	$1,23 \pm 0,1^d$	$0,23 \pm 0,01^c$	$2,00 \pm 0,2^c$	nhỏ yếu, màu xanh hơi vàng.
1,5	0,0	$2,33 \pm 0,3^d$	$1,74 \pm 0,1^c$	$0,29 \pm 0,04^c$	$2,00 \pm 0,2^c$	nhỏ, màu xanh nhạt.
1,5	0,1	$3,33 \pm 0,3^c$	$2,10 \pm 0,1^b$	$0,36 \pm 0,04^b$	$3,67 \pm 0,2^b$	trung bình, màu xanh nhạt.
1,5	0,3	$4,30 \pm 0,3^b$	$2,04 \pm 0,1^b$	$0,38 \pm 0,02^b$	$4,32 \pm 0,3^a$	mập, cao, màu xanh đậm.
1,5	0,5	$6,00 \pm 0,3^a$	$3,03 \pm 0,1^a$	$0,51 \pm 0,08^a$	$4,70 \pm 0,2^a$	mập, cao, màu xanh đậm.
1,5	0,7	$3,67 \pm 0,3^{bc}$	$2,13 \pm 0,1^b$	$0,35 \pm 0,04^b$	$3,67 \pm 0,2^b$	trung bình, màu xanh nhạt.

3.2.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ

Khả năng ra rễ của lan Giả hạc tím Huế rất tốt đạt 100%. Trên môi trường bổ sung NAA, cho nồng độ 0,7 mg/L NAA hiệu quả ra rễ tốt nhất.

3.2 Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

3.2.1 Gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng *Colchicine* và *Dimethyl sulphate*

3.2.1.1 Gây đột biến trên protocorm lan Giả hạc tím Huế

Sau thời gian 4 tuần nuôi dưỡng trong môi trường dinh dưỡng các thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của protocorm giảm dần khi nồng độ hoá chất và thời gian xử lý tăng lên. Tỷ lệ mẫu sống cao nhất sau khi xử lý hoá chất là ở CT1 với nồng độ là 50 ppm, xử lý trong 2 giờ (Bảng 3.14).

Thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất, kết quả quan sát có sự khác biệt so với thời điểm 4 tuần. Hình thái của mẫu khác với đối chứng xuất hiện ngay công thức thí nghiệm CT1 với nồng độ xử lý 50 ppm và thời gian xử lý 2 giờ ở cả hai loại hoá chất colchicine là 16,22% và DMS là 7,83% (CT1, Bảng 3.15) .

3.2.1.2 Gây đột biến trên mô sẹo lan Giả hạc tím Huế

Kết quả 4 tuần nuôi cấy sau khi mô sẹo được xử lý hoá chất cho thấy tỷ lệ sống của mô sẹo đạt cao nhất 57,78% (CT1) khi xử lý bằng colchicine so với đối chứng là 96,67%. Thí nghiệm xử lý bằng DMS có tỷ lệ sống cao nhất đạt 83,17% khi xử lý với nồng độ 50 ppm và trong thời gian 2 giờ (CT1).

Giai đoạn 8 tuần sau khi xử lý, CT1 xử lý bằng 50 ppm colchicine trong 2 giờ cho tỷ lệ mẫu sống 50% . Tỷ lệ mô sẹo còn sống khi được xử lý bằng 50 ppm DMS trong 2 giờ và nuôi cấy sau 8 tuần cao nhất đạt được là 73,62% (Bảng 3.17).

3.2.2 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi của protocorm và mô sẹo đã xử lý hoá chất

3.2.2.1 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau khi xử lý hoá chất

Khả năng tạo chồi của protocorm xử lý đã colchicine ở nghiệm thức đối chứng khi không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng BA và NAA bổ sung vào môi trường cụ thể với tỷ lệ tạo chồi 66,78 %. Kết quả tái sinh chồi tốt nhất của protocorm xử lý bằng colchicine được ghi nhận ở CT7 khi môi trường bổ sung 1 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA. Khả năng tái sinh chồi tốt nhất của protocorm xử lý DMS là khi bổ sung kết hợp BA và NAA với nồng độ 0,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA .

3.2.2.2 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo sau khi xử lý hoá chất

Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo xử lý bằng colchicine ở công thức đối chứng (ĐC) khi không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng có được tỷ lệ hình thành chồi 12,44%. Công thức đạt kết quả tốt nhất là môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA. Khả năng tái sinh chồi tốt nhất của mô sẹo xử lý DMS được ghi nhận khi môi trường có bổ sung kết hợp 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA.

3.2.3 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi xử lý đột biến.

Khả năng nhân chồi của chồi xử lý colchicine ghi nhận kết quả tốt nhất khi môi trường được bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L IAA với hệ số nhân đạt được 4,47 lần (CT4).

Chồi được xử lý bằng DMS có khả năng nhân nhanh chồi ở môi trường được bổ sung thêm 1,5 mg/L BAP có khả năng nhân nhanh tốt với hệ số nhân chồi 1,93 lần.

3.2.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ của chồi đột biến

Kết quả được trình bày ở bảng 3.18, bảng 3.19.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi đột biến xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ NAA (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi					Đặc điểm của rễ và chồi
		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài của rễ (cm)	Chiều cao của cây (cm)	Số lá/cây	
ĐC	0	87,29±1,41 ^c	3,53±0,46 ^{bc}	1,51±0,21 ^d	3,47±0,07 ^d	4,53±0,27 ^{bc}	+
CT1	0,1	91,19±1,21 ^b	3,97±0,29 ^{bc}	2,42±0,17 ^c	3,96±0,17 ^c	4,79±0,23 ^{bc}	++
CT2	0,3	93,82±0,92 ^b	4,07±0,38 ^b	3,02±0,31 ^{bc}	4,19±0,12 ^c	5,07±0,25 ^b	+++
CT3	0,5	100±0,00 ^a	4,47±0,24 ^b	3,25±0,18 ^b	4,71±0,12 ^b	5,00±0,20 ^b	+++
CT4	0,7	100±0,00 ^a	5,73±0,25 ^a	4,54±0,18 ^a	5,81±0,21 ^a	6,27±0,23 ^a	++++
CT5	1	81,71±1,15 ^d	2,93±0,48 ^c	2,53±0,36 ^{bc}	4,21±0,11 ^c	4,20±0,15 ^c	+

+: rễ ít, nhỏ, ngắn, có màu trắng, cây xanh hơi vàng, nhỏ, lá mảnh.
 ++: số lượng rễ trung bình, ngắn, nhỏ, rễ có màu trắng, cây lá xanh, lá dày.
 +++: rễ nhiều, dài nhưng nhỏ yếu, có màu trắng xanh, cây lá xanh, lá dày.
 ++++: rễ nhiều, dài to mập, rễ có màu trắng xanh, cây lá xanh đậm, lá dày, dài.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi đột biến xử lý bằng DMS sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ NAA (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi					Đặc điểm của rễ và chồi
		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài của rễ (cm)	Chiều cao của chồi	Số lá/chồi	
ĐC	0,0	73,63±1,08 ^e	2,20±0,28 ^d	1,05±0,20 ^d	2,25±0,05 ^d	4,07±0,21 ^b	+
CT1	0,1	80,04±2,23 ^d	2,23±0,27 ^d	1,68±0,30 ^c	3,52±0,07 ^{cd}	4,07±0,21 ^b	+
CT2	0,3	86,86±0,95 ^c	3,07±0,23 ^c	2,47±0,20 ^b	3,68±0,10 ^{bc}	4,37±0,26 ^b	++
CT3	0,5	93,79±0,93 ^b	3,60±0,39 ^{bc}	3,37±0,13 ^a	3,81±0,13 ^{bc}	5,13±0,21 ^a	+++
CT4	0,7	100±0,00 ^a	4,67±0,27 ^a	3,73±0,22 ^a	4,47±0,19 ^a	5,60±0,16 ^a	++++
CT5	1,0	95,78±1,54 ^b	4,13±0,26 ^{ab}	3,27±0,15 ^a	4,05±0,17 ^b	3,87±0,19 ^b	++

+: rễ ít, nhỏ, ngắn, có màu trắng, cây xanh hơi vàng, nhỏ, lá mảnh.
 ++: số lượng rễ trung bình, ngắn, nhỏ, rễ có màu trắng, cây lá xanh, lá dày.
 +++: rễ nhiều, dài nhưng nhỏ yếu, có màu trắng xanh, cây lá xanh, lá dày.
 ++++: rễ nhiều, dài to mập, rễ có màu trắng xanh, cây lá xanh đậm, lá dày, dài.

3.3. Đánh giá đặc điểm hình thái/di truyền của các dòng lan đột biến

3.3.1. Đặc điểm hình thái của cây đột biến

Hình thái biến dị sai khác so với đối chứng xuất hiện sớm nhất ở giai đoạn protocorm và mô sẹo sau khi xử lý hoá chất được 6-8 tuần. Đối với protocorm có những hình thái biến dị xuất hiện như thay vì có màu xanh như đối chứng thì xuất hiện một số protocorm có màu trắng, vàng tuy nhiên hình thái này bị chết sau 8 tuần nuôi cấy. Kích thước của protocorm được xử lý bằng colchicine lớn hơn so với protocorm xử lý bằng DMS và đối chứng(Hình 3.19).

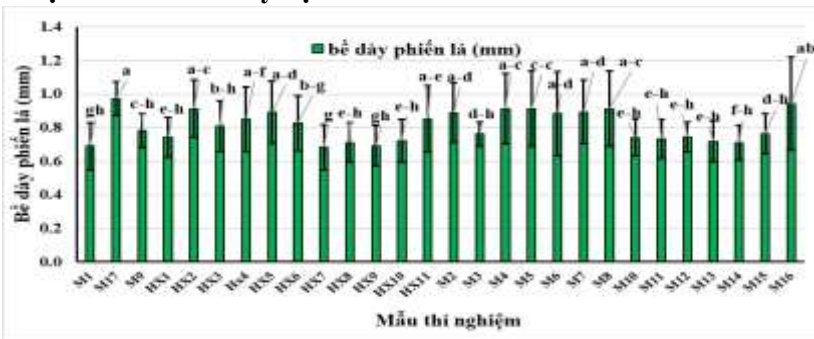
Tương tự như protocorm thì mô sẹo sau khi được xử lý bằng colchicine và DMS sau thời gian nuôi cấy 3- 4 tuần cũng xuất hiện các hình thái khác với đối chứng. (Hình 3.20).



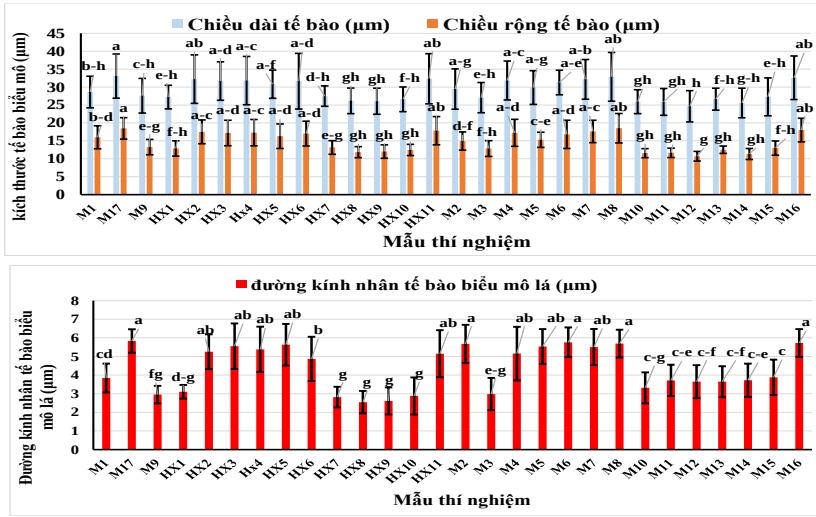
Hình 3.20. Hình thái biến dị mặt hoa của một số dòng đột biến.

A. Hoa cây đối chứng; *B.* Hoa nhỏ, cánh hoa dày của dòng M14; *C.* Hoa có cánh hoa thuần dài của dòng HX4; *D.* Hoa bị biến dạng của dòng M11; *E.* Hoa có kích thước lớn của dòng M2; *F.* Cây không ra hoa, có lên mầm gốc; *G.* Hoa có đốm tím trên cánh hoa của dòng M5; *H.* Hoa bị biến dạng dòng M9; *I.* Hoa có kích thước lớn của dòng M8; *J.* Cây không ra hoa, có chồi phát triển; *K.* Hoa có đốm tím trên cánh hoa của dòng M7; *L.* Hoa có cánh hoa thuần dài của dòng M17

3.3.2. Đặc điểm tế bào cây đột biến

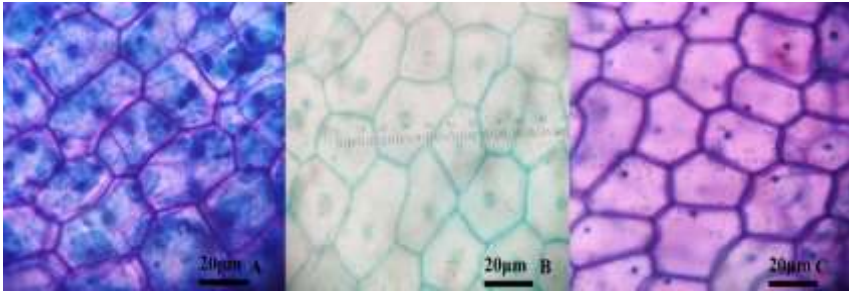


Hình 3.24: Biểu đồ bề dày của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi.

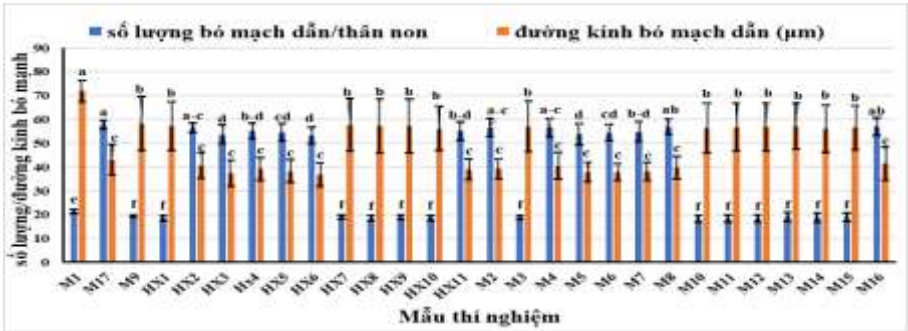


Hình 3.25: Biểu đồ kích thước (chiều dài, chiều rộng) và đường kính nhân của tế bào biểu mô lá

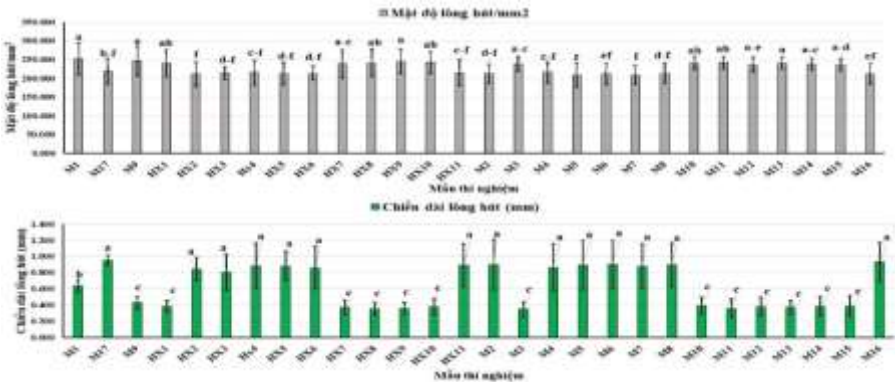
Các đặc điểm tế bào ở mẫu đối chứng, mẫu xử lý colchicine và mẫu xử lý DMS về hình thái, kích thước, số lượng, trật tự sắp xếp đều có sự biến đổi khác nhau (hình 3.25). Kết quả này cho thấy hoá chất colchicine và DMS đã có tác động đến cấu trúc mô, tế bào dẫn đến các thay đổi về hình dạng, trật tự sắp xếp và kích thước tế bào



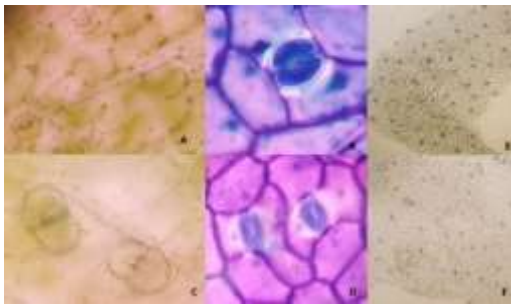
Hình 3.26. Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế.
(A. Tế bào lá đối chứng không xử lý hoá chất; B. mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17) ; C. Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9).)



Hình 3.27: Biểu đồ số lượng bó mạch và đường kính bó mạch dẫn trong thân non của lan Giả hạc tím Huế.



Hình 3.30: Biểu đồ thể hiện mật độ và chiều dài lông hút rễ lan Giả hạc tím Huế



chứng (10x); F: Khí khổng ở lá có xử lý colchicine (10x).

Hình 3.31. Hình thái khí khổng của lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy chồi. A, B: Khí khổng ở lá cây đối chứng (40x); C: Khí khổng ở lá cây xử lý colchicine (40x); D: Khí khổng ở lá cây xử lý DMS (40x); E: Số lượng khí khổng ở lá đối

Phân tích 27 mẫu lá của cây có xử lý hoá chất đột biến cho kết quả hàm lượng Chl và caroten đều cao nhất hơn so với cây đối chứng.

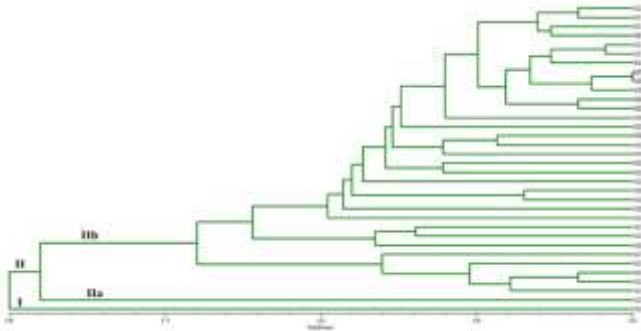
Qua quan sát hình ảnh NST dưới kính hiển vi đã đếm được số lượng NST ở mẫu rễ cây đối chứng không xử lý hoá chất đột biến là $2n=2x=38$, số lượng NST ở mẫu rễ cây được xử lý colchicine đã quan sát và đếm được số lượng NST là $4n=4x= 76$ (Hình 3.30).

3.3.3 Phân tích đa dạng di truyền

Kết quả chúng tôi chọn được 10 mẫu ngẫu nhiên RAPD (Bảng 3.22) để thực hiện phân tích đa dạng di truyền cho 34 mẫu lan được chọn lọc.

Bảng 3.22. Kết quả khuếch đại PCR dựa trên mỗi mẫu RAPD của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế

TT	Mẫu	Tỷ lệ cá thể khuếch đại PCR thành công (%)	Số band DNA hình thành/mẫu	Số band DNA đa hình	Kích thước của band DNA (bp)	Tỷ lệ band DNA đa hình (%)
1	P6	100	8	8	650-1600	100,00
2	P9	100	9	9	450-1200	100,00
3	P16	100	5	4	450-800	80,00
4	P17	100	9	6	350-1450	66,67
5	P18	100	6	4	400-1100	66,67
6	OPA-03	100	6	3	750-1250	50,00
7	OPF-01	100	7	6	600-1050	85,71
8	OPF-05	100	5	3	600-900	60,00
9	OPO-04	100	9	6	500-1100	66,67
10	OPBH-16	100	6	4	500-800	66,67
Tổng số band DNA		-	70	53	-	-
Số band DNA trung bình/mỗi mẫu		100	7	5,3	-	75,71



Hình 3.35. Cây phân nhóm di truyền 34 dòng lan Giả hạc tím Huế.

3.4 Quy trình tái sinh một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến có triển vọng

3.4.1 Tái sinh mô sẹo từ chồi của một số dòng đột biến

Kết quả dòng M17 cho kết quả tốt nhất tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là 82,00%.

Bảng 3.24. Khả năng tái sinh mô sẹo hoặc chồi của một số dòng đột biến

sau 12 tuần

Mẫu	Thời gian hình thành mô sẹo/chồi	Tỷ lệ sống của mẫu (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Kích thước mô sẹo (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)
M1	29,45±0,90 ^a	90,67±1,90 ^b	71,78±2,54 ^b	1,13±0,07 ^b	15,56±2,94 ^a	1,73±0,08 ^b
HX3	33,27±0,92 ^b	95,33±1,20 ^a	78,44±1,45 ^a	1,58±0,11 ^a	11,56±1,02 ^{ab}	2,24±0,11 ^a
HX10	41,40±1,69 ^c	82,22±1,80 ^c	62,67±2,46 ^c	0,94±0,09 ^{bc}	11,56±1,38 ^{ab}	1,81±0,09 ^b
M5	35,27±0,69 ^b	92,89±1,62 ^{ab}	76,44±1,70 ^{ab}	1,63±0,14 ^a	12,22±1,01 ^{ab}	2,35±0,09 ^a
M13	47,87±1,68 ^d	75,56±1,41 ^d	53,56±1,54 ^d	0,76±0,06 ^c	7,33±0,58 ^b	1,37±0,05 ^c
M14	44,47±1,50 ^{cd}	78,67±1,48 ^{cd}	64,22±2,19 ^c	1,14±0,07 ^b	9,33±1,96 ^b	1,61±0,10 ^{bc}
M17	27,40±0,79 ^a	96,44±1,19 ^a	82,00±1,21 ^a	1,62±0,11 ^a	10,89±0,69 ^{ab}	2,41±0,11 ^a

3.4.2 Tái sinh chồi từ mô sẹo của các dòng đột biến

Kết quả tái sinh chồi từ mô sẹo của mẫu M17 và HX3 là tốt nhất với tỷ lệ 94,67% và 89,33%.

3.4.3. Nhân nhanh chồi của các dòng đột biến

Khả năng nhân chồi của chồi đột biến M17 là cao nhất với hệ số nhân chồi có được 7,53 lần.

3.4.4. Kết quả ra rễ tạo cây hoàn chỉnh từ các chồi đột biến

Khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế là rất tốt, đều đạt tỷ lệ ra rễ 100% ở tất cả các mẫu thử nghiệm, tuy nhiên mẫu mang lại hiệu quả tốt nhất là M17 với số rễ đạt 6,31 rễ/chồi

3.4.5 Quy trình tái sinh một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến

-Quy trình được thể hiện qua 5 bước và sơ đồ hoá của 5 bước.

3.5 Xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm

-Giá thể phù hợp để ra bầu cây con là xơ dừa: than trâu (1 : 1), w : w) và băng dương xỉ có phủ rêu.

-Kết quả tốt nhất là dòng M17 với tỷ lệ sống đạt 56,60%.

-Hiệu quả cao nhất khi tỷ lệ che nắng 50%, cụ thể tỷ lệ sống đạt 56,67%. Kết quả cho thấy cây lan con giai đoạn vườn ươm rất nhạy cảm với ánh nắng và nó phù hợp nhất ở mức che sáng 50%.

-Kết quả phân lập vi sinh vật nội sinh từ các bộ phận khác nhau của cây lan rừng đã thu được 30 chủng vi khuẩn nội sinh.

-Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ pha trộn sinh khối vi sinh vật nội sinh và hỗn hợp dung dịch dinh dưỡng thích hợp và hiệu quả nhất là 1: 50. Không có sự khác biệt lớn giữa các chế phẩm CP2, CP5, CP6, điểm khác biệt lớn nhất ở tỷ lệ nhiễm bệnh của cây lan con, kết quả cụ thể theo thứ tự là 7,56%, 14,67% và 11,56%.

- Quy trình được trình bày qua 7 bước và được sơ đồ hoá.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1. Nghiên cứu đã thành công trong việc xác định, thu thập đúng mẫu lan Giả hạc tím Huế (*Denrobium anosmum* Lindl) tại thành phố Huế, làm nguyên liệu nuôi cấy thành công *in-vitro* lan này từ hạt và chồi ngủ, tạo ra vật liệu khởi đầu (protocorm và mô sẹo) cho các thí nghiệm tiếp theo. Đồng thời, nghiên cứu xác định được các điều kiện phù hợp để nhân giống *in-vitro* cho lan Giả hạc tím Huế.

2. Xử lý đột biến bằng Colchicine và DMS trên protocorm và mô sẹo đã được thực hiện hiệu quả ở nồng độ 50 – 400 ppm trong 2 – 10 giờ tạo ra các mẫu sống với biến đổi hình thái. Nghiên cứu đã chọn lọc được 27 dòng lan biến dị, trong đó có 14 dòng từ Colchicine và 13 dòng từ DMS.

3. Thực hiện đánh giá các dòng đột biến bằng các chỉ thị hình thái, tế bào, hoá sinh và bằng chỉ thị RAPD. Nghiên cứu đã lựa chọn được 6 dòng triển vọng có sự khác biệt rõ về hình thái và di truyền để nghiên cứu phát triển.

4. Nghiên cứu xây dựng thành công quy trình chăm sóc lan con *in-vitro* phù hợp cho giai đoạn vườn ươm, tìm được điều kiện tối ưu để cây lan con *in-vitro*

thích nghi và phát triển tại vườn. Ứng dụng được chế phẩm vi sinh vật nội sinh trong chăm sóc cây lan con tại vườn, giảm bớt việc sử dụng các loại phân hoá học và thuốc bảo vệ thực vật.

2. Đề nghị

- Cần tiếp tục khảo nghiệm các dòng đột biến trong điều kiện sản xuất (vườn ươm, vườn cảnh).
- Cần có những nghiên cứu sâu hơn về phân tử, đặc biệt là xác định được những thay đổi về mặt di truyền là từ gen nào; hoặc xác định các dòng đa bội (chẵn hoặc lẻ) và đặc điểm của chúng.
- Cần đánh giá giá trị kinh tế, thẩm mỹ và tiềm năng ứng dụng thực tế của lan Giả hạc tím Huế và các dòng đột biến của nó.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, Pham Thanh, Hoang Khanh Linh, and Nguyen Thi Kim Cuc (2023). Conservation of *Dendrobium anosmum* ‘tim Hue’ by in vitro propagation. Tạp chí Journal Propagation of Ornamental Plants, Tập 23, số 2, 39-48.
2. **Nguyễn Hữu Thọ**, Nguyễn Thị Oanh, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024). Ảnh hưởng của một số yếu tố đến nhân giống lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Hội thảo Khoa học quốc tế về “Nghiên cứu đa dạng sinh học và tiềm năng dược liệu thuộc họ Orchidaceae (Họ Lan), Theaceae (Họ trà) và Zingiberaceae (Họ Gừng) ở Việt Nam”. Nhà xuất bản Đại học Huế, 62-68.
3. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, and Nguyen Thi Kim Cuc (2024). *Dendrobium anosmum* Lindl. ‘Tim Hue’ and the method of vegetative propagation from the axillary node shoots of the stem (keikis). Hội nghị khoa học Quốc gia lần thứ 6 về Nghiên cứu và giảng dạy sinh học ở Việt Nam, 908-915.
4. **Nguyễn Hữu Thọ**, Nguyễn Thị Oanh, Lã Thị Thu Hằng, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024). Nghiên cứu ảnh hưởng của Dimethyl sulfide (DMS) đến tạo biến dị lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.). Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, 467-473.
5. **Nguyễn Hữu Thọ**, Trương Thị Bích Phượng, Hồ Thị Xuân Túy, Phạm Thành, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024). Nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng. 2024. Tạp chí Đại học Huế, Tập 133, số 1C, 179-191.

INTRODUCTION

Each region of Vietnam possesses distinct lines or cultivars of *Dendrobium anosmum* (commonly known as Giả hạc) that differ in stem morphology, leaf structure, floral characteristics, and blooming periods. Thua Thien Hue Province, situated between Northern and Southern Vietnam, harbors a rich flora, including several native varieties of *Dendrobium anosmum*, notably the *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue'.

This cultivar exhibits not only the general traits of *Dendrobium anosmum* but also unique features such as large floral structures, waxy petals with margins, a gentle fragrance, and a signature Hue purple coloration. Remarkably, its blooming season occurs in May–June, contrasting with other varieties that typically flower in February–March. However, its genetic resources remain limited, with no notable mutations identified to date, and its economic value is still modest.

Moreover, the *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' is currently rare in the wild due to excessive and uncontrolled harvesting. The overexploitation of *D. anosmum* Lindl. In particular, wild orchids are generally widespread across various regions. Most wild orchid species in Vietnam are listed in the Vietnam Red Data Book, with many classified as critically endangered. [1].

So, to contribute to the development of this orchid species, we carry out the project **“Research on creating some orchid lines *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' mutant by experimental method”** to create some valuable mutant lines from this native orchid source, as well as to serve the needs of orchid collectors, and contribute to preserving the genetic resources of native orchid varieties.

Research objectives

- Create some mutant lines of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchids by experimental methods.

Research content

- Investigation into the development of *in-vitro* initial materials derived from the *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue'. - Experimental induction of mutations in the

Dendrobium anosmum 'Tim Hue' orchid line. - Evaluation of morphological and genetic characteristics of the mutant orchid lines. - Study on the establishment of acclimatization protocols for seedlings in nursery conditions and the impact of endogenous microbial formulations on the growth of mutated *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' lines

Research scope

The study was conducted on the *Dendrobium anosmum* "Tim Hue" orchid, collected from Hue City. Tissue culture techniques were applied, and the effects of colchicine and dimethyl sulphate on this species were investigated. The research was carried out at the Institute of Biotechnology, Hue University, from May 2021 to May 2024.

Scientific and practical significance

The study enhances species identification of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue', refines *in-vitro* propagation and mutagenesis protocols, and evaluates mutant traits via morphological, cellular, and molecular markers. It also identifies the role of endophytic microbes for bioproduct development and produces seedlings to support conservation efforts.

New points of the thesis

- This is the first study to describe in detail the identification characteristics of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchids.
- For the first time, build the process of creating experimental mutant varieties on *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchids at Hue city.
- Analyze to evaluate genetic diversity by RAPD molecular markers.
- Isolate some strains of endogenous microorganisms on wild orchids and apply them to create microbial preparations.

CHAPTER 1. OVERVIEW OF DOCUMENTS

1. Overview of the *Dendrobium* genus and the *Dendrobium anosmum* Lindl.

1.1. *Dendrobium* genus

The genus *Dendrobium* includes 1,600 species of epiphytic orchids. These genera are characterized by long pseudobulbs or pseudobulbs with soft leaves along the length of the stem. In some orchid species, the pseudobulbs are short or enlarged. [113].

According to the APG III classification system in 2009 [75] *Dendrobium anosmum* Lindl. Division: *Magnoliophyta*, Class: *Liliopsida*, Order: *Asparagales*, Family: *Orchidaceae*, Genus: *Dendrobium*.



Image 1.2. *D. anosmum* Lindl. 'Tim Hue' .Nguyen Huu Tho (2021), photo taken during the research process.

1.2. *Dendrobium anosmum* Lindl

Stem: Pseudobulbous stem structure. **Leaves:** Elongated, lanceolate leaves arranged alternately. **Flowers:** Occur either solitarily or in clusters. **Fragrance:** *Dendrobium anosmum* flowers consistently emit a gentle, pleasant aroma. **Flowering period:** Typically blooms profusely from late spring to early summer. **Fruit:** Classified as a capsule-type fruit, elongated in shape. **Roots:** Fine adhesive roots with a diameter ranging from 1 to 1.5 mm.

2. Overview of research on methods for propagating *Dendrobium anosmum* orchids

2.1 Traditional propagation;

2.2 In-vitro propagation of *Dendrobium* orchids

3. Factors affecting seedling growth in the garden

- Factors affecting seedling growth in the garden are light, temperature, humidity, water, and growing medium.

4. Plant endophytic microorganisms

Endophytic microorganisms isolated from orchids possess the potential to enhance plant growth effectively due to their ability to solubilize phosphate, synthesize growth-promoting substances, and notably resist certain pathogenic agents. These properties enable their application in the development of microbial bioformulations.

5. Breeding by the mutation method

Mutagenesis aims to alter genetic material to produce high-quality, productive mutants. Chemicals like colchicine, acenaphthene, oryzalin, and DMS are widely used; colchicine is most commonly used for inducing polyploidy, while DMS is a potent methylator that causes point mutations. These methods are central to modern plant breeding.

6. Some methods of genetic diversity analysis in plants

To assess genetic diversity, there are several methods, such as based on morphological indicators, physiological-biochemical indicators, and most importantly, based on DNA molecular indicators such as RFLP, AFLP, RAPD, SSR, or ISSR.

7. Some research results related to the thesis

Orchids have attracted scientific interest globally since World War II, with many in vitro propagation studies conducted in Vietnam. Mutant lines of *D. anosmum* have been successfully cultured from stem buds in Phu Tho and seeds collected in Quang Tri and An Giang.

Chapter 2. RESEARCH OBJECTS, MATERIALS AND METHODS

2.1. Subjects, location, and time of research

Dendrobium anosmum ‘Tim Hue’ The study was conducted from May 2021 to May 2024.

2.2. Research materials

Physiologically mature orchid fruits and stem segments contain dormant buds. The starting materials used for mutagenesis experiments were primary callus and protocorm.

2.3. Research methods

2.3.1. Creating in-vitro starting material from *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' orchids.

2.3.1.1 *Identifying and collecting research samples.*

According to the method of describing orchid morphological characteristics of De (2020) [93]. Identification: Using comparative morphology and molecular identification methods.

2.3.1.2 *In-vitro propagation from *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' orchids*

a. Using *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' orchid samples

Experiment 1: In-vitro seeding

Orchid seeds were sown in MS medium with different illumination times (0 hours, 4 hours, 8 hours, and 12 hours).

Experiment 2: Inoculation of stem segments containing dormant buds

The sterilization process was carried out in an incubator (Table 2.2).

Table 2.2. Effect of concentration and sterilization time on the infection rate of the sample

N°	Sterilization time (minutes)		
	NaClO (2%)	H ₂ O ₂ (3%)	HgCl ₂ (0,1%)
CT1	10	-	-
CT2	10	10	-
CT3	10	15	-
CT4	10	20	-
CT5	10	-	5
CT6	10	-	10
CT7	10	-	15

b. Effects of environment and growth regulators on tissue culture stages of *Dendrobium anosmum* "Tim Hue" orchid

- Environmental effects on the ability to form protocorm/callus from *Dendrobium anosmum* "Tim Hue" orchid

* Experiment to study a suitable environment for entering the sample.

Specifically, the following environments are used: testing with MS, ½ MS, VW, Hyp, Knusond C, and environments with some additional substances depending on each experimental formula.

c. Effect of growth regulators on the ability to form protocorm/callus from *Dendrobium anosmum* "Tim Hue" orchid

The experiment is arranged according to the formulas in Tables 2.3 and 2.4.

Table 2.3. Formula for studying the effect of growth regulators on protocorm formation.

Nº	Environment	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)
CT1	optimal	0,0	0,00
CT2	optimal	0,0	0,25
CT3	optimal	0,25	0,25
CT4	optimal	0,50	0,25
CT5	optimal	0,75	0,25
CT6	optimal	1,00	0,25
CT7	optimal	0,0	0,5
CT8	optimal	0,25	0,5
CT9	optimal	0,50	0,5
CT10	optimal	0,75	0,5
CT11	optimal	1,00	0,5

Table 2.4. Formula for studying the effect of growth regulators on callus formation

Nº	Environment	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)
CT1	optimal	0,0	0,0	0,0
CT2	optimal	0,5	0,0	0,5
CT3	optimal	1,0	0,0	0,5
CT4	optimal	1,5	0,0	0,5
CT5	optimal	2,0	0,0	0,5
CT6	optimal	0,0	0,5	0,5
CT7	optimal	0,0	1,0	0,5
CT8	optimal	0,0	1,5	0,5
CT9	optimal	0,0	2,0	0,5

d. Effect of growth regulators on shoot regeneration ability

The research formula is shown in Table 2.5.

Table 2.5. Research formula of the effect of growth regulators on the ability to regenerate shoots

Nº	Environment	BA (mg/L)	NAA (mg/L)
CT1	optimal	0,0	0,0
CT2	optimal	0,5	0,0
CT3	optimal	1,0	0,0
CT4	optimal	1,5	0,0
CT5	optimal	2,0	0,0

CT6	optimal	0,0	0,5
CT7	optimal	0,5	0,5
CT8	optimal	1,0	0,5
CT9	optimal	1,5	0,5
CT10	optimal	2,0	0,5
CT11	optimal	0,0	1,0
CT12	optimal	0,5	1,0
CT13	optimal	1,0	1,0
CT14	optimal	1,5	1,0
CT15	optimal	2,0	1,0

e. Effect of growth regulators on shoot multiplication ability

The experimental formula is presented in Table 2.6.

Table 2.6. A formula for studying the effect of growth regulators on the ability to multiply shoots

N°	Environment	BAP (mg/L)	IAA(mg/L)
CT1	optimal	0,0	0,0
CT2	optimal	1,5	0,0
CT3	optimal	1,5	0,1
CT4	optimal	1,5	0,3
CT5	optimal	1,5	0,5
CT6	optimal	1,5	0,7

f. Effect of growth regulators on rooting ability

The experimental formula for rooting is shown in Table 2.7.

Table 2.7. Formula for studying the effect of growth regulators on rooting ability

N°	Environment	IAA (mg/L)	NAA(mg/L)
CT1	optimal	0,0	0,0
CT2	optimal	0,1	0,0
CT3	optimal	0,3	0,0
CT4	optimal	0,5	0,0
CT5	optimal	0,7	0,0
CT6	optimal	1,0	0,0
CT7	optimal	0,0	0,1
CT8	optimal	0,0	0,3
CT9	optimal	0,0	0,5
CT11	optimal	0,0	0,7
CT12	optimal	0,0	1,0

2.3.2. Creating a mutant *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid line using experimental methods

The process of chemical treatment of mutations and creation of mutant *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid lines is carried out according to the steps described in Appendix 4.

2.3.2.1. Method of causing mutations in *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchids by colchicine and dimethyl sulphate

The samples are directly immersed in the environment containing chemicals, and the experimental formulas are shown in Table 2.8.

Table 2.8. Research formula for treating mutations with colchicine on protocorm/callus tissue

CT	Concentration colchicine (ppm)	Processing time (h)	CT	Concentration colchicine (ppm)	Processing time (h)
ĐC	0	-	CT13	200	6
CT1	50	2	CT14	400	
CT2	100		CT15	800	
CT3	200		CT16	50	8
CT4	400		CT17	100	
CT5	800		CT18	200	
CT6	50	4	CT19	400	
CT7	100		CT20	800	10
CT8	200		CT21	50	
CT9	400		CT22	100	
CT10	800		CT23	200	
CT11	50	6	CT24	400	
CT12	100		CT25	800	

Table 2.9. Research formula for treating mutations with DMS on protocorm/callus tissue

CT	Concentration DMS (ppm)	Processing time (h)	CT	Concentration DMS (ppm))	Processing time (h)
ĐC	0	-	CT13	200	6
CT1	50	2	CT14	400	
CT2	100		CT15	800	
CT3	200		CT16	50	8
CT4	400		CT17	100	

CT5	800	4	CT18	200	10
CT6	50		CT19	400	
CT7	100		CT20	800	
CT8	200		CT21	50	
CT9	400		CT22	100	
CT10	800		CT23	200	
CT11	50	6	CT24	400	
CT12	100		CT25	800	

2.3.2.2. Effects of growth regulators on tissue culture stages of chemically treated *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’ orchid samples

The experimental formulas are arranged similarly to Tables 2.5; 2.6; 2.7

2.3.3. Evaluation of morphological and genetic characteristics of mutant orchid lines

-Method of studying morphological characteristics of mutant plants (stems, roots, leaves, flowers);-Method of studying cellular characteristics of mutant lines;-Method of studying biochemical characteristics of mutant plants
-Method of studying the genetic diversity of mutant lines using RAPD molecular markers

2.3.4. Method of studying the regeneration process of some selected mutant lines

- Implement according to the best experimental formula in tables 2.4; 2.5 and tables 2.6; 27 for mutant shoots.

2.3.5. Research method to develop a process of training seedlings in the nursery

- Research suitable substrate for planting seedlings; - Research environmental conditions (temperature, humidity, light) affecting the growth of seedlings in the garden.- Research the influence of endogenous microorganisms on the growth of mutant *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’ orchids. - Develop a process of propagating and training seedlings in vitro, *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’

2.3.6 Some formulas and methods for determining evaluation criteria

2.3.7. Data processing method

- Data processed using SPSS and Microsoft Excel 2019, NTSYSpc v2.1, BioEdit 7.0.5.3., MEGA X, ImageJ 1.8.0.

CHAPTER III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Creating in-vitro starting material from samples of the *D. anosmum* 'Tim Hue'

3.1.1 Identification and collection of *D. anosmum* 'Tim Hue' orchid strains as mother plants

- *Morphological identification*

Descriptive characteristics of the morphology, such as stem, root, leaf, and flower of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid (2 years old or older) collected from some gardens in Hue City, we have built a table of morphological characteristics of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid presented in Table 3.1, Figure 3.1.



Figure 3.1. Morphological characteristics of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue')

- *Identification by molecular markers*

Based on 4 gene regions (including ITS, trnL, matK, and rbcL), we have determined the scientific name of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid species as *D. anosmum*, and we named it *Dendrobium anosmum* voucher GHTH (*D. anosmum* voucher GHTH).

3.1.2 In-vitro propagation of *D.anosmum* 'Tim Hue' orchid

3.1.2.1 In-vitro propagation of *D.anosmum* 'Tim Hue' orchid from seeds

The results are presented in Table 3.1.

Table 3.1: Optimal conditions for *in-vitro* propagation of *D.anosmum* 'Tim Hue' from seeds.

Nº	Propagation Stage		Optimal conditions	Test results
1	into the seed sample	Sterilize samples	Sterilize the fruit using 96° alcohol and burn it over an alcohol lamp flame, with a lighting time of 8 hours per day.	- Achieved high efficiency, with a sterility rate of over 95%, and no statistically significant differences between experimental treatments. - Germination time was 41.33 days, the lowest seed mortality rate was 20.36%, and germination and protocorm formation rates were 64.76% and 60.89%, respectively.
		Environ-ment	- Formula 1: MS medium + 7 g/L agar + 0.5 g/L activated carbon + 30 g/L saccharose + 60 g/L finely grated potato, 100 mL/L coconut water, pH 5.8. - Formula 4: Hyp medium (20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L (6.5N-6P-19K)) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0.5 g/L activated carbon + 30 g/L saccharose, pH 5.8	- In CT1 (MS): Germination time was 41.33 days, germination rate was 64.76%, protocorm formation rate was 60.89%, and seed mortality rate was 20.36%. - In CT4 (Hyp): Germination time was 42.87 days, germination rate was 63.08%, protocorm formation rate was 59.62%, and seed mortality rate was 20.36%.
2	Create Protocorm		- Nutrient medium supplemented with 0.75 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA	- The germination time of the seeds was 23.27 days, the germination rate was 93.46%, the protocorm formation rate was 88.75%, and the seed mortality rate was 4.43%.
3	Shoot regeneration from protocorm		- Nutrient medium supplemented with 1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	- The shoot regeneration rate reached 96.00%, with 2.76 shoots per sample, shoot height 1.83 cm, and 2.76 leaves per shoot.

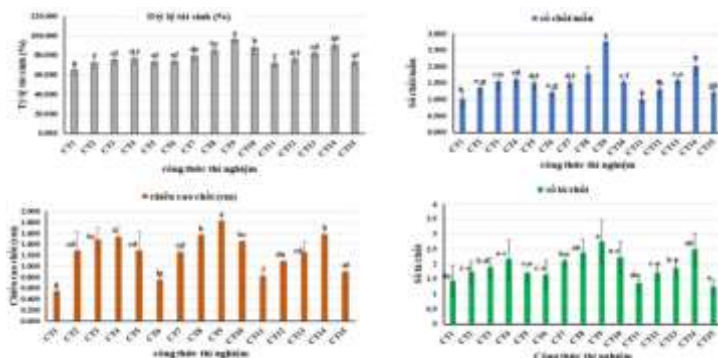


Figure 3.3. Graph showing the effect of plant growth regulators on shoot regeneration from protocorms after 8 weeks of culture.



Figure 3.2. Developmental stages of *D. anosmum* 'Tim Hue' orchid seeds sown on MS medium + 0.75 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA, illuminated for 8 hours/day.

(A. Orchid seeds newly removed from the fruit; B. Orchid seeds sown 15 days ago; C. Orchid seeds sown 25 days ago; D. Orchid seeds sown 35 days ago.)

3.1.2.2 In-vitro propagation of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' from stem segments with dormant buds

The results are presented in Table 3.2

Table 3.2. Optimal conditions for in-vitro propagation of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' from stem segments with dormant buds

N ^o	Propagation Stage		Optimal conditions	Test results
1	using a stem segment.	Sterilize samples	- Treat the sample with 2% NaClO and 0.1% HgCl ₂ for 10 minutes (CT6).	- The percentage of clean samples was 66.67%, the percentage of dead samples was 22.22%, and the percentage of contaminated samples was low at 11.11%.
		Environ-ment	- Formula 1: MS medium + 7 g/L agar + 0.5 g/L activated carbon + 30 g/L	- The survival rate of the sample was 66.33%, the rate of callus formation was 17.67%, and the

			saccharose + 60 g/L finely grated potato, 100 mL/L coconut water, pH 5.8. - Formula 4: Hyp medium (20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L (6.5N-6P-19K)) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0.5 g/L activated carbon + 30 g/L saccharose, pH 5.8	size of the callus was 0.65 cm (CT1). - The survival rate of the sample was 71.00%; the rate of callus formation was 14.67%, and the size of the callus was 0.67 cm (CT4).
2	The callus formation		- Nutrient medium supplemented with a combination of 1.5 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA	- The callus formation time was 32.07 days, the sample survival rate was 86.67%, the percentage of samples forming callus was 64.33%, and the achieved callus size was 0.97 cm.
3	Shoot regeneration	From the trunk section	- Nutrient medium supplemented with 1.5 mg/L BA	- Tỷ lệ tái sinh chồi 88,89 %, số chồi trên một mẫu đạt 2,33 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi đạt 1,57 cm, có 3,24 lá/chồi.
		The callus	Nutrient medium supplemented with 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA	- The shoot regeneration rate was 78.67%, the number of shoots reached 2.58 shoots/sample, the shoot height was 1.71 cm and the number of leaves was 2.92.

.The experimental results are shown in Figure 3.6 after 8 weeks of cultivation.

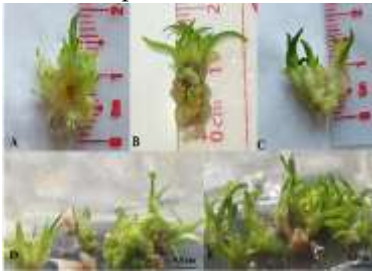


Figure 3.5. Effect of plant growth regulators on shoot regeneration from callus tissue of *D. anosmum* 'Tim Hue' from Hue after 8 weeks of culture. (A. Control, medium without plant growth regulators; B. Medium supplemented with 1.5 mg/L BA; C. Medium supplemented with 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA; D. Shoots in bark medium supplemented with 1.5 mg/L BA; E. Shoots in bark medium supplemented with 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA.)

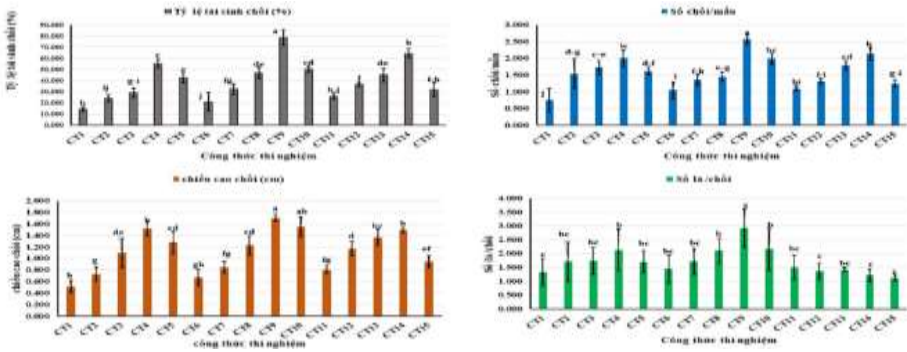


Figure 3.6: Graph of the effect of growth regulators on the ability to regenerate shoots from callus of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid after 8 weeks of culture.

3.1.2.3 Effect of growth regulators on shoot multiplication

The results obtained after 8 weeks of culture are presented in Table 3.9.

Table 3.9. Effect of BA and IAA on shoot multiplication of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid after 8 weeks of culture

BA (mg/L)	IAA (mg/L)	Multiplier	Shoot height (cm)	Shoot diameter (cm)	Number of leaves/s shoot	Shoot characteristics
0,0	0,0	$1,13 \pm 0,1^e$	$1,23 \pm 0,1^d$	$0,23 \pm 0,01^c$	$2,00 \pm 0,2^c$	small weak, yellowish green
1,5	0,0	$2,33 \pm 0,3^d$	$1,74 \pm 0,1^c$	$0,29 \pm 0,04^c$	$2,00 \pm 0,2^c$	small, light blue
1,5	0,1	$3,33 \pm 0,3^c$	$2,10 \pm 0,1^b$	$0,36 \pm 0,04^b$	$3,67 \pm 0,2^b$	medium, light blue
1,5	0,3	$4,30 \pm 0,3^b$	$2,04 \pm 0,1^b$	$0,38 \pm 0,02^b$	$4,32 \pm 0,3^a$	fat, tall, dark blue
1,5	0,5	$6,00 \pm 0,3^a$	$3,03 \pm 0,1^a$	$0,51 \pm 0,08^a$	$4,70 \pm 0,2^a$	fat, tall, dark blue
1,5	0,7	$3,67 \pm 0,3^{bc}$	$2,13 \pm 0,1^b$	$0,35 \pm 0,04^b$	$3,67 \pm 0,2^b$	medium, light blue

3.1.2.4 Effect of growth regulators on rooting ability

The rooting ability of the *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid is very good, reaching 100%. On the NAA-supplemented medium, the best rooting effect was obtained at a concentration of 0.7 mg/L NAA.

3.2 Creating mutant *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid lines by experimental methods

3.2.1 Inducing mutations in *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchids using Colchicine and Dimethyl sulphate

3.2.1.1 Inducing mutations in the *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’ orchid protocorm

After 4 weeks of cultivation in the nutrient medium, experiments showed that the survival rate of the protocorm gradually decreased as the chemical concentration and treatment time increased. The highest survival rate after chemical treatment was in CT1 with a concentration of 50 ppm, treated for 2 hours (Table 3.14).

At 8 weeks after chemical treatment, the observed results were different from those at 4 weeks. The morphology of the sample was different from the control, appearing immediately in the experimental formula CT1 with a treatment concentration of 50 ppm and a treatment time of 2 hours. In both chemicals, colchicine was 16.22% and DMS was 7.83% (CT1, Table 3.15).

3.2.1.2 Inducing mutations on callus tissue of *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’ cerevisiae

The results of 4 weeks of culture after the callus tissue was treated with chemicals showed that the survival rate of the callus tissue reached the highest level of 57.78% (CT1) when treated with colchicine, compared to the control of 96.67%. The experiment treated with DMS had the highest survival rate of 83.17% when treated with a concentration of 50 ppm for 2 hours (CT1).

8 weeks after treatment, CT1 treated with 50 ppm colchicine for 2 hours gave a survival rate of 50%. The highest survival rate of callus treated with 50 ppm DMS for 2 hours and cultured after 8 weeks was 73.62% (Table 3.17).

3.2.2 Effect of growth regulators on the shoot regeneration ability of protocorm and chemically treated callus

3.2.2.1 Effect of growth regulators on shoot regeneration ability from protocorm after chemical treatment

Colchicine-treated protocorms showed 66.78% shoot formation without BA and NAA, with optimal regeneration in CT7 (1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA).

DMS-treated protocorms performed best with 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA supplementation.

3.2.2.2 Effect of growth regulators on shoot regeneration ability from callus after chemical treatment

Callus treated with colchicine showed 12.44% shoot formation without growth regulators, while the best result occurred with 1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA. DMS-treated callus also responded optimally to this same combination.

3.2.3 Effect of growth regulators on the ability to multiply mutant shoots.

Colchicine-treated shoots showed the highest multiplication rate (4.47times) in medium with 1.5 mg/L BAP and 0.5 mg/L IAA. DMS-treated shoots also multiplied effectively in 1.5 mg/L BAP medium, reaching 1.93times.

3.2.4 Effect of growth regulators on the ability to form roots of mutant shoots

The results are presented in Table 3.18, Table 3.19

Table 3.18. Effect of growth regulators on the rooting ability of mutant shoots treated with colchicine after 8 weeks of culture

N°	NAA (mg/L)	Tracking metrics					Characteristics of roots and shoots
		Rooting rate (%)	Number of roots/shoots	Root length (cm)	Height of the tree (cm)	Number of leaves/plant	
ĐC	0	87,29±1,41 ^c	3,53±0,46 ^{bc}	1,51±0,21 ^d	3,47±0,07 ^d	4,53±0,27 ^{bc}	+
CT1	0,1	91,19±1,21 ^b	3,97±0,29 ^{bc}	2,42±0,17 ^c	3,96±0,17 ^c	4,79±0,23 ^{bc}	++
CT2	0,3	93,82±0,92 ^b	4,07±0,38 ^b	3,02±0,31 ^{bc}	4,19±0,12 ^c	5,07±0,25 ^b	+++
CT3	0,5	100±0,00 ^a	4,47±0,24 ^b	3,25±0,18 ^b	4,71±0,12 ^b	5,00±0,20 ^b	+++
CT4	0,7	100±0,00 ^a	5,73±0,25 ^a	4,54±0,18 ^a	5,81±0,21 ^a	6,27±0,23 ^a	++++
CT5	1	81,71±1,15 ^d	2,93±0,48 ^c	2,53±0,36 ^{bc}	4,21±0,11 ^c	4,20±0,15 ^c	+

+: few roots, small, short, white, yellowish green, small, thin leaves.

++: average number of roots, short, small, white roots, green leaves, thick leaves.

+++ : many roots, long but small and weak, white-green, green leaves, thick leaves.

++++: many roots, long, big and fat, white-green roots, dark green leaves, thick, long leaves.

Table 3.19. Effect of growth regulators on the rooting ability of mutant shoots treated with DMS after 8 weeks of culture

N°	NAA (mg/L)	Tracking metrics					Characteristics of roots and shoots
		Rooting rate (%)	Number of roots/shoots	Root length (cm)	Height of the tree (cm)	Number of leaves/plant	
ĐC	0,0	73,63±1,08 ^e	2,20±0,28 ^d	1,05±0,20 ^d	2,25±0,05 ^d	4,07±0,21 ^b	+

N°	NAA (mg/L)	Tracking metrics					Characteristics of roots and shoots
		Rooting rate (%)	Number of roots/shoots	Root length (cm)	Height of the tree (cm)	Number of leaves/plant	
CT1	0,1	80,04±2,23 ^d	2,23±0,27 ^d	1,68±0,30 ^c	3,52±0,07 ^{cd}	4,07±0,21 ^b	+
CT2	0,3	86,86±0,95 ^c	3,07±0,23 ^c	2,47±0,20 ^b	3,68±0,10 ^{bc}	4,37±0,26 ^b	++
CT3	0,5	93,79±0,93 ^b	3,60±0,39 ^{bc}	3,37±0,13 ^a	3,81±0,13 ^{bc}	5,13±0,21 ^a	+++
CT4	0,7	100±0,00 ^a	4,67±0,27 ^a	3,73±0,22 ^a	4,47±0,19 ^a	5,60±0,16 ^a	++++
CT5	1,0	95,78±1,54 ^b	4,13±0,26 ^{ab}	3,27±0,15 ^a	4,05±0,17 ^b	3,87±0,19 ^b	++

+: few roots, small, short, white, yellowish green, small, thin leaves.

++: medium number of roots, short, small, white roots, green leaf plant, thick leaves.

+++ : many roots, long but small and weak, white-green, green leaf plant, thick leaves.

++++: many roots, long, big and fat, white-green roots, dark green leaf plant, thick, long leaves.

3.3. Evaluation of morphological/genetic characteristics of mutant orchid lines

3.3.1. Morphological characteristics of mutant plants



Figure 3.21. Morphological variation of the flower surface of some mutant lines. A. Control plant flower; B. Small flower, thick petal of line M14; C. Flower with elongated petal of line HX4; D. Deformed flower of line M11; E. Large flower of line M2; F. Plant does not flower, has root bud; G. Flower with purple spot on petal of line M5; H. Deformed flower of line M9; I. Large flower of line M8; J. Plant does not flower, has developing buds; K. Flower with purple spot on petal of line M7; L. Flower with elongated petals of line M17

Morphological changes were first observed at the protocorm and callus stages after 6–8 weeks of chemical treatment. Some protocorms turned white or yellow but died after 8 weeks, and those treated with colchicine were larger than others. Callus samples treated with colchicine and DMS also exhibited altered morphology within 3–4 weeks.

3.3.2. Cellular characteristics of mutant plants

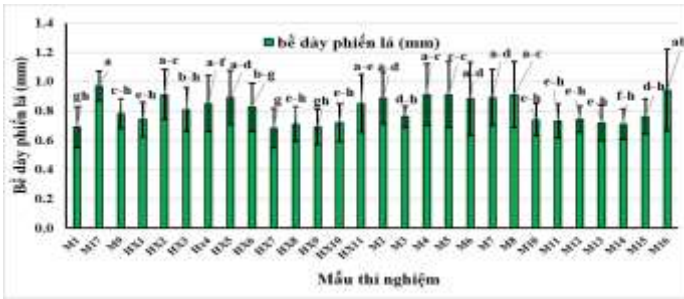


Figure 3.24: Thickness chart of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid leaf blade after 3 months of shoot regeneration culture.

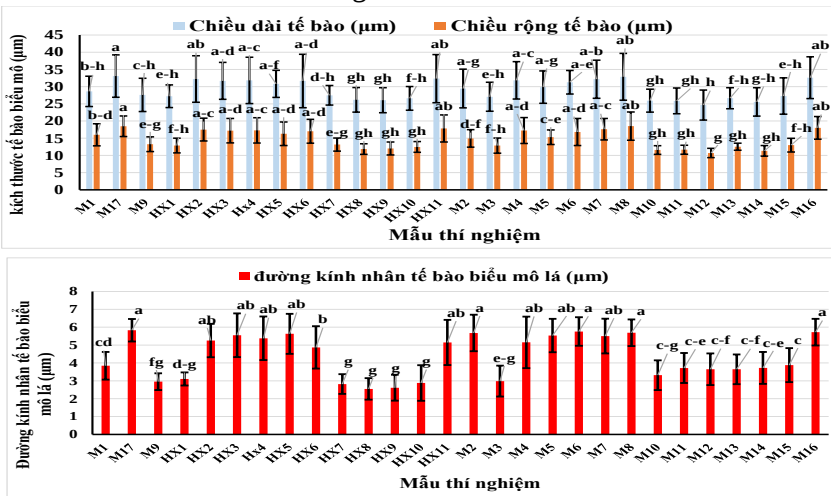


Figure 3.25: Size chart (length, width) and nucleus diameter of leaf epithelial cells

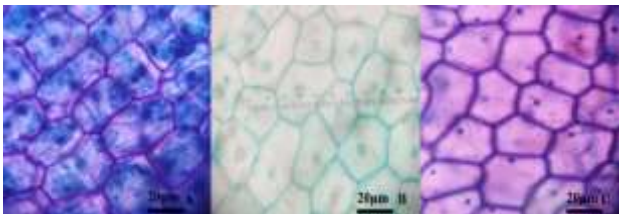


Figure 3.26. Underlying epithelial cells of a leaf of the Hue purple Phalaenopsis orchid. (A). Control leaf cells without chemical treatment; B. Sample treated with 100 ppm colchicine for 10 hours (M17); C. Sample treated with 50 ppm DMS for 4 hours (M9).)

The cell characteristics of the control sample, colchicine-treated sample, and DMS-treated sample in terms of morphology, size, quantity, and arrangement order all had different changes (Figure 3.25). This result shows that the chemicals colchicine and DMS have affected the tissue and cell structure, leading to changes in shape, arrangement order, and cell size.

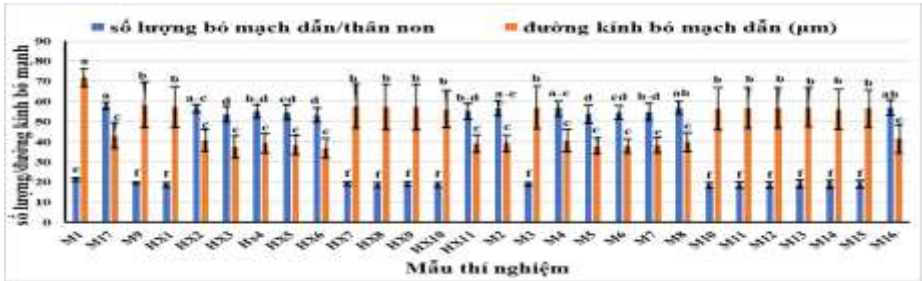


Figure 3.27: Graph of the number of strong bundles and the diameter of strong bundles in the young stem of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid.

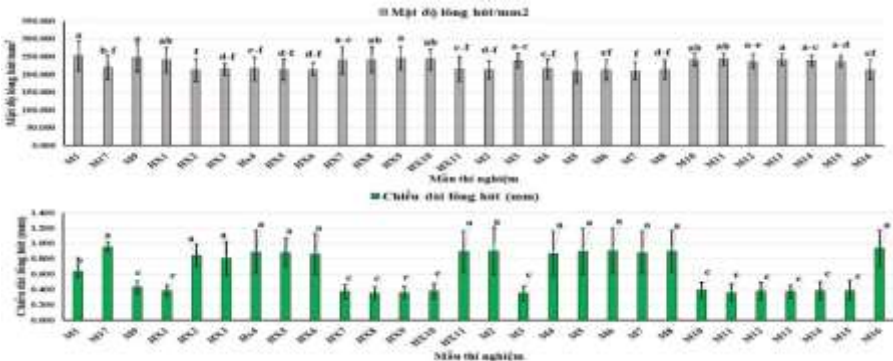


Figure 3.30: Graph showing the density and length of root hairs of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid

Analysis of 27 leaf samples of chemically treated mutant plants showed that Chl and carotene contents were higher than those of control plants.

Mutagen-treated plants showed increased chlorophyll and carotene levels compared to controls. Chromosome analysis revealed diploid control roots ($2n=38$) and tetraploid colchicine-treated roots ($4n=76$)

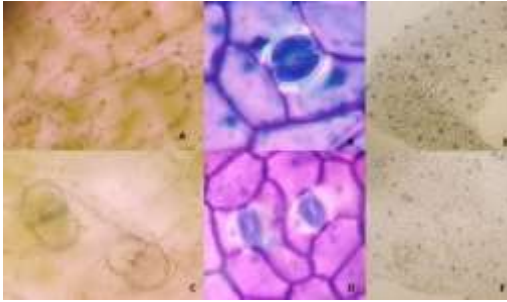


Figure 3.31. Stomatal morphology of the *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid after 3 months of shoot culture. A, B: Stomata in leaves of control plants (40x); C: Stomata in leaves of colchicine-treated plants (40x); D: Stomata in leaves of DMS-treated plants (40x); E: Number of stomata in control leaves (10x); F: Stomata in leaves treated with colchicine (10x).

3.3.3 Genetic diversity analysis

As a result, we selected 10 random RAPD primers (Table 3.22) to perform genetic diversity analysis for 34 selected orchid samples.

Table 3.22. PCR amplification results based on each RAPD primer of 34 *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid samples

N°	primers	Percentage of individuals successfully amplified by PCR (%)	Number of DNA bands formed/primer	Number of polymorphic DNA bands	Size of DNA band (bp)	Polymorphic DNA band rate (%)
1	P6	100	8	8	650-1600	100,00
2	P9	100	9	9	450-1200	100,00
3	P16	100	5	4	450-800	80,00
4	P17	100	9	6	350-1450	66,67
5	P18	100	6	4	400-1100	66,67
6	OPA-03	100	6	3	750-1250	50,00
7	OPF-01	100	7	6	600-1050	85,71
8	OPF-05	100	5	3	600-900	60,00
9	OPO-04	100	9	6	500-1100	66,67
10	OPBH-16	100	6	4	500-800	66,67
Total DNA bands		-	70	53	-	-
Average DNA band number/primer		100	7	5,3	-	75,71

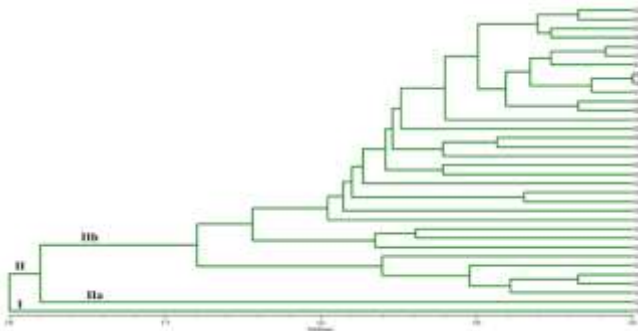


Figure 3.35. Genetic clustering tree of 34 *D. anosmum* 'Tim Hue' orchid lines.

3.4 Regeneration process of some promising mutant lines of *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’ cerevisiae

3.4.1 Regeneration of callus tissue from shoots of some mutant lines

The M17 line gave the best results, with the rate of callus formation being 82.00%.

Table 3.24. Callus or shoot regeneration ability of some mutant lines after 12 weeks

samples	Callus/shoot formation time	Sample survival rate (%)	Rate of callus formation (%)	Size of scar tissue (cm)	Rate of shoot forming samples (%)	Shoot height (cm)
M1	29,45±0,90 ^a	90,67±1,90 ^b	71,78±2,54 ^b	1,13±0,07 ^b	15,56±2,94 ^a	1,73±0,08 ^b
HX3	33,27±0,92 ^b	95,33±1,20 ^a	78,44±1,45 ^a	1,58±0,11 ^a	11,56±1,02 ^{ab}	2,24±0,11 ^a
HX10	41,40±1,69 ^c	82,22±1,80 ^c	62,67±2,46 ^c	0,94±0,09 ^{bc}	11,56±1,38 ^{ab}	1,81±0,09 ^b
M5	35,27±0,69 ^b	92,89±1,62 ^{ab}	76,44±1,70 ^{ab}	1,63±0,14 ^a	12,22±1,01 ^{ab}	2,35±0,09 ^a
M13	47,87±1,68 ^d	75,56±1,41 ^d	53,56±1,54 ^d	0,76±0,06 ^c	7,33±0,58 ^b	1,37±0,05 ^c
M14	44,47±1,50 ^{cd}	78,67±1,48 ^{cd}	64,22±2,19 ^c	1,14±0,07 ^b	9,33±1,96 ^b	1,61±0,10 ^{bc}
M17	27,40±0,79 ^a	96,44±1,19 ^a	82,00±1,21 ^a	1,62±0,11 ^a	10,89±0,69 ^{ab}	2,41±0,11 ^a

3.4.2 Regeneration of shoots from callus tissue of mutant lines

The results of shoot regeneration from callus tissue of M17 and HX3 samples were the best, with rates of 94.67% and 89.33%.

3.4.3. Rapid multiplication of shoots of mutant lines

The ability to multiply shoots of mutant M17 shoots was the highest, with the shoot multiplication coefficient obtained being 7.53 times.

3.4.4. Rooting results to create complete plants from mutant shoots

The rooting ability of the *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’ orchid shoots is very good, achieving a rooting rate of 100% in all tested samples; however, the sample with the best results is M17, with the number of roots reaching 6.31 roots/shoot

3.5.5 Regeneration process of some mutant *Dendrobium anosmum* ‘Tim Hue’ orchid lines

-The process is shown through 5 steps and diagrams of the 5 steps.

3.5 Building a process to train seedlings in the nursery

-Treatment M17 yielded the highest survival rate at 56.60%.

- Orchid seedlings in the nursery stage respond best under 50% shading, with a survival rate of 56.67%, confirming their high sensitivity to light exposure.
- A total of 30 strains of endophytic bacteria were successfully isolated from various parts of wild orchids.
- The most effective biomass-to-nutrient solution ratio for microbial preparations was 1:50.
- Among the CP2, CP5, and CP6 treatments, differences were observed in infection rates: 7.56%, 14.67%, and 11.56%, respectively.
- The protocol was documented in a 7-step process, presented in diagrammatic form.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

1. Conclusion

1. The study successfully identified and collected the correct samples of *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' in Hue City, which were used as materials for successful in-vitro culture from seeds and dormant buds, generating initial materials (protocorms and callus tissues) for subsequent experiments. At the same time, the study determined suitable conditions for in-vitro propagation of *Dendrobium anosmum* 'tim Hue'.

2. Mutation treatment using Colchicine and DMS on protocorms and callus tissues was effectively carried out at concentrations of 50–400 ppm for 2–10 hours, producing viable samples with morphological variations. The study selected 27 variant orchid lines, including 14 lines from Colchicine and 13 lines from DMS.

3. Evaluation of the mutant lines was conducted using morphological, cytological, biochemical markers, and RAPD markers. The study selected 6 promising lines with clear morphological and genetic differences for further development research.

4. The study successfully established a suitable protocol for caring for in-vitro orchid seedlings during the nursery stage, identifying optimal conditions for the seedlings to adapt and grow in the garden. Endophytic microbial preparations were applied in the care of orchid seedlings in the garden, reducing the use of chemical fertilizers and pesticides.

2. Recommendations

Further evaluation of mutant lines under production conditions (nursery and ornamental gardens) is required.

In-depth molecular studies are necessary, particularly to identify the specific genes responsible for genetic alterations, as well as to determine the ploidy levels (even or odd) and their associated characteristics.

A comprehensive assessment of the economic value, aesthetic appeal, and practical application potential of the *Dendrobium anosmum* "Tim Hue" and its mutant lines is essential.

LIST OF PUBLISHED WORKS

1. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, Pham Thanh, Hoang Khanh Linh, and Nguyen Thi Kim Cuc (2023). Conservation of *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' by in vitro propagation. Tạp chí Journal Propagation of Ornamental Plants, Vol. 23, No. 2, 39-48.
2. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, Nguyen Thi Kim Cuc (2024). The influence of some factors on the propagation of *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue'. Orchid by the in vitro culture method. International Scientific Conference on "Research on biodiversity and medicinal potential of Orchidaceae, Theaceae and Zingiberaceae in Vietnam". Hue University Publishing House, 62-68.
3. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, and Nguyen Thi Kim Cuc (2024). *Dendrobium anosmum* Lindl. 'Tim Hue' and the method of vegetative propagation from the axillary node shoots of the stem (keikis). The 6th National Scientific Conference on Biological Research and Teaching in Vietnam, 908-915.
4. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, La Thi Thu Hang, Truong Thi Bich Phuong, Nguyen Thi Kim Cuc (2024). Study on the effect of Dimethyl sulfide (DMS) on creating mutations in *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue' orchid. National scientific conference on Biotechnology, 467-473.
5. **Nguyen Huu Tho**, Truong Thi Bich Phuong, Ho Thi Xuan Tuy, Pham Thanh, Nguyen Thi Kim Cuc (2024). Study on isolation of endophytic bacteria from some wild orchid species. 2024. Hue University Journal, Vol. 133, No. 1C, 179-191.