

ĐẠI HỌC HUẾ  
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC  
---o0o---

NGUYỄN HỮU THỌ

NGHIÊN CỨU TẠO MỘT SỐ DÒNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ  
(*Dendrobium anosmum* Lindl.) ĐỘT BIẾN BẰNG PHƯƠNG PHÁP  
THỰC NGHIỆM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2025

**ĐẠI HỌC HUẾ**  
**VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**  
---o0o---

**NGUYỄN HỮU THỌ**

**NGHIÊN CỨU TẠO MỘT SỐ DÒNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ**  
**(*Dendrobium anosmum* Lindl.) ĐỘT BIẾN BẰNG PHƯƠNG**  
**PHÁP THỰC NGHIỆM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**  
**Ngành: Sinh học**  
**Mã số: 9420101**

**Người hướng dẫn khoa học:**  
**1. TS. NGUYỄN THỊ KIM CÚC**  
**2. PGS.TS. TRƯƠNG THỊ BÍCH PHƯƠNG**

**HUẾ, 2025**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của chúng tôi. Các số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án này là trung thực, khách quan và chưa từng dùng để bảo vệ lấy bất kỳ học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ rõ nguồn gốc.

*Huế, ngày    tháng    năm 2025*

**Tác giả luận án**

**Nguyễn Hữu Thọ**

## **LỜI CẢM ƠN**

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án tiến sĩ, tôi đã nhận được rất nhiều sự quan tâm, giúp đỡ rất tận tình từ Quý Thầy Cô, các anh chị em, gia đình và bạn bè.

Đầu tiên, cho phép tôi được bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới đến hai cô là TS. Nguyễn Thị Kim Cúc, PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng đã tận tình hướng dẫn, dành nhiều công sức, thời gian và đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi có thể hoàn thành tốt quá trình học tập, thực hiện đề tài nghiên cứu và luận án của mình.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi học tập, thực hiện nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến lãnh đạo khoa Nông lâm nghiệp, Ban giám hiệu, Trường Cao đẳng Cơ điện -Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án NCS.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Nguyễn Thị Kim Cúc, phòng thí nghiệm tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế; Trường Cao đẳng Cơ điện -Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ; Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VINBIGDATA), GS. TS Dương Tấn Nhựt, Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã hỗ trợ kinh phí, tặng học bổng cho tôi để học tập và thực hiện đề tài luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các cán bộ Bộ môn Sinh học và Công nghệ sinh học ứng dụng, phòng thí nghiệm Tế bào, phòng thí nghiệm Công nghệ gen, phòng thí nghiệm Công nghệ Enzyme và Protein, phòng thí nghiệm Vi sinh vật học và Công nghệ lên men, phòng thí nghiệm Sinh học phân tử Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cùng các nghiên cứu sinh đã hết lòng giúp đỡ, động viên tôi hoàn thành luận án.

Cuối cùng, con xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ba Mẹ, Gia đình hai bên; xin gửi lời cảm ơn đến Vợ cùng Anh Chị Em người thân và toàn thể bạn bè, đồng nghiệp đã động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

*Thành Phố Huế, ngày..... tháng..... năm 2025*

**Tác giả luận án**

**Nguyễn Hữu Thọ**

## MỤC LỤC

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| LỜI CAM ĐOAN.....                                                                                                       | i   |
| LỜI CẢM ƠN.....                                                                                                         | ii  |
| MỤC LỤC.....                                                                                                            | iii |
| DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....                                                                                              | vii |
| DANH MỤC SƠ ĐỒ HÌNH ẢNH.....                                                                                            | xi  |
| DANH MỤC BẢNG BIỂU.....                                                                                                 | xv  |
| MỞ ĐẦU .....                                                                                                            | 1   |
| Mục tiêu nghiên cứu .....                                                                                               | 2   |
| Nội dung nghiên cứu .....                                                                                               | 2   |
| Phạm vi nghiên cứu .....                                                                                                | 3   |
| Ý nghĩa khoa học và thực tiễn .....                                                                                     | 3   |
| Những điểm mới của luận án.....                                                                                         | 4   |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU .....                                                                         | 5   |
| 1. Tổng quan chi lan Hoàng Thảo ( <i>Dendrobium</i> ) và loài lan Giả hạc tím ( <i>Dendrobium anosmum</i> Lindl.) ..... | 5   |
| 1.1. Chi lan Hoàng Thảo ( <i>Dendrobium</i> ) .....                                                                     | 5   |
| 1.2. Lan Giả hạc ( <i>Dendrobium anosmum</i> Lindl.).....                                                               | 5   |
| 1.2.1 Phân loại thực vật .....                                                                                          | 5   |
| 1.2.2 Phân bố .....                                                                                                     | 6   |
| 1.2.3. Đặc điểm của lan Giả hạc .....                                                                                   | 6   |
| 1.2.4. Đặc điểm bộ nhiễm sắc thể (NST) của lan Giả hạc.....                                                             | 8   |
| 1.2.5. Giá trị của lan Giả hạc .....                                                                                    | 9   |
| 1.2.6. Lan Giả hạc tím Huế.....                                                                                         | 11  |
| 2. Tổng quan nghiên cứu các phương pháp nhân giống lan Giả hạc.....                                                     | 12  |
| 2.1. Nhân giống truyền thống .....                                                                                      | 12  |
| 2.2. Nhân giống in-vitro lan Giả hạc .....                                                                              | 14  |
| 3. Các yếu tố ảnh hưởng đến cây con sinh trưởng ở vườn .....                                                            | 17  |
| 3.1. Ánh sáng .....                                                                                                     | 17  |
| 3.2. Nhiệt độ .....                                                                                                     | 18  |
| 3.3. Độ ẩm .....                                                                                                        | 18  |

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4. Nước .....                                                                                        | 18 |
| 3.5. Giá thể trồng .....                                                                               | 18 |
| 4. Vi sinh vật nội sinh thực vật .....                                                                 | 19 |
| 5. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến .....                                                       | 21 |
| 5.1. Khái niệm.....                                                                                    | 21 |
| 5.2. Sơ lược về tạo đột biến bằng tác nhân hoá học .....                                               | 21 |
| 6. Một số phương pháp phân tích đa dạng di truyền ở thực vật .....                                     | 23 |
| 6.1. Phân tích đa dạng hình thái .....                                                                 | 23 |
| 6.2. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào chỉ thị sinh lý – sinh hoá .....                              | 24 |
| 7. Một số kết quả nghiên cứu có liên quan đến đề tài .....                                             | 27 |
| 7.1. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô.....                                                      | 27 |
| 7.2. Tạo giống đột biến bằng phương pháp thực nghiệm .....                                             | 31 |
| 7.3. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử .....                                            | 33 |
| CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....                                          | 35 |
| 2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu .....                                                 | 35 |
| 2.2. Vật liệu nghiên cứu .....                                                                         | 35 |
| 2.2.1. Vật liệu thực vật .....                                                                         | 35 |
| 2.2.2. Hoá chất thí nghiệm.....                                                                        | 36 |
| 2.2.3. Điều kiện phòng và môi trường nuôi cấy .....                                                    | 37 |
| 2.3. Phương pháp nghiên cứu .....                                                                      | 38 |
| 2.3.1 Tạo vật liệu khởi đầu <i>in-vitro</i> cho lan Giả hạc tím Huế .....                              | 38 |
| 2.3.2. Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm .....                        | 46 |
| 2.3.3. Đánh giá đặc điểm hình thái và di truyền của các dòng lan đột biến.....                         | 49 |
| 2.3.4. Quy trình tái sinh lại một số dòng đột biến được chọn lọc.....                                  | 53 |
| 2.3.5. Xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm.....                                          | 54 |
| 2.3.6. Một số công thức và cách xác định chỉ tiêu đánh giá .....                                       | 58 |
| 2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu .....                                                                 | 59 |
| CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....                                                                  | 60 |
| 3.1. Tạo vật liệu khởi đầu <i>in-vitro</i> từ mẫu lan Giả hạc tím Huế ( <i>D. anosmum</i> Lindl.)..... | 60 |
| 3.1.1 Nhận diện và thu thập dòng lan Giả hạc tím Huế làm cây đầu dòng .....                            | 60 |
| 3.1.2 Nhân giống <i>in-vitro</i> lan Giả hạc tím Huế .....                                             | 62 |
| 3.2 Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm .....                           | 80 |

|                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1 Gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng <i>Colchicine</i> hoặc <i>Dimethyl sulphate</i> .....                                                       | 80  |
| 3.2.3 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi xử lý đột biến.....                                                                | 98  |
| 3.2.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ của chồi đột biến .....                                                               | 100 |
| 3.3. Đánh giá đặc điểm hình thái/di truyền của các dòng lan đột biến.....                                                                               | 102 |
| 3.3.1. Đặc điểm hình thái của cây đột biến .....                                                                                                        | 103 |
| 3.3.2. Đặc điểm tế bào cây đột biến .....                                                                                                               | 109 |
| 3.3.3. Đa dạng di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử RAPD .....                                                                          | 121 |
| 3.4 Quy trình tái sinh lại một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến có triển vọng.....                                                                  | 126 |
| 3.4.1 Tái sinh mô sẹo từ chồi của một số dòng đột biến .....                                                                                            | 126 |
| 3.5.3. Nhân nhanh chồi của các dòng đột biến.....                                                                                                       | 128 |
| 3.5.4. Kết quả ra rễ tạo cây hoàn chỉnh từ các chồi đột biến.....                                                                                       | 128 |
| 3.5 Xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm .....                                                                                             | 130 |
| 3.5.1. Nghiên cứu giá thể phù hợp để ra bầu cây con. ....                                                                                               | 130 |
| 3.5.2. Ảnh hưởng giá thể trồng đến các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến giai đoạn vườn ươm.....                                                        | 132 |
| 3.5.3. Điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng) ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây lan con Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> đột biến ra vườn..... | 134 |
| 3.5.4 Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến .....                                           | 136 |
| 3.5.5 Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con <i>in-vitro</i> lan Giả hạc tím Huế.....                                                               | 143 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....                                                                                                                               | 144 |
| 1. Kết luận .....                                                                                                                                       | 144 |
| 2. Đề nghị.....                                                                                                                                         | 144 |
| DANH MỤC CÁC BÀI BÁO, CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN .....                                                                                            | 145 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO.....                                                                                                                                 | 146 |
| PHỤ LỤC.....                                                                                                                                            | 159 |

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

| Chữ viết tắt | Tiếng Anh                                                                       | Nghĩa tiếng việt                                                           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 2-iP         | 2-isopentenylpyridine                                                           | -                                                                          |
| 2,4-D        | 2,4-dichlorophenoxyacetic                                                       | -                                                                          |
| 2,4,5-T      | 2,4,5-trichlorophenoxyacetic                                                    | -                                                                          |
| 4-CPA        | Sodium 4-chlorophenoxyacetate acid acetic                                       | -                                                                          |
| 6-BAP        | 6-benzylaminopurine                                                             | -                                                                          |
| ABA          | Acid abscisic                                                                   |                                                                            |
| ACC          | 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid                                           | -                                                                          |
| ACMP         | Cyclic adenosine monophosphate                                                  | -                                                                          |
| ADP          | Adenosine diphosphat                                                            | -                                                                          |
| AIA          | Acid $\beta$ -Indolyacetic                                                      | -                                                                          |
| AIB          | Acid $\beta$ -Indolybutyric                                                     | -                                                                          |
| AFLP         | Amplified fragment length polymorphism                                          | Đa hình độ dài các đoạn được khuếch đại                                    |
| ANOVA        | Analysis of Variance                                                            | Phân tích phương sai                                                       |
| APG          | Angiosperm Phylogeny Group                                                      | Hệ thống phân loại sinh học thực vật                                       |
| ARN          | Acid ribonucleic                                                                | -                                                                          |
| ATP          | Adenosine triphosphate                                                          | -                                                                          |
| BA           | 6-benzylaminopurine                                                             | -                                                                          |
| BA2H         | Acid benzoic 2-hydroxylase                                                      | -                                                                          |
| BLAST        | Basic Local Alignment Search Tool                                               | Công cụ tìm kiếm đối chiếu cơ bản                                          |
| BPA          | Bisphenol A                                                                     | -                                                                          |
| BR           | Brassinosteroid                                                                 | -                                                                          |
| CITES        | Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora | Công ước quốc tế về buôn bán các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp |
| CM           | Chorismate mutase                                                               | -                                                                          |
| Colc         | Colchicine                                                                      | -                                                                          |
| COR          | Coronatine                                                                      | -                                                                          |
| CPS          | <i>ent</i> -copalyl diphosphate synthase                                        | -                                                                          |
| CT           | -                                                                               | Công thức                                                                  |
| CTAB         | Cetyltrimethylammonium-bromide                                                  | -                                                                          |
| DMS          | Dimethyl sulfide                                                                | -                                                                          |
| DNA          | Acid Deoxyribonucleic                                                           | -                                                                          |
| dNTP         | deoxyribonucleotide triphosphate                                                | -                                                                          |
| DPPH         | 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl                                                   | -                                                                          |
| EMS          | Ethyl methanesulphonate                                                         | -                                                                          |
| Et           | Ethylene                                                                        | -                                                                          |

|        |                                                         |                                                        |
|--------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| FAO    | Food and agriculture organization of the United Nations | Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hợp Quốc        |
| FDP    | Farnesyl diphosphate                                    |                                                        |
| FL     | Fluorescent lamp                                        | Đèn huỳnh quang                                        |
| GA     | Gibberellin                                             | -                                                      |
| GE     | Gabbage enzyme                                          | -                                                      |
| GGDP   | Geranylgeranyl diphosphate                              | -                                                      |
| Hyp    | Hyponex                                                 | -                                                      |
| IAA    | acid Indole-3-acetic                                    | -                                                      |
| IAAld  | Indole-3-acetaldehyde                                   | -                                                      |
| IAEA   | International atomic energy agency                      | Cơ quan năng lượng nguyên tử quốc tế                   |
| IBA    | Acid Indole-3-butyric                                   | -                                                      |
| IC     | Isochorismate                                           | -                                                      |
| ISP2   | International streptomyces project 2                    | -                                                      |
| ISSR   | Inter – simple sequence repeats                         | Chuỗi lặp lại đơn giản giữa                            |
| iP RTP | isopentenyladenosine-5'-triphosphate                    | -                                                      |
| iPRDP  | isopentenyladenosine-5'-diphosphate                     | -                                                      |
| IPA    | indole-3-pyruvate                                       | -                                                      |
| IPL    | isochorismate pyruvate lyase                            | -                                                      |
| ITS    | Internal Transcribed Spacer                             | Vùng đệm trong được sao mã                             |
| JA     | Jasmonate                                               | -                                                      |
| KC     | Knudson C                                               | -                                                      |
| Kn     | Kinetin                                                 | -                                                      |
| LB     | Luria-Bertani                                           | -                                                      |
| LED    | Light-Emitting-Diode                                    | ánh sáng Đi-ốt phát quang                              |
| matK   | Maturase K                                              | -                                                      |
| MMS    | Miracle Mineral Solution                                | Dung dịch muối khoáng thần kì                          |
| MS     | Murashige and Skoog                                     | Môi trường Murashige và Skoog                          |
| MVW    | Vacin & went medium                                     | Môi trường Vacin & went                                |
| NA     | Nutrient agar                                           | Môi trường thạch dinh dưỡng                            |
| NAA    | Acid naphthaleneacetic                                  | -                                                      |
| NCBI   | National Center for Biotechnology Information           | Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa kỳ |
| NST    | Chromosome                                              | Nhiễm sắc thể                                          |
| Nu     | Nucleotide                                              | Nucleotit                                              |
| PCR    | Polymerase Chain Reaction                               | Phản ứng chuỗi Polymerase                              |
| PE     | Polyethylene                                            | -                                                      |

|        |                                                            |                                                                                                                                      |
|--------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PGR    | Plant growth regulators                                    | Chất điều hòa sinh trưởng thực vật                                                                                                   |
| PLB    | Protocorm like bodies                                      | Thể giống protocorm                                                                                                                  |
| PM     | proliferation medium                                       | Môi trường tăng trưởng                                                                                                               |
| PVK    | Pikovskaya                                                 | -                                                                                                                                    |
| PVP    | polyvinin pyrroline                                        | -                                                                                                                                    |
| RAPD   | Randomly Amplified Polymorphic DNA                         | DNA đa hình được nhân bản ngẫu nhiên                                                                                                 |
| rbcL   | Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase                      | -                                                                                                                                    |
| RFLP   | Restriction fragment length polymorphism                   | Đa hình độ dài các đoạn cắt hạn chế                                                                                                  |
| rRNA   | Ribosomal RNA                                              | RNA ribosome                                                                                                                         |
| SAHN   | Successive Approximations Based on Hierarchical and Nested | Các phép xấp xỉ liên tiếp dựa trên phân cấp và lồng nhau                                                                             |
| SCA    | Starch casein agar                                         | Thạch tinh bột casein                                                                                                                |
| SCoT   | Start Codon Targeted                                       | Vị trí codon mã hoá                                                                                                                  |
| SD     | standard deviation                                         | Độ lệch chuẩn                                                                                                                        |
| SE     | Standard error                                             | Sai số chuẩn                                                                                                                         |
| SPSS   | Statistical Package for the Social Sciences                | Phần mềm thống kê khoa học xã hội                                                                                                    |
| SSR    | Simple Sequence Repeats                                    | Các chuỗi lặp lại đơn                                                                                                                |
| TBE    | Tris – Boric acid -EDTA                                    | -                                                                                                                                    |
| TDZ    | Thidiazuron                                                | -                                                                                                                                    |
| TN     |                                                            | Thí nghiệm                                                                                                                           |
| UBND   | -                                                          | Ủy ban nhân dân                                                                                                                      |
| UPGMA  | Unweighted pair group method using arithmetic averages     | Phương pháp khoảng cách để xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên phương pháp gom cụm không có trọng số, dùng trung bình số học. |
| USD    | United States Dollar                                       | Đô la Mỹ                                                                                                                             |
| UV     | Ultraviolet                                                | Tử ngoại                                                                                                                             |
| UV-VIS | Ultraviolet - Visible                                      | Tử ngoại - khả kiến                                                                                                                  |

## DANH MỤC SƠ ĐỒ HÌNH ẢNH

| TT                 | Tên sơ đồ, hình ảnh.                                                                                                          | Trang |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Hình 1.1</b>    | Nhiễm sắc thể của <i>Dendrobium anosmum</i>                                                                                   | 9     |
| <b>Hình 1.2</b>    | Hoa lan Giả hạc tím Huế ( <i>D. anosmum</i> Lindl.)                                                                           | 12    |
| <b>Hình 2.1</b>    | Mẫu lan Giả hạc tím Huế                                                                                                       | 35    |
| <b>Hình 3.1</b>    | Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế ( <i>D. anosmum</i> lindl.)                                                        | 60    |
| <b>Hình 3.2</b>    | Các giai đoạn phát triển của hạt lan Giả hạc tím Huế                                                                          | 66    |
| <b>Hình 3.3</b>    | Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của lan Giả hạc tím Huế từ protocorm.                         | 67    |
| <b>Hình 3.4</b>    | Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy                   | 68    |
| <b>Hình 3.5</b>    | 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      | 73    |
| <b>Hình 3.6</b>    | 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. | 74    |
| <b>Hình 3.7</b>    | Tái sinh chồi <i>in-vitro</i> từ đoạn thân Giả hạc tím Huế                                                                    | 75    |
| <b>Hình 3.8.</b>   | Nhân nhanh chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy                                                                       | 78    |
| <b>Hình 3.9.</b>   | Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy                   | 80    |
| <b>Hình 3.10</b>   | Hình thái protocorm sau khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 4 tuần.                                                | 81    |
| <b>Hình 3.11</b>   | Hình thái protocorm xử lý bằng colchicine hoặc DMS được nuôi cấy sau 8 tuần                                                   | 83    |
| <b>Hình 3.12</b>   | Trạng thái mô sẹo khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 4 tuần                                                       | 90    |
| <b>Hình 3.13</b>   | Trạng thái mô sẹo khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 8 tuần                                                       | 90    |
| <b>Hình 3.14.</b>  | Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của protocorm đã xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy        | 93    |
| <b>Hình 3.15</b>   | Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của mô sẹo đã xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy.          | 96    |
| <b>Hình 3.16</b>   | Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng nhân chồi đã xử lý hoá chất.                                             | 99    |
| <b>Hình 3.17.1</b> | Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy.                                 | 101   |
| <b>Hình 3.17.2</b> | Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng DMS sau 8 tuần nuôi cấy.                                        | 102   |
| <b>Hình 3.18</b>   | Một số hình dạng bất thường của protocorm xử lý hoá chất                                                                      | 103   |
| <b>Hình 3.19</b>   | Một số hình dạng bất thường của mô sẹo xử lý hoá chất.                                                                        | 104   |
| <b>Hình 3.20</b>   | Hình thái chồi tái sinh từ mô sẹo và protocorm xử lý hoá chất.                                                                | 106   |
| <b>Hình 3.21</b>   | Hình thái biến dị mặt hoa của một số dòng đột biến.                                                                           | 108   |
| <b>Hình 3.22</b>   | Đỉnh sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế được quan sát dưới                                                                   | 110   |

|                  |                                                                                                                                               |     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                  | kính hiển vi.                                                                                                                                 |     |
| <b>Hình 3.23</b> | Mặt cắt ngang của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi                                                             | 110 |
| <b>Hình 3.24</b> | Biểu đồ bề dày của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi                                                            | 111 |
| <b>Hình 3.25</b> | Biểu đồ kích thước (chiều dài, chiều rộng) và đường kính nhân của tế bào biểu mô lá                                                           | 112 |
| <b>Hình 3.26</b> | Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế                                                                                            | 112 |
| <b>Hình 3.27</b> | Biểu đồ số lượng bó mạch và đường kính bó mạch dẫn trong thân non của lan Giả hạc tím Huế                                                     | 113 |
| <b>Hình 3.28</b> | Hình thái giải phẫu mặt cắt ngang của thân chồi lan Giả hạc tím Huế                                                                           | 114 |
| <b>Hình 3.29</b> | Hình giải phẫu rễ lan Giả hạc tím Huế.                                                                                                        | 114 |
| <b>Hình 3.30</b> | Biểu đồ thể hiện mật độ và chiều dài lông hút của rễ lan Giả hạc tím Huế                                                                      | 115 |
| <b>Hình 3.31</b> | Hình thái khí khổng của lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy chồi                                                                         | 116 |
| <b>Hình 3.32</b> | Bộ nhiễm sắc thể lan Giả hạc tím Huế quan sát dưới kính hiển vi                                                                               | 120 |
| <b>Hình 3.33</b> | Hình thái NST và sơ đồ karyotype của lan Giả hạc tím Huế                                                                                      | 120 |
| <b>Hình 3.34</b> | Kết quả sàng lọc môi PCR-RAPD trên mẫu lan được xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 8 giờ có ký hiệu mẫu là M5                   | 123 |
| <b>Hình 3.35</b> | Cây phân nhóm di truyền 34 dòng lan Giả hạc tím Huế.                                                                                          | 125 |
| <b>Hình 3.36</b> | Khả năng tái sinh chồi/mô sẹo của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.                                                                   | 125 |
| <b>Hình 3.37</b> | Sơ đồ các bước thực hiện tái sinh một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến                                                                    | 130 |
| <b>Hình 3.38</b> | Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây con lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> ở vườn ươm                                           | 131 |
| <b>Hình 3.39</b> | Thí nghiệm ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng sinh trưởng của <i>vitro</i> Giả hạc tím Huế đột biến đột biến ở vườn ươm.                     | 135 |
| <b>Hình 3.40</b> | Phân lập và tạo dòng thuần khiết các vi khuẩn nội sinh                                                                                        | 137 |
| <b>Hình 3.41</b> | Ảnh hưởng của các chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng.     | 139 |
| <b>Hình 3.42</b> | Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh CP2 đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> đột biến sau 3 tháng ở vườn ươm. | 140 |
| <b>Hình 3.43</b> | Sơ đồ quy trình nhân giống <i>in-vitro</i> lan Giả hạc tím Huế                                                                                | 142 |

## DANH MỤC BẢNG BIỂU

| TT               | Tên bảng biểu                                                                                                | Trang     |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Bảng 2.1</b>  | Kí hiệu và trình tự của 63 môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu                                                 | <b>36</b> |
| <b>Bảng 2.2</b>  | Trình tự nucleotide của các cặp môi                                                                          | 39        |
| <b>Bảng 2.3</b>  | Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng tới tỷ lệ nhiễm của mẫu                                         | 41        |
| <b>Bảng 2.4</b>  | Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành protocorm                        | 43        |
| <b>Bảng 2.5</b>  | Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành mô sẹo                           | 43        |
| <b>Bảng 2.6</b>  | Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi                      | 44        |
| <b>Bảng 2.7</b>  | Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi                          | 45        |
| <b>Bảng 2.8</b>  | Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ                             | 45        |
| <b>Bảng 2.9</b>  | Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng colchicine trên protocorm/mô sẹo                                    | 46        |
| <b>Bảng 2.10</b> | Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng DMS trên protocorm/ mô sẹo                                          | 47        |
| <b>Bảng 2.11</b> | Thành phần phản ứng PCR                                                                                      | 52        |
| <b>Bảng 3.1</b>  | Điều kiện tối ưu cho nhân giống <i>in-vitro</i> lan Giả hạc tím huế từ hạt                                   | 62        |
| <b>Bảng 3.2</b>  | Điều kiện tối ưu cho nhân giống <i>in-vitro</i> lan Giả hạc tím huế từ đoạn thân có mắt ngủ                  | 69        |
| <b>Bảng 3.3</b>  | Ảnh hưởng của BA và IAA đến khả năng nhân chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.                      | 77        |
| <b>Bảng 3.4</b>  | Ảnh hưởng của IAA và NAA đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy                 | 79        |
| <b>Bảng 3.5</b>  | Kết quả xử lý mẫu protocorm bằng colchicine sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy                                    | 84        |
| <b>Bảng 3.6</b>  | Kết quả xử lý mẫu protocorm bằng Dimethyl sulphate (DMS) sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy                       | 85        |
| <b>Bảng 3.7</b>  | Kết quả xử lý mẫu mô sẹo bằng colchicine sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy                                       | 88        |
| <b>Bảng 3.8</b>  | Kết quả xử lý mẫu mô sẹo bằng Dimethyl Sulphate (DMS) sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy                          | 89        |
| <b>Bảng 3.9</b>  | Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi đột biến từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy | 94        |
| <b>Bảng 3.10</b> | Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi đột biến từ mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy    | 97        |
| <b>Bảng 3.11</b> | Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân của chồi xử lý đột biến sau 8 tuần                 | 99        |

|                   |                                                                                                                                                              |     |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Bảng 3.12</b>  | 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                                       | 100 |
| <b>Bảng 3.13</b>  | 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                                              | 101 |
| <b>Bảng 3.14</b>  | Một số đặc điểm hình thái của mẫu được xử lý hoá chất và mẫu đối chứng                                                                                       | 107 |
| <b>Bảng 3.15</b>  | Đặc điểm của tế bào khí khổng trên biểu bì lá sau 3 tháng nuôi cấy.                                                                                          | 117 |
| <b>Bảng 3.16</b>  | Hàm lượng chlorophyll và carotenoid của một số dòng lan Giả hạc tím Huế xử lý hoá chất (mẫu lá thu ở giai đoạn sau khi cây chồi <i>in-vitro</i> được 8 tuần) | 119 |
| <b>Bảng 3.17</b>  | Kết quả khuếch đại PCR dựa trên mỗi mỗi RAPD của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế                                                                                  | 122 |
| <b>Bảng 3.18</b>  | Chỉ số đa dạng di truyền quần thể lan Giả hạc tím Huế cho mỗi mỗi RAPD                                                                                       | 124 |
| <b>Bảng 3.19</b>  | Khả năng tái sinh mô sẹo hoặc chồi của một số dòng đột biến sau 12 tuần                                                                                      | 127 |
| <b>Bảng 3.20</b>  | Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo dòng đột biến ở các dòng đột biến được chọn sau 8 tuần nuôi cấy.                                                           | 127 |
| <b>Bảng 3.21</b>  | Khả năng nhân nhanh chồi của các chồi đột biến sau 8 tuần nuôi cấy                                                                                           | 128 |
| <b>Bảng 3.22</b>  | Khả năng ra rễ của chồi ở một số dòng lan đột biến sau 8 tuần nuôi cấy                                                                                       | 129 |
| <b>Bảng 3.23</b>  | Ảnh hưởng của giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con <i>in-vitro</i> Giả hạc tím Huế trong vườn ươm sau 12 tuần trồng.                     | 132 |
| <b>Bảng 3.24</b>  | Ảnh hưởng của giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con <i>invitro</i> Giả hạc tím Huế đột biến trong vườn ươm sau 12 tuần.                   | 133 |
| <b>Bảng 3.25</b>  | Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng thích nghi, sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> đột biến sau 3 tháng ở vườn ươm..                        | 135 |
| <b>Bảng 3.26.</b> | Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng.                         | 139 |
| <b>Bảng 3.27</b>  | Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> đột biến giai đoạn vườn ươm.                         | 141 |
| <b>Bảng 3.28</b>  | Ảnh hưởng của giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con <i>in-vitro</i> Giả hạc tím Huế trong vườn ươm sau 12 tuần trồng                      | 130 |
| <b>Bảng 3.29</b>  | Ảnh hưởng của giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con <i>invitro</i> Giả hạc tím Huế đột biến trong vườn ươm sau 12 tuần                    | 131 |
| <b>Bảng 3.30</b>  | Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng thích nghi, sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> đột biến sau 3 tháng ở vườn ươm                          | 133 |
| <b>Bảng 3.31</b>  | Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng                          | 138 |
| <b>Bảng 3.32</b>  | Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế <i>in-vitro</i> đột biến giai đoạn vườn ươm                          | 140 |

## MỞ ĐẦU

Hiện nay, có khoảng 750 chi với 35.000 loài lan tự nhiên và 75.000 giống lan do kết quả chọn lọc và lai tạo [113]. Để đa dạng hoá các dòng/giống lan thì ngoài việc tìm kiếm các giống tự nhiên con người còn tạo ra các dòng/giống mới thông qua lai tạo, đột biến và mỗi năm tạo ra hàng trăm giống lan mới để đáp ứng nhu cầu thị trường về màu sắc, hình dáng và khả năng kháng bệnh [55]. Phương pháp tạo giống lan đột biến phổ biến hiện nay chủ yếu là chiếu xạ gây đột biến (tia Gamma, tia X), sử dụng hóa chất gây đột biến (như Ethyl methanesulfonate (EMS), Colchicine), lai tạo truyền thống qua thụ phấn chọn lọc, và nuôi cấy mô kết hợp chọn lọc biến dị [94].

*Dendrobium* là một trong 6 giống phong lan rừng phổ biến được ưa chuộng. Theo Trần Văn Bảo (1999), lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là loài lan rừng ở Việt Nam có nhiều trên dãy núi Trường Sơn từ Nam ra Bắc [4]. Lan Giả hạc được nhiều người lựa chọn do có đặc điểm thân lá và mặt hoa đẹp, mùi thơm, đặc biệt là giống lan này còn có những dòng đột biến rất có giá trị về thẩm mỹ, được người chơi săn tìm và sưu tầm. Các giống lan Giả hạc thuộc chi Hoàng thảo (*Dendrobium*), thường có thân thông hướng xuống, mọng nước. Mặt hoa của các giống thuộc chi này có nhiều biến thể khác nhau tạo nên sự độc đáo cho từng dòng, tất cả các điều này làm cho giá lan Giả hạc trong những năm gần đây tăng lên nhiều [113]. Hiện nay, các đột biến của lan Giả hạc chủ yếu là phát sinh tự nhiên do đó số lượng rất ít, chưa đa dạng, đồng thời mức độ ổn định di truyền của các đột biến này qua các thế hệ cũng chưa được kiểm chứng [10], [45].

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. Thành phố Huế nằm giữa hai miền Bắc Nam, có hệ thực vật phong phú trong đó có cả một số dòng lan Giả hạc, điển hình là dòng 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 sấp 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 như Tây Nguyên, Lâm Đồng, các tỉnh miền núi phía Bắc. 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 [1]. Ngoài ra, việc thu hẹp môi trường sống do các tác động của thiên tai, con người và khả năng nhân giống tự nhiên thấp dẫn đến số lượng lan rừng ngày càng ít đi nhanh chóng [41]. Trên đây là những nguyên nhân chính dẫn đến sự suy giảm mức độ đa dạng sinh học các loài trong tự nhiên trong đó có loài lan *D. anosmum* Lindl.

Vì vậy, để góp phần phát triển dòng 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**

*Mục tiêu tổng quát:* Tạo được dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm.

*Mục tiêu cụ thể:*

- Tạo được vật liệu khởi đầu *in-vitro* từ mẫu lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.).
- Tạo được một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng cách sử dụng colchicine và dimethyl sulphate (DMS) tác động lên mô sẹo và protocorm.
- Đánh giá được đặc điểm biến dị hình thái và di truyền của dòng đột biến.
- Đánh giá được ảnh hưởng của một số yếu tố (môi trường dinh dưỡng, chất điều hoà sinh trưởng, giá thể trồng, chế độ chiếu sáng, chế phẩm vi sinh) tới sinh trưởng, phát triển của các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.

### **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**

#### *Ý nghĩa khoa học*

- 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 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 đó làm cơ sở lựa chọn các dòng đột biến triển vọng.

#### *Ý nghĩa thực tiễn*

- Hoàn thiện quy trình nhân giống invitro và huấn luyện cây con sau nuôi cấy *in-vitro* (giá thể, ánh sáng, độ ẩm, bổ sung vi sinh) nhằm nâng cao tỷ lệ sống và rút ngắn thời gian ra vườn sản xuất. Cung cấp nguồn cây giống đồng đều, ổn định, giữ đặc trưng “tím Huế”, phục vụ bảo tồn nguồn gen địa phương và phát triển sản xuất hàng hoá/sinh vật cảnh; sẵn sàng chuyển giao quy trình cho vườn ươm và hộ trồng lan.

- Cung cấp các quy trình tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng hóa chất trên mô sẹo và hạt giống hiệu quả, có thể áp dụng cho các giống lan khác thuộc chi *Dendrobium*.

- Hoàn thiện quy trình từ nhân giống tới ra cây và chăm sóc cây con cho các dòng lan giả hạc tím huế đột biến.

- Tạo ra một số dòng lan giả hạc Tím Huế đột biến có hình thái khác biệt, có nguồn gen ổn định, cung cấp nguồn vật liệu cho quá trình chọn lọc và tạo giống để phục vụ cho chọn lọc và tạo giống.

- Nghiên cứu chế phẩm hữu cơ vi sinh để chăm sóc lan giả hạc tím Huế, sản phẩm này góp phần giảm bớt việc sử dụng phân bón hoá học và thuốc bảo vệ thực vật góp phần bảo vệ môi trường.

### **Những điểm mới của luận án**

- Nghiên cứu là lần đầu mô tả chi tiết các đặc điểm nhận dạng lan Giả hạc tím Huế, kết quả bổ sung vào khoá phân loại các đặc điểm nhận dạng loài này ở khu vực TP. Huế.

- Lần đầu tiên xây dựng quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên lan Giả hạc tím Huế bằng hoá chất colchicine và dimethyl sulphate 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 CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

### 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*) là một trong những chi quan trọng nhất trong họ phong lan (Orchidaceae), *Dendrobium* bao gồm 1600 loài lan biểu sinh. Các chi này có đặc điểm 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. Giả hành *Dendrobium* có 4 loại, đại diện điển hình là *D. nobile*, *D. kingianum*, *D. bigibbum* và *D. speciosum*. Kích thước lá từ 2,5 cm đến 40 cm, dày, rụng lá hoặc thường xanh. Hoa của chi *Dendrobium* có thể ra trực tiếp trên thân giả hành, mọc riêng lẻ hoặc thành từng cụm, hoặc là các chuỗi hoa mọc ra từ các nách lá hay đỉnh ngọn. Cụm hoa ở đầu hoặc cuối và được sắp xếp từ một đến vài chục hoa với kích thước và phạm vi màu hoa vô cùng đa dạng [84].

*Dendrobium* phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, miền Bắc và Đông Úc. Đa số các loài này nằm trong Công ước quốc tế về buôn bán các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp (CITES). Có 107 loài thuộc chi *Dendrobium* đã được tìm thấy ở Việt Nam và chúng phân bố rộng rãi trên khắp mọi miền của nước ta. Các loài thuộc chi *Dendrobium* giá trị thẩm mỹ cao được nhiều người lựa chọn [131], ngoài ra, chi lan này còn là những dược liệu có giá trị đối với sức khỏe con người như tác dụng loại bỏ các chất độc hại tích lũy trong mô, tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể, giảm lượng đường trong máu và kéo dài tuổi thọ [163], [187].

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

##### 1.2.1 Phân loại thực vật

Theo hệ thống phân loại APG III năm 2009 [60], lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) được phân loại như sau:

Giới: *Plants* (thực vật)

Ngành: *Magnoliophyta* (Mộc lan, thực vật có hoa, hạt kín)

Lớp: *Liliopsida* (Một lá mầm)

Bộ: *Asparagales* (Măng tây)

Họ: *Orchidaceae* (phong lan)

Chi: *Dendrobium* (Hoàng thảo)

Tên Khoa học: *Dendrobium anosmum* Lindl.

Tên tiếng Việt: Lưỡng diêm hạc; Phi điệp; Giả hạc; Giả hạc tím.

Tên khác: *Dendrobium superbum* Reichb. f. in Walp., *Dendrobium superbum* var. *delacourii* Gagnep. & Guillaum., *Dendrobium parishii* auct. (Guillaum.), non Reichb.f.

### **1.2.2 Phân bố**

Lan Giả hạc (*D. anosmum* Lindl) được phân phối rộng rãi từ Philippines đến New Guinea, bao gồm Borneo và nhiều hòn đảo của Indonesia, trên các bán đảo ở Malaysia, Thái Lan, Lào, Việt Nam và Sri Lanka [82]. Trong rừng núi chúng thường mọc ở độ cao dưới 750 m. Ở các khu vực Bulolo và Wau thuộc Papua New Guinea, chúng sống phổ biến trên cây có vỏ xù xì và gỗ mục, ở độ cao 1300 m so với mực nước biển [126]. Giống lan này được Lindley đặt tên từ năm 1845, thường mọc ở các quốc gia Đông Nam Á, nhưng nay phổ biến khắp thế giới bởi vì khá dễ trồng, nhiều hoa và hương thơm ngào ngạt [100].

Ở Việt Nam, lan Giả hạc có ở hầu khắp các tỉnh thành trong cả nước, đặc biệt nhiều trên dãy Trường Sơn [2] và mang các đặc tính gen và hình thái khác nhau theo địa lí, độ cao, độ ẩm và nhiệt độ, cũng từ đó cây mang nặng đặc tính vùng miền thể hiện qua thân lá và hoa [136], [35].

### **1.2.3. Đặc điểm của lan Giả hạc**

- Thân: thân giả hành, dạng đa thân, chiều dài của thân có thể đạt tới 1,2 m, thân có đốt mềm mại buông rủ xuống, thân có màu xanh, mọng nước. Thân giả hành sau khi ra hoa sẽ dần khô lại hoặc nếu trên thân còn mắt ngủ thì tiếp tục nuôi dưỡng mắt ngủ để lên chồi mới. Thân giả hành ra mới sau mỗi mùa hoa, thường sẽ phát triển từ mầm gốc [86].

- Lá: lá có hình thoi thuôn dài, mọc cách so le, màu xanh bóng, ngả vàng và rụng trước khi đến mùa ra hoa 2-3 tháng thường là mùa thu - đông, có bẹ lá ôm thân, không có cuống lá, tùy xuất xứ có cây lá hơi tròn, có vùng lại nhỏ dài [86].

- Hoa: tập hợp thành chùm hoặc đơn lẻ, phát triển từ chồi hoa ở các mắt ngủ trên giả hành. Hoa giả hạc thuộc loại hoa mẫu 3. Có 6 cánh hoa, trong đó có 3 cánh hoa ngoài cùng gọi là 3 cánh dài. Nằm kề bên trong có xen kẽ với 3 cánh dài là 3 cánh hoa. Hai cánh bên thường giống nhau, cánh còn lại nằm ở phía dưới của hoa, thường có màu sắc và hình dạng đặc biệt khác hẳn 2 cánh kia được gọi là cánh môi. Chính cánh môi quyết định giá trị thẩm mỹ hoa lan. Giữa hoa có một trụ nổi là bộ phận sinh dục của hoa. Trụ chứa cả nhị và nhụy nên được gọi là trụ - hợp - nhụy. Phần nhị nằm bên trên của trụ, thường có nắp che chở, bên trong chứa 4 khối phấn màu vàng, có dạng thuôn hơi cong lưỡi liềm. Hoa giả hạc có bầu hạ, thuôn dài kéo theo cuống. Bầu hoa lan có 3 ô gọi là 3 tâm bì (hoặc đỉnh noãn trung trụ) hoặc đỉnh noãn bên. Trong bầu chứa vô số các hạt nhỏ li ti gọi là tiểu noãn nằm trên 3 đường dọc theo chiều dài của 3 mép tâm bì. Sau khi thụ phấn, thụ tinh, các tiểu noãn sẽ biến đổi và phát triển thành hạt, trong khi đó bầu noãn sẽ to phát triển thành quả [77].

Hoa lan Giả hạc có mùi thơm dễ chịu, đường kính hoa trung bình từ 7 – 10 cm, tuy nhiên có một số biến thể nhỏ hoặc lớn hơn, thậm chí là không nở hoàn toàn. Trên một thân thường có nhiều cụm hoa, thường mỗi cụm hoa có từ 1-3 hoa, một cây có thể ra đến 50 – 70 hoa. Màu sắc hoa đa dạng, thay đổi từ màu hồng đậm đến tím nhạt và có trải qua màu sắc biến đổi trung gian. Các yếu tố màu sắc của hoa có phần nhạt, đậm từ viền hoa đến cuống hoa. Thông thường loài hoa này sẽ nở kéo dài trong khoảng thời gian là 3 tuần, điều kiện thời tiết xấu sẽ bị héo và rụng sớm và ngược lại nếu trong điều kiện khí hậu thời tiết mát mẻ thì thời gian hoa nở kéo dài hơn [86], [117].

- Mùi hương: hoa lan Giả hạc luôn có mùi hương, dịu nhẹ, thơm ngát, thoang thoảng trong khắp không khí [86].

- Thời điểm ra hoa: hoa thường nở rộ vào thời điểm cuối xuân - đầu hè, khoảng thời gian tháng 3 – tháng 6 hàng năm, hoa nở khoảng 2 – 3 tuần là bắt đầu tàn [117].

- Quả và hạt lan: Sự tạo quả của hoa lan nói chung và lan Giả hạc nói riêng trong tự nhiên rất khó do cấu tạo đặc biệt của hoa và thường phải nhờ côn trùng thụ phấn. Quả lan thuộc loại quả nang, quả có dạng thuôn dài đến hình trụ ngắn phình ở giữa. Khi chín quả nở ra theo 3 đến 6 đường nứt dọc, mảnh vỏ còn dính lại với nhau ở phía đỉnh và phía góc.

Ở một số loài, khi chín quả không nứt ra nên hạt chỉ ra khỏi quả khi quả bị mục nát. Bên trong chứa rất nhiều hạt, nhỏ li ti, phải trải qua 2 – 18 tháng hạt mới chín khi chín hạt có màu vàng. Hạt cấu tạo bởi một khối chưa phân hóa, trên một mạng lưới nhỏ xốp chứa đầy không khí, toàn bộ hạt trong một quả nặng chỉ bằng một phần mười đến một phần nghìn và hầu như không xác định được trọng lượng (mg), rất nhẹ nên dễ phát tán nhờ gió. Thông thường, cần có nấm cộng sinh hỗ trợ tạo các chất cần thiết để hạt lan nảy mầm, đặc biệt ở đầu các giai đoạn phát triển [41].

- Rễ : rễ lan Giả hạc nhỏ có đường kính 1 - 1,5 mm, bám dính, có hình trụ có nhánh từ bậc 1 bậc 2 cho đến bậc 3 hoặc không phân nhánh và thường rất dài, có màu xanh nhạt, trắng hoặc xanh - trắng. Khác với những loài đơn thân rễ mọc thẳng đứng từ thân và thường xen kẽ với lá thì rễ của lan Giả hạc chủ yếu mọc từ gốc cán hành [86].

#### **1.2.4. Đặc điểm bộ nhiễm sắc thể (NST) của lan Giả hạc**

Số lượng nhiễm sắc thể đầu tiên của loài *Dendrobium* đã được Hoffman ghi lại vào năm 1929, số lượng nhiễm sắc thể của loài này có thể giao động từ  $2n=38$  đến  $2n=114$ . Có sự khác biệt về kích thước nhiễm sắc thể ở các loài khác nhau, hầu hết các loài thuộc *Dendrobium* đều có nhiễm sắc thể nhỏ, nhưng một số loài như *D. macrophyllum*, *D. spectabile* và *D. anosmum* (*superbum*) có nhiễm sắc thể lớn gấp 3 đến 4 lần so với các loài khác. Số lượng nhiễm sắc thể của loài *D. anosmum* (*superbum*) là  $2n = 38$ , kích thước lớn [181]. Mặc dù một số loài biểu hiện sự khác biệt đáng kể về kích thước nhiễm sắc thể trung bình, nhưng không thể phân biệt hay nhận dạng loài bằng thông số này [181]. *D. anosmum* là một trong những bộ nhiễm sắc thể bổ sung lớn nhất trong chi trong khi *D. linguella* có bộ nhiễm sắc thể nhỏ nhất.

Ở một số khu vực địa lý khác nhau thì số lượng NST của các loài *Dendrobium* đặc trưng của vùng đó là khác nhau, phần lớn số NST ở các loài là  $2n = 38$  như ở loài *D. nobile* và *D. moniliforme* [79]. Một số ít loài có  $2n = 40$ ,  $2n = 36$  hoặc  $2n = 76$  hay 80. Ở loài *D. kingianum* có các mức bội thể như  $2n = 38$ ,  $3n=57$ ,  $4n = 76$  và  $6n = 114$  [98].



**Hình 1.1.** Nhiễm sắc thể của *Dendrobium anosmum* [180]; A. bộ NST tế bào soma (1800X); B. Phân tích Karyotypes bộ NST.

### 1.2.5. Giá trị của lan Giả hạc

#### 1.2.5.1. Giá trị kinh tế của lan Giả hạc

Lan Giả hạc là giống lan phổ biến được nhiều người ưa chuộng nhờ vào vẻ đẹp ấn tượng cùng hương thơm quyến rũ. Hoa có màu sắc rất đa dạng, tinh tế, mỗi màu sắc lại mang một đặc điểm hình thái khác nhau, và hoa có độ bền lâu. Vì vậy mà nó là loài hoa đầu tiên được đưa về trồng tại Hawaii vào đầu những năm 1986 từ Philippines [98]. Mùi hương của lan Giả hạc rất đặc trưng và quyến rũ, hầu hết các nhà sưu tầm lan đều có giống lan này, việc chiêm ngưỡng vẻ đẹp và tận hưởng mùi thơm của hoa lan làm cho tâm hồn con người như được giao hòa cùng thiên nhiên.

Lan giả hạc có giá trị kinh tế cao, từ năm 1945, loài hoa này đã được sử dụng để kinh doanh hoa cắt cành và cây cảnh ở Hawaii [98]. Hiện nay, thì loài hoa này càng ngày càng có giá trị ở các nước trên thế giới như Úc, Mỹ, Thái Lan, Hà Lan, Pilippines, Hawaii,... Cụ thể giá trị hoa Lan xuất khẩu trên thế giới tăng mạnh từ hơn 193 triệu USD năm 2016 đến khoảng hơn 217 triệu USD năm 2018. Đứng đầu trong ngành xuất khẩu hoa lan là Thái Lan, sau đó là Hà Lan, còn Việt Nam hiện đang đứng vị trí rất khiêm tốn trong thị trường xuất khẩu lan thế giới [185]. Kim ngạch xuất khẩu của mặt hàng hoa lan Việt Nam đạt 4 triệu USD trong năm 2018, chủ yếu sang các thị trường Nhật Bản (72,5%) và Mỹ (11,3%). Nếu so với thị phần của các quốc gia khác, thì mặt hàng hoa lan xuất khẩu của Việt Nam chiếm tỉ trọng rất nhỏ [33].

Việt Nam rất có lợi thế về các giống lan rừng quý hiếm, đa dạng về chủng loại nhưng việc khai thác và phát triển nguồn tài nguyên này hiện nay chưa tương xứng với tiềm năng [32]. Hiện nay ở Việt Nam, các mô hình, các nông trường và cơ sở phát triển lan giống số lượng nhiều, chất lượng cao chỉ tập trung ở một số địa phương như Đà Lạt, Thành Phố Hồ Chí Minh, Hà Nội còn những địa phương khác chưa thực sự khai thác được hết tiềm năng. Điều này do chủ yếu các cơ sở cung cấp giống lan đều tạo ra cây giống bằng phương pháp truyền thống, dẫn đến số lượng giống tạo ra không nhiều, không đồng đều về chất lượng để có thể đáp ứng nhu cầu trong nước và xuất khẩu [44].

Những năm gần đây, các địa phương cũng đã chú trọng đẩy mạnh phát triển nghề trồng hoa cây cảnh, đặc biệt là tập trung vào những loại hoa mang lại hiệu quả kinh tế cao trong đó có hoa lan. Theo Sở NN&PTNT TPHCM, năm 2022, Thành phố đã xuất khẩu được 200.000 cây kim ngân, lan *Mokara*, *Dendrobium* với kim ngạch xuất khẩu 500.000 đô la Mỹ. Thị trường xuất khẩu chủ yếu Campuchia, Mỹ, Nhật Bản, Hà Lan, Canada. Hiện toàn Thành phố đang có 2.325 ha trồng hoa, cây kiểng, trong đó, có 370 ha trồng hoa lan, chiếm gần 16% và mỗi héc-ta mang về cho nông dân mỗi năm từ 800 triệu đến 1 tỉ đồng [14]. Tỉnh Thừa Thiên Huế cũng có những chính sách tập trung phát triển nghề trồng hoa cây cảnh, trong đó có hoa lan. Đặc biệt các mô hình nông nghiệp đô thị, các mô hình này vừa đem lại kinh tế cho nhà vườn vừa tạo cảnh quan đẹp cho Thành phố. Năm 2018, UBND tỉnh Thừa Thiên Huế (cũ) đã phê duyệt dự án xây dựng mô hình sản xuất một số loài hoa lan bản địa giá trị cao tại tỉnh Thừa Thiên Huế (cũ), trong dự án có lan Giả hạc tím Huế ( *D. anosmum* Lindl.) [34].

#### **1.2.5.2. Giá trị dược liệu của lan Giả hạc**

Nhiều loài *Dendrobium* ngoài tác dụng trang trí cho không gian sống còn có giá trị chữa bệnh. *D. officinale* Kimura & Migo là cây thuốc quý được dùng hỗ trợ điều trị các bệnh lao, sốt, đau họng, đau lưng, đau dạ dày, viêm ruột,...[68]; *D. anosmum* Lindl. và *D. nobile* Lindl.. được dùng để chữa suy nhược cơ thể, căng thẳng, đau họng và suy nhược sinh lý ở nam giới [27].

Các loài có tầm quan trọng về mặt y học bao gồm *D. nobile*, *D. chrysanthum*, *D. officinale*, *D. loddigessi*, *D. fimbriatum* var. *oculatum*, *D. moniliforme*, và *D. candidum*. Chúng đã được sử dụng như các phương thuốc dân gian truyền thống để điều trị các bệnh khác nhau, chẳng hạn như viêm dạ dày teo mãn tính, tiểu đường và bệnh tim mạch. Các nghiên cứu hóa thực vật trước đây về các loài *Dendrobium* đã dẫn đến việc phân lập đa dạng các loại hợp chất, chẳng hạn như các alkaloid, bibenzyls, phenanthren, fluorenones, sesquiterpenoid, lignan, flavonoid, và polysaccharid. Các hợp chất này đã được báo cáo là có tác dụng bảo vệ thần kinh, chống ung thư, chất chống oxy hóa, chống viêm và các hoạt động điều hòa miễn dịch. Đặc biệt, đã có nhiều báo cáo về cơ chế hoạt động chống ung thư của chúng, bao gồm cả quá trình tự hủy và di chuyển tế bào [133].

*D. anosmum* Lindl. được nghiên cứu chiết xuất etanolic, Glucose để điều trị giảm đường huyết, cung cấp phương pháp điều trị hoặc thuốc thay thế cho bệnh nhân đái tháo đường [76], ngoài ra còn có 4 hợp chất khác đã được tách chiết từ lan này là alkaloid, flavonoid, tannin, và phenol [145]. Các thử nghiệm sàng lọc hóa chất thực vật và hoạt động chống oxy hóa đã được thực hiện để xác định loại hợp chất và hoạt động chiết xuất là chất chống oxy hóa trên lan *D. anosmum* var. *gigantea*. Môi trường dinh dưỡng có bổ sung hormone tăng trưởng NAA, BA được nuôi huyền phù. Sàng lọc thực vật được thực hiện bằng phương pháp thử nghiệm tại chỗ. Hoạt tính chống oxy hóa đã được thử nghiệm bằng phương pháp DPPH [145].

### **1.2.6. Lan Giả hạc tím Huế**

Mỗi địa phương có những dòng Giả hạc đặc trưng, như Giả hạc Thái Nguyên [46], Giả hạc Hoà Bình [136], Giả hạc Phú Thọ [104], Giả hạc Quảng Trị [45], Giả hạc Di Linh [7], nhưng dòng lan Giả hạc đặc trưng của Huế hầu như không được đề cập và ít tài liệu tham khảo, dựa trên tìm hiểu thì nhóm nghiên cứu đã tìm được Giả hạc tím Huế với những đặc điểm đặc trưng như thân, lá to, xanh mượt xen kẽ những sọc tím, hoa to, cánh sấp, màu tím đặc trưng của Huế, có viền trên cánh hoa, mùi thơm dịu nhẹ hơi giống mùi oải hương. Mặt hoa Giả hạc tím Huế là một trong những mặt hoa giả hạc đẹp, cân đối, độ bền lâu trong điều kiện nắng ráo (7-10 ngày), được nhiều người yêu thích và sưu tầm. Nguồn gốc của lan

Giả hạc tím Huế là một dòng của lan Giả hạc (*D. anosmum* Lindl.) được phân bố khu vực thành phố Huế, trong nghiên cứu này chúng tôi đã khảo sát ở một số nhà vườn như vườn lan Thiên An (Thuỷ Bằng, Xuân Thuỷ), vườn lan Lộc Hồng (08 Đoàn Hữu Trưng, Phước Vĩnh), vườn Lan Đô Nguyễn (18 Thạch Hãn, Thuận Hoà) có nuôi trồng dòng lan Giả hạc này. Đã từ lâu lan Giả hạc tím Huế được người chơi lan đưa từ rừng về thuần dưỡng ở điều kiện nhân tạo và đã thích nghi, phát triển tốt với điều kiện khí hậu, thời tiết của thành phố Huế.



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

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

### **2.1. Nhân giống truyền thống**

Nhân giống truyền thống có thể thực hiện bằng hình thức nhân giống sinh dưỡng hoặc gieo hạt. Nhân giống sinh dưỡng là hình thức nhân giống vô tính xảy ra ở thực vật trong đó một cây mới được tạo ra từ một phần của cây bố mẹ hoặc phát triển từ một cấu trúc sinh sản chuyên biệt. Đối với lan nhân giống bằng phương pháp này có thể thực hiện bằng cách tách bụi [132] các cây lan sau khi đã phát triển thành những bụi lan lớn sẽ được tách chiết ra trồng để hình thành những bụi lan mới, hoặc bằng thân giả, tức là sử dụng thân giả khoẻ mạnh, không sâu bệnh được cắt thành những đoạn ngắn có chứa những mầm ngủ

(kie), hoặc tách nhánh, ở một số loài lan thường có hiện tượng tạo cây con trên giả hành một cách tự nhiên, khi cây con này có rễ là có thể tách ra khỏi giả hành để trồng [132]. Ưu điểm của phương pháp nhân giống sinh dưỡng là cây con được tạo ra là giống hoàn toàn cây mẹ. Phương pháp này cho phép thực vật tránh được quá trình hình thành các cơ quan sinh sản hữu tính tốn năng lượng và phức tạp như ra hoa, quả và hạt, nhân giống sinh dưỡng giúp cây con đạt đến giai đoạn trưởng thành nhanh hơn. Trong tự nhiên, điều đó làm tăng cơ hội để cây phát triển thành công và về mặt thương mại nó giúp tiết kiệm rất nhiều thời gian và tiền bạc vì giảm thời gian canh tác [51]. Thực hiện phương pháp này không đòi hỏi kỹ thuật cao, dễ thực hiện, tiết kiệm chi phí và thời gian. Nhược điểm lớn của nhân giống sinh dưỡng là hệ số nhân giống thấp, phương pháp làm hạn chế đa dạng di truyền của loài có thể dẫn đến giảm năng suất và dần bị thoái hoá giống. Các cá thể nhân giống sinh dưỡng giống hệt nhau về mặt di truyền và do đó tất cả đều dễ bị nhiễm virus, vi khuẩn và nấm gây bệnh hàng loạt [51].

Hình thức nhân giống bằng gieo hạt: Trong thực tế hoa lan ít khi nhân giống hữu tính, vì hạt lan rất nhỏ, không có nội nhũ, kỹ thuật gieo ươm phức tạp, cần có nấm cộng sinh hạt mới nảy mầm, do đó tỷ lệ nảy mầm thấp và tính phân ly lớn khi trồng bằng hạt, khó duy trì được đặc tính tốt của cây mẹ. Nhưng cũng chính vì mang tính di truyền phức tạp, phân ly lớn nên là cơ hội tốt cho các nhà tạo giống và đông đảo người trồng hoa lan tuyển chọn được những giống lan quý. Vì vậy nhân giống bằng hạt cũng là một trong những khâu quan trọng trong tạo giống lan [154]. Có hai cách nhân giống lan bằng hạt là gieo hạt trực tiếp lên giá thể trồng hoặc gieo hạt trong môi trường *in-vitro*. Ưu điểm của phương pháp nhân giống bằng hạt là tiết kiệm chi phí, đa dạng hóa giống cây trồng, và tăng khả năng chịu đựng của cây trồng, tạo ưu thế lại, nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng. Nhân giống bằng hạt tạo ra cây con nhanh, cây đồng loạt, cùng kích cỡ, cùng độ tuổi, kỹ thuật đơn giản, cây con thích nghi tốt, bộ rễ khỏe, tuổi thọ cao. Tuy nhiên phương pháp có một số nhược điểm là cây con tạo ra dễ thoái hoá giống và chất lượng giống cây không đồng đều vì hiện tượng phân tính. Cây giống từ hạt có thời gian phát triển lâu cho sản phẩm chậm hơn và khó kiểm soát được chất lượng so với các phương pháp khác [154].

## 2.2. Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc

Nhân giống *in-vitro* là phương pháp nhân giống vô tính tiên tiến nhất hiện nay. Bộ phận để nhân giống có thể là ngọn cây, ngọn cành, nhánh, lá, hoa, rễ cây, cũng có thể là hạt. Cây giống *in-vitro* có đặc điểm sạch bệnh, cây sinh trưởng và phát triển tốt, độ đồng đều cao. Phương pháp có hệ số nhân giống cao so với các phương pháp khác [58]. Phương pháp nhân giống *in-vitro* có các yếu tố ảnh hưởng như:

### a. Vật liệu nuôi cấy

Việc lựa chọn vật liệu nuôi cấy quyết định đến sự thành bại của quá trình nhân giống *in-vitro*. Về nguyên tắc mọi tế bào của các mô chuyên hoá đều có tính toàn năng, nghĩa là đều có thể nuôi cấy thành công. Thực tế cho thấy các loại tế bào và mô khác nhau có mức độ nuôi cấy thành công khác nhau. Một nguyên tắc cơ bản trong nuôi cấy mô tế bào là các tế bào làm vật liệu nuôi cấy càng non thì khả năng nuôi cấy thành công càng cao. Như vậy, tế bào và mô phôi non là triển vọng nhất, rồi đến các tế bào của đỉnh sinh trưởng như: mô phân sinh đỉnh ngọn, đầu rễ, lá non, tượng tầng,... sau đó là các tế bào sinh dục như noãn bào và tế bào hạt phấn ở giai đoạn non [58].

Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím đã được thực hiện thành công trên vật liệu là hạt. Hạt lan được gieo trên môi trường dinh dưỡng để phát triển thành các protocorm từ đó thực hiện những giai đoạn nhân giống *in-vitro* tiếp theo. Trong nghiên cứu của Đặng Thị Thu Hà và Phạm Thu Hà (2020) thực hiện trên hạt lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl) [13], nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) nhân giống lan Giả hạc tím đột biến cũng được thực hiện bằng hạt [45]. Ngoài ra lan Giả hạc tím còn được nhân giống *in-vitro* thành công bằng chồi ngủ của thân như nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021) [104].

### b. Điều kiện vô trùng

Đây là điều kiện cơ bản đầu tiên của quá trình nuôi cấy *in-vitro*. Nếu điều kiện này không được đảm bảo thì mẫu nuôi cấy hoặc môi trường sẽ bị nhiễm, mô nuôi cấy bị chết, các thí nghiệm ở giai đoạn sau sẽ bị ngừng lại. Do đó, trong toàn bộ quá trình nuôi cấy *in-vitro* cần đảm bảo điều kiện vô trùng tuyệt đối. Để đảm bảo điều kiện vô trùng cần có phương pháp khử trùng mẫu thích hợp, phương tiện khử trùng hiện đại, buồng và bàn nuôi

cây vô trùng. Chọn đúng phương pháp khử trùng sẽ cho tỷ lệ sống cao, môi trường dinh dưỡng thích hợp sẽ đạt tốc độ sinh trưởng nhanh [58].

Một số loại chất khử trùng đã được sử dụng hiệu quả để khử trùng mẫu là quả lan hoặc đoạn thân lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl) như còn 96° và đốt trên ngọn lửa đèn cồn [13]; HgCl<sub>2</sub> 0,1% [42]; NaClO 2% [71]; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% [167].

### **c. Môi trường nuôi cấy**

Mỗi loại cây có hình thái và yêu cầu dinh dưỡng riêng. Hơn nữa, nhu cầu dinh dưỡng cho các mô trong mỗi bộ phận của cây là khác nhau [169]. Tìm ra môi trường nuôi cấy mô thực vật thích hợp cho từng đối tượng cây trồng là một thách thức trong giai đoạn đầu, vì một môi trường thích hợp là môi trường mô phỏng được nguồn dinh dưỡng sẵn có từ tự nhiên, điều này sẽ giúp cho cây phát triển tốt [169]. Các thành phần cơ bản bao gồm nguyên tố đa lượng (N, P, K, S, Mg, Ca,...) [153], nguyên tố vi lượng (Fe, Cu, Bo, Zn, Mn, Co, I,...) [153], nguồn carbon (các loại đường khoảng 20-30 mg/L) [58], chất hữu cơ bổ sung (chủ yếu là vitamin, nước dừa, khoai tây, chuối...) [153], chất điều hòa sinh trưởng như auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic, ethylene và các chất làm đông đặc (thường dùng agar) [153]. Các thành phần cơ bản phải được kết hợp ở một nồng độ cố định [169].

Trong nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl) môi trường dinh dưỡng được dùng phổ biến nhất là môi trường MS có bổ sung thêm một số chất hữu cơ như đường, nước dừa, khoai tây, chuối và agar như trong các nghiên cứu của Đặng Thị Thu Hà và Phạm Thu Hà (2020) [13], nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) [45], nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021) [104].

### **d. Các chất điều hoà sinh trưởng**

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật hay phytohormon (hormon thực vật) là các phân tử tín hiệu có bản chất hoá học khác nhau, tồn tại ở hàm lượng rất nhỏ (nồng độ µg, ng), được hình thành tại một nơi nhưng gây hiệu ứng sinh học mạnh tại một nơi (mô, cơ quan) khác cách xa nguồn, do đó nó phải di chuyển. Trong cơ thể thực vật, hormone điều hoà và phối hợp quá trình trao đổi chất, sinh trưởng và phát sinh hình thái thường phụ thuộc

vào các tín hiệu hóa học từ một phần này đến một phần khác của cơ thể. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật rất quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật vì chúng đóng vai trò quan trọng trong việc kéo dài thân, tính hướng và ưu thế ngọn. Chúng thường được phân loại thành các nhóm sau: auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic và ethylen [153]. Tỷ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái trong các hệ thống nuôi cấy. Đối với sự tạo phôi, để tạo callus và rễ trần có tỷ lệ auxin/cytokinin cao, trong khi ở trường hợp ngược lại sẽ dẫn đến sự sinh sản chồi và chồi nách [80].

Trong nhân giống *in-vitro* các giống lan thuộc chi *Dendrobium* sử dụng rất nhiều loại chất điều hòa sinh trưởng như BA, NAA, IAA, DTZ, Kn... đều mang lại hiệu quả tốt. Trong nghiên cứu của Lê Thị Luận và cộng sự (2020) về nhân giống *in-vitro* cây lan Giả hạc Hawaii (*D. adastra*) đã sử dụng môi trường có bổ sung thêm BA hoặc Kn giai đoạn gieo hạt và nhân chồi, ở giai đoạn ra rễ môi trường được bổ sung NAA hoặc IBA [111]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2021) nhân giống *in-vitro* cây lan *D. anosmum* Lindl đã sử dụng môi trường dinh dưỡng có bổ sung BA và NAA giai đoạn gieo hạt và nhân chồi [11]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Thị Hải Yến và Nguyễn Thu Hương (2021) nhân giống *in-vitro* lan *D. anosmum* Lindl cũng đã bổ sung BA, NAA vào môi trường dinh dưỡng giai đoạn gieo hạt, giai đoạn nhân chồi là bổ sung BA, và giai đoạn ra rễ là bổ sung NAA [46]. Trong nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) [45], nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021) [104] cũng đều sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng BA, NAA, IBA để bổ sung vào môi trường dinh dưỡng dùng trong nuôi cấy *in-vitro* lan Giả hạc tím.

#### ***e. Điều kiện nuôi cấy in-vitro***

Trong nuôi cấy mô tế bào các yếu tố của môi trường vật lý được quan tâm đó là ánh sáng, nhiệt độ và độ ẩm.

+ Ánh sáng: là yếu tố cần thiết cho sự phát triển và phát sinh hình thái của các mô nuôi cấy. Ánh sáng có ảnh hưởng tới mẫu cây thông qua thời gian chiếu sáng, cường độ và chất lượng ánh sáng, vì ánh sáng là một trong những tín hiệu chính được thực vật tiếp nhận bởi vì nó là nguồn năng lượng cho quá trình quang hợp và các quá trình sinh hóa như sản

xuất các chất chuyển hóa thứ cấp [57]. Thời gian chiếu sáng thích hợp là 8 - 12 giờ/ngày. Cường độ ánh sáng ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái mô nuôi cấy. Cường độ ánh sáng cao kích thích sinh trưởng của mô sẹo trong khi cường độ thấp gây nên sự tạo chồi, cường độ thích hợp cho nuôi cấy mô là từ 1000 - 7000 lux [57]. Các nghiên cứu về thời gian chiếu sáng như của Lê Thiên Vinh (2022), đã sử dụng điều kiện chiếu sáng 8 giờ/ngày trong nhân giống *in-vitro* lan *D. anosmum* Lindl có hiệu quả rất tốt [45]. Sorgato và cộng sự (2020) cho thấy ảnh hưởng tốt của ánh sáng đến loài *D. nobile*, *D. phalaenopsis* sau 16 giờ chiếu sáng/ngày [165].

+ Nhiệt độ: là nhân tố có ảnh hưởng rõ rệt đến sự phân chia tế bào và các quá trình trao đổi chất của mô nuôi cấy, đồng thời nó có ảnh hưởng tới sự hoạt động của auxin, do đó làm ảnh hưởng đến khả năng ra rễ của cây mô [141]. Ở nhiệt độ trung bình thì hoạt động trao đổi chất tốt hơn, còn ở nhiệt độ cao lại kích thích ra nhiều tế bào không có tổ chức. Trong nuôi cấy mô, nhiệt độ thường được duy trì ổn định, ban ngày từ 25 - 30°C và ban đêm từ 17 – 20°C [141].

+ Độ ẩm: trong các bình nuôi cấy luôn kín do đó độ ẩm tương đối luôn bằng 100% nên không cần phải quan tâm nhiều đến độ ẩm khi nuôi cấy mô.

Ngoài ra, cần phải chú ý tới độ pH của môi trường vì nó ảnh hưởng khá rõ nét đến khả năng hoà tan các chất khoáng trong môi trường. Sự ổn định của môi trường, khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của cây. Nếu pH thấp (< 4,5) hoặc cao (> 7,0) đều gây ức chế sinh trưởng, phát triển của cây trong nuôi cấy *in-vitro* nên việc xác định được độ pH ban đầu của môi trường cho quá trình sinh trưởng và phát triển của mô cấy là cần thiết. Độ pH thường được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật nói chung từ 5,6 – 6 [81].

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

#### **3.1. Ánh sáng**

Lan Giả hạc thuộc nhóm cây ưa ẩm và ánh sáng tán xạ, vì vậy ánh sáng là yếu tố quan trọng đầu tiên cần được cân nhắc trong quá trình trồng và chăm sóc; ánh sáng khoảng từ 50-70% là phù hợp cho cây sinh trưởng, phát triển hiệu quả nhất. Thời kì sinh trưởng không nên để cây tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời để làm cháy lá non, cây chậm

phát triển. Chỉ nên cho cây tiếp xúc với ánh nắng nhẹ khi chuẩn bị ra hoa là thích hợp nhất [98], [99].

### **3.2. Nhiệt độ**

Lan Giả hạc chịu lạnh và nóng rất tốt. Cây có thể chịu được 38°C vào mùa nóng và 3,3°C vào mùa lạnh. Các loài lan Giả hạc tự nhiên đều có sức sống mãnh liệt. Cây có thể sống trên kẽ đá, trên cây đang sinh trưởng, cây đã mục khô, thảm thực vật đã mục nát. Mỗi khi gặp những điều kiện sống bất lợi như trong điều kiện khô hạn thì rễ cây sẽ mọc ra nhiều và vươn dài ra rất nhanh để đi tìm nguồn nước; hoặc cây sẽ mọc ra nhiều cây con trên những đốt thân, đốt cành hoa đã già sau mỗi mùa rụng lá hoặc sau khi ra hoa [98], [99].

### **3.3. Độ ẩm**

Vườn trồng lan cần thông thoáng, độ ẩm tốt nhất để cây phát triển tốt từ 60 – 70% vào mùa xuân và cuối đông, độ ẩm khoảng từ 80 – 90% vào mùa hè, thu [7], đặc biệt là khi cây còn non và trong thời gian ra hoa của cây cần đảm bảo độ ẩm. Nếu không cung cấp đủ độ ẩm thì cây con sẽ teo dần và chết, đến mùa cũng có rất ít hoa.

### **3.4. Nước**

Mùa xuân, hè là thời điểm lan phát triển mạnh nhất, giai đoạn này đảm bảo lượng nước cho lan Giả hạc phát triển, cần tưới nước cho cây từ 1 – 2 lần/ngày. Sang giai đoạn mùa thu, cây sẽ tăng trưởng chậm hơn vì thế nhu cầu về nước của cây cũng ít. Tần suất tưới nước nên giảm xuống từ 1 đến 2 lần/tuần [7].

Giai đoạn lan Giả hạc chuẩn bị ra hoa đó chính là vào thời điểm mùa đông, nên dừng hẳn việc tưới nước vào giai đoạn này. Nếu điều kiện thời tiết quá khô, không đủ độ ẩm thì có thể sử dụng bình phun sương từ 1 – 2 lần/tuần.

### **3.5. Giá thể trồng**

Có thể dùng xơ dừa, khúc gỗ, thân cây để trồng lan hay ghép vào dớn. Ngoài ra có thể trồng Giả hạc trong chậu nhựa, chậu đất nung, chậu gỗ, chậu dớn,... thoát nước tốt, tránh tình trạng ứ đọng nước trong chậu quá lâu làm thối cây. Chọn chậu kích thước nhỏ vì giả hạc thích sống chật chội [49].

Giá thể trồng lan Giả hạc nên được trộn thêm với một ít xơ dừa, phân trùn quế, than củi,... rồi đem ủ 10 – 12 ngày. Việc này giúp tăng thêm dinh dưỡng trong giá thể, tốt cho sự phát triển của lan. Tuy nhiên, trồng lan Giả hạc bằng cách ghép vào dớn hoặc gỗ là tốt nhất vì cách này gần gũi với môi trường sống ngoài thiên nhiên của lan.

Trồng Giả hạc bằng giá thể hỗn hợp sau một thời gian trồng 2 – 3 năm cần phải thay giá thể trồng lan một lần, vì giá thể không còn đảm bảo cho cây phát triển.

Tóm lại trồng và chăm sóc lan Giả hạc phải luôn đảm bảo các điều kiện về nhiệt độ, ánh sáng, nước, độ ẩm để lan Giả hạc phát triển, đồng thời cũng cần đảm bảo các yêu cầu về dinh dưỡng, và phòng trừ sâu bệnh hại cho cây lan. Có thể dùng một số loại phân bón qua lá, phân chậm tan để bổ sung dinh dưỡng cho cây hoặc các loại chế phẩm vi sinh, phân vi sinh [49]. Đặc biệt chú ý đến công tác phòng trừ sâu bệnh hại như thối nhũn vào mùa mưa, sâu cắn lá,...

#### **4. Vi sinh vật nội sinh thực vật**

Vi sinh vật nội sinh thực vật (Endophytic bacteria) hiểu theo nghĩa đen là vi khuẩn cư trú bên trong cây. Sharma và cộng sự (2020) định nghĩa vi khuẩn nội sinh là những "vi khuẩn cư trú trong mô thực vật sống mà không làm tổn hại đáng kể hoặc đạt được lợi ích khác ngoài việc đảm bảo cư trú" [158].

Vi khuẩn nội sinh thực vật hiện diện phổ biến trong hầu hết tất cả các loài thực vật, chúng sống tiềm ẩn hoặc tích cực xâm chiếm nội mô thực vật một cách cục bộ hoặc hệ thống. Vi khuẩn nội sinh bắt nguồn từ các cộng đồng vi khuẩn biểu sinh vùng rễ và lá, cũng như từ hạt hoặc các vật liệu nhân giống vô tính. Nhiều nghiên cứu cho rằng vùng rễ là nguồn vi khuẩn nội sinh chính, từ đó chúng xâm chiếm vào bên trong mô tế bào thực vật. Vì vậy, vi khuẩn nội sinh thường được phát hiện ở rễ với mật độ cao ngay từ những giai đoạn đầu của sự phát triển [112].

Rễ được xem là vị trí ưa thích nhất, từ đó vi khuẩn xâm nhập vào bên trong cơ thể thực vật. Sau khi xâm nhập được vào bên trong cây chủ, vi khuẩn nội sinh sẽ cư trú ở các ổ nội sinh (endophytic niche). Các ổ nội sinh sẽ bảo vệ vi khuẩn nội sinh khỏi các tác động xấu từ môi trường, đồng thời giúp chúng xâm chiếm và thiết lập bên trong tế bào, mô thực

vật. Những vi khuẩn nội sinh thường xâm chiếm khoảng gian bào và được phân lập từ tất cả các bộ phận của cây như rễ, thân, lá, quả và kể cả hạt [101].

Vai trò của vi khuẩn nội sinh thực vật đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước. Cơ chế của những tác động có lợi của vi khuẩn nội sinh đối với cây chủ tương tự như của các vi khuẩn vùng rễ có khả năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật. Điều này là do hầu hết các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ nội mô các loài thực vật khỏe mạnh và có thể được xem như nội sinh không bắt buộc và có khả năng sống bên ngoài mô thực vật như những vi khuẩn vùng rễ [101].

Vi khuẩn nội sinh thực vật thúc đẩy sinh trưởng của cây chủ một cách trực tiếp thông qua tăng cường tổng hợp kích thích tố sinh trưởng thực vật auxin (IAA), tăng hàm lượng các chất khoáng, giúp cố định đạm sinh học, phân giải lân khó tan, hoặc gián tiếp thông qua tăng khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh, giảm sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây [168]. Ngoài ra, chúng còn có thể giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm [168]. Trong một số trường hợp chúng có thể đẩy mạnh tốc độ nảy mầm của hạt, thúc đẩy sự hình thành cây con trong điều kiện bất lợi. Ngoài ra, vi khuẩn nội sinh còn có thể ngăn chặn mầm bệnh phát triển bằng cách tổng hợp các chất nội sinh trung gian, qua đó tiếp tục tổng hợp các chất chuyển hóa và các hợp chất hữu cơ mới. Vi khuẩn nội sinh cũng có một số tác dụng có lợi khác như sản sinh siderophore, giúp phần nào thỏa mãn nhu cầu về sắt của cây chủ, giúp cây phòng chống lây nhiễm các mầm bệnh [168]. Như vậy, có thể thấy rằng tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn nội sinh trong sản xuất nông nghiệp bền vững là rất lớn.

Một số nghiên cứu đã gợi ý rằng 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 [168]. Như vậy, vi sinh vật nội sinh trong lan có thể coi là một trong những đối tượng tiềm năng trong việc nuôi trồng lan an toàn, tuy nhiên hiện nay ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào tập trung vào hướng khai thác nguồn vi sinh vật nội sinh của lan, đặc biệt là định hướng sử dụng vi sinh vật nội sinh trong hỗ trợ sinh trưởng, phát triển của các dòng lan đột biến có giá trị kinh tế cao.

## **5. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến**

### **5.1. Khái niệm**

Đột biến là những biến đổi bất thường trong vật chất di truyền ở cấp độ phân tử (DNA, gen) hoặc cấp độ tế bào (nhiễm sắc thể) có thể là những thay đổi về cấu trúc hoặc số lượng của vật chất di truyền, dẫn đến sự biến đổi đột ngột của một hoặc một số tính trạng, những biến đổi này có tính chất bền vững và có thể di truyền cho các thế hệ tiếp theo. [6], [29].

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. Các giống đột biến tạo ra có những thay đổi về hình thái, màu sắc, thân, lá, hoa; các tính trạng về giảm chiều cao, đột biến diệt lục tố, kháng sâu bệnh, tăng cường độ quang hợp và chín sớm, tạo ra những kiểu hình khác lạ và có lợi cho nhu cầu con người [123].

### **5.2. Sơ lược về tạo đột biến bằng tác nhân hoá học**

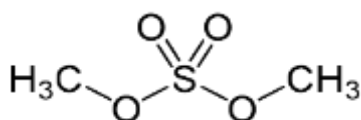
Cơ sở khoa học của việc tạo đột biến liên quan đến cơ chế sao chép DNA và cách thức các yếu tố môi trường có thể tương tác với DNA để gây ra thay đổi. Ở cấp độ tế bào các đột biến ảnh hưởng trực tiếp đến nhiễm sắc thể (NST) về cấu trúc hoặc số lượng, cơ sở của những thay đổi này liên quan đến các bất thường trong quá trình nhân đôi, phân ly và tổ hợp của NST [6].

Các chất hoá học gây đột biến làm tổn hại trực tiếp hoặc gián tiếp đến vật chất di truyền của sinh vật. Các chất này có thể tác động trực tiếp lên DNA, gây tổn thương trực tiếp lên DNA và thường dẫn đến lỗi trong quá trình sao chép. Tuy nhiên, một số chất hoá học lại có thể tác động lên cơ chế sao chép và phân chia nhiễm sắc thể. Nhiều chất gây đột biến không tự chúng gây đột biến, nhưng có thể tạo thành các chất chuyển hóa gây đột biến thông qua các quá trình tế bào, ví dụ thông qua hoạt động của hệ thống cytochrome P450 và các oxygenase khác như cyclooxygenase [105].

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), 2 Aminopurine (2-AP), ethylene imine (EI), diethyl sulfate (DES), ethyl

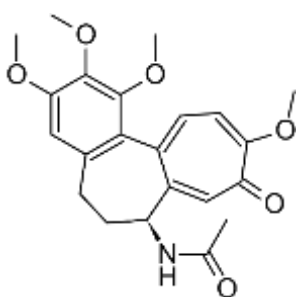
nitrosourethane (ENU), ethyl methane sulfonate (EMS), methyl methane sulfonate (MMS), 5-bromodeoxyuridine (BrdU), axit nitrous, hydroxyl amin và natri azide [78]. Trong số đó colchicine là hoá chất được dùng phổ biến nhất trong tạo đột biến đa bội ở thực vật, nó mang lại hiệu quả đa bội cao, hòa tan trong nước, bền nhiệt, có thể hấp khử trùng và dễ dàng áp dụng cho các mô thực vật [78]. 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, DMS thường được sử dụng trong nghiên cứu đột biến gen để tìm hiểu chức năng của gen hoặc cải thiện các đặc tính sinh học, chẳng hạn như nâng cao hiệu quả sản xuất của cây trồng [91].

### 5.3. Gây đột biến bằng dimethyl sulphate ( $C_2H_6O_4S$ )



Dimethyl sulphate là di-este của metanol và acid sulfuric, chất lỏng dầu không màu, có mùi giống hành tây nhẹ. DMS là một chất alkyl hóa đơn chức phản ứng với DNA thông qua phản ứng thay thế hai phân tử ( $S_N2$ ), tạo thành một phức hợp chuyển tiếp với nucleophile mạnh, đặc biệt là nitrogen bazơ như vị trí  $N^7$  của guanin và vị trí  $N^3$  của adenin. Nó phản ứng ít với các trung tâm nucleophilic yếu hơn trong DNA, chẳng hạn như vị trí  $O^6$  của guanin [91]. Do đó,  $N^7$ -methylguanin và  $N^3$  - methyladenine là các sản phẩm bổ sung DNA chính được hình thành khi dimethyl sulphate phản ứng với DNA trong ống nghiệm hoặc *in-vivo*,  $O^6$  -methylguanine được hình thành ở mức rất thấp. Trong số các chất bổ sung, chỉ có  $O^6$ -methylguanine là được thiết lập chắc chắn là sai khớp trực tiếp, dẫn đến đột biến chuyển tiếp GC  $\rightarrow$  AT [161]. dimethyl sulphate

### 5.4. Gây đột biến bằng colchicine ( $C_{22}H_{25}NO_6$ )



Colchicine là chất mà thường được sử dụng để gây ra đa bội trong thực vật và cho kết quả tốt nhất. Colchicine được áp dụng rất có hiệu quả đối với cả hai nhóm thực vật một và hai lá mầm. Về cơ bản, colchicine ngăn chặn sự hình thành vi ống trong quá trình phân chia tế bào, do đó các nhiễm sắc thể không tách ra như bình thường. Kết quả cuối cùng là một tế bào có số lượng nhiễm sắc thể gấp đôi

bình thường. Nếu tế bào này phân chia một lần nữa trong tương lai, thì số lượng nhiễm sắc thể nhân đôi sẽ được truyền cho các tế bào con và tạo ra cây đa bội, có những cây đa bội không thể phát triển và sinh sản nhưng cũng có những cây đa bội có thể có lá và hoa lớn hơn cây lưỡng bội. Các bộ phận của cây thường được sử dụng làm vật liệu xử lý như: rễ, hoa, chồi nách, mô sẹo, protocorm,...[37].

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

Đa dạng di truyền là sự đa dạng về thành phần gen giữa các cá thể trong cùng một loài và giữa các loài khác nhau, là sự đa dạng về gen có thể di truyền trong một quần thể hoặc giữa các quần thể. 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 [63]. Ngoài ra một số trình tự gen như vùng *ITS*, vùng *rbcL*, vùng *trnL*, vùng *matK*.

### **6.1. Phân tích đa dạng hình thái**

Hình thái thực vật là hình dáng bên ngoài của thực vật. Nó được áp dụng cho bất kỳ loài nào và bao gồm các chi tiết về các đặc điểm sinh dưỡng và sinh sản để tạo thành một hệ thống thông tin của loại thực vật đó, có thể được sử dụng để so sánh chung các loài thực vật có cấu trúc tương tự hoặc so sánh chi tiết trong một loài để xác định giống (cây trồng) hoặc xác định loài thực vật [184]. Các đặc điểm hình thái được quan sát và sử dụng làm chỉ thị để phân loại hay nhận diện loài gồm có [72]:

*Hình dạng và kích thước*: hình dạng và kích thước của thực vật có thể khác nhau đáng kể, từ rêu nhỏ đến cây khổng lồ, tùy thuộc vào loài và môi trường sống của nó.

*Cấu trúc của lá*: cấu trúc của lá có thể khác nhau rất nhiều về hình dạng, kích thước, màu sắc và tùy theo chúng là lá đơn, lá kép hay lá kim (hình kim), lá có xẻ thùy hay không,... Loại thực vật và môi trường sống của nó thường xác định cấu trúc của lá.

*Cấu trúc của hoa*: hoa là bộ phận sinh sản của thực vật có hoa và có cấu trúc, màu sắc, hương thơm, giới tính (đơn tính hoặc lưỡng tính) của chúng có thể khác biệt và đa dạng tùy thuộc vào loài thực vật.

*Quả:* quả là bầu nhụy trưởng thành của hoa, thường chứa hạt và có thể thay đổi về hình dạng, kích thước, màu sắc và mùi vị. Cấu trúc của quả tùy loài mà cũng khác nhau có quả hạch, quả mọng, quả phức, quả tụ, quả đơn, quả giả.

*Hệ thống rễ:* hệ thống rễ của cây hỗ trợ hấp thụ nước và chất dinh dưỡng từ đất và giúp neo cây vào đất. Rễ thực vật có 2 dạng chính là rễ chùm và rễ cọc, được phân ra các loại rễ khác nhau bao gồm rễ cái, rễ xơ và rễ bất định. Ngoài ra còn có một số loại rễ đặc biệt như rễ củ, rễ thở, rễ móc, rễ giác mút.

*Thân cây:* thân cây thực hiện nhiều chức năng khác nhau như dẫn nước, khoáng chất và thức ăn, chất dinh dưỡng (nhờ mạch dẫn libe và mạch gỗ) và đóng vai trò là nơi dự trữ thức ăn dự trữ. Thực vật có 2 dạng thân chính là thân thảo và thân gỗ. Thực vật cũng có các dạng biến đổi của thân như thân củ, thân rễ, thân leo, thân bò.

Cùng với nhau, những đặc điểm hình thái phân biệt này tạo nên cấu trúc của thực vật và đóng vai trò quan trọng trong việc xác định và phân loại loài.

## **6.2. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào chỉ thị sinh lý – sinh hoá**

Phân tích đa dạng di truyền thực vật dựa trên dấu hiệu sinh lý và sinh hóa là một cách tiếp cận toàn diện để hiểu được sự biến đổi di truyền trong một loài hoặc giữa các loài.

Các dấu hiệu sinh lý là những đặc điểm thường liên quan đến phản ứng của thực vật với các yếu tố môi trường, nó có thể bao gồm các đặc điểm như khả năng chịu hạn, chịu mặn, hiệu quả quang hợp, trao đổi chất và hấp thụ dinh dưỡng. Vì những đặc điểm này thường liên quan trực tiếp với khả năng tồn tại và khả năng sống sót của thực vật nên chúng cung cấp manh mối về cấu trúc di truyền của thực vật có thể chịu trách nhiệm cho những phản ứng này [121].

Tương tự, các dấu hiệu sinh hóa như protein và enzyme có thể cung cấp thông tin quan trọng về sự đa dạng di truyền của thực vật. Một số dấu hiệu này liên quan đến việc kiểm tra các protein hoặc enzyme cụ thể khác nhau giữa các cá nhân, thường là do đột biến gen. Phân tích isozyme là một kỹ thuật phổ biến được sử dụng để phân tích những khác biệt này ở mức độ protein. Các enzyme, được mã hóa trực tiếp bởi các gen, có thể biểu hiện

các biến thể (allozyme) do sự khác biệt trong các gen cơ bản. Những allozyme này sau đó được sử dụng làm chất đánh dấu để đánh giá các biến thể và tính đa dạng di truyền [89].

Bằng cách xem xét cả các dấu hiệu sinh lý và sinh hóa, các nhà nghiên cứu có thể thu thập được sự hiểu biết toàn diện hơn về sự đa dạng di truyền của thực vật. Sự đa dạng này đóng một vai trò quan trọng trong sự tồn tại lâu dài và khả năng thích ứng của các loài thực vật, đặc biệt là trước sự thay đổi môi trường. Việc giải mã sự đa dạng này có thể giúp đưa ra các quyết định bảo tồn và nỗ lực nhân giống nhằm tạo ra các giống cây trồng có phẩm chất và năng suất cao [121].

Việc lựa chọn các dấu hiệu sinh lý và sinh hóa sẽ phụ thuộc vào mục tiêu nghiên cứu, loài thực vật được nghiên cứu và nguồn tài nguyên sẵn có.

### **6.3. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào chỉ thị phân tử RAPD**

Đa dạng di truyền thể hiện sự khác biệt ở cấp độ gen hoặc DNA giữa các cá thể của cùng một loài. Thông tin đa dạng di truyền rất quan trọng, vì nó giúp cho công tác bảo tồn, quản lý, và sử dụng hợp lý các nguồn lợi gen.

Ngày nay, những chỉ thị phân tử như SSR, RAPD, ISSR,... là các chỉ thị phân tử được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật sinh học phân tử để nhận diện sự biến đổi di truyền ở thực vật. Cách tiếp cận phân tử để xác định kiểu gen thực vật có hiệu quả hơn so với các chỉ thị hình thái học truyền thống vì nó cho phép truy cập trực tiếp tới hệ gen thực vật, chúng không bị ảnh hưởng bởi môi trường và có thể phát hiện được trong tất cả các giai đoạn phát triển. Hiện nay kỹ thuật RAPD được sử dụng nhiều trong nghiên cứu đa dạng di truyền ở thực vật [26].

RAPD là một phương pháp tạo ra các chuỗi DNA đa hình là kết quả của sự khuếch đại ngẫu nhiên nhiều vị trí của khuôn mẫu DNA đích. RAPD sử dụng các đoạn môi đơn ngẫu nhiên có 8-10 nucleotide có tỷ lệ GC cao (60-80%) và nhiệt độ bắt cặp thấp (36-40°C), kỹ thuật này thường tạo ra 3-20 sản phẩm khuếch đại cho mỗi mẫu. Các vùng được khuếch đại bằng kỹ thuật này thường nằm rải rác trong genome, phần lớn chúng là các trình tự nucleotide lặp lại [26], [53].

Sự khác nhau về mặt di truyền được đánh giá dựa trên có hay không xuất hiện của mỗi sản phẩm khuếch đại do sự thay đổi trong trình tự DNA tại mỗi locus. Đa hình RAPD được tìm thấy khi có sự thay đổi ở vị trí gắn mồi hoặc xuất hiện đột biến thêm, mất đoạn giữa các vị trí gắn. Về nguyên tắc, khi mẫu hoàn toàn giống nhau, sau khi thực hiện phản ứng RAPD ở cùng điều kiện sẽ tạo ra số lượng các đoạn như nhau và chiều dài các đoạn tương ứng bằng nhau. Khi có đột biến làm xuất hiện hay mất đi một vị trí bắt cặp ngẫu nhiên sẽ tạo ra số lượng và chiều dài các đoạn DNA khác nhau giữa các cá thể, vì vậy kỹ thuật RAPD có thể phát hiện đột biến [26].

RAPD sử dụng cho nhiều mục đích, từ các nghiên cứu ở cấp độ cá thể như nhận dạng di truyền đến các nghiên cứu liên quan đến các loài có quan hệ họ hàng gần như đa dạng di truyền. RAPD cũng đã được áp dụng trong các nghiên cứu lập bản đồ gen, di truyền quần thể, di truyền tiến hóa phân tử và nhân giống cây trồng và vật nuôi [26].

Ưu điểm kỹ thuật RAPD là dễ thực hiện, không yêu cầu biết trước trình tự bộ gen đối tượng cần nghiên cứu. Thao tác đơn giản, chất lượng DNA khuôn không cần độ tinh sạch quá cao, lượng DNA khuôn mẫu không cần nhiều và không sử dụng chất phóng xạ. Thời gian thực hiện nhanh, nhân bản cao, chi phí thực hiện thấp [15], [26].

Nhược điểm của phương pháp là vì có tính trội (dominant) do đó khó phân biệt được những gen lặn hay cá thể đồng hợp hoặc dị hợp tử. Có tính chất ngẫu nhiên nên sản phẩm PCR không thống nhất, cần có thiết bị điện toán để xử lý số liệu. Phương pháp có độ tin cậy tùy thuộc vào kỹ thuật cá nhân, độ chính xác không cao, không ổn định (mức độ lặp lại giống nhau thấp), phụ thuộc nhiều vào điều kiện phản ứng đặc biệt là nhiệt độ gắn mồi. Khả năng nhân bản trong phản ứng PCR cao nhưng khả năng xuất hiện đa hình thấp, khả năng nhận diện chỉ thị phân tử thấp, khó xác định trong trường hợp mẫu vật có sự hiện diện của nhiều loại sinh vật khác nhau [15], [26].

RAPD là kỹ thuật nhạy với những thay đổi nhỏ trong hệ gen, chỉ cần một nucleotide thay đổi tại vị trí bắt cặp cũng có thể tạo ra sự xuất hiện/mất band [26], [53]. Với mục tiêu của đề tài là phát hiện sự khác biệt di truyền giữa các dòng đột biến thực nghiệm, đặc biệt

là biến dị nhỏ trong hệ gen, phương pháp RAPD là phù hợp và được nhiều nghiên cứu trên *Dendrobium* sử dụng [56], [96].

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

### **7.1. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô**

#### *Ngoài nước*

Trên thế giới, hoa lan được giới nhà khoa học quan tâm từ rất sớm bắt đầu từ trong thế chiến thứ II. Lan Giả hạc được thử nghiệm nhân giống bằng phương pháp gieo hạt *in-vitro* bởi các nhà khoa học đến từ trường đại học Hawaii từ năm 1972 -1978. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô nhanh hơn, dễ hơn, và rẻ hơn so với phương pháp nhân giống tự nhiên [98].

Một nghiên cứu khác về môi trường nuôi cấy, tác giả thử nghiệm nuôi cấy hạt lan Giả hạc trên bốn môi trường khác nhau bao gồm Hyponex, Murashige và Skoog (MS), OKF1 và Knudson C (KC). Kết quả cho thấy là hạt nảy mầm tốt nhất trên môi trường nuôi cấy MS với thời gian nảy mầm là 50 ngày, trong khi trên những môi trường khác là dài hơn với 59 ngày. Cây con trên môi trường MS cũng sinh trưởng và phát triển về thân, lá, rễ tốt hơn các môi trường khác [48].

Sự nảy mầm của hạt lan *D. antentum* trong ống nghiệm xuất hiện tốt trên môi trường Growmore 10 - 55 - 10 bổ sung 10% nước dừa (GCw) và môi trường Growmore 10-55-10 bổ sung 50 g/L chiết xuất hành lá [137]. Trong nghiên cứu của Bhowmik & Rahman (2020), sự nảy mầm của hạt *in-vitro* và sự phát triển của cây con *D. transparens* Wall ex Lindl. đã được đánh giá trên môi trường thạch KC; MS; PM và MVW có ba nguồn carbohydrate khác nhau. sucrose, glucose và lactose. Môi trường PM được chứng minh là tốt nhất cho sự nảy mầm sớm và hình thành PLB, sau đó là môi trường MS [59]. Việc nhân giống đại trà có thể được tiến hành thông qua các phương pháp công nghệ sinh học sử dụng kỹ thuật *in-vitro* thông thường với việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đã nhân giống thành công với lan *D. lineale* (Rolfe.) and *Vanda tricolor* (Lindl.) [157].

Nhiều giống lan thuộc *Dendrobium* có nguy cơ tuyệt chủng đã được nghiên cứu và nhân giống thành công nhờ phương pháp nuôi cấy mô. Maharjan và cộng sự (2020), đã

nhân giống *in-vitro* thành công loài lan *D. chryseum* Rolfe có nguy cơ tuyệt chủng từ protocorms trên môi trường  $\frac{1}{2}$  Ms có bổ sung một số kích thích sinh trưởng Kn, BA, GA3, IAA, IBA, và NAA ở các nồng độ 0,5 – 2 mg/L vào giai đoạn khác nhau [119]. Tối ưu hóa được quy trình nhân giống *in-vitro* cây *D. heterocarpum* Wall. ex. Lindl. và đánh giá độ chính xác di truyền dòng vô tính của các cây tái sinh: Một số loài lan có tầm quan trọng trong dược liệu đang có nguy cơ mất đi. Môi trường dinh dưỡng phù hợp nhân giống là MS có bổ sung kích thích sinh trưởng Kn, NAA, tỷ lệ này mầm đạt 95%, khả năng tái sinh chồi cao 18 chồi/mẫu, tỷ lệ sống của cây con khi trồng trên giá thể hỗn hợp xơ dừa: giấm gỗ (1:1 w/w) đạt 87% [116]. Lan *D. lineale* được đưa vào phụ lục II CITES do *D. lineale* có tiềm năng lớn làm hoa cắt cành và là cây đầu dòng của các loài lan lai. Nuôi cấy *in-vitro* được sử dụng để nhân giống lan này hàng loạt nhằm mục đích nhân giống thương mại cũng như bảo tồn. Môi trường nuôi cấy bổ sung các chất hữu cơ có thể làm tăng sự phát triển của cây con kết quả cho thấy khả năng ra rễ đạt 3 rễ/chồi, dài 3,96 mm/rễ, chiều dài của lá đạt 10,58 mm và có hàm lượng diệp lục đạt 1,58 mg/g [130].

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật luôn ảnh hưởng rất lớn đến các quá trình nhân giống *in-vitro*. Việc tìm ra loại PGR và liều lượng dùng cho mỗi giai đoạn vì nhân giống để phù hợp từng loại cây luôn là những vấn đề được các nhà khoa học nghiên cứu. Harahap và cộng sự (2020) đã nghiên cứu tác động của PGR trong các giai đoạn nhân giống *in-vitro* của lan thuộc chi *Dendrobium* nhận thấy môi trường bổ sung BA (0, 1, 2, 3 mg/L) và nước dừa (0%, 5%, 10%) là phù hợp với cây lan thuộc chi *Dendrobium*. Bổ sung chất hữu cơ như nước dừa, khoai tây, chuối,... vào môi trường nuôi cấy cũng rất hiệu quả cho sự phát triển của lan *D. anosmum* Lindl. [83].

Ngoài các nghiên cứu với mục đích nhân giống thì có nhiều nghiên cứu về giá thể phù hợp để trồng những loại lan này ở vườn ươm. Những giá thể thường được sử dụng là vỏ dừa, xơ dừa, gạch vụn, than củi, trấu hun, bả dớn, vỏ thông, bả gỗ,... Trong nghiên cứu của Lakshanthi & Seran (2019) đã ghi nhận về tỷ lệ sống, chiều dài chồi, số lá/cây, chiều rộng lá, số rễ/cây, chiều dài rễ dài nhất sau khi cấy sang điều kiện *ex-vitro* tốt nhất ở

nhịệm thức trồng trên vỏ dừa: gạch vụn: than củi: đá dăm theo tỷ lệ 1:1:1:1 cho tỷ lệ sống hơn 90% ở 4 tuần sau khi cấy sang điều kiện *ex-vitro* [110].

Những nghiên cứu trên thế giới từ trước đến nay đối với các giống lan vẫn tập trung chủ yếu về di truyền, nhân giống để bảo tồn những loại lan có nguy cơ mất đi, hay những loài lan có giá trị cao về dược liệu, kinh tế. Còn ít nghiên cứu về các yếu tố tác động đến sinh trưởng phát triển ở các giai đoạn của cây khi trồng ngoài vườn hoặc khi đưa vào môi trường tự nhiên để trồng bảo tồn. Thời gian các nghiên cứu chưa đủ dài để theo dõi hết chu kỳ sinh trưởng của lan. Ngoài ra các nghiên cứu cũng chưa đánh giá đúng thực chất các giá trị mà cây lan mang lại đặc biệt là các dòng lan đột biến, các giống lai tạo. Phân bố của các nghiên cứu về lan cũng chưa đồng đều chủ yếu tập trung ở Mỹ, Trung Quốc, Úc, Anh, Brazil [183].

#### *Trong nước*

Hiện nay, hầu hết các loại lan Giả hạc rừng của Việt Nam đã bị khai thác cạn kiệt nên để duy trì và phát triển những giống lan này đã đặt ra yêu cầu phải tìm ra những phương pháp nhân giống nhanh, hiệu quả. Để đáp ứng nhu cầu này 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]. Nhóm nghiên cứu Phan Văn Hoài Luân và cộng sự (2024), đã nhân giống *in-vitro* thành công lan Giả hạc trên môi trường MS có bổ sung hormone thực vật IBA và BA [28].

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Diễm và cộng sự (2021) đã đưa ra một số biện pháp kỹ thuật trồng và chăm sóc cây lan Giả hạc Di Linh (*D. anosmum* DL.) từ cây con *in-vitro*. Qua nghiên cứu này cho thấy, giá thể phù hợp nhất cho cây con Giả hạc Di Linh gieo hạt *in-vitro* ra bầu ươm là giá thể xơ dừa và trấu hun (tỷ lệ 1:1), cây con có tỉ lệ sống 100%, với số lá mới đạt 43,33%. Nhóm phân bón hoá học và nhóm phân bón hữu cơ là hai nhóm phân hiệu quả cho cây ra bầu ươm [7]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Thị Hải và cộng sự (2022) đã nhân giống *in-vitro* thành công lan từ hạt *D. anosmum* Lindl ở Hoà Bình trên môi trường MS có bổ sung kích thích sinh trưởng Kn, NAA, BA; Môi trường MS + 1,0 mg/L Kn + 0,5 mg/L NAA + 30 g sucrose + 8,0 g agar mỗi lít, pH 5,7–5,8 là môi trường

tối ưu để tăng chiều dài chồi. Môi trường MS + 1,0 g than hoạt tính + 30 g sucrose + 8,0 g agar/L, pH 5,7–5,8 là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của chồi sau 6 tuần nuôi cấy, chiều dài chồi trung bình là 1,09 cm, số lượng trung bình của chồi là 1,09 cm, số lá là 6,13, số rễ trung bình là 3,17 và chiều dài rễ trung bình là 1,11 cm, cao hơn lần lượt khoảng 3,3, 4,17, 3,41 và 1,67 lần so với đối chứng (không có than hoạt tính) [136]. 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 [174], hoặc từ hạt của lan *D. anosmum* Lindl. ở Quảng Trị [45], hay ở An Giang [11].

Ngoài ra một số nghiên cứu về những nhân tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng, phát triển của cây lan như ánh sáng, giá thể, phân bón,... Trong nghiên cứu của Đào Quốc Hưng và cộng sự, (2021) thể protocorm (PLB) *D. anosmum* Di Linh Taly được nghiên cứu bằng nuôi cấy *in-vitro* dưới đèn FL (đèn huỳnh quang) và dưới đi-ốt phát quang có sự kết hợp màu xanh và đỏ (LED BR 30:35). Tỷ lệ chồi tạo PLB ở đèn LED 30B:35R là 38 – 42%, gấp 3,8 – 4,2 lần so với đèn FL (10%). Số lượng rễ trên mỗi chồi dưới đèn LED 30B:35R là 3,67 – 5,16, nhiều hơn đáng kể so với đèn FL (1,95 rễ trên mỗi chồi). Chiều dài gốc dưới đèn LED 30B:35R là 3,42 – 4,14 mm trong khi dưới đèn FL là 2,97 mm. Các cây con *in-vitro* đều thích nghi tốt trong môi trường nhà kính. LED 30B:35R có thể thúc đẩy đáng kể sự sinh trưởng và phát triển của chồi và rễ *D. anosmum* Di Linh Taly, tăng hiệu quả chi phí trong vi nhân giống [20]. Hay nghiên cứu tối ưu các điều kiện nhân giống cho lan *D. thyrsiflorum* từ môi trường dinh dưỡng, kích thích sinh trưởng, giá thể trồng [138]. Một nghiên cứu khác về ảnh hưởng của hormone và phân bón đến sự ra hoa sớm của cây giống lai *D. anosmum* trong điều kiện *ex-vitro* [135]. Nghiên cứu của Trương Thị Bích Phượng và cộng sự (2022) về tác dụng của chiết xuất vi khuẩn lam đối với quá trình nhân giống *in-vitro* của *D. anosmum* Lindl., kết quả nhân giống *in-vitro* cho thấy dịch chiết vi khuẩn lam có tác dụng tăng cường khả năng nhân chồi và ra rễ của cây lan *D. anosmum* Lindl. [36].

Mặc dù đã có một số nghiên cứu về nhân giống *in-vitro* các loại lan. Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng chỉ dừng lại ở việc hoàn thiện quy trình nhân giống, chưa đi sâu vào nghiên

cứu di truyền, nghiên cứu các tính trạng biến dị cũng như tạo dòng biến dị từ việc tạo đột biến thực nghiệm.

## 7.2. Tạo giống đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

Hơn 3500 giống đột biến thuộc hơn 240 loài thực vật bao gồm ngũ cốc, đậu, hạt có dầu, rau, trái cây, sợi và hoa cây cảnh đã được phát triển và tung ra vào năm 2022 là bằng chứng cho thấy việc sử dụng thành công kỹ thuật đột biến trong chọn tạo giống thực vật [102]. Đối với hoa lan, nhiều giống thương mại đã được chọn thông qua gây đột biến bằng colchicine, Huy và cộng sự (2019) đã nghiên cứu ảnh hưởng của colchicine trên chồi non *in-vitro* của loài *Paphiopedilum villosum*. Nghiên cứu đã cho tỷ lệ cảm ứng đa bội đạt 19,88% ở nghiệm thức xử lý colchicine 50  $\mu\text{M}$  xử lý 6 ngày. Trong số các cây con đa bội thu được, các cây tứ bội chiếm 88,24% [92].

Nghiên cứu của Bunnag & Hongthongkham (2015) thực hiện nhằm tìm ra điều kiện tối ưu để tạo đa bội thể *in-vitro* cho lan *D. draconis* Rchb.f., thí nghiệm thực hiện trên protocorm ở môi trường MS chứa nồng độ colchicine khác nhau (0-0,1%, v/v) và duy trì trong bóng tối trong 1, 2, 3 hoặc 4 ngày ở  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Kết quả các cây đa bội thu được có lá dày hơn, màu xanh đậm với các tế bào bảo vệ lớn hơn khi so với các cây lưỡng bội. Tuy nhiên, số lượng tế bào bảo vệ trên một đơn vị diện tích được quan sát thấy đối với các cây đa bội được tạo ra thấp hơn so với số lượng được tìm thấy ở các cây lưỡng bội, điều này có thể là do sự gia tăng kích thước của các tế bào bảo vệ [62].

Sabzehzari và cộng sự (2019) đã đánh giá các đặc điểm hình thái, giải phẫu, tế bào, hoá sinh trên loài *Plantago psyllium* sau khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,1, 0,3 và 0,5% (w/v) trong thời gian 6, 12, và 24 giờ. Kết quả xác định bộ nhiễm sắc thể ở thể tứ bội ( $2n = 4x = 24$ ), ở thể lưỡng bội nguyên vẹn ( $2n = 2x = 12$ ). Kích thước của thể tứ bội lớn hơn thể lưỡng bội về số cánh, hạt và hạt phấn, độ dày của lá và chiều cao cây. Khí khổng của thể tứ bội lớn hơn với mật độ thấp hơn so với thể lưỡng bội. Số lượng lục lạp trong các tế bào bảo vệ, cùng với hàm lượng chất diệp lục và caroten đều cao hơn ở các thể tứ bội, nghiên

cứu cũng cho thấy rằng quá trình tứ bội hóa cải thiện hàm lượng chất nhầy của hạt cho mục đích thương mại [155].

Ngoài ra còn có nhiều nghiên cứu về lĩnh vực tạo giống cây trồng nhờ thực hiện các biện pháp gây đột biến để tạo ra những sai khác về kiểu hình như trên đối tượng lan *Phalaenopsis* [125], *Cymbidium* [170] hay trên *Dendrobium* [159].

Trong nông nghiệp, đa bội hóa cung cấp các giống cây trồng được cải thiện về mặt kinh tế. Hơn nữa, đột biến thể đa bội làm tăng tần số; do đó, nó đẩy nhanh việc tạo ra cây đa bội sử dụng trong các chương trình nhân giống. Đây là lý do nó sử dụng trong việc phát triển nhiều loại cây trồng có lợi ích kinh tế, như trường hợp hoa lan trên thị trường hoa. Thể đa bội ở cây cảnh chủ yếu liên quan đến hoa có kích thước lớn hơn, hương thơm và màu sắc đậm hơn khi so sánh với cây lưỡng bội tự nhiên. Do đó, các chương trình nhân giống nhằm mục đích thu được những bông hoa có kích thước lớn hơn, độ bền cao, màu sắc đậm, và khả năng chống lại mầm bệnh. Hơn nữa, lai giống phong lan với cảm ứng đa bội đã được sử dụng để tạo ra các giống lai cải tiến [176].

Trong tạo giống cây trồng đột biến ngoài tạo giống cây đa bội thì các nhà nghiên cứu còn chỉnh sửa, thay đổi cấu trúc di truyền của cây trồng, nhằm tạo ra nhiều biến dị, tìm kiếm các đặc điểm có lợi cho con người. Phương pháp dễ thực hiện, ít chi phí có hiệu quả cao và ít gây ảnh hưởng đến sức sống của cây trồng nhất là gây đột biến điểm thay thế cặp base nitơ [91] bằng phương pháp hoá học được sử dụng nhiều.

Tạo giống đột biến bằng xử lý dimethyl sulphate (DMS) được các nhà nghiên cứu tiến hành thành công trên nhiều đối tượng cây trồng vì chất này có khả năng tạo ra đột biến điểm thay thế cặp base nitơ. Trong nghiên cứu của Mostafa (2015) sử dụng trên cây Xà cừ (*Khaya senegalensis*) để tạo ra các giống mới có đặc tính tốt hơn. Ông đã sử dụng hạt cây Xà cừ ngâm trong dung dịch DMS đã tạo ra các cây có biến đổi về số cành và lá, chiều cao cây, màu sắc thân cây, màu sắc cuống lá. Nghiên cứu cũng tạo ra những cây Xà cừ có tốc độ tăng trưởng nhanh [126]. Một nghiên cứu khác Mostafa và Alhamd (2016) trên cây hoa Huỳnh liên (*Tecoma stans*) đã dùng hạt để ngâm trong dung dịch DMS nhằm tạo đột biến.

Kết quả tạo ra được những cây Huỳnh liên biến đổi về số lượng, màu sắc hoa, hình dạng, kích thước lá và chiều cao cây [127].

Sử dụng DMS đã tạo ra những biến đổi của cây trồng về hình thái như chiều cao cây, kích thước hoa, màu sắc hoa, lá, số lượng lá, hoa hay các biến đổi về tốc độ sinh trưởng, thời gian nở hoa, hàm lượng diệp lục...đều có những biến đổi theo hướng tốt và có triển vọng để phát giống cho thương mại như cây hoa Hướng dương (*Helianthus annuus*)[175], cây Muồng hoàng yến (*Enna occidentalis* (L.) Link) [171], cây rau Sam ( *Portulaca oleracea* L.) [140].

Tuy DMS có hiệu quả trong gây đột biến trên nhiều loại cây trồng nhưng trên cây hoa lan đặc biệt là các loài của chi lan *Dendrobium* vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về tác động của nó. Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm tác động của DMS lên cây lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum*) ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau, để đánh giá khả năng tạo ra biến dị.

Phương pháp gây đột biến thực nghiệm kết hợp với nuôi cấy mô, đồng thời kết hợp với phân tích DNA để chọn lọc các dòng đột biến, đây là phương pháp tối ưu trong công tác tạo chọn giống hiện nay [67], vì phương pháp có nhiều lợi thế rõ ràng như: (a) sử dụng hiệu quả các chất gây đột biến bằng hóa chất và vật lý ở liều thấp; (b) tỷ lệ đột biến cao; và (c) đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả trong việc nhân giống vô tính *in-vitro* của cá thể đột biến cung cấp nguyên liệu đầy đủ để sàng lọc thêm cũng như giảm sự hình thành thể khảm (cá thể có nhiều hơn một hệ gen). Tiêu biểu như nghiên cứu của Srivastava và cộng sự (2018), đã phát triển quy trình tạo đột biến *in-vitro* ở lan *Aerides crispa* Lindl, kết quả đã lựa chọn được các dòng có hình thái độc đáo [166].

### **7.3. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử**

Vì chu kỳ sinh trưởng của lan rất dài nên việc chọn lọc các đột biến qua khảo sát hình thái gặp nhiều khó khăn và tốn thời gian. Vì vậy, phân tích di truyền sau xử lý đột biến rất hữu ích để phân lập nhanh các dòng đột biến, trong đó kỹ thuật RAPD rất phổ biến để xác định các biến dị di truyền của các dòng đột biến khi so sánh với các cây đối chứng

không xử lý đột biến. Trên lan, RAPD được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền ở nhiều loài *Dendrobium* [56]. Ngoài ra các chỉ thị phân tử AFLP, ISSR, SSR, cũng được sử dụng để đánh giá, phân tích đa dạng di truyền.

Chỉ thị phân tử RAPD rất hiệu quả trong việc phân tích bộ gen, điều tra mức độ đa dạng di truyền từ đó cung cấp các dữ liệu quan trọng để bảo tồn và phát triển các giống cây trồng có nguy cơ tuyệt chủng. Trong nghiên cứu của Phuong và cộng sự, (2022) đã phân tích 20 mẫu lan Ngọc điểm bằng chỉ thị RAPD để phân tích các giống lai của *Coelogyne pandurate*, *C. rumphii* đã đánh giá được các biến dị di truyền khác với cây bố mẹ [85] làm cơ sở phân loại và bảo tồn. Việc phân tích đa dạng, và tính ổn định di truyền sẽ chính xác hơn khi có sự kết hợp của 2 chỉ thị phân tử, trong nghiên cứu của Joshi và cộng sự (2023) về vi nhân giống và đánh giá tính ổn định di truyền của *D. transparens* Wall. Ex Lindl. sử dụng chỉ thị RAPD và ISSR đã cho kết quả rất tốt [96], hay khả năng ứng dụng chỉ thị SCoT và ISSR trong việc đánh giá đa dạng di truyền lan *Crepidium acuminatum* (D. Don) Szlach [172].

*D. anosmum* Lindl. phân bố ở nhiều vùng địa lý khác nhau và nó có những đặc điểm đặc trưng nên mức độ đa dạng của lan này rất cao. Đã có những nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử như RAPD, SSR, ITS,... để phân loại và xác định mức độ đa dạng loài. Như nghiên cứu mối quan hệ di truyền của *D. anosmum* Lindl. var. và loài *semialba* dựa trên phân tích trình tự gen lục lạp *matK*, *rbcL* [142]. Trong công bố của Lê Thị Ngọc Diệp và cộng sự (2020), vùng *ITS* cho tiềm năng cao hơn so với *matK* trong nhận diện lan *Dendrobium* với tỉ lệ nhận diện 100%, do đó, vùng *ITS* xem là tiềm năng trong nhận diện nhóm lan *Dendrobium* [8].

Ngoài ứng dụng trên các loại hoa lan, chỉ thị phân tử RAPD còn được áp dụng trên nhiều loài thực vật khác để phân tích đa dạng di truyền như trên cây chuối [90]; cây nghệ tây [124]; cây *Maerua oblongifolia* (Forssk.) A. Rich [128], cây mướp hương (*Luffa cylindrica* (L.) Roem) [16].

## 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.) được thu thập tại Thành phố Huế, đã được Bảo tàng thiên nhiên Duyên hải miền Trung giám định là loài lan Giả hạc tím với tên khoa học là *Dendrobium anosmum* Lindl. ở văn bản số 01/BT-NCKH, với mẫu hiệu VNCC-MAG-001 (Phụ lục 1).

Các thí nghiệm của nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm tế bào, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế.

Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 5/2021 đến tháng 5/2024.

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.2.1. Vật liệu thực vật

Quả lan đã chín sinh lý và những đoạn thân có chứa chồi ngủ của cây lan Giả hạc tím Huế ban đầu được lựa chọn. Các mẫu thu thập đều khoẻ mạnh, sạch bệnh dùng cho nuôi cấy *in-vitro* tạo vật liệu khởi đầu cho nghiên cứu.

Vật liệu ban đầu sử dụng cho các thí nghiệm xử lý hoá chất đột biến là mô sẹo sơ cấp được tạo ra từ nuôi cấy đoạn thân có chồi ngủ và protocorm phát triển từ hạt.



**Hình 2.1.** Mẫu lan Giả hạc tím Huế A. Quả lan; B. Đoạn thân có chứa chồi ngủ.  
(Nguyễn Hữu Thọ (2021), hình chụp trong thời gian lấy mẫu nghiên cứu)

### 2.2.2. Hoá chất thí nghiệm

Các hoá chất đa lượng, vi lượng, vitamin xuất xứ từ các hãng Duchefa Biochemie (Hà Lan); Merck (Đức) và Trung Quốc. Các chất điều hoà sinh trưởng sử dụng trong thí nghiệm là TDZ, NAA, BA, IAA. Sử dụng dung dịch NaOH 1N để hoà tan PGRs với nồng độ 1 mg/mL. Các dung dịch stock sau khi pha bảo quản ở điều kiện 2-8°C.

Dung dịch colchicine (Colchicine dạng bột, độ tinh khiết > 97,0%, Duchefa Biochemie (Hà Lan)) hoặc Dimethyl sulphate (DMS) (DMS dạng dung dịch, độ tinh khiết  $\geq 99,5\%$ , Duchefa Biochemie (Hà Lan)) được hoà tan trong cồn (90%), sau đó dung dịch này được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn (10.000 ppm) bằng cách thêm nước cất vô trùng và lọc qua màng lọc khử trùng (0,22  $\mu\text{m}$ ). Dung dịch này được thêm trực tiếp vào môi trường MS lỏng đã hấp tiệt trùng để đạt nồng độ thí nghiệm.

Hoá chất dùng để tách chiết DNA gồm có: Nitrogen, CTAB, Phenol, Chloroform, Isoamyl alcohol, Isopropanol, ethanol, enzyme RNase.

Hoá chất dùng để chạy PCR-RAPD: Nước cất đã khử ion, dung dịch đệm, dNTP, Tag DNA polymerase, các môi RAPD (Bảng 2.1).

Hoá chất để chạy điện di sản phẩm PCR: Agarose, dung dịch TBE (Tris – Boric acid -EDTA), Ethidium bromide, loading dye, thang DNA chuẩn (marker 1kp).

**Bảng 2.1.** Ký hiệu và trình tự của 63 môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

| TT | Ký hiệu môi | Trình tự (5'-3') | TT | Ký hiệu môi | Trình tự (5'-3') |
|----|-------------|------------------|----|-------------|------------------|
| 1  | P1          | GTCCACACGG       | 33 | OPA-13      | CAGCACCCAC       |
| 2  | P2          | TCGGCGGTTC       | 34 | OPA-14      | TCTGTGCTGG       |
| 3  | P3          | GGTGACGCAG       | 35 | OPA-15      | TTCCGAACCC       |
| 4  | P4          | GTGGCATCTC       | 36 | OPN-02      | ACCAGGGGCA       |
| 5  | P5          | GGACTGGAGT       | 37 | OPN-03      | GGTACTCCCC       |
| 6  | P6          | AGAGCCGTCA       | 38 | OPN-04      | GACCGACCCA       |
| 7  | P9          | ACCCCCGAAG       | 39 | OPN-06      | GAGACGCACA       |
| 8  | P10         | CACAGACACC       | 40 | OPN-10      | ACAAGTGGGG       |
| 9  | P11         | GTAGACCCGT       | 41 | OPK-12      | TGGCCCTCAC       |
| 10 | P12         | AAGCGACCTG       | 42 | OPK-13      | GGTTGTACCC       |
| 11 | P14         | ACCGCGAAGG       | 43 | OPK-16      | GAGCGTCGAA       |
| 12 | P15         | GGCACTGAGG       | 44 | OPG-10      | AGGGCCGTCT       |
| 13 | P16         | GGACCCAACC       | 45 | OPG-17      | ACGACCGACA       |

|    |        |            |    |         |              |
|----|--------|------------|----|---------|--------------|
| 14 | P17    | CAGCTCACGA | 46 | OPG-18  | GGCTCATGTG   |
| 15 | P18    | GTCGCCGTCA | 47 | OPBH-16 | CTGCGGGTTG   |
| 16 | P20    | GGTGACGCAG | 48 | OPBH-19 | GTCGTCCGGA   |
| 17 | OPB-01 | GTTTCGCTCC | 49 | OPF-01  | ACGGATCCTG   |
| 18 | OPB-02 | TGATCCCTGG | 50 | OPF-04  | GGTGATCAGG   |
| 19 | OPB-03 | CATCCCCCTG | 51 | OPF-05  | CCGAATTCCC   |
| 20 | OPB-04 | GGACTGGAGT | 52 | OPF-06  | GGGAATTCTG G |
| 21 | OPB-05 | TGCGCCCTTC | 53 | OPD-02  | GGACCCAACC   |
| 22 | OPB-06 | TGCTCTGCCC | 54 | OPD-07  | TTGGCACGGG   |
| 23 | OPB-08 | GTCCACACGG | 55 | OPD-11  | ACCCGGTCAC   |
| 24 | OPB-10 | CTGCTGGGAC | 56 | OPD-16  | AGGGCGTAAG   |
| 25 | OPB-17 | AGGGAACGAG | 57 | OPH-14  | ACCGTGGGTG   |
| 26 | OPB-18 | CCACAGCAGT | 58 | OPH-20  | GGGAGACATC   |
| 27 | OPB-20 | GGACCCTTAC | 59 | OPV-08  | GGACGGCGTT   |
| 28 | OPA-01 | CAGGCCCTTC | 60 | OPO-04  | AAGTCCGCTC   |
| 29 | OPA-03 | AGTCAGCCAC | 61 | OPAT-14 | GTGCCGCACT   |
| 30 | OPA-04 | AATCGGGCTG | 62 | OPC-13  | GGGGGTCTTT   |
| 31 | OPA-07 | GAAACGGGTG | 63 | OPAO-02 | AATCCGCTGG   |
| 32 | OPA-08 | GTGACGTAGG |    |         |              |

(Nguồn: các primer RAPD bảng 2.1 đều được cung cấp bởi hãng Operon Technologies)

### 2.2.3. Điều kiện phòng và môi trường nuôi cấy

#### 2.2.3.1. Điều kiện phòng nuôi cấy

**Phòng nuôi sáng:** Phòng nuôi mẫu đảm bảo kín, có hệ thống quạt thông khí có màng lọc khí, các điều kiện nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, thời gian chiếu sáng, cường độ ánh sáng có thể điều chỉnh để phù hợp với từng thí nghiệm. Phòng nuôi có nhiệt độ được cài đặt  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ánh sáng 1000 lux, độ ẩm được điều chỉnh từ 50-60% và các thông số này được kiểm soát nhờ nhiệt kế, quang kế và ẩm kế.

Sử dụng đèn huỳnh quang chiếu sáng với mật độ thông lượng photon quang hợp trong khoảng  $13,5 - 27 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ , thời gian chiếu sáng được điều chỉnh 8 giờ/ ngày.

**Phòng nuôi tối:** Phòng cần tắt cả các điều kiện như phòng sáng chỉ khác là không cần lắp đèn chiếu sáng cho cây, cửa sổ cần được che kín bằng vải đen.

#### 2.2.3.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy *in-vitro*: Các môi trường được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường  $\frac{1}{2}$  Murashige and Skoog ( $\frac{1}{2}$  MS), MS, môi trường Vacin Went (VW), môi trường Hyponex (Hyp), môi trường Knusond C. Các môi trường thí nghiệm được bổ sung 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 100 ml/L nước dừa + 30 g/L khoai tây nghiền mịn. Tùy vào mỗi thí nghiệm mà PGR được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH 5,8 trước khi hấp khử trùng.

Môi trường nuôi cấy vi sinh: Các môi trường sử dụng trong nuôi cấy vi sinh là môi trường Luria-Bertani (LB), nước Peptone 1%, môi trường Pikovskaya (PVK), môi trường Nutrient agar (NA), môi trường NA bán lỏng, môi trường Starch casein agar (SCA), môi trường International streptomyces project 2 (ISP2), môi trường Ashby.

Môi trường sau khi pha xong được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 30 phút, môi trường đặc được đổ vào các đĩa petri, hoặc bì nylon (12 x 25 cm hoặc 8 x 12 cm). Thành phần các môi trường dinh dưỡng được trình bày phụ lục 2.

### **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

Mỗi phương pháp nghiên cứu áp dụng phù hợp vào từng nội dung nghiên cứu, và có sự kế thừa nhau, logic của nghiên cứu được sơ đồ hoá qua hình P.1 và hình P.2 được trình bày ở phụ lục 3.

#### **2.3.1 Tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* cho lan Giả hạc tím Huế**

##### **2.3.1.1 Nhận dạng và thu thập mẫu nghiên cứu**

Các mẫu lan Giả hạc tím Huế được thu thập ở khu vực TP. Huế, trong đó cây lan lựa chọn làm cây mẹ để lấy mẫu cho nghiên cứu được lấy tại nhà vườn Lan Đô Nguyễn, 18 Thạch Hãn, TP. Huế (5/2021). Trong thời gian nghiên cứu các mẫu được trồng chăm sóc tại vườn lan Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Thời điểm thu thập mẫu cây đang có hoa nên đã xác định đúng được mặt hoa lan Giả hạc tím Huế, mô tả các đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế theo phương pháp mô tả đặc điểm hình thái hoa lan của De (2020) [72]. Định loại mẫu theo hai phương pháp:

##### ***a. Phương pháp hình thái so sánh***

Việc xác định các đặc điểm hình thái được thực hiện theo phương pháp mô tả dựa trên quan sát trực tiếp các bộ phận của cây lan và tham khảo với công bố đã có như của Sri Hartati và cộng sự (2022) [86], Vu Quoc Luan và cộng sự (2022) [117]. Mẫu lan cũng được gửi để giám định tại Bảo tàng thiên nhiên Duyên hải miền Trung.

Các đặc điểm xác định về chiều cao cây, đường kính cây, chiều dài lóng, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lớn nhất của lá, đường kính mặt hoa và các đặc điểm hình dạng, màu sắc, mùi hương của thân, lá, rễ, hoa. Tất cả các kích thước được đo bằng thước có vạch chia nhỏ nhất là 1 mm.

### **b. Phương pháp định danh phân tử**

#### **+ Tách chiết DNA**

Mẫu lá non, mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế sau khi thu thập được tách chiết DNA tổng số theo phương pháp mô tả của Doyle (1991) cải tiến [74] (Phụ lục 4). Chất lượng DNA tổng số được kiểm tra qua điện di với điện thế 100 V thời gian 15 phút trên gel agarose 1% trong đệm TAE Tris-Acetate-EDTA 1X và nhuộm bằng thuốc nhuộm Gelred (Biotium, Mỹ). Các bước thực hiện điện di được mô tả ở phụ lục 4.

#### **+ Phản ứng khuếch đại PCR và giải trình tự gen**

Vùng gen *rbcL*, *ITS*, *trnL* và *matK* được khuếch đại bằng cách sử dụng thành phần phản ứng PCR như sau với các cặp môi tương ứng được trình bày ở bảng 2.2.

**Bảng 2.2.** Trình tự nucleotide của các cặp môi

| <b>Tên môi</b> | <b>Trình tự nucleotide (3'→ 5')</b> | <b>Tài liệu tham khảo</b> |
|----------------|-------------------------------------|---------------------------|
| RbcLa_F        | ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC          | [5]                       |
| rbcLa_R        | GTAAATCAAGTCCACCRCG                 |                           |
| ITS_4          | TCCTCCGCTTATTGATATGC-               | [115]                     |
| ITS_5          | GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG              |                           |
| matK 390_F     | CGATCTATTCATTCAATATTTTC             | [69]                      |
| matK 1326_R    | TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT              |                           |
| trnL_F         | CGAAATCGGTAGACGCTACG                | [107]                     |
| trnL_R         | ATTTGAACTGGTGACACGAG                |                           |

Thành phần phản ứng PCR: 25 µL GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega), 1µL môi xuôi (10 pmol/µL, IDT, Mỹ), 1µL môi ngược (10 pmol/µL, IDT, Mỹ), 100 ng DNA

khuôn mẫu và bổ sung nước cất vô trùng cho đủ tổng thể tích 50  $\mu$ L. Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại đoạn các đoạn gen: 95°C/5phút; sau đó 30 chu kỳ tiếp theo với (95°C/45 giây, 56°C/45 giây, 72°C/60 giây) và cuối cùng 72°C/10 phút để hoàn thành phản ứng.

Tất cả các phản ứng đều được thực hiện trong máy luân nhiệt Máy luân nhiệt MJ mini thermal cycler (ThermoFisher, Mỹ). Các sản phẩm PCR được điện di bằng cách sử dụng gel agarose 1% và so sánh với thang chuẩn 1kb (Bioline, UK) để xác định kích thước của sản phẩm khuếch đại. Các sản phẩm khuếch đại PCR sau đó được tinh sạch bằng cách sử dụng ISOLATE II PCR và Gel Kit (Bioline, UK) và sau đó được thực hiện phản ứng giải trình tự gen trực tiếp với cặp mồi tương ứng trên máy ABI 3100 (Applied Biosystems, Mỹ) tại công ty 1st Base -Malaysia (<https://base-asia.com/>). Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit 7.0.5.3 và công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen Mỹ (GenBank) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) để xác định tên loài. Cây thể hiện mối quan hệ di truyền xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood và Tamura-Nei model bằng phần mềm MEGA X.

### ***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***

Quả lan sau khi chín sinh lý được thu thập mang về phòng thí nghiệm và làm sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy với xà phòng, được rửa lại một lần nữa với nước hấp vô trùng trong 1 phút ở tủ cấy vô trùng. Sau đó, quả được khử trùng bằng cách nhúng ngập toàn bộ quả vào trong cồn ethanol 96° và lắc nhẹ trong 30 giây. Quả được lấy ra và đốt qua với đèn cồn trước khi quả được cắt đôi để lấy hạt [13]. 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) để xác định hiệu quả của quy trình khử trùng và xác định thời gian chiếu sáng thích hợp cho hạt nảy mầm. Mỗi công thức thí nghiệm được tiến hành với 10 bì môi trường (8x12 cm), và lặp lại 3 lần.

Các chỉ tiêu đánh giá sau 12 tuần theo dõi bao gồm: Thời gian hạt nảy mầm (ngày) (Tính từ ngày gieo hạt đến ngày xuất hiện hạt nảy mầm. Quy ước hạt lan nảy mầm: khi hạt

lan xuất hiện mầm lá xanh), tỷ lệ hạt nảy mầm (%), tỷ lệ hình thành protocorm (%), tỷ lệ hạt chết (%), tỷ lệ nhiễm (%).

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

Các đoạn thân khỏe mạnh, sạch bệnh dài khoảng 15-20 cm của lan Giả hạc tím Huế có chồi nách được thu thập. Đầu tiên, các đoạn thân này được rửa dưới vòi nước chảy và lắc nhẹ trong xà phòng thương mại pha loãng trong 5 phút, sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước máy để loại bỏ hoàn toàn xà phòng. Sau đó, các mẫu được cắt thành các đoạn dài 6-7 cm và đặt vào bình tam giác dung tích 500 ml, được rửa lại bằng cách lắc chúng trong nước cất 2-3 lần mỗi 2 phút. Quá trình khử trùng được thực hiện trong tủ cấy bằng NaClO 2% trong 10 phút [71], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% trong 10 -20 phút [167] và HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5-10 phút [40] (Bảng 2.3). Cuối cùng, mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-4 lần trước khi đưa vào môi trường MS cơ bản. Để đánh giá hiệu quả khử trùng các chỉ tiêu được ghi lại sau một tuần nuôi cấy bao gồm: tỷ lệ mẫu sạch (%), tỷ lệ chết (%), tỷ lệ nhiễm (%).

**Bảng 2.3.** 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%) | HgCl <sub>2</sub> (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.

Mẫu của quả lan sau khi vô trùng hoặc các mẫu thân còn sống, không bị nhiễm nấm khuẩn của nội dung 2.3.2 sau 1 tuần được sử dụng làm nguyên liệu cấy vào các môi trường

thí nghiệm. Cụ thể dùng các 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 và pH 5,8 [46].
- CT2: Môi trường  $\frac{1}{2}$  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 và pH 5,8 [174].
- CT3: Môi trường VW + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 [23].
- 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 [148].
- CT5: Môi trường Knusond C + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 [42].

Các công thức môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng và được nuôi trong cùng điều kiện phòng nuôi. Mỗi công thức được tiến hành trong 10 bì môi trường (8x12 cm) và lặp lại 3 lần. Số lượng hạt lan được đếm bằng buồng đếm hồng cầu và gieo 50 hạt/bì. Số liệu sẽ được thu thập ngay sau khi hạt tạo protocorm, và thời gian theo dõi là 12 tuần. Đánh giá hiệu quả của môi trường dựa vào thời gian hạt nảy mầm (ngày), tỷ lệ (%) nảy mầm của hạt, tỷ lệ (%) hình thành protocorm, tỷ lệ (%) hạt chết.

Mẫu thân được cấy trong bì nhựa PE chịu nhiệt (8x12 cm), mỗi bì 3 mẫu, mỗi thí nghiệm 5 bì và được lặp lại 2 lần. Số liệu sẽ được thu thập ngay sau khi mẫu thân tạo mô sẹo/chồi, và thời gian theo dõi là 12 tuần. Đánh giá các chỉ tiêu về thời gian hình thành mô sẹo/chồi, tỷ lệ (%) sống của mẫu, tỷ lệ (%) hình thành mô sẹo/chồi, kích thước mô sẹo/chồi.

Kết quả thí nghiệm lựa chọn ra môi trường dinh dưỡng phù hợp để sử dụng trong nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế, trong nghiên cứu này được gọi là môi trường dinh dưỡng tối ưu.

#### ***- Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm/mô sẹo từ lan Giả hạc tím Huế***

Mẫu vô trùng được cấy chuyển lên môi trường dinh dưỡng tối ưu và bổ sung riêng lẻ hoặc tổ hợp các chất điều hoà sinh trưởng NAA nồng độ 0,0 - 1,0 mg/L, BA nồng độ 0,0 – 2,0

mg/L, và TDZ nồng độ 0 – 2 mg/L để thăm dò khả năng tạo protocorm/mô sẹo của mẫu, thời gian theo dõi các chỉ tiêu đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy, thí nghiệm được bố trí theo các công thức bảng 2.4 và 2.5.

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

| <b>Công thức</b> | <b>Môi trường</b> | <b>NAA(mg/L)</b> | <b>BA (mg/L)</b> |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| CT1              | Môi trường tối ưu | 0,0              | 0,00             |
| CT2              | Môi trường tối ưu | 0,0              | 0,25             |
| CT3              | Môi trường tối ưu | 0,25             | 0,25             |
| CT4              | Môi trường tối ưu | 0,50             | 0,25             |
| CT5              | Môi trường tối ưu | 0,75             | 0,25             |
| CT6              | Môi trường tối ưu | 1,00             | 0,25             |
| CT7              | Môi trường tối ưu | 0,0              | 0,5              |
| CT8              | Môi trường tối ưu | 0,25             | 0,5              |
| CT9              | Môi trường tối ưu | 0,50             | 0,5              |
| CT10             | Môi trường tối ưu | 0,75             | 0,5              |
| CT11             | Môi trường tối ưu | 1,00             | 0,5              |

Mỗi công thức thí nghiệm được tiến hành trong 10 bì môi trường (8x12 cm) và lặp lại 3 lần. Số lượng hạt lan được đếm bằng buồng đếm hồng cầu và gieo 50 hạt/bì. Các chỉ tiêu theo dõi gồm thời gian hạt nảy mầm (ngày), tỷ lệ (%) hạt nảy mầm, tỷ lệ (%) hạt chết, tỷ lệ (%) hình thành protocorm.

**Bảng 2.5.** Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành mô sẹo.

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

Mẫu cây trong bì nhựa PE chịu nhiệt (8x12 cm), mỗi bì 3 mẫu, mỗi thí nghiệm 5 bì và được lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi hình thành mô sẹo là thời gian hình thành mô sẹo, tỷ lệ (%) mẫu sống, tỷ lệ (%) mẫu hình thành mô sẹo và kích thước mô sẹo (cm).

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

Các protocorm/mô sẹo (có màu xanh lá, không nhiễm nấm khuẩn, sinh trưởng tốt) được tạo thành từ nội dung nghiên cứu trên, cấy chuyển sang môi trường tái sinh chồi. Môi trường dinh dưỡng để nhân nhanh chồi là môi trường dinh dưỡng tối ưu có bổ sung nồng độ 0,0 -2,0 mg/L BA kết hợp 0,5-1,0 mg/L NAA để tái sinh chồi. Mỗi công thức được bố trí trong 5 bì môi trường, mỗi bì chứa 5 mẫu và có 3 lần lặp lại. Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy, công thức nghiên cứu được thể hiện qua bảng 2.6.

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

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

Các chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ (%) tái sinh chồi, số chồi, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi

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

Chồi tái sinh (cao 1-2 cm, xanh tốt, không nhiễm nấm khuẩn) được tách riêng sau đó cấy chuyển sang môi trường nhân chồi. Môi trường để nhân chồi là môi trường dinh dưỡng

tối ưu có bổ sung 1,5 mg/L BA và IAA nồng độ 0,0 – 0,7 mg/L. Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí trong 5 bình môi trường, mỗi bình cấy 5 chồi và có 3 lần lặp lại, các công thức thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.7.

**Bảng 2.7.** Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi

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

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm hệ số nhân chồi, chiều cao chồi (cm), đường kính chồi (cm), số lá và đặc điểm chồi sau 8 tuần nuôi cấy.

#### ***e. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ***

Chồi *in-vitro* đạt 3-4 lá, cao 2-3 cm, chồi xanh không nhiễm nấm bệnh được cấy chuyển sang môi trường ra rễ. Môi trường để ra rễ là môi trường dinh dưỡng tối ưu có bổ sung 0,1-1,0 mg/L NAA hoặc IAA để kích thích ra rễ. Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí trong 5 bình môi trường, mỗi bình cấy 5 chồi, có 3 lần lặp lại. Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy, công thức thí nghiệm cho ra rễ được thể hiện ở bảng 2.8. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ (%) chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm), đặc điểm hình thái rễ, chồi.

**Bảng 2.8.** Công thức nghiên cứu ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ.

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

#### 2.3.2.1. Gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng colchicine và dimethyl sulphate

Thời gian và nồng độ colchicine, DMS xử lý được tham khảo theo công bố của Nguyễn Phúc Huy và cộng sự (2019), Lita Soetopo và Dan Hosnia (2018), Gehan và Alhamd (2016), các protocorm/ mô sẹo *in-vitro* sau 60 ngày ( $\leq 0,5$  cm, khối lượng từ 0,02-0,1 g ) nuôi cấy từ mẫu của lan Giả hạc tím Huế được xử lý hoá chất với nồng độ 50–800 ppm với thời gian xử lý là 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ [92], [127], [162].

Mẫu (không bị nhiễm nấm bệnh, khoẻ, sinh trưởng tốt) được ngâm trực tiếp vào môi trường có chứa hoá chất, sau thời gian xử lý mẫu rửa bằng nước cất vô trùng 2 lần sau đó cấy trên môi trường dinh dưỡng tối ưu, với số lượng 5 mẫu/bì. Các thí nghiệm thực hiện ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm 6 bì và lặp lại 3 lần. Các công thức thí nghiệm thể hiện qua bảng 2.9. và bảng 2.10

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

| CT   | Nồng độ colchicine (ppm) | Thời gian xử lý (giờ) | CT   | Nồng độ colchicine (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                      | 10                    |
| 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                      |                       |

**Bảng 2.10.** Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng DMS trên protocorm/ mô sẹo

| CT   | Nồng độ DMS (ppm) | Thời gian xử lý (giờ) | CT   | Nồng độ 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               | 10                    |
| 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               |                       |

Các chỉ tiêu đánh giá được đánh giá tại 2 thời điểm sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá sau 4 tuần nuôi cấy là: Tỷ lệ (%) mẫu sống, tỷ lệ (%) mẫu phát triển mầm chồi, tỷ lệ (%) và kích thước mẫu sống (cm). Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy là: Tỷ lệ (%) mẫu sống, tỷ lệ (%) mẫu phát triển mầm chồi, tỷ lệ (%) mẫu có hình thái biến dị, kích thước mẫu sống (cm).

#### **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**

Môi trường dinh dưỡng được sử dụng cho các thí nghiệm này là môi trường dinh dưỡng tối ưu. Theo từng giai đoạn nuôi cấy mà môi trường được bổ sung chất điều hoà sinh trưởng khác nhau. Cấy mẫu vào môi trường với số lượng 5 mẫu/bì. Các thí nghiệm thực hiện ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm thực hiện 6 bì và lặp lại 3 lần.

##### **- Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi**

Các protocorm/mô sẹo đã xử lý hóa chất còn sống, khoẻ mạnh, không bị nhiễm nấm khuẩn, có kích thước tương đồng (0,3-0,5 cm), được cấy chuyển sang môi trường tái sinh

chồi. Môi trường dinh dưỡng tối ưu có bổ sung 0,0 – 2,0 mg/L BA và 0,0-1,0 mg/L NAA để tái sinh chồi. Các chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ (%) tạo chồi, số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá của chồi, đặc điểm chồi sau 8 tuần nuôi cấy. Các công thức thí nghiệm được bố trí giống bảng 2.6. Đặc điểm chồi được quy ước +: chồi thấp nhỏ yếu, có màu xanh vàng, ít lá hoặc chưa có lá; ++: Chồi thấp, nhỏ yếu có màu xanh, có lá nhỏ và ít; +++: Chồi cao, to khỏe, có màu xanh đậm, lá nhiều và lớn.

#### ***- Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi***

Chồi tái sinh từ protocorm/mô sẹo đã xử lý hóa chất được cấy chuyển sang môi trường nhân chồi. Lựa chọn chồi có kích thước tương đồng (cao 1,5 – 2 cm), có 2-3 lá, không nhiễm nấm, khuẩn, có màu xanh tươi. Môi trường dinh dưỡng tối ưu có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA nồng độ 1,5 mg/L và IAA từ 0,0 – 0,7 mg/L (Bảng 2.7). Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm hệ số nhân chồi, số lá, chiều cao (cm), đường kính (cm) thân chồi và đặc điểm chồi sau 8 tuần nuôi cấy. Các công thức thí nghiệm được bố trí giống bảng 2.7. Đặc điểm chồi được quy ước +: Chồi thấp, nhỏ yếu, màu xanh vàng, ít lá, lá mảnh, nhỏ; ++: Chồi cao trung bình cây nhỏ yếu có màu xanh nhạt, lá mảnh nhỏ; +++: Chồi cao, khỏe, có màu xanh lá dày; Chồi cao, to khỏe, màu xanh đậm lá nhiều và dày.

#### ***- Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ***

Chồi *in-vitro* xử lý hóa chất được cấy chuyển sang môi trường ra rễ. Lựa chọn các chồi đạt tiêu chuẩn, kích thước tương đồng (cao 2,5-3 cm), có từ 3-4 lá, chồi to, khỏe, có màu xanh tươi. Môi trường dinh dưỡng tối ưu có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng nồng độ từ 0,0 - 1,0 mg/L NAA hoặc IAA để kích thích ra rễ. Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ (%) chồi ra rễ, số rễ, chiều dài rễ (cm), chiều cao cây (cm), số lá của cây, đặc điểm của rễ và chồi sau 8 tuần nuôi cấy. Các công thức thí nghiệm cho ra rễ được bố trí giống bảng 2.8. Đặc điểm của rễ và chồi quan sát đánh giá bằng mắt thường được quy ước +: rễ ít, nhỏ, ngắn có màu trắng, cây hơi vàng, nhỏ, lá mảnh; ++: số lượng rễ trung bình, ngắn, nhỏ rễ có màu trắng, cây lá xanh và 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 và dài.

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

Từ kết quả thí nghiệm tạo dòng đột biến, lựa chọn những dòng có thay đổi triển vọng để đánh giá sâu hơn về hình thái, hoá sinh, tế bào và di truyền từ đó tạo cơ sở để lựa chọn nguyên liệu cho chọn tạo giống. Các tiêu chí lựa chọn dòng đột biến có triển vọng là: Cây không bị nhiễm nấm bệnh, khả năng sinh trưởng tốt, có những thay đổi hình thái của thân, lá, rễ rõ nét so với đối chứng về hình dạng, màu sắc, kích thước và số lượng.

#### **2.3.3.1. Đặc điểm hình thái của cây đột biến (Thân, rễ, lá, hoa)**

Sử dụng chỉ thị hình thái đánh giá theo các tiêu chí sinh học: Theo dõi đặc điểm hình thái, đặc tính sinh học của cơ quan sinh dưỡng, cơ quan sinh sản theo các chỉ tiêu định tính và định lượng, từ những mẫu cây đã được xử lý colchicine, DMS và có biểu hiện ra các tính trạng biến dị. Cụ thể, trong các thông số hình thái gồm chiều cao cây, chiều dài và chiều rộng của lá, được đo bằng thang đo cm. Số lượng lá trên mỗi cây, hình dạng lá, màu sắc của cây đối chứng và cây đột biến được đánh giá bằng quan sát bằng mắt thường [72].

#### **2.3.3.2. Đặc điểm tế bào của các dòng đột biến**

Phương pháp quan sát tế bào bằng kính hiển vi thực hiện theo mô tả của Trần Công Khánh (2005) [21]. Mẫu thực hiện quan sát được lấy ở các giai đoạn protocorm/ mô sẹo, chồi và giai đoạn cây hoàn chỉnh, mẫu thu vào thời điểm 8-10 giờ buổi sáng.

##### **- Quan sát tế bào biểu bì lá, thân, rễ**

Sử dụng mẫu biểu bì lá, thân non, rễ của cây non lan Giả hạc tím Huế đột biến và cây đối chứng ở giai đoạn chồi hoặc tạo cây hoàn chỉnh thực hiện làm tiêu bản tạm thời để quan sát dưới kính hiển vi. Tiêu bản có thể được nhuộm màu (xanh metylen hoặc đỏ carmine) hoặc không nhuộm, phương pháp làm tiêu bản kính hiển vi được trình bày ở Phụ lục 6. Sử dụng kính hiển vi quang học (Olympus, Nhật Bản) để quan sát với độ phóng đại vật kính là 10x và 40x, của thị kính là 10x. Thị kính có gắn thước đo trực vi (thước kính trực vi có chiều dài 100  $\mu\text{m}$ , được chia làm 100 vạch, mỗi vạch dài 1  $\mu\text{m}$ ). Quan sát đánh giá kích thước, hình dạng, trật tự sắp xếp của tế bào.

##### **- Quan sát tế bào khí khổng**

Phân tích khí khổng được thực hiện bằng phương pháp của Jadra và cộng sự (2009) [95]. Lấy một lớp biểu bì mỏng ở mặt dưới của lá (lá cây giai đoạn cây hoàn chỉnh) bằng mũi kim và đặt lên lam kính để làm tiêu bản. Tiêu bản được quan sát bằng kính hiển vi ở độ phóng đại 100x hoặc 400x. Kích thước khí khổng (chiều dài, chiều rộng) được đo trong quá trình quan sát bằng cách sử dụng thang đo dòng (trắc vi thị kính) được gắn vào thị kính. Xác định thể đa bội nếu chiều dài lỗ khí của chúng  $\geq 1,25 \times$  mức đối chứng [152]. Mật độ khí khổng được đếm trong 4 ô vuông cụ thể của trường nhìn kính hiển vi và sau đó tính ra cho 1 mm<sup>2</sup>.

Ghi nhận các chỉ tiêu về khí khổng gồm kích thước khí khổng (chiều dài, chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )), mật độ khí khổng/mm<sup>2</sup> và diện tích ( $\mu\text{m}^2$ ) tế bào khí khổng.

*- Quan sát nhiễm sắc thể (NST)*

Phân tích nhiễm sắc thể được thực hiện theo phương pháp theo mô tả của Ilya Kirov và cộng sự (2014) [106]. Quan sát số lượng NST có thể được đếm bằng cách quan sát tiêu bản của đầu rễ của mẫu đột biến, các bước làm tiêu bản được mô tả ở phụ lục 6. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại vật kính 100x và thị kính là 10x, dùng dầu cho lên tiêu bản để quan sát.

*-Phương pháp lập karyotype*

Kiểu nhân của lan Giả hạc tím Huế lưỡng bội và đa bội được quan sát và phân tích ở mẫu đối chứng (2n) không xử lý colchicine và mẫu xử lý colchicine. Hình ảnh NST từ quan sát bằng kính hiển vi được chụp bằng máy ảnh hoặc ứng dụng camera trên kính hiển vi quan sát (PROVIEW-dùng cho máy tính), sau đó được xử lý bằng phần mềm ImageJ 1.8.0 và Microsoft Excel để phân tích đặc điểm NST. Các đặc điểm quan sát được là số lượng, kích thước và hình dạng NST, đây là cơ sở để lập karyotype. Phân tích karyotype thực hiện thông qua việc ghép cặp NST tương đồng dựa trên sự giống nhau về kích thước và hình dạng NST [87].

**2.3.3.3. Đặc điểm hoá sinh của cây đột biến**

+ Xác định hàm lượng diệp lục và carotenoid có trong lá:

Tổng hàm lượng chất diệp lục và carotenoid được chiết xuất bằng phương pháp chuẩn của Porra RJ (2002) [144] (phụ lục 6). Hàm lượng chlorophyll a, b và carotenoid được tính theo công thức của Porra (2002) [144], [75], tính theo trọng lượng tươi:

$$\text{Chlorophyll a (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{(12,7.A663 - 2,69.A645).V}{m}$$

$$\text{Chlorophyll b (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{(22,9.A645 - 4,68.A663).V}{m}$$

$$\text{Chlorophyll tổng (mg.g}^{-1}\text{)} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

$$\text{Carotenoid (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{[1000.A470 - 1,82.(12,25.A663 - 2,97.A645) - 85,02.(21,5.A645 - 5,1.A663)].V}{198.m}$$

Trong đó A470, A645, A663 lần lượt là độ hấp phụ (A), được đo bằng máy quang phổ ở các bước sóng 470, 645, 663 nm; m là khối lượng mẫu (g); V là thể tích acetone 80% (ml). Mẫu lá thu từ chồi của các dòng được chọn sau khi cấy chồi *in-vitro* được 8 tuần, thời gian thu mẫu từ 8-10 giờ sáng, thí nghiệm được thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên và ba lần lặp lại trong điều kiện vật lý giống nhau.

#### **2.3.3.4. Đa dạng di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử RAPD**

##### **a. Tách chiết DNA tổng số**

Mẫu lá non, mô sẹo của các dòng biến đổi hình thái sau khi thu thập được tách chiết DNA theo phương pháp mô tả ở phần 2.3.1.2

##### **b. Phương pháp thực hiện phản ứng PCR-RAPD**

Các mẫu DNA được phân tích kiểu gen dựa trên phản ứng PCR với các mồi ngắn (Bảng 2.1) để nhân bản ngẫu nhiên các đoạn DNA, theo phương pháp của Williams và cộng sự (1993) [182]. Phản ứng PCR-RAPD được thực hiện theo mô tả ở phụ lục 7.

##### **\* Điều kiện phản ứng PCR-RAPD**

- Phản ứng PCR-RAPD thực hiện trên máy MJ mini thermal cycler. Tổng thể tích cho một phản ứng PCR-RAPD là 25 µL. Thành phần và nồng độ của các chất tham gia phản ứng như bảng 2.11.

**Bảng 2.11.** Thành phần phản ứng PCR-RAPD

| Thành phần phản ứng PCR          | Nồng độ  | Thể tích cho 1 phản ứng |
|----------------------------------|----------|-------------------------|
| Đệm PCR                          | 10x      | 2,5 µL                  |
| DNA khuôn                        | 50 ng/µL | 1 µL                    |
| dNTPs                            | 2mM      | 2 µL                    |
| Môi RAPD                         | 10 µM    | 1 µL                    |
| Taq DNA pol                      | 5U/µL    | 2 µL                    |
| H <sub>2</sub> O (siêu sạch)     | -        | 16,5 µL                 |
| Tổng thể tích cho 1 phản ứng PCR |          | 25 µL                   |

Chương trình nhiệt cho phản ứng PCR-RAPD: Giai đoạn biến tính nhiệt độ 94°C kéo dài 5 phút; sau đó 40 chu kỳ gia nhiệt tiếp theo bao gồm các giai đoạn: Biến tính DNA ở 94°C trong 45 giây, gắn mồi ở 37°C trong 60 giây, và tổng hợp DNA ở 72°C trong 120 giây và cuối cùng hoàn thiện sản phẩm ở 72°C trong 10 phút và lưu trữ ở 4°C. Tất cả các phản ứng PCR-RAPD được thực hiện lặp lại 2 lần độc lập để đảm bảo tính ổn định và loại bỏ các band giả. Các band chỉ được chấp nhận nếu xuất hiện ổn định 100% ở cả hai lần lặp, có độ phân giải rõ ràng, cường độ ổn định (không quá mờ, không quá đậm). Các band không ổn định hoặc chỉ xuất hiện 1 lần đều bị loại.

Kết quả điện di sản phẩm PCR-RAPD là các các band DNA, các band này được mã hóa bằng hệ nhị phân theo nguyên tắc dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các band, đánh số “1” nếu có xuất hiện band và số “0” nếu không xuất hiện band, dữ liệu này được dùng xây dựng cây phân nhóm di truyền bằng phần mềm NTSYS2.1 theo phương pháp UPGMA [150]. Nếu một band DNA (có kích thước cụ thể) xuất hiện ở mẫu a nhưng không xuất hiện ở mẫu b hoặc đồng thời xuất hiện ở cả a và b nhưng không xuất hiện ở các mẫu khác thì band DNA này gọi là band đa hình. Ngược lại nếu band DNA nào xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu thì gọi là band đồng hình. Tính các chỉ số \*h (đa dạng gen Nei's (1973)), chỉ số đa dạng di truyền (\*h) theo cách tính của Nei's được tính bằng:  $*h = \sum p_i^2$  (p<sub>i</sub> là tần số của alen thứ i tại locus đó) [134]; \*i<sub>0</sub> (Chỉ số đa dạng di truyền Shannon  $*i_0 = \sum_{i=1}^s (p_i * \ln p_i)$ ), trong đó p<sub>i</sub> là tỷ lệ số lượng cá thể tương ứng với bất taxon thứ i trong bộ mẫu, s là độ phong phú của loài, Shannon (1949), [108]) bằng phần mềm Popgen 23.

Chỉ tiêu đánh giá sản phẩm PCR-RAPD: Tỷ lệ khuếch đại PCR thành công (%), số band hình thành/mỗi, số band đa hình, kích thước của band, tỷ lệ band đa hình (%).

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

Nguyên liệu nghiên cứu là chồi *in-vitro* của một số dòng tạo ra từ nội dung 2.3.2 trong nghiên cứu này, những mẫu được lựa chọn có các thay đổi về hình thái so với đối chứng và kiểm tra lại bằng chỉ thị tế bào, hoá sinh và phân tử.

##### **2.4.4.1. Khả năng tái sinh mô sẹo/chồi của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.**

###### **a. Tái sinh mô sẹo/chồi từ đoạn thân có chồi ngủ**

Các mẫu chồi xử lý bỏ lá, cắt thành đoạn 1,5-2,0 cm, sau đó cấy lên môi trường dinh dưỡng tối ưu và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng theo công thức tốt nhất ở bảng 2.5.

Các chỉ tiêu theo dõi được đánh giá sau 12 tuần nuôi cấy gồm thời gian hình thành mô sẹo/chồi (ngày), tỷ lệ số của mẫu (%), tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%), kích thước mô sẹo (cm), tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (cm).

###### **b. Tái sinh chồi từ mô sẹo**

Mô sẹo tái sinh của những dòng đột biến được lựa chọn với kích thước tương đồng ( $\geq 0,5$  cm), khoẻ mạnh, không bị nhiễm nấm, vi khuẩn được cấy vào môi trường dinh dưỡng tái sinh chồi, môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng theo công thức thí nghiệm tốt nhất ở bảng 2.5 dùng cho tái sinh chồi từ mô sẹo đột biến.

Những chỉ tiêu đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy gồm có tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) và số lá/chồi.

##### **2.3.4.2. Ảnh hưởng chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng nhân chồi và ra rễ dòng Giả hạc tím Huế đột biến**

###### **a. Nhân chồi đột biến**

Chồi *in-vitro* của dòng đột biến cấy chuyển sang môi trường nhân chồi. Môi trường nhân chồi là môi trường dinh dưỡng tối ưu và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng theo công thức thí nghiệm tốt nhất ở bảng 2.7 dùng cho chồi đột biến. Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí trong 6 bì, mỗi bì chứa 5 chồi, và được lặp lại 3 lần.

Các chỉ tiêu theo dõi gồm có hệ số nhân chồi, chiều cao chồi (cm), đường kính thân chồi (cm), số lá của chồi và đặc điểm của chồi nhân sau 8 tuần nuôi cấy.

#### *b. Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh*

Lựa chọn chồi *in-vitro* của các dòng lan đột biến tạo ra từ thí nghiệm nhân chồi đạt tiêu chuẩn (cao 3-4 cm và có 4-5 lá) cấy vào môi trường dinh dưỡng tối ưu và có bổ sung thêm chất điều hoà sinh trưởng theo công thức thí nghiệm tốt nhất ở bảng 2.8 dùng cho chồi lan đột biến. Mỗi công thức thí nghiệm bố trí trong 6 bình, mỗi bình chứa 5 chồi, và được lặp lại 3 lần.

Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy gồm có tỷ lệ ra rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm), chiều cao cây (cm), số lá và đặc điểm của rễ.

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

#### **2.3.5.1. Nghiên cứu thành phần giá thể phù hợp để ra bầu cây con**

Cây lan Giả hạc *in-vitro* đủ tiêu chuẩn được đưa ra vườn ươm huấn luyện từ 15-20 ngày trước khi ra bầu. Giá thể dùng để trồng cây con là xơ dừa, trấu hun, dớn vụn vỏ thông, bả dương xỉ [138].

Công thức giá thể thí nghiệm: **CT1:** Xơ dừa: Trấu hun tỉ lệ 1:1; **CT2:** Xơ dừa: Dớn tỉ lệ 1:1; **CT3:** Xơ dừa: vụn vỏ thông tỉ lệ 1:1; **CT4:** Dớn; **CT5:** Xơ dừa; **CT6:** Gắn trên bả dương xỉ (20x15 cm) có phủ dớn; **CT7:** Gắn trên bả gỗ vú sữa (20x15 cm) có phủ dớn. Mỗi công thức sẽ được lặp lại 3 lần, mỗi lần 30 cây.

Các cây sau khi ra bầu được tiếp xúc với ánh sáng tán xạ 70% (kiểm soát bằng việc tăng giảm các lớp lưới lan đen và đo độ sáng bằng máy đo ánh sáng), nhiệt độ duy trì từ 25-35°C (kiểm soát bằng việc sử dụng nhiệt kế treo trực tiếp tại vườn ươm, nếu nhiệt độ cao hơn sẽ tiến hành phun sương để duy trì nhiệt độ; ở thời tiết dưới 30°C tưới 1 lần/ngày vào buổi sáng và trên 30°C tưới 2 lần/ngày vào buổi sáng và chiều.)

Các chỉ tiêu đánh giá sau 12 tuần trồng là tỷ lệ sống của cây con (%), chiều cao cây (cm), đường kính cây (cm), số lá, chiều rộng lá (cm), chiều dài lá (cm), số lá mới.

Kết quả nghiên cứu này lựa chọn ra giá thể phù hợp để ra cây lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* giai đoạn vườn ươm, và dùng giá thể này khảo nghiệm khả năng sinh trưởng của các dòng lan đột biến được lựa chọn ở giai đoạn vườn ươm. Những tiêu chí đánh giá cho

các dòng lan đột biến sau 12 tuần trồng gồm tỷ lệ sống của cây con (%), chiều cao cây (cm), đường kính cây (cm), số lá, chiều rộng lá (cm), chiều dài lá (cm), số lá mới.

#### **2.3.5.2. Nghiên cứu điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, độ sáng) ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây con ra vườn.**

Áp dụng kỹ thuật giàn che nhân tạo để tạo các điều kiện che sáng bằng lưới lan đen, gồm 5 công thức sau: không che nắng, che nắng 25%, 50%, 75% và 100%. Mỗi công thức thí nghiệm 50 cây, bố trí ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần. Các cây con trong các thí nghiệm đồng nhất về sinh trưởng, chất lượng khi bắt đầu trồng, chiều cao trung bình 4-5 cm, có từ 3 - 5 lá và được trồng trong công thức giá thể tối ưu.

Các điều kiện chăm sóc khác ở các công thức thí nghiệm là giống nhau. Dùng cảm biến và dụng cụ đo ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm không khí cho từng công thức thí nghiệm từ đó điều chỉnh ngưỡng thích hợp. Các chỉ tiêu đánh giá sau 12 tuần trồng là tỷ lệ sống của cây (%), tỷ lệ nhiễm nấm bệnh (%), chiều cao cây (%), đường kính cây (cm), số lá, số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm).

#### **2.3.5.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của vi sinh vật nội sinh tới sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến**

##### **a. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ lan rừng**

##### **- Phân lập vi khuẩn nội sinh**

Sử dụng các phần thân, lá, rễ của những mẫu lan rừng được thu thập ở Bình Định (cũ), Gia Lai (cũ), Kon Tum (cũ), TP. Huế. Các giống lan được thu thập gồm có Giả hạc (*D. anosmum*), Giáng hương tam bảo sắc (*Aerides falcata*), Kiều vàng (*D. thyrsiflorum*), Hoàng thảo vảy rồng (*D. lindleyi*), và lan kiếm (*Cymbidium finlaysonianum*). Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh được tiến hành theo mô tả của Kumar và cộng sự (2016) [109], được trình bày ở phụ lục 8. Sử dụng môi trường bán lỏng NA nuôi cấy tạo vòng pellicle [31]. Sau đó lấy vi khuẩn từ vòng pellicle lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường NA, LB, SCA, ISP2 đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc trên các đĩa môi trường được theo dõi bằng cách đo kích thước và quan sát hình dạng khuẩn lạc bao

gồm các chỉ tiêu: màu sắc, hình dạng mép, bề mặt khuẩn lạc bằng mắt thường. Đối với những khuẩn lạc có kích thước quá nhỏ thì sử dụng kính lúp (10x) để quan sát.

*- Tuyển chọn chủng vi sinh vật nội sinh có tiềm năng*

Thực hiện phân tích các đặc điểm hoá sinh như khả năng phân giải lân [12], khả năng cố định đạm [24], khả năng sinh IAA [61], khả năng sinh  $\text{NH}_3$  [137] và khả năng đối kháng [30] của các chủng vi sinh vật nội sinh với vi sinh vật gây bệnh (vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên lan), lựa chọn những chủng vi sinh có tiềm năng nhất để định danh và sử dụng để làm chế phẩm vi sinh chăm sóc cho cây lan *in-vitro* ở vườn ươm. Phương pháp thực hiện được mô tả ở phụ lục Phụ lục 9.

Định loại phân tử chuẩn vi sinh vật: DNA tổng số từ vi khuẩn được tách chiết theo mô tả của Sambrook và Russell [151], các vùng 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi thuận 27F (5'-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG-3') và mồi ngược 1492R (5'-ACGG (CT) TACCTTGTTACGACTT-3') [54] (Phụ lục 9).

*b. Tạo chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh và ứng dụng chăm sóc cho cây lan Giả hạc tím Huế in-vitro giai đoạn vườn ươm*

Các chủng vi sinh vật nội sinh được chọn lọc nhân giống riêng rẽ và thu sinh khối. Nuôi sinh khối thực hiện trên môi trường LB lỏng, nuôi lắc 150 vòng/phút, trong thời gian 72 giờ, ở nhiệt độ phòng. Sinh khối của các vi sinh vật nội sinh sẽ được trộn với dịch dinh dưỡng (Dung dịch dinh dưỡng được tạo ra nhờ lên men dịch trùn quế và một số phụ gia khác, các bước thực hiện được trình bày ở Phụ lục 10), tỷ lệ pha trộn giữa dịch dinh dưỡng và sinh khối vi sinh vật nội sinh theo mỗi thí nghiệm (1:50 (CP2); 1:100 (CP3); 1:500 (CP4)). Hỗn hợp được ủ kín trong 2 tháng, chiết lấy dịch để thử nghiệm, liều lượng sử dụng 10 ml pha cho 1 lít nước.

Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 4 công thức và 3 lần lặp lại, mỗi công thức gồm có ít nhất 10 cây. Các cây ra bầu theo phương pháp đã được nghiên cứu ở nội dung 2.3.7.1 và bổ sung chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh gồm:

- Công thức 1: Chăm sóc theo điều kiện ở nội dung 2.3.7.1, không bổ sung chế phẩm dinh dưỡng vi sinh và được sử dụng là công thức đối chứng

- Công thức 2: Sử dụng chế phẩm chứa vi sinh vật nội sinh được tạo ra trong nghiên cứu này (theo 3 loại).

- Công thức 3: Sử dụng chế phẩm GE (Gabbage enzyme) và vitamin B1 theo công bố trước đây Nguyễn Thị Diễm và cộng sự (2020) [7].

- Công thức 4: Sử dụng chế phẩm chứa vi sinh vật nội sinh bán trên thị trường.

Các công thức thí nghiệm phun 2 lần/ tuần, bằng cách phun qua lá. Trong đó, chế phẩm GE được chiết ra từ hỗn hợp ủ các loại trái cây chín cắt nhỏ, rỉ mật và nước theo tỷ lệ 3:1:10, hỗn hợp này ủ trong 3 tháng.

Các công thức trên đều được bổ sung thêm phân bón tan chậm qua rễ với liều lượng như nhau cho mỗi cây 1 g/cây/ tháng. Loại phân được sử dụng là loại phân có tỉ lệ N:P:K:Mg tương đương là 6:40:6:15. Các chỉ tiêu như tỷ lệ sống (%), tỷ lệ nhiễm nấm bệnh (%), chiều cao cây (cm), đường kính cây (cm), số lá, số lá mới, chiều dài lá (cm), rộng lá (cm), số rễ, dài rễ (cm) các chỉ tiêu được đánh giá sau 3 tháng theo dõi.

*c. Ảnh hưởng của chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của của các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến*

Sử dụng chế phẩm có hiệu quả tốt nhất được tạo ra để khảo nghiệm khả năng thích nghi, sinh trưởng của những dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến đã chọn lọc. Liều lượng chế phẩm sử dụng là 10 ml pha cho 1 lít nước, phun 2 lần/ tuần. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với các dòng lan đột biến và 3 lần lặp lại, mỗi mỗi dòng lan đột biến thí nghiệm có ít nhất 10 cây.

Các tiêu chí đánh giá gồm có tỷ lệ sống (%), tỷ lệ nhiễm nấm bệnh (%), chiều cao cây (cm), đường kính cây (cm), số lá, số lá mới, chiều dài lá (cm), rộng lá (cm), số rễ, dài rễ (cm) các chỉ tiêu được đánh giá sau 3 tháng theo dõi.

#### ***2.3.5.4. Xây dựng quy trình nhân giống và huấn luyện cây in-vitro lan Giả hạc tím Huế***

Từ kết quả có được của nghiên cứu qua các giai đoạn nhân giống *in-vitro* (Thu mẫu, khử trùng, nuôi cấy khởi đầu, tái sinh mô sẹo/protocorm, tái sinh chồi, nhân chồi, ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, ra cây con tại vườn ươm) lựa chọn được các điều kiện tối ưu như môi trường dinh dưỡng, thời gian chiếu sáng, điều kiện khử trùng, chất và hàm lượng chất điều

hoà sinh trưởng, giá thể trồng, tỷ lệ che sáng, chế phẩm chăm sóc tại vườn ươm. Sử dụng kết quả tối ưu đưa vào quy trình nhân giống và huấn luyện cây con. Quy trình được trình bày theo các bước tiến hành, mô tả lại quá trình thực hiện, đồng thời có sơ đồ hoá các bước.

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

$$\text{-Tỷ lệ sống của mẫu (\%)} = \frac{\text{số mẫu sống}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu cấy}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ chết của mẫu (\%)} = \frac{\text{Số mẫu chết}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu cấy}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ nhiễm (\%)} = \frac{\text{Số mẫu bị nhiễm}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu cấy}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ hạt nảy mầm (\%)} = \frac{\text{số hạt nảy mầm}}{\text{Tổng số hạt gieo}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ hình thành protocorm (\%)} = \frac{\text{Số protocorm hình thành}}{\text{Tổng số hạt gieo}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ hình thành mô sẹo (\%)} = \frac{\text{Số mô sẹo hình thành}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu nuôi cấy}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ tạo chồi (\%)} = \frac{\text{Số mẫu có chồi xuất hiện}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu thí nghiệm}} \times 100$$

$$\text{-Hệ số nhân chồi} = \frac{\Sigma \text{Tổng số chồi mới tạo ra}}{\Sigma \text{Tổng số chồi ban đầu}}$$

$$\text{-Tỷ lệ ra chồi ra rễ (\%)} = \frac{\text{Số chồi có rễ}}{\Sigma \text{Tổng số chồi ban đầu}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ mẫu có mầm chồi phát triển (\%)} = \frac{\text{Số mẫu có mầm chồi}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu ban đầu}} \times 100$$

$$\text{-Tỷ lệ mẫu có hình thái biến dị (\%)} = \frac{\text{Số mẫu có hình thái biến dị}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu ban đầu}} \times 100$$

$$\text{- Diện tích tế bào khí khổng } (\mu\text{m}^2) = 3,14 \times \frac{\text{chiều dài tế bào}}{2} \times \frac{\text{chiều rộng tế bào}}{2}$$

- Số chồi (chồi/mẫu cấy): đếm tất cả chồi trên một mẫu cấy.

- Chiều cao chồi (cm): đo chiều cao từ phần cuối của giả hành cho đến chóp lá cao nhất của chồi.

- Số lá (lá/chồi): đếm số lá có trên chồi.

- Chiều dài lá (cm): chọn lá nguyên vẹn, đo từ gốc lá đến chóp lá.

- Chiều rộng lá (cm): chọn lá nguyên vẹn, đo khoảng cách 2 mép ở vị trí giữa lá.

- Số rễ (rễ/mẫu cây): đếm tổng số rễ trên một mẫu cây.
- Chiều dài rễ (cm): được đo từ gốc rễ đến chóp rễ.
- Đường kính giả hành (cm): dùng thước kẹp đo đường kính ở vị trí giữa thân.
- Kích thước mô sẹo (cm): đo theo chiều có kích thước lớn nhất của mô sẹo.
- Chiều dài, chiều rộng tế bào ( $\mu\text{m}$ ) : Dùng thước đo trong trắc vi thị kính, hoặc phần mềm ImageJ 1.8.0., đo chiều dài/rộng nhất của tế bào.
- Đặc điểm bên ngoài của mô sẹo, protocorm, chồi, rễ được đánh giá cảm quang qua quan sát bằng mắt đánh giá về màu sắc, hình dạng.

### **2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu**

- Dữ liệu thu được từ tất cả các thí nghiệm được phân tích Analysis of Variance (ANOVA) một chiều để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Độ lệch chuẩn (SD) được tính để mô tả mức độ biến động của dữ liệu trong mỗi nghiệm thức. So sánh giá trị trung bình giữa các nghiệm thức được thực hiện bằng phương pháp Duncan ở mức ý nghĩa 5%. Phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 26.
- Các số liệu thô thu từ các nội dung nghiên cứu sẽ được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học nhờ phần mềm Office excel 2019.
- Đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các giống cũng dựa trên ma trận hệ số tương đồng (Similarity coefficient) và phân tích sơ đồ hình nhánh (Cluster) bằng phần mềm NTSYSpc v2.1 theo phương pháp UPGMA [150].
- Tính các chỉ số  $H$  (đa dạng gen Nei's);  $H_{10}$  (chỉ số đa dạng di truyền Shannon) bằng phần mềm Popgen23.
- Các mẫu sau khi giải trình tự sẽ được truyền qua máy tính và phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.0.5.3. và MEGA X để xếp hàng (alignment) các trình tự để xác định vị trí và các dạng đột biến DNA.
- Hình ảnh tế bào được phân tích, đo, đếm bằng phần mềm 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 bằng đặc điểm hình thái:

Đặc điểm mô tả hình thái thân, rễ, lá, hoa của giống lan Giả hạc tím Huế (2-3 năm tuổi trở lên) thu thập tại một số nhà vườn ở TP.Huế chúng tôi đã xây dựng bảng đặc điểm hình thái lan Giả hạc tím Huế được trình bày chi tiết ở bảng P11-3.1, P11-3.2 phụ lục 11, và hình 3.1.

Đặc điểm hình thái được mô tả đều thể hiện được đặc điểm chung của chi lan *Dendrobium*. Bên cạnh đó những đặc điểm chi tiết của hoa về màu sắc, cấu trúc hoa hay mùi hương có thể xác định được loài của mẫu lan này. Kết hợp với các mô tả hình thái về loài lan *D. anosmun* đã công bố trước đây như của Hartati và cộng sự (2022) [86], Vu Quoc Luan và cộng sự (2022) [117] có thể nhận định rằng lan Giả hạc tím Huế đang nghiên cứu là loài lan Giả hạc tím với tên khoa học là *D. anosmum* Lindl.



**Hình 3.1.** Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) (Nguyễn Hữu Thọ, 2022). (A. Cây lan Giả hạc tím Huế; B. Vị trí cụm hoa trên thân; C1,2. Mặt trên và dưới của lá; D1,2,3,4,5. Mặt hoa nhìn theo các hướng (D1. mặt trước, D2. mặt trên, D3.

mặt dưới, D4. mặt bên, D5. hoa được dàn trải trên mặt phẳng); E. Trụ hoa (chứa nhụy hoa); F. Nắp bao phấn (mũi hoa); G. Bao phấn ( Pollinia); H. Cánh đài trên, I. Hai cánh vai; K. Hai cánh đài dưới, L. Cánh môi.)

Những đặc điểm hình thái của *D. anosmum* ở Việt Nam đã được mô tả trước đây với các đặc điểm chung và riêng của loài; Tương tự, *D. anosmum* tím Huế cũng có những đặc điểm đặc trưng của loài *D. anosmum* và thêm vào những nét độc đáo về màu sắc, mùi hương. Đặc điểm hình thái cấu trúc của cây lan bao gồm các kiểu sinh trưởng, lá, hoa, giả hành và rễ. Hoa là cơ quan quan trọng nhất để nhận dạng loài. Cấu trúc của hoa lan chủ yếu là cánh hoa, đài hoa, phần hoa, trụ hoa và cánh hoa môi [66]. Trong mô tả hình thái loài *D. anosmum* Lindl. trước đây của một số tác giả đã có những mô tả đặc điểm tương đồng như khuôn hoa hình sao cân đối, có mùi hương, có nhiều biến dị màu sắc, cánh hoa môi có nhiều lông mịn [64], [86], [135].

#### - Nhận diện bằng chỉ thị phân tử

Để có nhận định chắc chắn hơn về lan Giả hạc tím Huế chúng tôi tiếp tục định loại bằng chỉ thị phân tử. Trong nghiên cứu này, mẫu loài lan giả hạc (Giả hạc tím Huế - GHTH) thu thập ở TP. Huế đã được xác định tên khoa học dựa trên một số vùng gen thuộc hệ gen nhân và hệ gen lục lạp bao gồm *ITS*; *trnL*; *matK* và *rbcL*. Kết quả cho thấy cả 4 vùng gen thu nhận được từ loài lan Giả hạc tím Huế đều được giải trình tự thành công với kích thước thu được của các vùng gen tương ứng là 695 bp (*ITS*); 891 bp (*trnL*); 849 bp (*matK*) và 560 bp (*rbcL*) (Phụ lục 12). Sử dụng chương trình phân tích tương đồng trực tuyến BLAST trong NCBI, kết quả cho thấy trình tự nucleotide của các vùng gen thu được từ loài lan Giả hạc tím Huế độ tương đồng cao với các loài khác trong cùng chi *Dendrobium*. Từ 100 trình tự nucleotide của các loài thuộc chi *Dendrobium*, các loài có mức tương đồng cao với trình tự nucleotide của các vùng gen thu từ loài lan Giả hạc tím Huế được chọn làm dữ liệu phân tích tiến hoá phân tử và xây dựng cây phát sinh loài nhằm xác định tên khoa học của loài lan Giả hạc tím Huế.

Nhiều nghiên cứu trước đây cũng đã sử dụng chỉ thị *ITS*; *trnL*; *matK* và *rbcL* trong nhận diện loài *D. anosmum* Lindl., trong nghiên cứu của Phạm và cộng sự (2021) trên 12

mẫu của loài *D. anosmum* Lindl. var. *Semi alba* thu được từ nhiều địa phương ở Việt Nam, cặp môi này được đánh giá là hiệu quả cao trong định danh loài *D. anosmum* Lindl. var. *Semi alba* [142]; Lê Thị Ngọc Diệp và cộng sự (2020) sử dụng cặp môi này nhằm xác định 30 mẫu thuộc chi *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam. Kết quả nhận diện được 10/16 loài thuộc chi *Dendrobium* [8].

Kết quả phân tích 4 vùng gen khẳng định mẫu lan Giả hạc tím Huế thuộc loài *D. anosmum*. Chúng tôi kí hiệu mẫu chuẩn này là *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

Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế từ hạt được thực hiện qua các giai đoạn vào mẫu hạt, tạo protocorm, tái sinh chồi từ protocorm, nhân nhanh chồi, ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Mỗi giai đoạn được chúng tôi thử nghiệm với các điều kiện khác nhau để tìm ra điều kiện tối ưu nhất phù hợp với lan giả hạc tím Huế. Kết quả cụ thể được trình bày ở Bảng 3.1 và phụ lục 12.

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

| TT | 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.<br>- 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 tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa, pH 5,8.<br>- CT4: Môi trường Hyp loại 20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L loại 6,5N- | - Ở CT1 (MS): Thời gian nảy 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 %.<br>- Ở CT4 (Hyp) Thời gian nảy 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 %. |

|   |                            |  |                                                                                         |                                                                                                                             |
|---|----------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                            |  | 6P-19K) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 |                                                                                                                             |
| 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                  |

*a. Vào mẫu hạt lan Giả hạc tím Huế:*

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của khử trùng và thời gian chiếu sáng đến khả năng nảy mầm hạt lan Giả hạc tím Huế (hạt lan sử dụng làm mẫu nuôi cấy là hạt bên trong quả lan thời điểm chín sinh lý) sau 12 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.1 và bảng P12-3.1 phụ lục 12.

Quy trình khử trùng quả lan Giả hạc tím Huế 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. Điều này có thể giải thích do hạt lan Giả hạc tím Huế được bảo vệ bởi vỏ quả dày nên ít có nguy cơ bị nhiễm nấm, khuẩn hơn những loại hạt không được bảo vệ bởi vỏ. Trước đây, phương pháp khử trùng bằng cồn 96° và đốt trên ngọn lửa đèn cồn đã được Đặng Thị Thu Hà và Phạm Thu Hà (2020) thực hiện trên quả lan phi điệp tím (*D. anosmum* Lindl) nhưng tỉ lệ nhiễm cao hơn, có thể lên tới 38,33% [13].

So sánh với một số nghiên cứu sử dụng phương pháp khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> trên một số loài lan cho thấy nghiên cứu của chúng tôi cho hiệu quả khử trùng tốt hơn hoặc tương đương so những công bố trước đó [42], [43]. Theo Nguyễn Quỳnh Trang và cộng sự (2013) khi sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong thời gian 9 phút để khử trùng quả lan Giả hạc, kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm đạt 4,75% và tỷ lệ chồi tái sinh đạt 23,81% [42]. Ở nồng độ HgCl<sub>2</sub> 0,1% được sử dụng khử trùng cho quả lan Hoàng Thảo Vôi (*D. cretaceum* Lindley) trong thời gian 5 – 10 phút thu được tỷ lệ nhiễm lên tới 20% [43]. Như vậy, so sánh hai phương pháp

khử trùng bằng  $\text{HgCl}_2$  và phương pháp khử trùng bằng cồn  $96^\circ$  thì thấy rằng hai phương pháp cho kết quả vô trùng là tương đương nhưng khử trùng bằng cồn sẽ an toàn hiệu quả, và khả năng nảy mầm tốt hơn.

Nghiên cứu cho thấy thời gian chiếu sáng ảnh hưởng lớn đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế. Thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày cho kết quả tốt nhất, với 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% (Bảng 3.1 và bảng P12-3.1 phụ lục 12). Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) trên lan Giả hạc (*D. anosmum*) đột biến nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô *in-vitro* trong điều kiện chiếu sáng 8 giờ/ngày có tỷ lệ hạt nảy mầm là tốt nhất, tỷ lệ nảy mầm luôn lớn hơn 70%. Nghiên cứu của Sorgato và cộng sự (2020) cho thấy ảnh hưởng ánh sáng đến khả năng nảy mầm của hạt lan thuộc chi *Dendrobium*. Đối với loài *D. nobile* sau 16 giờ chiếu sáng/ngày cho tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 50,60%, đối với loài lan *D. phalaenopsis* tỷ lệ nảy thu được là 82,70% [165]. Kết quả phân tích có thể thấy thời gian chiếu sáng ảnh hưởng lớn đến khả năng nảy mầm của hạt lan và tùy từng loại lan thời gian chiếu sáng sẽ có ảnh hưởng khác nhau.

Như vậy, phương pháp khử trùng quả lan bằng cách nhúng quả lan vào cồn  $96^\circ$  trong 30 giây sau đó đốt qua ngọn lửa đèn cồn là phù hợp sử dụng cho quả lan Giả hạc tím Huế, đồng thời gian chiếu sáng thích hợp để hạt lan nảy mầm và hình thành protocorm trong điều kiện *in-vitro* là 8 giờ/ ngày.

#### *b. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến khả năng tạo protocorm*

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày sau 12 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 3.1 và bảng P12-3.2 phụ lục 12.

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng nhiều đến quá trình nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc. Ở CT1 (MS) và CT4 (Hyp) là 2 loại môi trường phù hợp để gieo hạt lan Giả hạc tím Huế với thời gian nảy mầm, tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ hình thành protocorm và tỷ lệ hạt chết của hạt theo thứ tự là 41,33 ngày, 64,76

%, 60,89 %, 20,36 % (CT1) và 42,87 ngày, 63,08 %, 59,62 %, 22,71 % (CT4). Kết quả được đánh giá kém nhất là CT5 (KC) với thời gian nảy mầm hạt kéo dài 62,93 ngày, tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp nhất 40,27 %, tỷ lệ hình thành protocorm chỉ đạt 29,29 % trong khi đó tỷ lệ hạt chết lên đến 52,65 % (Bảng 3.1 và bảng P12-3.2 phụ lục 12). Những công bố trước đây về môi trường dùng để gieo hạt lan Giả hạc cũng cho thấy sự thích hợp của 2 loại môi trường MS và Hyp. Nghiên cứu của Lê Thị Luận và cộng sự (2020) về nhân giống *in-vitro* cây lan Giả hạc Hawaii (*D. adastra*) đã dùng môi trường MS cho tất cả các thí nghiệm khảo sát và đều cho kết quả rất tốt, đối với giai đoạn gieo hạt có tỷ lệ nảy mầm lên đến 98,5 % khi môi trường có bổ sung thêm kích thích sinh trưởng BA [111]. Môi trường MS cũng phù hợp với cây lan *D. antennatum* Lindl cho tỷ lệ nảy mầm đạt 100 % trong 37,8 ngày [137]. Môi trường Hyp phù hợp với lan *Dendrobium* ‘Iriana Jokowi’ tỷ lệ nảy mầm đối với hạt lan này trên môi trường Hyp là 92,86 % sau 3 tháng gieo [148]. Môi trường Hyp là một môi trường dinh dưỡng thương mại được sử dụng trong môi trường nuôi cấy để hạt giống lan nảy mầm và tái sinh cây con từ thể PLB có hiệu quả giống môi trường MS [148].

Như vậy, hai loại môi trường khoáng MS và Hyp là phù hợp nhất để gieo hạt *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế.

#### c. Ảnh hưởng của Chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày và hạt được gieo trên môi trường MS được thể hiện ở bảng 3.1, bảng P12-3.3 phụ lục 12 và hình 3.2.

Khi môi trường dinh dưỡng không bổ sung kích thích sinh trưởng thì thời gian nảy mầm là 41,33 ngày, tỉ lệ nảy mầm của hạt là 64,76 %, tỷ lệ hình thành protocorm đạt 60,89 % và tỷ lệ chết của hạt chiếm 20,36 % (bảng P12-3.3 phụ lục 12). Kết quả này đã tăng lên đáng kể khi sử dụng 0,25 mg/L BA kết hợp với NAA nồng độ từ 0-1 mg/L. Ở CT5 với 0,75 mg/L NAA+ 0,25 mg/L BA là thời gian nảy mầm còn 28,27 ngày, tỷ lệ nảy mầm 87,64 %, tỷ lệ hình thành protocorm 82,04 % và tỷ lệ hạt chết là 10,49 %, hiệu quả có xu hướng giảm khi tăng nồng độ NAA lên 1 mg/L (31,33 ngày; 81,40 %; 77,41 %; 13,13 %) (CT6). Tuy nhiên, khi thay đổi nồng độ BA lên 0,5 mg/L thì kết quả có sự thay đổi, đạt kết quả tốt nhất

khi sử dụng 0,75 mg/L NAA+ 0,5 mg/L BA với thời gian nảy mầm của hạt, tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ hình thành protocorm và tỷ lệ hạt chết lần lượt là 23,27 ngày, 93,46 %, 88,75 % và 4,43 %, kết quả này tốt hơn cả CT5 (Bảng 3.1, bảng P12-3.3 phụ lục 12). Tương tự CT6 khi tăng nồng độ NAA lên 1 mg/L kết quả lại giảm đi ở CT11 cụ thể thời gian nảy mầm của hạt là 29,53 ngày; tỷ lệ hạt nảy mầm là 84,68 %; tỷ lệ hình thành protocorm là 78,66 %; và tỷ lệ chết của hạt là 13,61 % (CT11, bảng P12-3.3 phụ lục 12), điều này chứng tỏ khi nồng độ kích thích sinh trưởng quá cao dẫn đến sự ức chế quá trình nảy mầm hình thành protocorm. Kết quả nghiên cứu trên lan Giả hạc (*D. anosmum*) của một số tác giả khác cũng cho thấy hiệu quả của kích thích sinh trưởng BA và NAA đối với khả năng nảy mầm và tạo protocorm của hạt luôn cho tỷ lệ rất cao luôn trên 85 % [11], có trường hợp đạt 100 % [46].

Như vậy, với môi trường dinh dưỡng MS bổ sung 0,75 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA là phù hợp nhất để hạt lan Giả hạc tím Huế nảy mầm và tạo protocorm.



**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.)

*d. Ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm*

Những khối/cụm protocorm từ thí nghiệm nuôi cấy khởi đầu được cấy sang môi trường tái sinh chồi. Môi trường dinh dưỡng được sử dụng là MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA và NAA. Kết quả tái sinh chồi từ protocorm của lan Giả hạc tím Huế thu được sau 8 tuần nuôi cấy thể hiện qua biểu đồ hình 3.4, bảng 3.1, bảng P12-3.4 phụ lục 12.

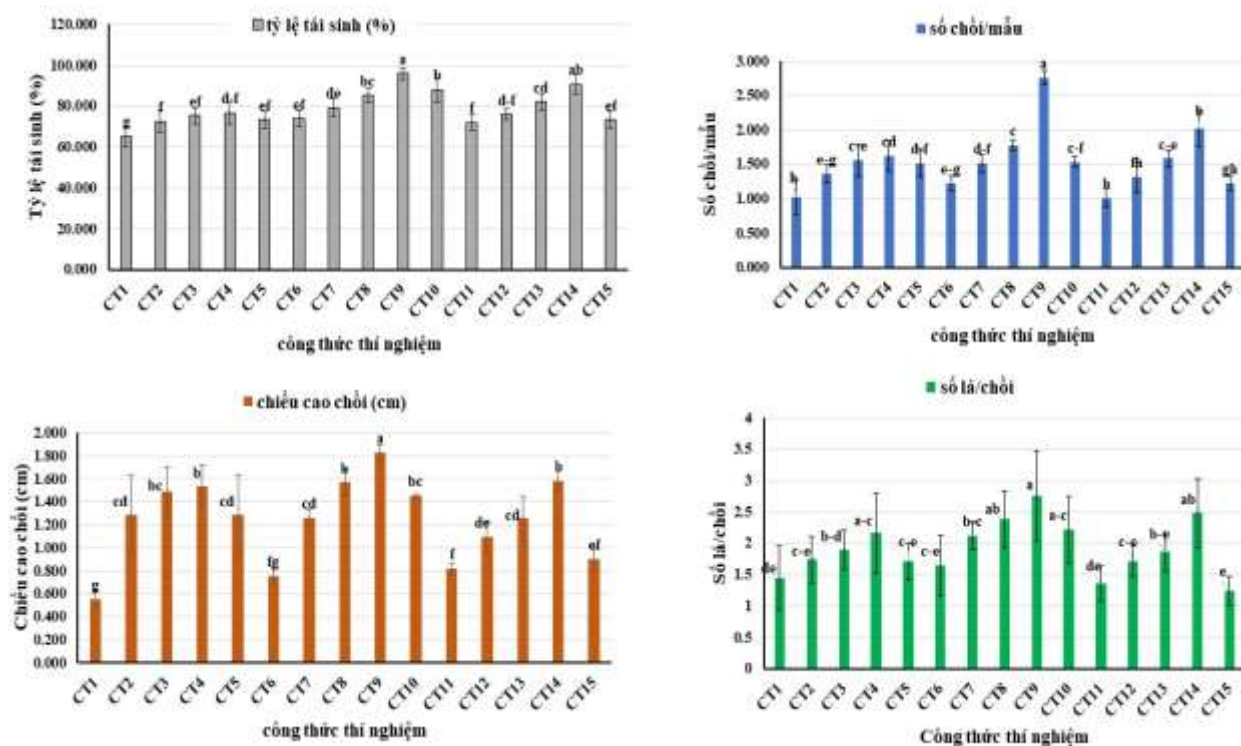
Kết quả nghiên cứu cho thấy tái sinh chồi từ protocorm rất hiệu quả trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA. Ở CT1 không bổ sung kích thích sinh trưởng cho kết quả tái sinh tương đối thấp với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 65,33 %, số chồi là 1,03 chồi/mẫu, chồi cao 0,55 cm và có số lá là 1,44 lá. Kết quả này tốt hơn khi môi trường bổ sung thêm BA và NAA, kết quả tốt nhất được ghi nhận ở CT9 khi bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA với 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, 3.4, bảng 3.1, bảng P12-3.4 phụ lục 12). Bổ sung kích thích sinh trưởng thấp hoặc cao hơn ngưỡng ở CT9 đều cho kết quả không tốt bằng CT9, điều này có thể do tỷ lệ auxin và cytokinin không phù hợp dẫn đến ức chế trong quá trình tái sinh chồi.



**Hình 3.3.** Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của lan Giả hạc tím Huế từ protocorm. (A. Môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng; B. Môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; C. Môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA + 1 mg/L NAA).

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Hải Yến và Nguyễn Thu Hương (2021) trên lan Giả hạc *D. anosmum* cũng cho thấy sự tương đồng, tác giả sử dụng BA và NAA để kích thích quá trình tái sinh chồi, nồng độ tốt nhất của nghiên cứu là 2 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA cho tỷ lệ tái sinh chồi 97,87 %, chồi xanh khỏe [46]. Một nghiên cứu đáng chú ý khác khi nhân giống lan Giả hạc *D. anosmum* ở Hoà Bình của Nguyễn Thị Hải và cộng sự (2022) đã cho kết quả tỷ lệ tái sinh chồi từ protocorm đạt 100 % ở tất cả các thí nghiệm, tuy nhiên chồi ở môi trường có kích thích sinh trưởng thì cao hơn (0,69 cm) so với môi trường không

có kích thích sinh trưởng (0,33 cm) [136]. Kết quả này có sự khác biệt với nghiên cứu của chúng tôi về tỷ lệ tái sinh chồi, nguyên nhân có thể do khác nhau về giống lan, về chất lượng hạt được gieo và thành phần môi trường được sử dụng.



**Hình 3.4.** Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy. ( Các chữ cái giống nhau trong cùng một biểu đồ cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test)

Như vậy, có thể thấy với môi trường dinh dưỡng có bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA là tốt nhất cho khả năng tái sinh chồi từ protocorm của Giả hạc tím Huế.

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

Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế từ đoạn thân có mắt ngủ được thực hiện qua các giai đoạn vào mẫu, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi, ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Mỗi giai đoạn thực hiện với các điều kiện khác nhau để tìm ra điều kiện tối ưu nhất cho lan Giả hạc tím Huế, kết quả được trình bày ở bảng 3.2 và phụ lục 12.

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

| TT | 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 <sub>2</sub> 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.<br>- 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).<br><br>-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.                                                                                                                     |

*a. Vào mẫu từ đoạn thân Giả hạc tím Huế có mắt ngủ*

Kết quả ảnh hưởng của thời gian và chất khử trùng đến hiệu quả vào mẫu của lan Giả hạc tím Huế được trình bày ở bảng 3.2. và bảng P12-3.5 phụ lục 12.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả khử trùng mẫu khi kết hợp giữa NaClO 2% và HgCl<sub>2</sub> 0,1% là tốt hơn so với kết hợp giữa NaClO 2% và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Công thức thí nghiệm xử lý mẫu bằng NaClO 2% và HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 15 phút là cho tỷ lệ nhiễm chỉ 4,67%, tỷ

lệ mẫu sạch thu được đạt 31,33% nhưng mẫu chết chiếm tỷ lệ cao (64,08%). Trong khi đó, công thức có kết quả tốt nhất là khi xử lý mẫu bằng NaClO 2% và HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 10 phút (CT6) thu được mẫu sạch đạt tỷ lệ cao nhất (66,67%) và tỷ lệ mẫu chết chiếm tỷ lệ thấp (22,22%), và tỷ lệ nhiễm của mẫu thấp (11,11%) (Bảng 3.2. và bảng P12-3.5 phụ lục 12). Các công thức thí nghiệm phối hợp khác đều cho tỷ lệ mẫu sạch thấp, dao động từ 0 đến 33,33%, tương ứng với tỷ lệ mẫu nhiễm cao, dao động từ 44,44% đến 100% (Bảng 3.3). Việc tiếp xúc lâu dài với HgCl<sub>2</sub> có thể gây độc hoặc gây thoái hóa mô dẫn đến số lượng mẫu chết tăng lên (CT7, Bảng P12-3.5). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với quan sát của Hashim và cộng sự (2021) khi thực hiện khử trùng trên loài *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau [88].

Phương pháp khử trùng mẫu sử dụng hoá chất (NaOCl, EtOH, Tween 20 và HgCl<sub>2</sub>) với các nồng độ khác nhau đối với cây lan trong nuôi cấy *in-vitro* cũng đã được nhiều tác giả công bố [77], [101]. Nghiên cứu của Dohling và cộng sự (2012) sử dụng phối hợp giữa NaClO 10% trong 10 phút và HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 2 phút đối với loài lan *D. longicornu* Lindl thu được tỷ lệ sống gần 90% [73]. Một nghiên cứu phối hợp khác giữa các chất khử trùng bao gồm EtOH 70% và HgCl<sub>2</sub> 0,1% trên loài lan *D. candidum* Wall ex Lindl cũng thu được tỷ lệ sống khá cao lên đến 97% [97]. Một nghiên cứu mới đây trên lan *D. anosmum* của Vì Thị Xuân Thuỷ và cộng sự (2022), khử trùng đoạn thân bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 9 phút kép, đạt tỷ lệ mẫu sống, sạch cao nhất (47,86%) [40]. Kết quả của nghiên cứu này trên lan *D. anosmum* cơ bản thấp hơn các công bố trước đó, điều này có thể do mẫu thu thập có nguồn gốc tự nhiên thời gian thuần dưỡng chưa lâu nên còn lẫn tạp nhiều loài vi khuẩn và nấm trong đó có các vi sinh vật nội sinh. Mặt khác, có thể do loài lan *D. anosmum* nhạy cảm với các chất khử trùng trong đó có HgCl<sub>2</sub> hơn so với nhiều loài lan khác thuộc chi *Dendrobium* [178].

Như vậy, có thể thấy phương pháp khử trùng tốt nhất cho đoạn thân lan Giả hạc tím Huế là dùng kết hợp 2 chất khử trùng NaClO 2% và HgCl<sub>2</sub> 0,1% xử lý mẫu trong 10 phút.

*b. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến khả năng hình thành mô sẹo từ đoạn thân của lan Giả hạc tím Huế*

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng hình thành mô sẹo được trình bày qua bảng 3.2 và bảng P12-3.6 phụ lục 12 sau 12 tuần nuôi cấy.

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường phù hợp để hình thành mô sẹo từ đoạn thân có chồi ngủ của lan Giả hạc tím Huế là CT1 (MS) và CT4 (Hyp). Cụ thể kết quả tỷ lệ sống của mẫu, tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu và kích thước mô sẹo của CT1 là 66,33 %; 17,67 %; 0,65 cm; ở CT4 là 71,00 %; 14,67 % và 0,67 cm tuy kết quả có sự khác nhau nhưng không sai khác về mặt thống kê. Tuy nhiên, thời gian hình thành mô sẹo của 2 môi trường khác nhau, ở CT1 thời gian này là 69,60 ngày, đối với môi trường CT4 là 75,80 ngày. Trong các môi trường thí nghiệm, môi trường CT3 (VW) cho kết quả kém nhất với thời gian hình thành mô sẹo lên đến 94,50 ngày, tỷ lệ sống của mẫu chỉ đạt 45,67 %, tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu rất thấp đạt 6,33 % và kích thước mô sẹo là 0,29 cm. Hai môi trường còn lại CT2 (1/2 MS) và CT5 (KC) có kết quả không tốt bằng hai môi trường CT1 và CT4.

Một số công bố về nghiên cứu tạo mô sẹo từ cơ quan sinh dưỡng của thực vật như nghiên cứu sự hình thành mô sẹo phát sinh phôi sinh dưỡng và cây con từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống địa lan lai vàng hoàng hậu (*Cymbidium hybrid* “fx750”) của Trần Thị Ngọc Lan và Trần Thị Hoàn Anh (2017), đã cho thấy môi trường MS phù hợp với quá trình tạo protocorm-like bodie (PLB) hoặc mô sẹo, khi môi trường không bổ sung kích thích sinh trưởng thì tỷ lệ hình thành là 40 %, tỷ lệ này tăng lên 46 - 53 % khi môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng NAA và BA [25]. Thực hiện nhân giống *in-vitro* từ mẫu chồi cây lan *D. aurantiacum* của Nyuk Ling Ma và cộng sự (2020) cũng đã sử dụng môi trường dinh dưỡng MS cho quá trình cảm ứng tạo mô sẹo. Mô sẹo đã hình thành được trên môi trường này dù không có hormone sinh trưởng tỷ lệ hình thành rất cao lên đến 100 %, tuy nhiên thời gian hình thành lâu hơn so với các thí nghiệm môi trường có bổ sung kích thích sinh trưởng [118]. Qua kết quả nghiên cứu và phân tích chứng tỏ môi trường MS rất phù hợp cho quá trình cảm ứng tạo mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế.

*c. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng hình thành mô sẹo từ đoạn thân lan Giả hạc tím Huế*

Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng hình thành mô sẹo của mẫu lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.2 và bảng P12-3.7 phụ lục 12.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả của việc bổ sung kích thích sinh trưởng vào môi trường để kích thích tạo mô sẹo. Ở CT1 làm đối chứng không dùng kích thích sinh trưởng thì cho kết quả kém nhất, thời gian hình thành mô sẹo trung bình 69,60 ngày, tỷ lệ sống của mẫu 66,33 %, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo là 17,67 % và kích thước mô sẹo đạt được là 0,65 cm. Kết quả được cải thiện tốt hơn khi môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng, đạt kết quả tốt nhất được ghi nhận ở CT8 khi kết hợp 1,5 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA cụ thể là với 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 (Bảng 3.2 và bảng P12-3.7 phụ lục 12). Khi nồng độ TDZ thấp hơn hoặc cao hơn nồng độ ở CT8 thì cho kết quả không tốt bằng, điều này cũng cho thấy nếu nồng độ kích thích sinh trưởng thấp thì không đủ để kích thích cảm ứng để tạo mô sẹo, ngược lại nếu nồng độ cao thì gây hại hoặc ức chế việc hình thành mô sẹo của mẫu lan Giả hạc tím Huế.

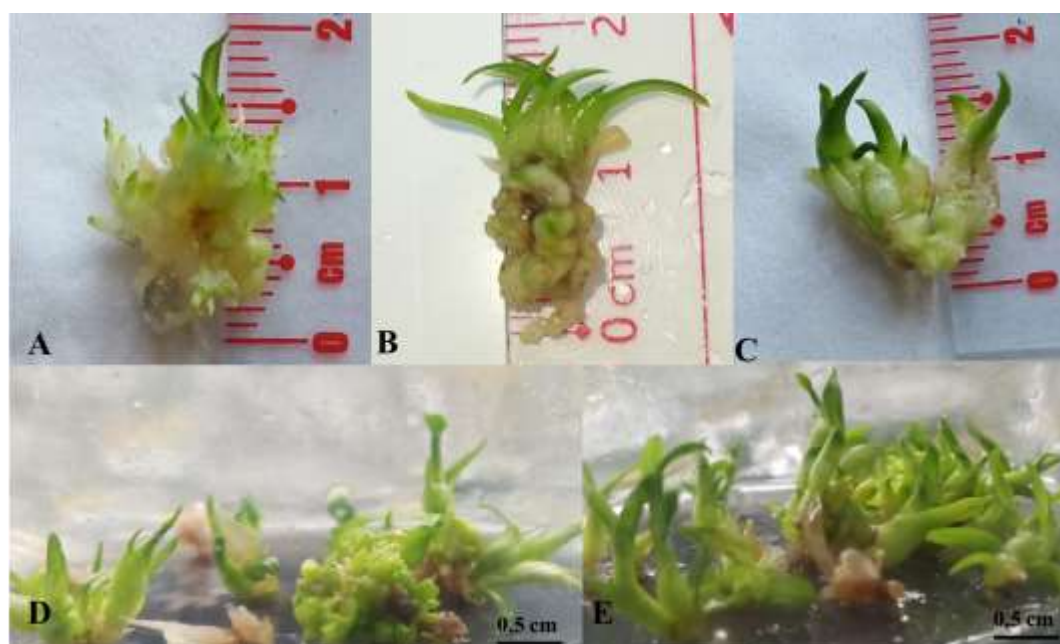
Nhiều nghiên cứu có liên quan đến chất điều hoà sinh trưởng ảnh hưởng đến khả năng hình thành mô sẹo trong nuôi cấy *in-vitro* trên nhiều đối tượng cây trồng trước đây đã được thực hiện, như nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021), nhân giống *in-vitro* cây lan Giả hạc 5 cánh trắng Phú Thọ (*D. anosmum*), đã ghi nhận với môi trường dinh dưỡng MS có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng TDZ và 2,4 D thì cho tỷ lệ tạo mô sẹo rất tốt, kết quả tốt nhất khi sử dụng 0,5 mg/L TDZ và 1,5 mg/L 2,4D thì tỷ lệ tạo mô sẹo từ đoạn thân đạt 56,29 % [104]. Trong nghiên cứu giống *in-vitro* lan kiếm phan trí (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) của Nguyễn Thị Điệp và Huỳnh Thị Kim (2020) đã cho thấy khi bổ sung chất điều hoà sinh trưởng vào môi trường dinh dưỡng MS thì cho kết quả tạo mô sẹo rất tốt, nồng độ cho kết quả tốt nhất để tạo mô sẹo cho lan này là 3 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA với tỷ lệ tạo mô sẹo 64,44 % [9]. Một nghiên cứu khác của Pyati (2023) về tái sinh

*in-vitro* loài lan *D. crepidatum* Lindl. & Paxton thông qua sự phát triển của các thể giống protocorm, đã ghi nhận kết quả tốt nhất ở môi trường dinh dưỡng ½ MS có bổ sung 1 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA cho tỷ lệ hình thành mô sẹo lên đến 83,3 % [146]. Những kết quả này khá tương đồng với kết quả nghiên cứu trong luận án, điều này cho thấy các chất kích thích sinh trưởng BA, NAA và TDZ phù hợp để kích thích quá trình tạo mô sẹo cho lan Giả hạc tím Huế.

Như vậy, với việc sử dụng kết hợp 1,5 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA là phù hợp nhất đối với sự hình thành mô sẹo từ đoạn thân lan Giả hạc tím Huế.

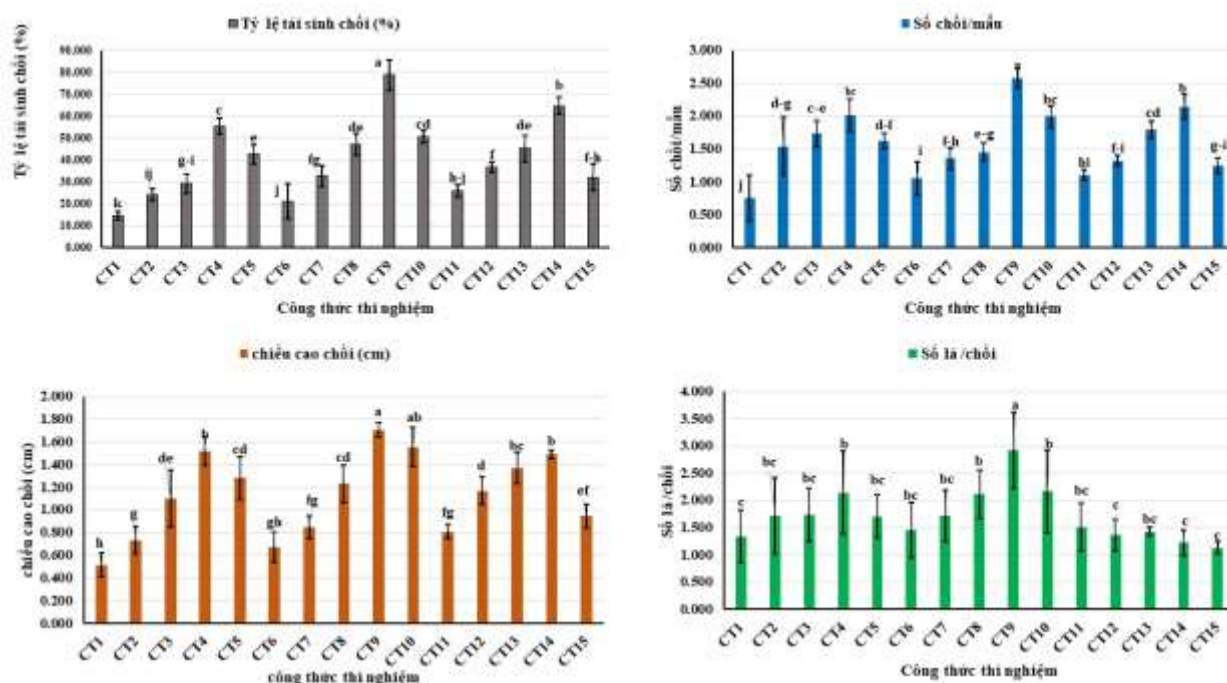
*d. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo*

Chất điều hoà sinh trưởng là nhân tố quan trọng trong giai đoạn tái sinh chồi, BA và NAA là 2 chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng trong thí nghiệm này. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở biểu đồ hình 3.6, hình 3.5 và bảng P12-3.8 phụ lục 12 sau 8 tuần nuôi cấy.



**Hình 3.5.** 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.).

Kết quả thí nghiệm cho thấy với việc bổ sung 1,5 mg/L BA với 0,5 mg/L NAA vào môi trường dinh dưỡng đã đem lại hiệu quả rất tốt khi tái sinh chồi từ mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế, với 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 (CT9), kết quả này cao hơn rất nhiều so với đối chứng không sử dụng kích thích sinh trưởng với tỷ lệ tái sinh chồi là 14,68 %; số lượng chồi đạt 0,76 chồi/mẫu; chiều cao chồi là 0,51 cm và chồi có số lá 1,34 (Hình 3.5, 3.6, bảng P12-3.8 phụ lục 12). Khi nồng độ BA vượt ngưỡng 1,5 mg/L thì hiệu quả tái sinh chồi giảm đi, điều này cho thấy nồng độ BA quá cao sẽ gây ức chế lại quá trình tái sinh mô sẹo. Mặc khác, việc kết hợp với NAA cũng có tác dụng rất lớn, nồng độ NAA sử dụng ở 0,5 mg/L đem lại hiệu quả tốt hơn khi sử dụng ở nồng độ 1 mg/L (Hình 3.5, 3.6, bảng P12-3.8 phụ lục 12).



**Hình 3.6:** 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. (Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test))

Trong một công bố của Silpa và Thomas (2021), tái sinh chồi từ mô sẹo của cây *Gymnostachyum febrifugum* Benth., tác giả sử dụng chất điều hoà sinh trưởng TDZ, BA, và NAA bổ sung vào môi trường dinh dưỡng MS để kích thích tạo chồi từ mô sẹo. Kết quả

tốt nhất ghi nhận với tỷ lệ tái sinh chồi lên đến 94 %, và có số chồi trung bình đạt 44,6 chồi/mẫu khi sử dụng 2 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA [160]. Một nghiên cứu khác của Ashok N. Pyati (2021) về nhân giống *in-vitro* lan *D. jerdonianum* Wight., nghiên cứu đã sử dụng chất điều hoà sinh trưởng TDZ, NAA, và BA để kích thích tạo chồi từ mô sẹo. Kết quả tốt nhất được ghi nhận khi môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,5  $\mu$ m NAA và 4,54  $\mu$ m TDZ, tỷ lệ tạo chồi đạt được 89,1 % [147]. Những kết quả nghiên cứu này có sự khác biệt với kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án, điều này có thể do mô sẹo lan Giả hạc tím Huế nhạy cảm với chất điều hoà sinh trưởng NAA và BA hơn so với các loài khác. Tuy nhiên nghiên cứu của luận án cũng khẳng định PGR có vai trò quan trọng với quá trình tái sinh chồi từ mô sẹo.

Như vậy, với môi trường dinh dưỡng MS bổ sung 1,5 mg/L BA với 0,5 mg/L NAA (CT9) là phù hợp nhất cho tái sinh chồi từ mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế.

**e. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ chồi ngủ**

Kết quả ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.2 và bảng P12-3.9 phụ lục 12.



**Hình 3.7.** Tái sinh chồi *in-vitro* từ đoạn thân Giả hạc tím Huế (Nguyễn Hữu Thọ, 2023)

(A. Tái sinh chồi *in-vitro* từ đoạn thân lan Giả hạc tím Huế sau 2 tuần nuôi cấy; B. Tái sinh chồi *in-vitro* từ đoạn thân lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA.)

Từ kết quả bảng 3.2 và bảng P12-3.9 phụ lục 12 đã cho thấy sự ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh của chồi. Ở công thức đối chứng không sử dụng BA thì kết quả kém nhất cụ thể tỷ lệ tái sinh chồi là 12,67 %; số chồi là 0,67 chồi/mẫu, chiều cao của chồi 0,56 cm, chồi có 1,89 lá trong khi đó công thức thí nghiệm có bổ sung 1,5 mg/L BA vào môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ tái sinh chồi lên đến 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. Khi tăng nồng độ BA trong môi trường lên 2,0 mg/L thì kết quả thí nghiệm giảm xuống đáng kể với tỷ lệ tái sinh chồi 55,56 %, số chồi 1,67 chồi/mẫu, chiều cao trung bình chồi 1,07 cm và có 2,21 lá. Theo thí nghiệm này thì chứng tỏ với nồng độ BA 1,5 mg/L là nồng độ phù hợp cho sự tái sinh chồi của lan Giả hạc tím Huế từ đoạn thân. Sử dụng môi trường MS kết hợp với nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng khác nhau đã được sử dụng trong các nghiên cứu trước để nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và chồi bên của các giống lan. Trong công bố của Song và cộng sự (2013) cũng đưa ra kết luận rằng chồi ngủ đoạn thân của lan *D. officinale* hình thành mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L NAA [164]. Theo công bố của Vì Thị Xuân Thuỷ và cộng sự (2022) thì môi trường MS bổ sung 1,5mg/L là tốt nhất cho khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân lan *D. anosmum* với tỷ lệ tái sinh chồi là 72,58 %, chồi to khỏe, xanh mướt [40].

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy môi trường dinh dưỡng được bổ sung 1,5 mg/L BA là phù hợp cho sự tái sinh chồi từ đoạn thân của lan Giả hạc tím Huế.

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

Tỷ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây; khi lượng cytokinin cao hơn sẽ kích thích sự xuất hiện và phát triển của chồi, BA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi [22]. Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành thử nghiệm kết hợp 2 chất điều hòa sinh trưởng BA và IAA ở các nồng độ khác nhau để đánh giá khả năng nhân nhanh chồi của lan Giả hạc tím Huế. Kết quả thu được sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.3.

Số liệu bảng 3.3 cho thấy, chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo chồi của lan Giả hạc tím Huế, môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cho hệ số nhân chồi (2,33 - 6,00 lần) vượt xa so với đối chứng (chỉ 1,13 lần). Môi trường dinh dưỡng nuôi cấy bổ sung BA và IAA kết quả ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi và chất lượng chồi. Môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung 1,5 mg/L BA cho hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 2,33 lần, chồi nhỏ, màu xanh nhạt. Giữ nguyên nồng độ BA là 1,5 mg/L và bổ sung thêm nồng độ IAA đã làm tăng hệ số nhân chồi, chất lượng chồi cũng tốt hơn. Thử nghiệm nồng độ IAA từ 0,1-0,7 mg/L, kết quả thu được tốt nhất ở nồng độ IAA lên 0,5 mg/L thì hệ số nhân chồi cao nhất đạt 6,00 lần, chồi sinh trưởng tốt, to mập và có màu xanh lá đậm. Tiếp tục tăng nồng độ IAA lên 0,7 mg/L thì nhận thấy hệ số nhân chồi giảm xuống, chất lượng chồi cũng không tốt, chồi nhỏ và yếu. Trong một công bố trước đây đã cho thấy môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L  $\alpha$ -NAA, kết quả được ghi nhận là tốt nhất với hệ số nhân là 8,33 lần, chồi to khỏe, có màu xanh đậm [40].

**Bảng 3.3.** Ảnh hưởng của BA và IAA đến khả năng nhân chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.

| Công thức | 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                    |
|-----------|-------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| CT1       | 0,0               | 0,0                | 1,13 $\pm$ 0,1 <sup>e</sup>  | 1,23 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup> | 0,23 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> | 2,00 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup> | Chồi nhỏ yếu, màu xanh hơi vàng. |
| CT2       | 1,5               | 0,0                | 2,33 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>  | 1,74 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup> | 0,29 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup> | 2,00 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup> | Chồi nhỏ, màu xanh nhạt.         |
| CT3       | 1,5               | 0,1                | 3,33 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>  | 2,10 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup> | 0,36 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup> | 3,67 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup> | Chồi trung bình, màu xanh nhạt.  |
| CT4       | 1,5               | 0,3                | 4,30 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>  | 2,04 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup> | 0,38 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> | 4,32 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup> | Chồi mập, cao, màu xanh đậm.     |
| CT5       | 1,5               | 0,5                | 6,00 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>  | 3,03 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup> | 0,51 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> | 4,70 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup> | Chồi mập, cao, màu xanh đậm.     |
| CT6       | 1,5               | 0,7                | 3,67 $\pm$ 0,3 <sup>bc</sup> | 2,13 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup> | 0,35 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup> | 3,67 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup> | Chồi trung bình, màu xanh nhạt.  |

(Trung bình  $\pm$  sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , Duncan's test)



**Hình 3.8.** Nhân nhanh chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy. (Nguyễn Hữu Thọ, 2023) (A: Môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng; B: Môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L IAA.)

Như vậy, với môi trường dinh dưỡng bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L IAA thích hợp cho nhân nhanh thể chồi lan Giả hạc tím Huế. Trong nhân giống *in-vitro*, nhiều loại cây trồng chỉ phù hợp với các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, nhưng nhiều loại cây trồng khi kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng giữa nhóm cytokinin và auxin làm nâng cao hiệu quả trong nhân giống.

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

Giai đoạn cuối cùng trong nhân giống *in-vitro* là hình thành rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Giai đoạn này đảm bảo chồi ra rễ đồng đều và đạt tỉ lệ sống cao khi đem ra vườn ươm, chồi sử dụng cho thí nghiệm này phải đủ điều kiện là có từ 3-4 lá, và cao 3-4 cm. Vai trò chất điều hoà sinh trưởng mang tính chất quyết định là nhóm auxin, đây là nhóm chất có tác dụng lên tăng phát sinh của mẫu nuôi cấy và đặc biệt trong giai đoạn này có tác dụng hình thành rễ [65]. Chồi lan Giả hạc tím Huế được cấy vào môi trường MS cơ bản có bổ sung thêm 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa, 30 g/L sucrose, 7,0 g/L agar, 0,7 g/L than hoạt tính, và các chất điều hoà sinh trưởng (NAA, IAA) ở các nồng độ khác nhau. Kết quả sau 8 tuần được thể hiện ở bảng 3.4.

Số liệu bảng 3.4 cho thấy khả năng ra rễ của lan Giả hạc tím Huế rất tốt, đạt 100 %. Tuy nhiên, có sự khác nhau rõ rệt về số rễ/cây và chiều dài rễ giữa các công thức thí nghiệm. Trên môi trường bổ sung NAA nồng độ 0,7 mg/L NAA hiệu quả ra rễ tốt nhất (4,60 rễ/cây; dài rễ 3,96 cm/rễ), tiếp đến là môi trường bổ sung IAA ở nồng độ 0,5 mg/L cho hiệu quả tương đối cao (với 4,27 rễ/cây và rễ dài 3,24 cm), khi tăng hay giảm nồng độ quanh ngưỡng 0,7 mg/L NAA hoặc 0,5 mg/L IAA đều cho kết quả kém hơn. Như vậy, sau 8 tuần nuôi cấy, chồi lan Giả hạc tím Huế ra rễ hiệu quả trên môi trường MS bổ sung 0,7 mg/L NAA hoặc 0,5 mg/L IAA; thêm 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 ml/L nước dừa, 30 g/L sucrose, 7,0 g/L agar, 0,7 g/L than hoạt tính.

Nghiên cứu của Đặng Thị Thắm và cộng sự (2018) cho thấy hiệu quả ra rễ trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS có bổ sung 0,5 mg/L NAA phù hợp cho quá trình tái sinh rễ *in-vitro* của *D. heterocarpum* Lindl. Số lượng rễ trung bình trên mỗi chồi là 4,4 và chiều dài trung bình là 3,12 cm. Trong môi trường chứa 0,5 mg/L IAA, số lượng rễ trung bình trên mỗi chồi là 1,8 với chiều dài 1,66 cm [70]. Lê Thị Luận và cộng sự (2020), đã tiến hành nhân giống lan *D. adastra* trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA, là môi trường tối ưu cho sự ra rễ của *D. adastra* với 4,13 rễ trên mỗi chồi và chiều dài 1,42 cm [111]. Như vậy kết quả nghiên cứu đã cho thấy 2 chất điều hoà sinh trưởng NAA, và IAA là phù hợp để kích thích cho chồi lan Giả hạc tím Huế ra rễ, và nó cũng có thể được ứng dụng trên các loài lan khác. Với môi trường dinh dưỡng được bổ sung 0,7 mg/L NAA là phù hợp nhất để kích thích chồi lan ra rễ.

**Bảng 3.4.** Ảnh hưởng của IAA và NAA đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Chất điều hoà sinh trưởng (mg/L) |     | Tỷ lệ chồi ra rễ (%) | Số rễ/chồi          | Chiều dài rễ (cm)   | Đặc điểm hình thái rễ, chồi |
|-----------|----------------------------------|-----|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|
|           | IAA                              | NAA |                      |                     |                     |                             |
| CT1       | 0,0                              | 0,0 | 100                  | $1,60 \pm 0,2^e$    | $1,19 \pm 0,1^f$    | +                           |
| CT2       | 0,1                              | 0,0 | 100                  | $2,67 \pm 0,3^d$    | $1,49 \pm 0,3^{ef}$ | +                           |
| CT3       | 0,3                              | 0,0 | 100                  | $3,20 \pm 0,4^{cd}$ | $1,83 \pm 0,3^{de}$ | ++                          |
| CT4       | 0,5                              | 0,0 | 100                  | $4,27 \pm 0,3^{ab}$ | $3,24 \pm 0,2^b$    | +++                         |
| CT5       | 0,7                              | 0,0 | 100                  | $3,67 \pm 0,4^{bc}$ | $2,62 \pm 0,1^c$    | +++                         |

|      |     |     |     |                     |                     |     |
|------|-----|-----|-----|---------------------|---------------------|-----|
| CT6  | 1,0 | 0,0 | 100 | $3,33 \pm 0,4^{cd}$ | $1,90 \pm 0,2^{de}$ | ++  |
| CT7  | 0,0 | 0,1 | 100 | $2,53 \pm 0,3^d$    | $1,70 \pm 0,2^{de}$ | ++  |
| CT8  | 0,0 | 0,3 | 100 | $2,87 \pm 0,2^{cd}$ | $2,40 \pm 0,2^c$    | ++  |
| CT9  | 0,0 | 0,5 | 100 | $3,33 \pm 0,2^{cd}$ | $3,39 \pm 0,2^b$    | +++ |
| CT10 | 0,0 | 0,7 | 100 | $4,60 \pm 0,4^a$    | $3,96 \pm 0,2^a$    | +++ |
| CT11 | 0,0 | 1,0 | 100 | $3,13 \pm 0,3^{cd}$ | $2,17 \pm 0,2^{cd}$ | ++  |

(+): Rễ ngắn, ít rễ, yếu, cây thấp; (++) : Rễ mập, khoẻ, cây cao xanh; (+++) : Rễ mập, dài, nhiều rễ, khoẻ, cây to, xanh tốt. (Trung bình  $\pm$  sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test)



**Hình 3.9.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy (Nguyễn Hữu Thọ, 2023). A. Đối chứng; B. dùng 0,5 mg/L IAA; C. dùng 0,7mg/L NAA;

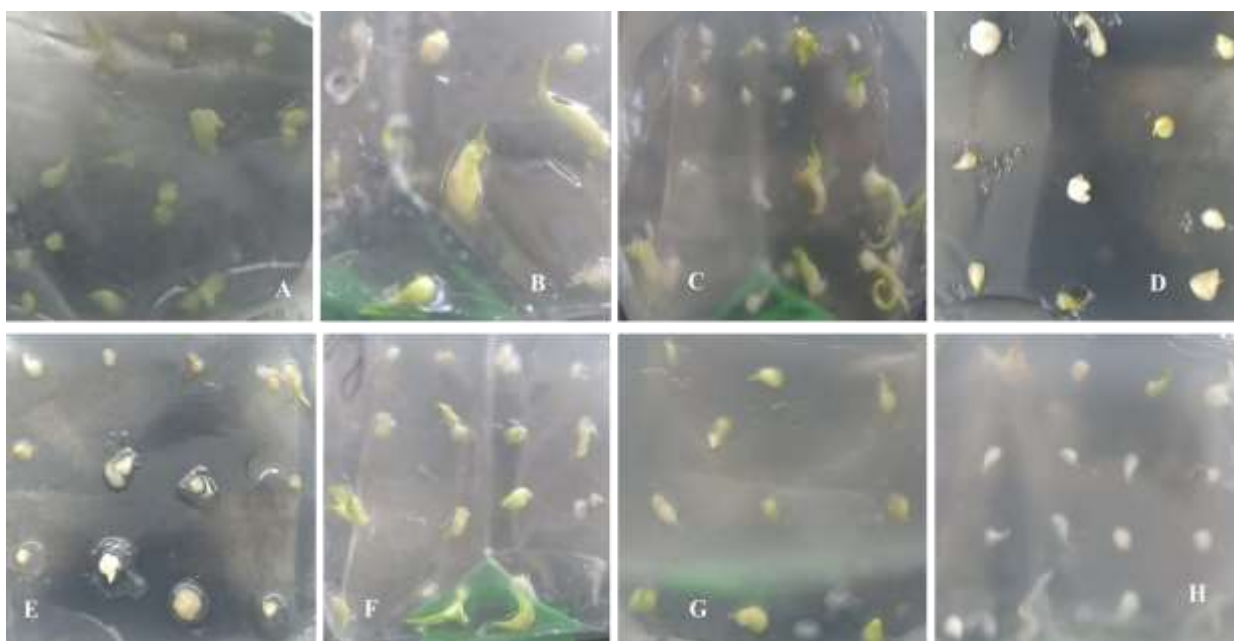
### 3.2 Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

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

Các chỉ tiêu theo dõi được ghi lại tại 2 thời điểm là 4 tuần và 8 tuần sau khi xử lý hoá chất. Chỉ tiêu đánh giá mức độ hiệu quả của hoá chất là tỷ lệ sống của mẫu xử lý, tỷ lệ mẫu có phát triển hình thành mầm chồi và kích thước của mẫu còn sống. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.5, bảng 3.6, bảng 3.7, và bảng 3.8.

### 3.2.1.1 Gây đột biến trên protocorm lan Giả hạc tím Huế

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.5 và bảng 3.6. Sau thời gian 4 tuần nuôi cấy các thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của protocorm giảm dần khi nồng độ hoá chất và thời gian xử lý tăng lên. Những công thức thí nghiệm được xử lý colchicine và DMS ở nồng độ 800 ppm, thời gian xử lý 6, 8 và 10 giờ (CT15, CT20, CT25) protocorm bị chết 100%, chỉ riêng CT15 xử lý DMS vẫn còn 3,33% protocorm còn sống sót nhưng chưa có sự xuất hiện của mầm chồi, điều này cho thấy với nồng độ hoá chất 800 ppm xử lý trong 6-10 giờ là quá cao đối với protocorm. Với nồng độ hoá chất 800 ppm xử lý protocorm trong 2-4 giờ tỷ lệ sống thấp 3,33-11,11 % (CT5, CT10), những mẫu sống này chưa có mầm chồi hoặc có nhưng thấp (1,11 %). Những công thức còn lại đều có protocorm phát triển và có mầm chồi (Bảng 3.5; 3.6).



**Hình 3.10.** Hình thái protocorm sau khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 4 tuần. (A. Đối chứng không xử lý hoá chất; B. Xử lý bằng colchicine 50 ppm trong 2 giờ; C. Xử lý bằng colchicine 200 ppm trong 4 giờ;; D. Xử lý bằng colchicine 400 ppm trong 10 giờ; E. Xử lý bằng colchicine 800 ppm trong 6 giờ. F. Xử lý bằng DMS 50 ppm trong 2 giờ; G. Xử lý bằng DMS 100 ppm trong 2 giờ; H. Xử lý bằng DMS 800 ppm trong 4 giờ.)

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 cho kết quả đối với colchicine là 75,56 %, DMS là 87,22 %, bên cạnh đó số lượng mẫu có xuất hiện mầm chồi cũng đạt tỷ lệ cao nhất trong các thí nghiệm xử lý hoá chất, đạt 22,22 % khi xử lý colchicine và 43,89 % khi xử lý DMS. Kết quả này cho thấy với công thức CT1, mức độ tác động lên protocorm chưa cao. Khi nồng độ hoá chất xử lý tăng lên 200 ppm thấy có sự biến động lớn, tỷ lệ sống của mẫu chỉ đạt 57,78 % khi xử lý colchicine trong 2 giờ, tương tự khi xử lý bằng DMS là 51,11 %, tỷ lệ này còn giảm đi nhiều khi tăng thời gian xử lý lên 4, 6, 8, và 10 giờ. Tỷ lệ sống giảm đi nhỏ hơn 50% khi nồng độ xử lý lớn hơn 400 ppm ở tất cả các khoảng thời gian xử lý và ở cả 2 loại hoá chất (Bảng 3.5; 3.6).

Thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất, kết quả quan sát có sự khác biệt so với thời điểm 4 tuần. Tỷ lệ sống của mẫu giảm xuống, nhưng tỷ lệ protocorm có mầm chồi lại tăng lên, đặc biệt là có một số mẫu xuất hiện hình thái khác thường so với đối chứng. Hình thái của mẫu khác với đối chứng xuất hiện ngay công thức thí nghiệm CT1 ở cả hai loại hoá chất colchicine là 16,22 % và DMS là 7,83 % (CT1, Bảng 3.5; 3.6) .

Thí nghiệm CT10 xử lý colchicine và CT19, CT23 xử lý DMS có tỷ lệ mẫu sống 2,22 % nhưng mẫu không có mầm chồi, mẫu có màu xanh nhạt hơi vàng, tăng trưởng kém chứng tỏ nồng độ và thời gian xử lý ở 3 công thức thí nghiệm này không phù hợp. Xử lý colchicine ở các công thức CT5, CT9, CT13, CT14, CT18, CT19, CT23, CT24 có mẫu sống và có phát triển chồi đều biểu hiện hình thái khác biệt so với đối chứng, tỷ lệ phát sinh từ 1,11–13,33%, khác biệt chủ yếu là hình dạng protocorm, hình dạng lá và đặc điểm phát sinh chồi. Kết quả này giống với các công thức thí nghiệm CT4, CT5, CT9, CT13, CT14, CT15, CT22, CT24 khi xử lý bằng DMS, tuy nhiên tỷ lệ phát sinh chồi và có biến dị thấp hơn chỉ từ 1,11–5,56 % (Bảng 3.5; 3.6).



**Hình 3.11.** Hình thái protocorm xử lý bằng colchicine hoặc DMS được nuôi cấy sau 8 tuần. *A. Đối chứng không xử lý hoá chất; B. Xử lý bằng colchicine 50 ppm trong 10 giờ; C. Xử lý bằng colchicine 200 ppm trong 6 giờ; D. Xử lý bằng colchicine 400 ppm trong 2 giờ; E. Xử lý bằng colchicine 400 ppm trong 8 giờ. F. Xử lý bằng DMS 100 ppm trong 6 giờ; G. Xử lý bằng DMS 200 ppm trong 6 giờ; H. Xử lý bằng DMS 400 ppm trong 4 giờ.*

Công thức có số mẫu biểu hiện hình thái nhiều nhất ở xử lý hoá chất colchicine là CT7 (C.100 ppm - 4 giờ) kết quả cho được 35,56 % số mẫu có những thay đổi về kiểu hình và tỷ lệ mẫu sống, có mầm chồi đạt 46,64 % và có kích thước mẫu 0,62 cm, có thể thấy đây là một công thức rất có tiềm năng để tạo ra những dòng đột biến (Bảng 3.5). Tỷ lệ tạo ra những thay đổi hình thái ở thí nghiệm xử lý bằng DMS thì thấp hơn, đạt kết quả cao nhất là 14,12 % ở CT6 (D.50 ppm - 4 giờ) xử lý bằng DMS; ngoài ra các công thức CT2, CT16 cũng có tỷ lệ hình thái biến dị cao là 13,37 % và 13,34 %. Những công thức thí nghiệm xử lý bằng DMS khác cho tỷ lệ hình thái biến dị dao động trong khoảng 1,11 – 11,36 %; còn thí nghiệm xử lý bằng colchicine là 11,11-31,67 % (Bảng 3.6).

**Bảng 3.5.** Kết quả xử lý mẫu protocorm bằng colchicine sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Nồng độ xử lý (ppm) | Thời gian xử lý (giờ) | Chỉ tiêu theo dõi mẫu protocorm xử lý bằng colchicine |                                         |                           |                           |                                         |                                           |                           |
|-----------|---------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------|
|           |                     |                       | 4 tuần                                                |                                         |                           | 8 tuần                    |                                         |                                           |                           |
|           |                     |                       | Tỷ lệ protocorm sống (%)                              | Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%) | Kích thước protocorm (cm) | Tỷ lệ protocorm sống (%)  | Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%) | Tỷ lệ protocorm có thành thái biến dị (%) | Kích thước protocorm (cm) |
| ĐC        | 0                   |                       | 95,56±2,22 <sup>a</sup>                               | 80,00±3,33 <sup>a</sup>                 | 0,26±0,00 <sup>fg</sup>   | 86,68±3,33 <sup>a</sup>   | 70,00±1,92 <sup>a</sup>                 | 0,00±0,00 <sup>j</sup>                    | 0,45±0,01 <sup>bc</sup>   |
| CT1       | 50                  | 2                     | 75,56±5,88 <sup>b</sup>                               | 22,22±2,94 <sup>b</sup>                 | 0,38±0,02 <sup>a-e</sup>  | 65,56±4,84 <sup>b</sup>   | 52,22±1,11 <sup>bc</sup>                | 16,22±2,26 <sup>d-g</sup>                 | 0,61±0,06 <sup>ab</sup>   |
| CT2       | 100                 | 2                     | 70,00±6,94 <sup>b</sup>                               | 13,33±1,92 <sup>cd</sup>                | 0,39±0,03 <sup>a-d</sup>  | 60,00±5,77 <sup>bc</sup>  | 43,33±3,85 <sup>cd</sup>                | 18,89±2,22 <sup>c-f</sup>                 | 0,61±0,03 <sup>ab</sup>   |
| CT3       | 200                 | 2                     | 57,78±4,84 <sup>c-e</sup>                             | 5,56±2,22 <sup>ef</sup>                 | 0,37±0,03 <sup>a-e</sup>  | 55,56±4,01 <sup>bc</sup>  | 44,44±4,84 <sup>cd</sup>                | 27,44±3,23 <sup>a-c</sup>                 | 0,65±0,05 <sup>ab</sup>   |
| CT4       | 400                 | 2                     | 40,00±5,77 <sup>gh</sup>                              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                  | 0,29±0,04 <sup>d-g</sup>  | 28,89±6,19 <sup>ef</sup>  | 22,22±6,76 <sup>g-i</sup>               | 18,56±5,57 <sup>c-f</sup>                 | 0,68±0,04 <sup>a</sup>    |
| CT5       | 800                 | 2                     | 11,11±2,93 <sup>l-o</sup>                             | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                  | 0,39±0,04 <sup>a-d</sup>  | 5,56±1,11 <sup>k-n</sup>  | 1,11±1,11 <sup>mn</sup>                 | 1,11±1,11 <sup>i</sup>                    | 0,63±0,04 <sup>ab</sup>   |
| CT6       | 50                  | 4                     | 67,78±4,01 <sup>bc</sup>                              | 20,00±1,92 <sup>c</sup>                 | 0,35±0,01 <sup>a-f</sup>  | 64,44±4,01 <sup>bc</sup>  | 55,56±4,01 <sup>b</sup>                 | 31,67±4,19 <sup>ab</sup>                  | 0,60±0,04 <sup>ab</sup>   |
| CT7       | 100                 | 4                     | 58,89±4,84 <sup>cd</sup>                              | 11,11±1,11 <sup>de</sup>                | 0,31±0,02 <sup>c-g</sup>  | 54,44±4,01 <sup>c</sup>   | 46,64±5,09 <sup>bc</sup>                | 35,56±4,84 <sup>a</sup>                   | 0,62±0,04 <sup>ab</sup>   |
| CT8       | 200                 | 4                     | 44,44±4,84 <sup>fg</sup>                              | 11,11±4,84 <sup>de</sup>                | 0,43±0,01 <sup>a</sup>    | 37,78±4,44 <sup>de</sup>  | 30,00±6,67 <sup>e-g</sup>               | 23,38±6,64 <sup>b-e</sup>                 | 0,65±0,05 <sup>ab</sup>   |
| CT9       | 400                 | 4                     | 14,44±2,94 <sup>k-n</sup>                             | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>                 | 0,28±0,01 <sup>e-g</sup>  | 8,89±1,11 <sup>i-n</sup>  | 3,33±1,92 <sup>mn</sup>                 | 3,33±1,92 <sup>hi</sup>                   | 0,63±0,03 <sup>ab</sup>   |
| CT10      | 800                 | 4                     | 4,44±1,11 <sup>no</sup>                               | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>                 | 0,30±0,04 <sup>c-g</sup>  | 2,22±1,11 <sup>n</sup>    | 0,00±0,00 <sup>n</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>j</sup>                    | 0,47±0,12 <sup>bc</sup>   |
| CT11      | 50                  | 6                     | 52,22±2,22 <sup>d-f</sup>                             | 18,89±2,94 <sup>bc</sup>                | 0,33±0,01 <sup>a-g</sup>  | 43,33±3,85 <sup>d</sup>   | 34,44±4,01 <sup>d-f</sup>               | 26,67±5,09 <sup>a-d</sup>                 | 0,59±0,02 <sup>ab</sup>   |
| CT12      | 100                 | 6                     | 44,44±4,84 <sup>fg</sup>                              | 12,22±1,11 <sup>d</sup>                 | 0,38±0,01 <sup>a-e</sup>  | 34,44±6,19 <sup>d-f</sup> | 25,56±7,29 <sup>e-h</sup>               | 21,11±8,01 <sup>b-f</sup>                 | 0,50±0,03 <sup>a-c</sup>  |
| CT13      | 200                 | 6                     | 22,22±6,19 <sup>i-l</sup>                             | 10,00±3,33 <sup>de</sup>                | 0,40±0,02 <sup>a-c</sup>  | 15,56±4,84 <sup>hi</sup>  | 7,78±4,01 <sup>k-n</sup>                | 7,78±4,01 <sup>g-i</sup>                  | 0,56±0,01 <sup>ab</sup>   |
| CT14      | 400                 | 6                     | 8,89±1,11 <sup>m-o</sup>                              | 2,22±1,11 <sup>f</sup>                  | 0,32±0,01 <sup>b-g</sup>  | 7,78±1,11 <sup>i-n</sup>  | 5,56±1,11 <sup>l-n</sup>                | 5,56±1,11 <sup>g-i</sup>                  | 0,62±0,04 <sup>ab</sup>   |
| CT15      | 800                 | 6                     | 0,00±0,00 <sup>o</sup>                                | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>h</sup>    | 0,00±0,00 <sup>n</sup>    | 0,00±0,00 <sup>n</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>j</sup>                    | 0,00±0,00 <sup>c</sup>    |
| CT16      | 50                  | 8                     | 47,78±1,11 <sup>e-g</sup>                             | 18,89±1,11 <sup>bc</sup>                | 0,32±0,01 <sup>b-g</sup>  | 43,33±3,85 <sup>d</sup>   | 35,56±4,01 <sup>de</sup>                | 30,16±3,89 <sup>ab</sup>                  | 0,58±0,01 <sup>ab</sup>   |
| CT17      | 100                 | 8                     | 30,00±3,33 <sup>hi</sup>                              | 13,33±1,92 <sup>cd</sup>                | 0,29±0,00 <sup>d-g</sup>  | 25,56±2,22 <sup>fg</sup>  | 24,44±2,94 <sup>f-h</sup>               | 18,89±2,22 <sup>c-f</sup>                 | 0,58±0,01 <sup>ab</sup>   |
| CT18      | 200                 | 8                     | 20,00±1,92 <sup>i-m</sup>                             | 11,11±2,94 <sup>de</sup>                | 0,30±0,01 <sup>c-g</sup>  | 14,44±1,11 <sup>i-l</sup> | 13,33±1,92 <sup>i-l</sup>               | 13,33±1,92 <sup>e-h</sup>                 | 0,59±0,03 <sup>ab</sup>   |
| CT19      | 400                 | 8                     | 5,56±1,11 <sup>no</sup>                               | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>                 | 0,36±0,01 <sup>a-e</sup>  | 4,44±1,11 <sup>l-n</sup>  | 4,44±1,11 <sup>l-n</sup>                | 4,44±1,11 <sup>hi</sup>                   | 0,62±0,03 <sup>ab</sup>   |
| CT20      | 800                 | 8                     | 0,00±0,00 <sup>o</sup>                                | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                  | 0,00±0,01 <sup>h</sup>    | 0,00±0,00 <sup>n</sup>    | 0,00±0,00 <sup>n</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>j</sup>                    | 0,00±0,00 <sup>d</sup>    |
| CT21      | 50                  | 10                    | 23,33±3,85 <sup>ik</sup>                              | 10,00±1,92 <sup>de</sup>                | 0,42±0,00 <sup>a</sup>    | 17,78±2,94 <sup>gh</sup>  | 16,67±1,92 <sup>h-k</sup>               | 12,22±2,22 <sup>f-h</sup>                 | 0,62±0,02 <sup>ab</sup>   |
| CT22      | 100                 | 10                    | 14,44±1,11 <sup>k-n</sup>                             | 5,56±1,11 <sup>ef</sup>                 | 0,36±0,02 <sup>a-e</sup>  | 13,33±1,23 <sup>i-m</sup> | 12,22±1,11 <sup>i-m</sup>               | 11,11±2,22 <sup>f-i</sup>                 | 0,63±0,03 <sup>ab</sup>   |
| CT23      | 200                 | 10                    | 3,33±1,92 <sup>no</sup>                               | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>                 | 0,30±0,08 <sup>c-g</sup>  | 3,33±1,92 <sup>mn</sup>   | 3,33±1,92 <sup>mn</sup>                 | 3,33±1,92 <sup>hi</sup>                   | 0,50±0,17 <sup>a-c</sup>  |
| CT24      | 400                 | 10                    | 1,11±1,11 <sup>no</sup>                               | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                  | 0,24±0,09 <sup>gh</sup>   | 1,11±1,11 <sup>n</sup>    | 1,11±1,11 <sup>mn</sup>                 | 1,11±1,11 <sup>i</sup>                    | 0,32±0,17 <sup>cd</sup>   |
| CT25      | 800                 | 10                    | 0,00±0,00 <sup>o</sup>                                | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>h</sup>    | 0,00±0,00 <sup>n</sup>    | 0,00±0,00 <sup>n</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>j</sup>                    | 0,00±0,00 <sup>d</sup>    |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test)

**Bảng 3.6.** Kết quả xử lý mẫu protocorm bằng Dimethyl sulphate (DMS) sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Nồng độ xử lý (ppm) | Thời gian xử lý (giờ) | Chỉ tiêu theo dõi mẫu protocorm xử lý bằng <i>Dimethyl sulphate</i> (DMS) |                                         |                           |                          |                                         |                                          |                           |
|-----------|---------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|
|           |                     |                       | 4 tuần                                                                    |                                         |                           | 8 tuần                   |                                         |                                          |                           |
|           |                     |                       | Tỷ lệ protocorm sống (%)                                                  | Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%) | Kích thước protocorm (cm) | Tỷ lệ protocorm sống (%) | Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%) | Tỷ lệ protocorm có hình thái biến dị (%) | Kích thước protocorm (cm) |
| ĐC        | 0                   | 0                     | 97,78±2,22 <sup>a</sup>                                                   | 70,00±1,92 <sup>a</sup>                 | 0,25±0,01 <sup>a-c</sup>  | 91,11±4,84 <sup>a</sup>  | 84,44±2,94 <sup>a</sup>                 | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                   | 0,57±0,1 <sup>a</sup>     |
| CT1       | 50                  | 2                     | 87,22±5,30 <sup>b</sup>                                                   | 43,89±1,47 <sup>b</sup>                 | 0,26±0,02 <sup>ab</sup>   | 71,22±2,86 <sup>b</sup>  | 48,56±1,83 <sup>b</sup>                 | 7,83±0,92 <sup>b-d</sup>                 | 0,46±0,01 <sup>ab</sup>   |
| CT2       | 100                 | 2                     | 65,56±4,84 <sup>c</sup>                                                   | 12,22±2,22 <sup>e</sup>                 | 0,25±0,01 <sup>a-c</sup>  | 51,11±2,93 <sup>d</sup>  | 21,11±1,11 <sup>de</sup>                | 13,37±2,23 <sup>a</sup>                  | 0,42±0,02 <sup>b-d</sup>  |
| CT3       | 200                 | 2                     | 51,11±1,11 <sup>d</sup>                                                   | 8,89±1,11 <sup>ef</sup>                 | 0,22±0,01 <sup>a-d</sup>  | 40,00±1,92 <sup>e</sup>  | 17,78±1,11 <sup>ef</sup>                | 11,36±1,94 <sup>ab</sup>                 | 0,37±0,01 <sup>b-f</sup>  |
| CT4       | 400                 | 2                     | 17,78±1,11 <sup>f</sup>                                                   | 4,44±1,11 <sup>gh</sup>                 | 0,22±0,00 <sup>a-d</sup>  | 15,56±1,11 <sup>gh</sup> | 5,56±1,11 <sup>g-i</sup>                | 5,56±1,11 <sup>d-g</sup>                 | 0,39±0,01 <sup>b-f</sup>  |
| CT5       | 800                 | 2                     | 8,89±1,11 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,20±0,01 <sup>b-e</sup>  | 6,67±0,06 <sup>ij</sup>  | 2,22±1,11 <sup>h-j</sup>                | 2,22±1,11 <sup>f-h</sup>                 | 0,39±0,02 <sup>b-e</sup>  |
| CT6       | 50                  | 4                     | 80,56±5,30 <sup>b</sup>                                                   | 34,67±1,47 <sup>c</sup>                 | 0,27±0,02 <sup>a</sup>    | 63,56±3,66 <sup>c</sup>  | 44,56±1,93 <sup>b</sup>                 | 14,12±1,99 <sup>a</sup>                  | 0,38±0,01 <sup>b-f</sup>  |
| CT7       | 100                 | 4                     | 40,00±3,33 <sup>e</sup>                                                   | 5,56±1,11 <sup>fg</sup>                 | 0,26±0,00 <sup>ab</sup>   | 33,33±1,92 <sup>f</sup>  | 15,56±2,94 <sup>f</sup>                 | 10,38±2,26 <sup>a-c</sup>                | 0,37±0,03 <sup>b-f</sup>  |
| CT8       | 200                 | 4                     | 18,89±2,94 <sup>f</sup>                                                   | 4,44±1,11 <sup>gh</sup>                 | 0,20±0,00 <sup>b-e</sup>  | 12,22±2,22 <sup>hi</sup> | 6,67±1,92 <sup>gh</sup>                 | 4,33±0,55 <sup>d-h</sup>                 | 0,38±0,01 <sup>b-f</sup>  |
| CT9       | 400                 | 4                     | 5,56±1,11 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,18±0,01 <sup>c-e</sup>  | 3,33±1,92 <sup>g</sup>   | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>                 | 1,11±1,11 <sup>gh</sup>                  | 0,34±0,07 <sup>b-f</sup>  |
| CT10      | 800                 | 4                     | 3,33±1,92 <sup>g</sup>                                                    | 1,11±1,11 <sup>gh</sup>                 | 0,19±0,02 <sup>c-e</sup>  | 2,22±1,11 <sup>g</sup>   | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>                 | 1,11±1,11 <sup>gh</sup>                  | 0,29±0,07 <sup>d-f</sup>  |
| CT11      | 50                  | 6                     | 65,44±2,92 <sup>c</sup>                                                   | 22,37±3,92 <sup>d</sup>                 | 0,26±0,02 <sup>ab</sup>   | 57,78±4,84 <sup>c</sup>  | 31,70±2,17 <sup>c</sup>                 | 10,69±1,75 <sup>a-c</sup>                | 0,36±0,04 <sup>b-f</sup>  |
| CT12      | 100                 | 6                     | 18,89±2,94 <sup>f</sup>                                                   | 4,44±1,11 <sup>gh</sup>                 | 0,25±0,01 <sup>a-c</sup>  | 15,56±1,11 <sup>gh</sup> | 8,89±1,11 <sup>g</sup>                  | 6,80±1,93 <sup>c-e</sup>                 | 0,35±0,01 <sup>b-f</sup>  |
| CT13      | 200                 | 6                     | 7,78±2,22 <sup>g</sup>                                                    | 1,11±1,01 <sup>gh</sup>                 | 0,19±0,01 <sup>c-e</sup>  | 5,56±2,94 <sup>ij</sup>  | 3,33±1,92 <sup>h-j</sup>                | 3,33±1,92 <sup>e-h</sup>                 | 0,31±0,07 <sup>c-f</sup>  |
| CT14      | 400                 | 6                     | 4,44±1,11 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,21±0,02 <sup>a-e</sup>  | 3,33±1,92 <sup>j</sup>   | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>                 | 1,11±1,11 <sup>gh</sup>                  | 0,29±0,06 <sup>d-f</sup>  |
| CT15      | 800                 | 6                     | 3,33±1,92 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,25±0,06 <sup>a-c</sup>  | 3,33±1,92 <sup>j</sup>   | 2,22±1,11 <sup>h-j</sup>                | 2,22±1,11 <sup>f-h</sup>                 | 0,32±0,09 <sup>b-f</sup>  |
| CT16      | 50                  | 8                     | 54,78±5,83 <sup>d</sup>                                                   | 18,48±0,90 <sup>d</sup>                 | 0,26±0,02 <sup>ab</sup>   | 48,78±2,44 <sup>d</sup>  | 23,78±2,34 <sup>d</sup>                 | 13,34±2,24 <sup>a</sup>                  | 0,45±0,03 <sup>a-c</sup>  |
| CT17      | 100                 | 8                     | 17,78±1,11 <sup>f</sup>                                                   | 3,33±0,87 <sup>gh</sup>                 | 0,26±0,01 <sup>ab</sup>   | 14,44±1,11 <sup>gh</sup> | 8,89±1,11 <sup>g</sup>                  | 6,56±0,88 <sup>c-f</sup>                 | 0,40±0,02 <sup>b-d</sup>  |
| CT18      | 200                 | 8                     | 4,44±1,11 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,26±0,01 <sup>ab</sup>   | 3,33±0,00 <sup>j</sup>   | 2,22±1,11 <sup>h-j</sup>                | 1,11±1,11 <sup>gh</sup>                  | 0,35±0,00 <sup>b-f</sup>  |
| CT19      | 400                 | 8                     | 2,22±1,11 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,22±0,04 <sup>a-d</sup>  | 2,22±1,11 <sup>j</sup>   | 0,00±0,00 <sup>k</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                   | 0,25±0,05 <sup>fg</sup>   |
| CT20      | 800                 | 8                     | 0,00±0,00 <sup>h</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>f</sup>    | 0,00±0,00 <sup>k</sup>   | 0,00±0,00 <sup>k</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                   | 0,00±0,00 <sup>h</sup>    |
| CT21      | 50                  | 10                    | 25,34±5,09 <sup>f</sup>                                                   | 12,78±1,47 <sup>e</sup>                 | 0,26±0,02 <sup>ab</sup>   | 21,56±2,89 <sup>g</sup>  | 15,28±1,63 <sup>f</sup>                 | 10,83±1,81 <sup>a-c</sup>                | 0,38±0,04 <sup>b-f</sup>  |
| CT22      | 100                 | 10                    | 7,78±1,11 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,26±0,02 <sup>ab</sup>   | 6,67±1,92 <sup>ij</sup>  | 3,33±0,00 <sup>h-j</sup>                | 3,33±0,00 <sup>e-h</sup>                 | 0,37±0,03 <sup>b-f</sup>  |
| CT23      | 200                 | 10                    | 3,33±1,92 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,21±0,03 <sup>a-e</sup>  | 2,22±2,22 <sup>j</sup>   | 0,00±0,00 <sup>k</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                   | 0,26±0,06 <sup>e-g</sup>  |
| CT24      | 400                 | 10                    | 5,56±1,11 <sup>g</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,23±0,01 <sup>a-d</sup>  | 3,33±1,92 <sup>j</sup>   | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>                 | 1,11±1,11 <sup>gh</sup>                  | 0,32±0,06 <sup>b-f</sup>  |
| CT25      | 800                 | 10                    | 0,00±0,00 <sup>h</sup>                                                    | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>f</sup>    | 0,00±0,00 <sup>k</sup>   | 0,00±0,00 <sup>k</sup>                  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>                   | 0,00±0,00 <sup>h</sup>    |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , Duncan's test)

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

Mô sẹo được tách nhỏ thành những khối nhỏ có kích thước tương đồng nhau (0,2-0,3 cm) sau đó xử lý colchicine và DMS. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.7 và bảng 3.8.

Kết quả 4 tuần nuôi cấy sau khi mô sẹo được xử lý colchicine cho thấy tỷ lệ sống của mô sẹo đạt cao nhất 57,78 % (CT1) so với đối chứng là 96,67 % điều này chứng tỏ mô sẹo chịu ảnh hưởng rất lớn bởi colchicine. Tỷ lệ sống của mô sẹo luôn thấp hơn 50 % khi xử lý bằng colchicine với nồng độ 200 ppm trở lên ở bất kỳ thời gian xử lý nào, tỷ lệ này thấp nhất ở các công thức CT15, CT20, CT25 với 0 % mẫu còn sống. Các thí nghiệm có mô sẹo xuất hiện mầm chồi rất thấp chỉ từ 1,11 – 22,22 % so với đối chứng thì tỷ lệ này là 85,56 %. Tuy nhiên kích thước của mô sẹo lại tăng, đạt giá trị cao nhất là 0,69 cm ở công thức đối chứng và 0,67 cm (CT13) (Bảng 3.7).

Thí nghiệm xử lý bằng DMS sau 4 tuần có tỷ lệ sống cao nhất đạt 83,17 % (CT1). Tỷ lệ sống thấp nhất (0 %) ở các công thức CT20 và CT25 khi nồng độ DMS ở mức 800 ppm và thời gian xử lý là 8 giờ trở lên. Số lượng mô sẹo phát triển có mầm chồi khi xử lý bằng DMS cao nhất đạt 51,72 % (CT1) so với đối chứng là 76,67 %, các công thức thí nghiệm CT5, CT13, CT14, CT15, CT18, CT19, CT22, CT23, CT24 đều có mẫu sống nhưng mẫu chưa có phát triển xuất hiện mầm chồi. Đối với công thức còn lại mẫu đều có xuất hiện mầm chồi với tỷ lệ từ 1,11 %-16,74 %. Những mô sẹo còn sống có kích thước dao động từ 0,51-0,63 cm so với ban đầu là 0,2-0,3 cm (Bảng 3.8).

Kết quả sau 8 tuần theo dõi, cả hai thí nghiệm xử lý bằng colchicine và DMS kết quả so với thời điểm 4 tuần nuôi cấy thì đều cho thấy tỷ lệ mẫu sống có phần giảm xuống nhưng tỷ lệ mẫu có mầm chồi xuất hiện lại tăng lên, bên cạnh đó các mẫu mô sẹo phát triển cũng xuất hiện các hình thái khác biệt so với đối chứng. Giai đoạn 8 tuần sau khi xử lý colchicine, CT1 cho tỷ lệ mẫu sống 50 % và tỷ lệ mẫu có mầm chồi phát triển (40 %) cao nhất. Ở công thức thí nghiệm CT5, CT24 vẫn có mẫu sống với tỷ lệ lần lượt là 2,22 % và 1,11% tuy nhiên các mẫu này không phát triển được mầm chồi. Tỷ lệ mẫu có xuất hiện hình thái biến dị cao nhất là ở các công thức CT3, CT6, CT11 theo thứ tự là 24,67 %; 24,93 % và 25,69 %. Đối với

các công thức CT10, CT14, CT19, CT23 có tỷ lệ mẫu sống rất thấp chỉ từ 1,11 %- 2,22 % nhưng đều phát triển mầm chồi và có biểu hiện hình thái khác với đối chứng. Mô sẹo tăng trưởng đạt kích thước tốt nhất là CT11 (0,90 cm), ngoài các công thức có mẫu chết hoàn toàn thì những công thức còn lại mẫu đều có sự tăng trưởng kích thước từ 0,51-0,88 cm (Bảng 3.7).

Khi được xử lý bằng DMS, tỷ lệ mô sẹo còn sống sau 8 tuần cao nhất đạt được là 73,62 %, tỷ lệ mầm chồi phát triển đạt 53,32 % tuy nhiên số mẫu có biểu hiện hình thái khác so với đối chứng thấp chỉ đạt 4,43 % (CT1). Công thức có số mẫu biến dị hình thái lớn nhất là 14,93 % (CT6), các công thức khác tỷ lệ này chỉ dao động ở mức 1,11-12,19 %. Khi xử lý mô sẹo bằng DMS với nồng độ 400 ppm trở lên trong thời gian 6-10 giờ các mẫu bị chết 100 % và ở nồng độ 800 ppm trong 2 giờ cũng có kết quả tương tự (Bảng 3.14). Kích thước của mẫu giai đoạn này đạt được trong khoảng 0,51 – 0,86 cm, cao nhất ở công thức đối chứng (0,86 cm) (Bảng 3.8).

Gây đột biến bằng sử dụng DMS được Mostafa (2015) sử dụng trên cây Xà cừ (*Khaya senegalensis*) để tạo ra các giống mới có đặc tính tốt hơn. Ông đã sử dụng hạt cây Xà cừ ngâm trong dung dịch DMS (0, 1000, 2000, 3000, 4000 và 5000 ppm) và trong 15 giờ. Kết quả đã ra cây có số cành, số lá tăng lên đáng kể, đồng thời các đặc điểm về hình dạng lá, màu của thân non, cuốn lá cũng thay đổi (từ xanh chuyển sang đỏ), đặc biệt là khả năng sinh trưởng được cải thiện tốt hơn [126]. Một công bố khác của Mostafa và Alhamd (2016) trên cây Cây hoa Huỳnh liên (*Tecoma stans*) đã sử dụng DMS (nồng độ 0, 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm trong 15 giờ ) để xử lý hạt mục tiêu tạo ra biến dị di truyền. Kết quả thu được các biến dị về tính trạng sinh dưỡng như hình dạng, kích thước lá, chiều cao cây, và một số đặc điểm biến dị ở số lượng, hình dạng và màu sắc hoa [127].

Theo Vasko và Kyrychenko (2016) trên cây hoa Hướng dương (*Helianthus annuus*), tác giả đã sử dụng DMS với nồng độ 0,01 – 0,05 % để xử lý hạt trong 18 giờ, kết quả đã thu được những biến đổi về đặc điểm hình thái chiều cao, kích thước hoa, màu sắc, số lá ở 1, 2 thế hệ [175]. Ngoài ra, hiện nay để tăng hiệu quả tác động của DMS lên đối tượng cần xử lý, các nhà khoa học còn dùng các dẫn xuất của DMS [173].

**Bảng 3.7.** Kết quả xử lý mẫu mô sẹo bằng colchicine sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy

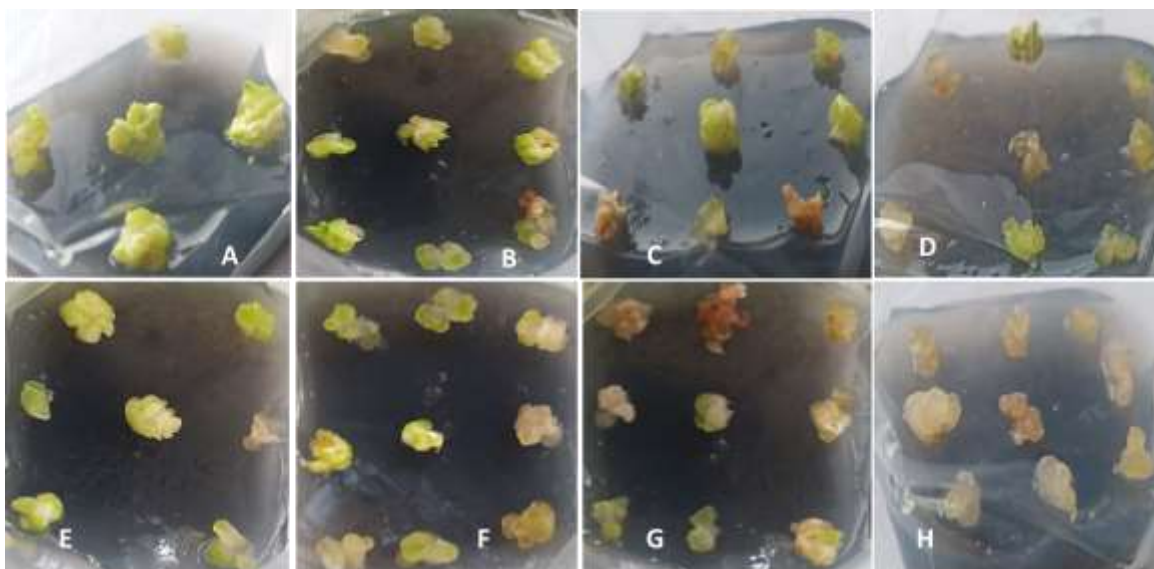
| Công thức | Nồng độ xử lý (ppm) | Thời gian xử lý (giờ) | Chỉ tiêu theo dõi mô sẹo xử lý bằng colchicine |                                      |                          |                          |                                      |                                        |                          |
|-----------|---------------------|-----------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
|           |                     |                       | 4 tuần                                         |                                      |                          | 8 tuần                   |                                      |                                        |                          |
|           |                     |                       | Tỷ lệ mô sẹo sống (%)                          | Tỷ lệ mô sẹo phát triển mầm chồi (%) | Kích thước mô sẹo (cm)   | Tỷ lệ mô sẹo sống (%)    | Tỷ lệ mô sẹo phát triển mầm chồi (%) | Tỷ lệ mô sẹo có thành thái biến dị (%) | Kích thước mô sẹo (cm)   |
| ĐC        | 0                   |                       | 96,67±1,93 <sup>a</sup>                        | 85,56±1,11 <sup>a</sup>              | 0,69±0,04 <sup>a</sup>   | 96,67±1,93 <sup>a</sup>  | 94,44±2,94 <sup>a</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                 | 0,79±,035 <sup>a-e</sup> |
| CT1       | 50                  | 2                     | 57,78±4,84 <sup>b</sup>                        | 15,56±1,11 <sup>c</sup>              | 0,65±0,01 <sup>a-c</sup> | 50,00±3,85 <sup>b</sup>  | 40,00±5,09 <sup>b</sup>              | 19,31±0,78 <sup>b</sup>                | 0,81±0,03 <sup>a-e</sup> |
| CT2       | 100                 | 2                     | 52,22±4,01 <sup>c</sup>                        | 14,44±2,22 <sup>cd</sup>             | 0,65±0,02 <sup>a-c</sup> | 43,33±3,85 <sup>c</sup>  | 31,11±4,01 <sup>c</sup>              | 23,33±1,92 <sup>ab</sup>               | 0,82±0,02 <sup>a-d</sup> |
| CT3       | 200                 | 2                     | 46,67±1,92 <sup>cd</sup>                       | 6,67±1,92 <sup>f-h</sup>             | 0,61±0,03 <sup>b-d</sup> | 37,78±2,94 <sup>cd</sup> | 27,78±2,94 <sup>cd</sup>             | 24,67±2,91 <sup>a</sup>                | 0,81±0,03 <sup>a-e</sup> |
| CT4       | 400                 | 2                     | 33,33±1,92 <sup>f</sup>                        | 0,00±0,00 <sup>j</sup>               | 0,55±0,01 <sup>e</sup>   | 24,44±1,11 <sup>f</sup>  | 13,33±1,92 <sup>e</sup>              | 11,33±1,02 <sup>cd</sup>               | 0,71±0,02 <sup>d-g</sup> |
| CT5       | 800                 | 2                     | 8,89±1,11 <sup>j-l</sup>                       | 0,00±0,00 <sup>j</sup>               | 0,52±0,01 <sup>e</sup>   | 2,22±1,11 <sup>jk</sup>  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>               | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                 | 0,52±0,01 <sup>i</sup>   |
| CT6       | 50                  | 4                     | 47,78±1,11 <sup>cd</sup>                       | 14,44±1,11 <sup>cd</sup>             | 0,65±0,01 <sup>a-c</sup> | 42,22±2,94 <sup>cd</sup> | 27,78±1,11 <sup>cd</sup>             | 24,93±2,13 <sup>a</sup>                | 0,88±0,01 <sup>ab</sup>  |
| CT7       | 100                 | 4                     | 44,44±1,11 <sup>d</sup>                        | 13,33±1,92 <sup>c-e</sup>            | 0,64±0,01 <sup>a-c</sup> | 42,22±1,11 <sup>cd</sup> | 22,22±1,11 <sup>d</sup>              | 18,89±1,11 <sup>b</sup>                | 0,87±0,04 <sup>a-c</sup> |
| CT8       | 200                 | 4                     | 34,44±1,11 <sup>f</sup>                        | 7,78±2,22 <sup>fg</sup>              | 0,63±0,01 <sup>bc</sup>  | 20,00±1,92 <sup>fg</sup> | 13,33±1,92 <sup>e</sup>              | 13,33±1,92 <sup>c</sup>                | 0,76±0,02 <sup>a-f</sup> |
| CT9       | 400                 | 4                     | 15,56±1,11 <sup>hi</sup>                       | 4,44±1,11 <sup>g-j</sup>             | 0,65±0,01 <sup>a-c</sup> | 11,11±1,11 <sup>hi</sup> | 8,89±1,11 <sup>e-g</sup>             | 7,78±1,11 <sup>de</sup>                | 0,82±0,02 <sup>a-d</sup> |
| CT10      | 800                 | 4                     | 5,56±1,11 <sup>k-m</sup>                       | 2,22±1,11 <sup>h-j</sup>             | 0,53±0,01 <sup>e</sup>   | 1,11±1,11 <sup>jk</sup>  | 1,11±1,11 <sup>h</sup>               | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>                | 0,60±0,06 <sup>g-i</sup> |
| CT11      | 50                  | 6                     | 46,67±1,92 <sup>cd</sup>                       | 22,22±2,94 <sup>b</sup>              | 0,63±0,01 <sup>a-c</sup> | 40,00±1,92 <sup>cd</sup> | 31,11±4,01 <sup>c</sup>              | 25,69±4,19 <sup>a</sup>                | 0,90±0,03 <sup>a</sup>   |
| CT12      | 100                 | 6                     | 37,78±2,92 <sup>ef</sup>                       | 15,56±2,94 <sup>c</sup>              | 0,66±0,01 <sup>a-c</sup> | 31,11±2,22 <sup>e</sup>  | 25,56±2,22 <sup>cd</sup>             | 20,97±2,00 <sup>ab</sup>               | 0,82±0,03 <sup>a-d</sup> |
| CT13      | 200                 | 6                     | 18,89±2,94 <sup>h</sup>                        | 10,00±1,92 <sup>d-f</sup>            | 0,67±0,03 <sup>ab</sup>  | 15,56±1,11 <sup>gh</sup> | 13,33±0,00 <sup>e</sup>              | 12,22±1,11 <sup>cd</sup>               | 0,80±0,02 <sup>a-e</sup> |
| CT14      | 400                 | 6                     | 7,78±1,11 <sup>kl</sup>                        | 2,22±1,11 <sup>h-j</sup>             | 0,53±0,01 <sup>e</sup>   | 2,22±1,11 <sup>jk</sup>  | 2,22±1,11 <sup>h</sup>               | 2,22±1,11 <sup>f</sup>                 | 0,70±0,09 <sup>d-g</sup> |
| CT15      | 800                 | 6                     | 0,00±0,00 <sup>m</sup>                         | 0,00±0,00 <sup>j</sup>               | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 0,00±0,00 <sup>k</sup>   | 0,00±0,00 <sup>i</sup>               | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                 | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT16      | 50                  | 8                     | 42,22±1,11 <sup>de</sup>                       | 21,11±2,22 <sup>b</sup>              | 0,66±0,03 <sup>ab</sup>  | 36,67±1,92 <sup>d</sup>  | 26,67±1,92 <sup>cd</sup>             | 21,33±1,63 <sup>ab</sup>               | 0,86±0,04 <sup>a-c</sup> |
| CT17      | 100                 | 8                     | 25,56±1,11 <sup>g</sup>                        | 10,00±1,92 <sup>d-f</sup>            | 0,60±0,01 <sup>cd</sup>  | 18,89±2,22 <sup>g</sup>  | 12,22±1,11 <sup>e</sup>              | 10,78±0,43 <sup>cd</sup>               | 0,80±0,05 <sup>a-e</sup> |
| CT18      | 200                 | 8                     | 11,11±1,11 <sup>i-k</sup>                      | 5,56±1,11 <sup>f-i</sup>             | 0,55±0,02 <sup>e</sup>   | 6,67±0,00 <sup>ij</sup>  | 5,56±1,11 <sup>f-h</sup>             | 4,83±0,98 <sup>ef</sup>                | 0,68±0,05 <sup>e-h</sup> |
| CT19      | 400                 | 8                     | 3,33±1,93 <sup>lm</sup>                        | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>              | 0,57±0,04 <sup>de</sup>  | 1,11±1,11 <sup>jk</sup>  | 1,11±1,11 <sup>h</sup>               | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>                | 0,63±0,11 <sup>f-i</sup> |
| CT20      | 800                 | 8                     | 0,00±0,00 <sup>m</sup>                         | 0,00±0,00 <sup>j</sup>               | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 0,00±0,00 <sup>k</sup>   | 0,00±0,00 <sup>h</sup>               | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                 | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT21      | 50                  | 10                    | 14,44±1,11 <sup>h-j</sup>                      | 8,89±1,11 <sup>e-g</sup>             | 0,62±0,00 <sup>bc</sup>  | 11,11±1,11 <sup>hi</sup> | 11,11±1,11 <sup>ef</sup>             | 10,11±0,35 <sup>cd</sup>               | 0,76±0,03 <sup>b-f</sup> |
| CT22      | 100                 | 10                    | 8,89±1,11 <sup>j-l</sup>                       | 4,44±1,11 <sup>g-j</sup>             | 0,64±0,01 <sup>a-c</sup> | 4,44±1,11 <sup>jk</sup>  | 4,44±1,11 <sup>gh</sup>              | 4,44±1,11 <sup>ef</sup>                | 0,74±0,01 <sup>c-f</sup> |
| CT23      | 200                 | 10                    | 5,56±1,11 <sup>k-m</sup>                       | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>              | 0,52±0,01 <sup>e</sup>   | 1,11±1,11 <sup>jk</sup>  | 1,11±1,11 <sup>h</sup>               | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>                | 0,56±0,04 <sup>hi</sup>  |
| CT24      | 400                 | 10                    | 1,11±1,11 <sup>m</sup>                         | 0,00±0,00 <sup>j</sup>               | 0,51±0,00 <sup>e</sup>   | 1,11±1,11 <sup>jk</sup>  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>               | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                 | 0,52±0,00 <sup>hi</sup>  |
| CT25      | 800                 | 10                    | 0,00±0,00 <sup>m</sup>                         | 0,00±0,00 <sup>j</sup>               | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 0,00±0,00 <sup>k</sup>   | 0,00±0,00 <sup>i</sup>               | 0,00±0,00 <sup>g</sup>                 | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , Duncan's test)

**Bảng 3.8.** Kết quả xử lý mẫu mô sọ bằng Dimethyl Sulphate (DMS) sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Nồng độ xử lý (ppm) | Thời gian xử lý (giờ) | Chỉ tiêu theo dõi mô sọ xử lý bằng <i>Dimethyl Sulphate (DMS)</i> |                                     |                          |                          |                                     |                                      |                          |
|-----------|---------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|           |                     |                       | 4 tuần                                                            |                                     |                          | 8 tuần                   |                                     |                                      |                          |
|           |                     |                       | Tỷ lệ mô sọ sống (%)                                              | Tỷ lệ mô sọ phát triển mầm chồi (%) | Kích thước mô sọ (cm)    | Tỷ lệ mô sọ sống (%)     | Tỷ lệ mô sọ phát triển mầm chồi (%) | Tỷ lệ mô sọ có hình thái biến dị (%) | Kích thước mô sọ (cm)    |
| ĐC        | 0                   | 0                     | 96,67±1,93 <sup>a</sup>                                           | 85,56±1,11 <sup>a</sup>             | 0,69±0,04 <sup>a</sup>   | 95,56±2,94 <sup>a</sup>  | 88,89±1,11 <sup>a</sup>             | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,86±0,05 <sup>a</sup>   |
| CT1       | 50                  | 2                     | 57,78±4,84 <sup>b</sup>                                           | 15,56±1,11 <sup>c</sup>             | 0,65±0,01 <sup>a-c</sup> | 73,62±1,32 <sup>b</sup>  | 53,32±2,34 <sup>b</sup>             | 4,43±0,63 <sup>e</sup>               | 0,85±0,0 <sup>a</sup>    |
| CT2       | 100                 | 2                     | 52,22±4,01 <sup>c</sup>                                           | 14,44±2,22 <sup>cd</sup>            | 0,65±0,02 <sup>a-c</sup> | 54,44±2,94 <sup>d</sup>  | 32,22±2,94 <sup>d</sup>             | 8,38±1,19 <sup>d</sup>               | 0,75±0,02 <sup>bc</sup>  |
| CT3       | 200                 | 2                     | 46,67±1,92 <sup>cd</sup>                                          | 6,67±1,92 <sup>f-h</sup>            | 0,61±0,03 <sup>b-d</sup> | 33,33±3,85 <sup>g</sup>  | 21,11±2,22 <sup>e</sup>             | 12,19±1,50 <sup>bc</sup>             | 0,80±0,02 <sup>ab</sup>  |
| CT4       | 400                 | 2                     | 33,33±1,92 <sup>f</sup>                                           | 0,00±0,00 <sup>j</sup>              | 0,55±0,01 <sup>e</sup>   | 7,78±2,22 <sup>jk</sup>  | 4,44±1,11 <sup>gh</sup>             | 3,71±0,38 <sup>ef</sup>              | 0,71±0,02 <sup>cd</sup>  |
| CT5       | 800                 | 2                     | 8,89±1,11 <sup>j-l</sup>                                          | 0,00±0,00 <sup>j</sup>              | 0,52±0,01 <sup>e</sup>   | 0,00±0,00 <sup>m</sup>   | 0,00±0,00 <sup>i</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT6       | 50                  | 4                     | 47,78±1,11 <sup>cd</sup>                                          | 14,44±1,11 <sup>cd</sup>            | 0,65±0,01 <sup>a-c</sup> | 66,58±2,95 <sup>c</sup>  | 37,49±2,11 <sup>c</sup>             | 14,93±1,91 <sup>a</sup>              | 0,67±0,01 <sup>de</sup>  |
| CT7       | 100                 | 4                     | 44,44±1,11 <sup>d</sup>                                           | 13,33±1,92 <sup>c-e</sup>           | 0,64±0,01 <sup>a-c</sup> | 24,44±1,11 <sup>h</sup>  | 14,44±1,11 <sup>f</sup>             | 7,77±0,63 <sup>d</sup>               | 0,65±0,04 <sup>de</sup>  |
| CT8       | 200                 | 4                     | 34,44±1,11 <sup>f</sup>                                           | 7,78±2,22 <sup>fg</sup>             | 0,63±0,01 <sup>bc</sup>  | 7,78±1,11 <sup>jk</sup>  | 3,33±0,00 <sup>g-i</sup>            | 3,33±0,00 <sup>ef</sup>              | 0,61±0,02 <sup>e-g</sup> |
| CT9       | 400                 | 4                     | 15,56±1,11 <sup>hi</sup>                                          | 4,44±1,11 <sup>g-j</sup>            | 0,65±0,01 <sup>a-c</sup> | 3,33±1,92 <sup>k-m</sup> | 1,11±1,11 <sup>hi</sup>             | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>              | 0,56±0,05 <sup>f-h</sup> |
| CT10      | 800                 | 4                     | 5,56±1,11 <sup>k-m</sup>                                          | 2,22±1,11 <sup>h-j</sup>            | 0,53±0,01 <sup>e</sup>   | 1,11±1,11 <sup>lm</sup>  | 1,11±1,11 <sup>hi</sup>             | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>              | 0,53±0,02 <sup>h</sup>   |
| CT11      | 50                  | 6                     | 46,67±1,92 <sup>cd</sup>                                          | 22,22±2,94 <sup>b</sup>             | 0,63±0,01 <sup>a-c</sup> | 47,74±1,08 <sup>e</sup>  | 18,68±0,73 <sup>e</sup>             | 13,56±1,09 <sup>ab</sup>             | 0,68±0,01 <sup>c-e</sup> |
| CT12      | 100                 | 6                     | 37,78±2,92 <sup>ef</sup>                                          | 15,56±2,94 <sup>c</sup>             | 0,66±0,01 <sup>a-c</sup> | 10,00±1,92 <sup>j</sup>  | 5,56±1,11 <sup>g</sup>              | 3,89±0,48 <sup>ef</sup>              | 0,69±0,02 <sup>c-e</sup> |
| CT13      | 200                 | 6                     | 18,89±2,94 <sup>h</sup>                                           | 10,00±1,92 <sup>d-f</sup>           | 0,67±0,03 <sup>ab</sup>  | 2,22±1,11 <sup>lm</sup>  | 1,11±1,11 <sup>hi</sup>             | 2,22±1,11 <sup>e-g</sup>             | 0,53±0,02 <sup>h</sup>   |
| CT14      | 400                 | 6                     | 7,78±1,11 <sup>kl</sup>                                           | 2,22±1,11 <sup>h-j</sup>            | 0,53±0,01 <sup>e</sup>   | 0,00±0,00 <sup>m</sup>   | 0,00±0,00 <sup>i</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT15      | 800                 | 6                     | 0,00±0,00 <sup>m</sup>                                            | 0,00±0,00 <sup>j</sup>              | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 0,00±0,00 <sup>m</sup>   | 0,00±0,00 <sup>i</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT16      | 50                  | 8                     | 42,22±1,11 <sup>de</sup>                                          | 21,11±2,22 <sup>b</sup>             | 0,66±0,03 <sup>ab</sup>  | 41,43±1,13 <sup>f</sup>  | 12,59±1,35 <sup>f</sup>             | 10,23±1,35 <sup>cd</sup>             | 0,61±0,04 <sup>e-g</sup> |
| CT17      | 100                 | 8                     | 25,56±1,11 <sup>g</sup>                                           | 10,00±1,92 <sup>d-f</sup>           | 0,60±0,01 <sup>cd</sup>  | 5,56±1,11 <sup>j-l</sup> | 4,44±1,11 <sup>gh</sup>             | 2,72±1,43 <sup>e-g</sup>             | 0,62±0,02 <sup>ef</sup>  |
| CT18      | 200                 | 8                     | 11,11±1,11 <sup>i-k</sup>                                         | 5,56±1,11 <sup>f-i</sup>            | 0,55±0,02 <sup>e</sup>   | 1,11±1,11 <sup>lm</sup>  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,52±0,00 <sup>h</sup>   |
| CT19      | 400                 | 8                     | 3,33±1,93 <sup>lm</sup>                                           | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>             | 0,57±0,04 <sup>de</sup>  | 0,00±0,00 <sup>m</sup>   | 0,00±0,00 <sup>i</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT20      | 800                 | 8                     | 0,00±0,00 <sup>m</sup>                                            | 0,00±0,00 <sup>j</sup>              | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 0,00±0,00 <sup>m</sup>   | 0,00±0,00 <sup>i</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT21      | 50                  | 10                    | 14,44±1,11 <sup>h-j</sup>                                         | 8,89±1,11 <sup>e-g</sup>            | 0,62±0,00 <sup>bc</sup>  | 19,62±0,77 <sup>i</sup>  | 6,78±0,85 <sup>g</sup>              | 3,03±0,72 <sup>ef</sup>              | 0,56±0,05 <sup>f-h</sup> |
| CT22      | 100                 | 10                    | 8,89±1,11 <sup>j-l</sup>                                          | 4,44±1,11 <sup>g-j</sup>            | 0,64±0,01 <sup>a-c</sup> | 2,22±1,11 <sup>lm</sup>  | 1,11±1,11 <sup>hi</sup>             | 1,11±1,11 <sup>fg</sup>              | 0,54±0,02 <sup>gh</sup>  |
| CT23      | 200                 | 10                    | 5,56±1,11 <sup>k-m</sup>                                          | 1,11±1,11 <sup>ij</sup>             | 0,52±0,01 <sup>e</sup>   | 1,11±1,11 <sup>lm</sup>  | 0,00±0,00 <sup>i</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,51±0,00 <sup>h</sup>   |
| CT24      | 400                 | 10                    | 1,11±1,11 <sup>m</sup>                                            | 0,00±0,00 <sup>j</sup>              | 0,51±0,00 <sup>e</sup>   | 0,00±0,00 <sup>m</sup>   | 0,00±0,00 <sup>h</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |
| CT25      | 800                 | 10                    | 0,00±0,00 <sup>m</sup>                                            | 0,00±0,00 <sup>j</sup>              | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 0,00±0,00 <sup>m</sup>   | 0,00±0,00 <sup>h</sup>              | 0,00±0,00 <sup>g</sup>               | 0,00±0,00 <sup>i</sup>   |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test))



**Hình 3.12.** Trạng thái mô sẹo khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 4 tuần. (A. Đối chứng không xử lý hoá chất; B. Xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong 2 giờ; C. Xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong 4 giờ; D. Xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong 6 giờ; E. Xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 2 giờ; F. Xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong 4 giờ; G. Xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong 4 giờ; H. Xử lý DMS nồng độ 800 ppm trong 8 giờ.)



**Hình 3.13.** Trạng thái mô sẹo khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 8 tuần. (A. Đối chứng không xử lý hoá chất; B. Xử lý colchicine nồng độ 50 ppm trong 6 giờ; C. Xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong 8 giờ; D. Xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong 10 giờ; E. Xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 2 giờ; F. Xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong 4 giờ; G. Xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong 4 giờ; H. Xử lý DMS nồng độ 800 ppm trong 8 giờ.)

**E.** Xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong 2 giờ; **F.** Xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong 8 giờ ; **G.** Xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong 4 giờ; **H.** Xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong 10 giờ.)

Như vậy, qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi và những công bố trước đây có thể thấy DMS là một chất có tác dụng mạnh làm biến đổi cấu trúc di truyền, dẫn đến những biến đổi về hình thái ở các thế hệ tiếp theo. Nó có thể được áp dụng trên nhiều đối tượng cây trồng, và có thể được xử lý ở các giai đoạn, protocorm, mô sẹo trong nuôi cấy *in-vitro*, hoặc được xử lý trực tiếp trên hạt.

Phát triển các phương pháp và kỹ thuật tạo giống đột biến hiệu quả bằng hoá chất thì Colchicine là một chất được lựa chọn hàng đầu để ứng dụng. Có tác động làm tăng số lượng nhiễm sắc thể hay còn gọi là đa bội là một trong những công cụ để cải thiện cây trồng. Thể đa bội đã đóng một vai trò quan trọng trong nhân giống cây trồng và cả sự tiến hóa của thực vật [149]. Một nghiên cứu trên lan *D. chrysotoxum* L. nghiên cứu dùng colchicine nồng độ 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 và 0,05 % (w/v) trong 1, 2, 3, 4 và 5 ngày để xử lý thể giống protocorm (PLB), kết quả là khoảng 84 % PLB sống sót và tỷ lệ mẫu tứ bội là 47 % [50]. Theo công bố của Deepti Srivastava và cộng sự (2018) tạo đột biến lan *Aerides crisa* Lindl., tác giả dùng colchicine (0,025-0,4 %) tác động lên protocorm xử lý trong 5 ngày. Kết quả ghi nhận tỷ lệ sống của protocorm sau 30 ngày xử lý đạt 42-58 %, tỷ lệ xuất hiện biến dị là 19-86 %, hiệu quả tạo biến dị cao khi có sự kết hợp với EMS hoặc tia gamma [166]. Nghiên cứu của Fei Wang và cộng sự (2023) đã tạo dòng đa bội lan *D. wardianum* Warner bằng colchicine nồng độ 25, 75, 125, 250 và 500  $\mu$ M, thời gian xử lý là 6, 8, 12 và 24 giờ, tác động lên protocorm. Kết quả được ghi lại sau 60 ngày nuôi cấy là tỷ lệ sống 62- 96 %, các mẫu đã có phân hoá chồi lá [177].

Kết quả nghiên cứu và những công bố trước đây đã cho thấy colchicine là một chất có tác động mạnh trong tạo biến dị cây trồng và có thể được áp dụng ở nhiều loại cây trồng có thể ở giai đoạn hạt, mô sẹo, protocorm, hoặc đỉnh sinh trưởng đều mang lại hiệu quả. Tuy nhiên nếu xử lý ở nồng độ cao và thời gian kéo dài thì tỷ lệ sống của mẫu thấp cũng như có nhiều biến đổi bất lợi cho cây [177]. Một tác động khác của colchicine là ở nồng độ thấp nó có tác dụng kích thích cho sự sinh trưởng, đẩy nhanh tốc độ tăng trưởng của tế bào, giúp tăng

cường tổng hợp hormone tăng trưởng thực vật và thay đổi hoạt động các enzyme, từ đó làm tăng khả năng thích nghi của tế bào với môi trường [166].

### **3.2.2 Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi**

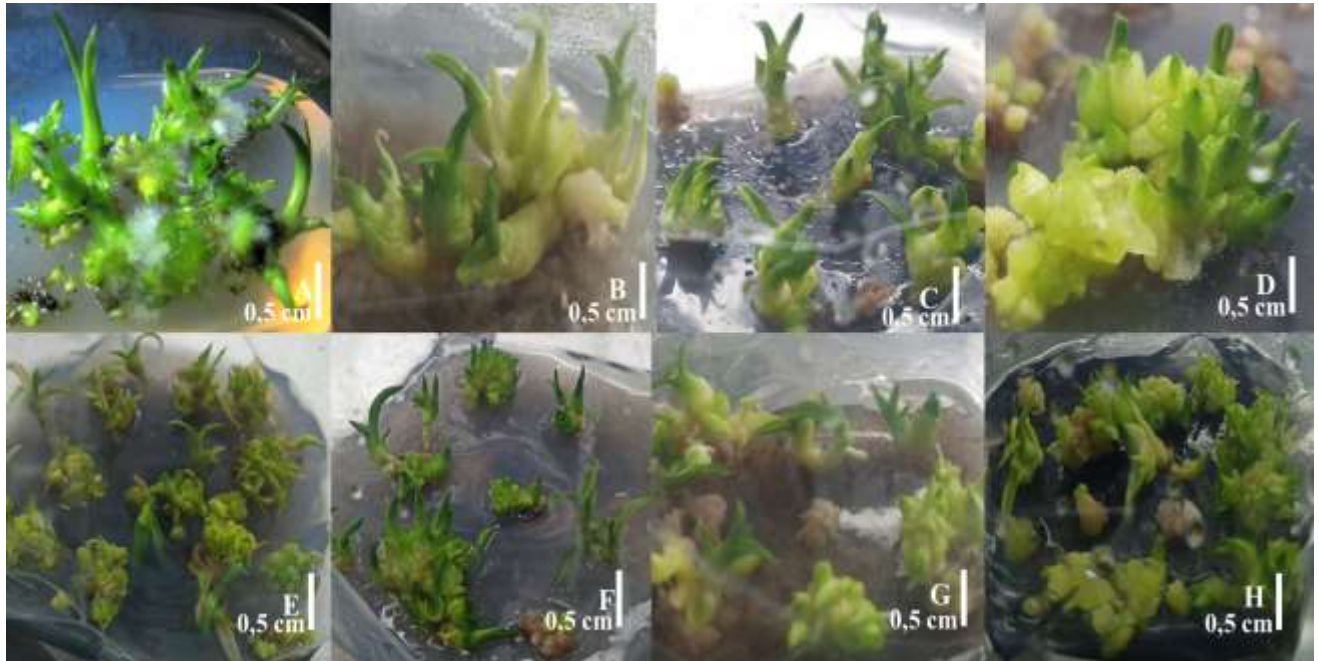
#### **3.2.2.1 Tái sinh chồi từ protocorm sau khi xử lý hoá chất**

Mẫu protocorm sau khi cấy vào môi trường dinh dưỡng có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng BA và NAA được theo dõi và ghi lại các chỉ tiêu đánh giá ở 8 tuần nuôi cấy. Kết quả trình bày ở bảng 3.9.

Khả năng tạo chồi của protocorm xử lý colchicine ở nghiệm thức đối chứng khi không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng BA và NAA vào môi trường cụ thể với tỷ lệ tạo chồi 66,78 %, trung bình 2,34 chồi/mẫu, chiều cao chồi 1,25 cm và có 2,55 lá/chồi. Kết quả đạt tốt hơn khi môi trường có bổ sung thêm chất điều hoà sinh trưởng, với nồng độ BA từ 0,5 – 1.5 mg/L (CT1, 2, 3) đã cho tỷ lệ tạo chồi 73,86 – 80,78 %, trung bình đạt từ 3,47-4,48 chồi/mẫu, chiều cao 1,49-1,74 cm và số lá là 3,13-3,25 lá/chồi. Kết quả tái sinh chồi tốt nhất được ghi nhận ở CT7 khi môi trường bổ sung 1 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA đã cho tỷ lệ tạo chồi 100 %, số chồi đạt 4,95 chồi/mẫu, chiều cao chồi là 2,28 cm và chồi có số lá 4,10 lá/chồi, chồi cao, to khoẻ có màu xanh đậm lá nhiều là lớn. Hiệu quả tái sinh và chất lượng chồi đều giảm đi khi nồng độ BA và NAA bổ sung vượt quá 1,5 mg/L, điều này có thể do hàm lượng kích thích sinh trưởng quá cao trong môi trường đã gây ức chế quá trình phân hoá tế bào để protocorm hình thành chồi.

Kết quả thí nghiệm khả năng tái sinh chồi của protocorm đã xử lý DMS thể hiện không tốt bằng khi so với protocorm được xử lý colchicine. Với nghiệm thức đối chứng (ĐC) cho tỷ lệ tạo chồi 60,36 %, số chồi trung bình đạt 1,57 chồi/mẫu, chiều cao 0,86 cm và có 1,75 lá/chồi, chồi thấp, nhỏ yếu, có màu xanh vàng, có ít lá hoặc chưa có lá. Khả năng tái sinh chồi cũng được cải thiện khi môi trường dinh dưỡng bổ sung BA nồng độ 0,5-1,5 mg/L, với tỷ lệ tạo chồi dao động 66,77 – 74,65 %, trung bình đạt từ 1,56-2,55 chồi/mẫu, chiều cao từ 0,96-1,21 cm và có số lá từ 2,44-2,74 lá/chồi (CT1,2,3). Khả năng tái sinh chồi tốt nhất khi môi trường bổ sung kết hợp BA và NAA với nồng độ 0,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA cho kết quả tỷ lệ tạo chồi 95,68 %, trung bình 3,67 chồi/mẫu, chiều cao 2,00 cm/chồi và đạt 3,80 lá/chồi, chồi to khoẻ, có màu xanh đậm,

lá nhiều. Khi nồng độ kích thích sinh trưởng bổ sung vào môi trường dinh dưỡng vượt ngưỡng 1 mg/L cho hiệu quả tái sinh chồi giảm xuống, và chất lượng chồi kém đi.



**Hình 3.14.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của protocorm đã xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy. (A. *Protocorm trên môi trường không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng (ĐC)*; B. *Protocorm xử lý colchicine trong môi trường có 0,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA*; C. *Protocorm xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA*; D. *Protocorm xử lý colchicine trong môi trường có 1 mg/L BA và 1 mg/L NAA*; E. *Protocorm xử lý DMS trong môi trường có 1 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA*; F. *Protocorm xử lý DMS trong môi trường có 0,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA*; G. *Protocorm xử lý DMS trong môi trường có 2 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA*; H. *Protocorm xử lý DMS trong môi trường có 1 mg/L BA.*)

**Bảng 3.9.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi đột biến từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Chất điều hoà sinh trưởng (mg/L) |     | Chỉ tiêu theo dõi                      |                         |                          |                         |               |                                               |                         |                          |                         |               |
|-----------|----------------------------------|-----|----------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|-----------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
|           |                                  |     | Chồi đột biến do xử lý bằng colchicine |                         |                          |                         |               | Chồi đột biến do xử lý bằng dimethyl sulphate |                         |                          |                         |               |
|           | BA                               | NAA | Tỷ lệ tạo chồi (%)                     | Số chồi/mẫu             | Chiều cao chồi (cm)      | Số lá/chồi              | Đặc điểm chồi | Tỷ lệ tạo chồi (%)                            | Số chồi/mẫu             | Chiều cao chồi (cm)      | Số lá/chồi              | Đặc điểm chồi |
| ĐC        | 0,0                              | 0,0 | 66,78±0,61 <sup>e</sup>                | 2,34±0,11 <sup>de</sup> | 1,25±0,04 <sup>c-e</sup> | 2,55±0,06 <sup>e</sup>  | ++            | 60,36±0,58 <sup>e</sup>                       | 1,57±0,06 <sup>e</sup>  | 0,86±0,07 <sup>de</sup>  | 1,75±0,06 <sup>de</sup> | +             |
| CT1       | 0,5                              | 0,0 | 73,86±0,87 <sup>d</sup>                | 3,47±0,18 <sup>c</sup>  | 1,49±0,08 <sup>bc</sup>  | 3,13±0,04 <sup>c</sup>  | ++            | 73,48±0,52 <sup>c</sup>                       | 2,55±0,06 <sup>c</sup>  | 1,21±0,09 <sup>bc</sup>  | 2,67±0,06 <sup>bc</sup> | ++            |
| CT2       | 1,0                              | 0,0 | 80,78±0,97 <sup>c</sup>                | 4,17±0,11 <sup>b</sup>  | 1,64±0,16 <sup>b</sup>   | 3,25±0,05 <sup>c</sup>  | ++            | 74,65±0,65 <sup>c</sup>                       | 2,39±0,09 <sup>cd</sup> | 1,01±0,02 <sup>cd</sup>  | 2,74±0,10 <sup>bc</sup> | ++            |
| CT3       | 1,5                              | 0,0 | 80,71±0,82 <sup>c</sup>                | 4,48±0,06 <sup>b</sup>  | 1,74±0,05 <sup>b</sup>   | 3,24±0,17 <sup>c</sup>  | +++           | 66,77±0,55 <sup>d</sup>                       | 1,56±0,07 <sup>e</sup>  | 0,96±0,04 <sup>c-e</sup> | 2,44±0,12 <sup>c</sup>  | ++            |
| CT4       | 2,0                              | 0,0 | 67,63±0,59 <sup>e</sup>                | 1,87±0,14 <sup>f</sup>  | 1,16±0,02 <sup>de</sup>  | 2,67±0,05 <sup>de</sup> | ++            | 40,86±1,49 <sup>h</sup>                       | 1,09±0,07 <sup>gh</sup> | 1,28±0,09 <sup>bc</sup>  | 1,76±0,13 <sup>de</sup> | +             |
| CT5       | 0,0                              | 0,5 | 80,41±1,06 <sup>c</sup>                | 2,47±0,05 <sup>d</sup>  | 1,38±0,02 <sup>cd</sup>  | 2,85±0,06 <sup>d</sup>  | ++            | 66,73±1,04 <sup>d</sup>                       | 2,15±0,16 <sup>d</sup>  | 1,44±0,07 <sup>b</sup>   | 2,62±0,09 <sup>bc</sup> | ++            |
| CT6       | 0,5                              | 0,5 | 86,76±0,60 <sup>b</sup>                | 4,29±0,27 <sup>b</sup>  | 1,64±0,05 <sup>b</sup>   | 3,84±0,07 <sup>b</sup>  | ++            | 95,68±1,28 <sup>a</sup>                       | 3,67±0,06 <sup>a</sup>  | 2,00±0,18 <sup>a</sup>   | 3,80±0,12 <sup>a</sup>  | +++           |
| CT7       | 1,0                              | 0,5 | 100±0,00 <sup>a</sup>                  | 4,95±0,19 <sup>a</sup>  | 2,28±0,17 <sup>a</sup>   | 4,10±0,17 <sup>a</sup>  | +++           | 81,69±1,33 <sup>b</sup>                       | 3,35±0,05 <sup>b</sup>  | 1,41±0,09 <sup>b</sup>   | 2,95±0,10 <sup>b</sup>  | ++            |
| CT8       | 1,5                              | 0,5 | 79,67±1,21 <sup>c</sup>                | 1,97±0,08 <sup>ef</sup> | 1,22±0,06 <sup>de</sup>  | 2,55±0,06 <sup>e</sup>  | ++            | 61,95±2,30 <sup>e</sup>                       | 1,46±0,05 <sup>ef</sup> | 1,17±0,09 <sup>b-d</sup> | 1,88±0,14 <sup>d</sup>  | +             |
| CT9       | 2,0                              | 0,5 | 60,95±1,32 <sup>f</sup>                | 1,28±0,09 <sup>g</sup>  | 0,90±0,11 <sup>f</sup>   | 2,76±0,04 <sup>g</sup>  | ++            | 53,40±1,29 <sup>f</sup>                       | 1,08±0,07 <sup>gh</sup> | 1,07±0,08 <sup>cd</sup>  | 1,56±0,18 <sup>de</sup> | +             |
| CT10      | 0,0                              | 1,0 | 73,12±1,53 <sup>d</sup>                | 3,15±0,17 <sup>c</sup>  | 1,27±0,04 <sup>cd</sup>  | 2,85±0,05 <sup>d</sup>  | ++            | 66,75±1,57 <sup>d</sup>                       | 1,28±0,08 <sup>fg</sup> | 1,06±0,10 <sup>cd</sup>  | 1,88±0,19 <sup>d</sup>  | +             |
| CT11      | 0,5                              | 1,0 | 86,40±1,45 <sup>b</sup>                | 4,12±0,09 <sup>b</sup>  | 1,63±0,01 <sup>b</sup>   | 3,84±0,05 <sup>b</sup>  | +++           | 61,20±1,36 <sup>e</sup>                       | 1,14±0,16 <sup>gh</sup> | 1,07±0,15 <sup>cd</sup>  | 1,93±0,22 <sup>d</sup>  | +             |
| CT12      | 1,0                              | 1,0 | 66,14±0,85 <sup>e</sup>                | 1,77±0,14 <sup>f</sup>  | 1,00±0,11 <sup>ef</sup>  | 2,18±0,08 <sup>f</sup>  | ++            | 46,67±0,52 <sup>g</sup>                       | 0,89±0,08 <sup>h</sup>  | 0,97±0,06 <sup>c-e</sup> | 1,39±0,09 <sup>ef</sup> | +             |
| CT13      | 1,5                              | 1,0 | 53,40±1,77 <sup>g</sup>                | 1,10±0,06 <sup>g</sup>  | 0,85±0,05 <sup>f</sup>   | 1,46±0,06 <sup>h</sup>  | +             | 46,61±0,65 <sup>g</sup>                       | 0,61±0,02 <sup>i</sup>  | 0,97±0,12 <sup>c-e</sup> | 1,11±0,14 <sup>fg</sup> | +             |
| CT14      | 2,0                              | 1,0 | 46,56±1,12 <sup>h</sup>                | 0,93±0,05 <sup>g</sup>  | 0,57±0,03 <sup>g</sup>   | 1,24±0,06 <sup>h</sup>  | +             | 33,93±0,88 <sup>i</sup>                       | 0,45±0,01 <sup>i</sup>  | 0,69±0,09 <sup>e</sup>   | 0,83±0,03 <sup>g</sup>  | +             |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

+: Chồi thấp, nhỏ yếu, có màu xanh vàng, ít lá hoặc chưa có lá.

++: Chồi thấp, nhỏ yếu, có màu xanh, có lá nhỏ và ít.

+++ : Chồi cao, to khoẻ, có màu xanh đậm, lá nhiều và lớn.

### **3.2.2.2 Tái sinh chồi từ mô sẹo sau khi xử lý hoá chất**

Mô sẹo xử lý bằng colchicine và DMS cấy trong môi trường dinh dưỡng có bổ sung chất kích thích BA và NAA, sau 8 tuần nuôi cấy kết quả đánh giá được thể hiện ở bảng 3.10.

Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo xử lý bằng colchicine ở công thức đối chứng (ĐC) có tỷ lệ hình thành chồi 12,44 %, số chồi trung bình 0,64 chồi/mẫu, chiều cao chồi 0,56 cm, và có 1,15 lá/chồi, chồi có đặc điểm nhỏ yếu, có màu xanh hơi vàng, ít lá. Khi môi trường được bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thì tỷ lệ hình thành chồi cao hơn, trong số này công thức đạt kết quả tốt nhất là môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA (CT8) với kết quả về tỷ lệ hình thành chồi, số chồi, chiều cao chồi và số lá chồi thứ tự đạt là 70,29 %; 2,35 chồi/mẫu; 2,34 cm; 3,32 lá/chồi, chồi có đặc điểm to khoẻ, có màu xanh đậm và chồi có nhiều lá. Với môi trường chỉ bổ sung BA từ 0,5 – 2 mg/L (CT1, 2, 3, 4) cho kết quả tỷ lệ hình thành chồi từ 21,86 – 60,05 %, số chồi hình thành đạt 1,47 – 1,81 chồi/mẫu, chiều cao chồi dao động từ 0,65 – 1,54 cm và có số lá từ 1,58 – 2,08 lá /chồi. Kết quả thí nghiệm này nhận thấy khi hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng được bổ sung vào môi trường vượt quá 2 mg/L thì khả năng tái sinh chồi của mẫu bắt đầu giảm xuống như ở công thức thí nghiệm CT9 và CT13, CT14 (Bảng 3.10).

Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo được xử lý bằng DMS khi môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng (ĐC) là thấp nhất trong các công thức thí nghiệm với tỷ lệ tạo chồi đạt 8,11 %; số chồi trung bình 0,58 chồi/mẫu; chiều cao chồi 0,50 cm và 1,11 lá/chồi, chồi có đặc điểm nhỏ yếu, màu xanh hơi vàng, lá hình thành ít. Hiệu quả tái sinh chồi được cải thiện khi môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng BA và NAA đơn lẻ hoặc kết hợp. Bổ sung đơn lẻ chất điều hoà sinh trưởng BA hoặc NAA ở các công thức CT1, 2, 3, 4, 5, 10 cho kết quả tỷ lệ tạo chồi dao động từ 18,98 – 60,05 %, số chồi đạt từ 1,05 – 1,81 chồi/mẫu, chiều cao từ 0,65 – 1,54 cm và đạt số lá từ 1,22 – 2,08 lá/chồi. Khả năng tái sinh chồi tốt nhất được ghi nhận ở công thức thí nghiệm CT8, khi môi trường có bổ sung kết hợp 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA với tỷ lệ hình thành chồi 65,29 %, số chồi 2,15 chồi/mẫu, chiều cao chồi 2,00 cm và số lá 2,76 lá/chồi, chồi to khoẻ, có màu xanh, sinh trưởng tốt. Khả năng tái sinh chồi của mẫu cũng bắt đầu kém đi khi hàm

lượng chất điều hoà sinh trưởng bổ sung vào môi trường vượt quá 2 mg/L ở các công thức CT9, CT13, CT14 (Bảng 3.10).

Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu về nuôi cấy *in-vitro* sử dụng DMS tác động vào giai đoạn mô sẹo hay protocorm để tạo đột biến. DMS được sử dụng tác động trực tiếp lên chồi ngủ hoặc hạt sau đó được trồng ở điều kiện *ex-vitro*. Theo Muniappan và cộng sự (2017), dùng đoạn đốt mầm cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) được xử lý DMS với nồng độ 2 - 10 mM, và cấy vào môi trường tái sinh chồi, sau 45 ngày nuôi cấy môi trường bổ sung 12 mg/L BA và 1 mg/L IAA cho hiệu quả tái sinh chồi tốt nhất, với tỷ lệ tái sinh chồi 90,2 %, và số chồi đạt 17,33 chồi/mẫu ở mẫu được xử lý DMS với nồng độ 6 mM [129].

Khả năng tái sinh chồi của protocorm và mô sẹo được xử lý bằng colchicine cũng đã có những công bố trước đây. Khả năng tái sinh chồi được ghi nhận bởi Atichart (2013) trên lan *D. chrysotoxum* thì PLB đã xử lý colchicine nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng bổ sung 0 – 1 mg/L NAA và 0 – 1 mg/L BA để tái sinh cây, kết quả cho thấy PLB được xử lý colchicine có khả năng tái sinh chồi cao từ 2,36 – 4,35 chồi/ mẫu [50]. Nghiên cứu của Aziz và cộng sự (2019) trên lan *Phalaenopsis amabilis*, cho khả năng tái sinh chồi từ protocorm đã được xử lý colchicine sau khi nuôi cấy 8 tuần trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung 0-1 mg/L BA và 0-1 mg/L TDZ được ghi nhận là từ 2,5 – 9, 5 chồi /mẫu [52].



**Hình 3.15.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của mô sẹo đã xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy. (A. Mô sẹo trên môi trường không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng (ĐC); B. Mô sẹo xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 1 mg/L

NAA; C. Mô sẹo xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA; D. Mô sẹo xử lý colchicine trong môi trường có 2 mg/L BA và 1 mg/L NAA; E. Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 2 mg/L BA và 1 mg/L NAA; F. Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA; G. Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 1 mg/L NAA; H. Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA.)

**Bảng 3.10.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi đột biến từ mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Chất điều hoà sinh trưởng (mg/L) |     | Chỉ tiêu theo dõi                      |                          |                          |                          |               |                                               |                          |                          |                          |               |
|-----------|----------------------------------|-----|----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
|           |                                  |     | Chồi đột biến do xử lý bằng colchicine |                          |                          |                          |               | Chồi đột biến do xử lý bằng dimethyl sulphate |                          |                          |                          |               |
|           | BA                               | NAA | Tỷ lệ tạo chồi (%)                     | Số chồi/mẫu              | Chiều cao chồi (cm)      | Số lá tb/chồi            | Đặc điểm chồi | Tỷ lệ tạo chồi (%)                            | Số chồi/mẫu              | chiều cao chồi (cm)      | Số lá/chồi               | Đặc điểm chồi |
| ĐC        | 0,0                              | 0,0 | 12,44±0,94 <sup>j</sup>                | 0,64±0,06 <sup>g</sup>   | 0,56±0,03 <sup>g</sup>   | 1,15±0,05 <sup>fg</sup>  | +             | 8,11±1,42 <sup>i</sup>                        | 0,58±0,03 <sup>d</sup>   | 0,50±0,03 <sup>d</sup>   | 1,11±0,03 <sup>e</sup>   | +             |
| CT1       | 0,5                              | 0,0 | 21,86±0,78 <sup>hi</sup>               | 1,47±0,05 <sup>c-f</sup> | 0,65±0,05 <sup>fg</sup>  | 1,58±0,04 <sup>d-g</sup> | +             | 17,52±1,12 <sup>gh</sup>                      | 1,20±0,23 <sup>b-d</sup> | 0,61±0,08 <sup>cd</sup>  | 1,34±0,11 <sup>de</sup>  | +             |
| CT2       | 1,0                              | 0,0 | 26,48±0,50 <sup>gh</sup>               | 1,57±0,06 <sup>c-e</sup> | 1,11±0,18 <sup>c-g</sup> | 1,75±0,05 <sup>d-f</sup> | +             | 21,81±1,30 <sup>fg</sup>                      | 1,50±0,09 <sup>a-c</sup> | 0,87±0,28 <sup>b-d</sup> | 1,75±0,23 <sup>b-e</sup> | ++            |
| CT3       | 1,5                              | 0,0 | 60,05±1,35 <sup>c</sup>                | 1,81±0,19 <sup>b-d</sup> | 1,54±0,06 <sup>b-d</sup> | 2,08±0,17 <sup>c-e</sup> | ++            | 55,28±2,55 <sup>bc</sup>                      | 1,81±0,19 <sup>ab</sup>  | 1,20±0,33 <sup>a-d</sup> | 2,08±0,41 <sup>a-d</sup> | ++            |
| CT4       | 2,0                              | 0,0 | 44,96±2,24 <sup>e</sup>                | 1,67±0,10 <sup>b-e</sup> | 1,30±0,12 <sup>b-f</sup> | 1,84±0,30 <sup>d-f</sup> | ++            | 39,30±1,53 <sup>d</sup>                       | 1,50±0,07 <sup>a-c</sup> | 1,06±0,20 <sup>b-d</sup> | 1,44±0,17 <sup>c-e</sup> | ++            |
| CT5       | 0,0                              | 0,5 | 18,98±1,26 <sup>i</sup>                | 1,27±0,12 <sup>ef</sup>  | 1,08±0,18 <sup>d-g</sup> | 1,18±0,12 <sup>fg</sup>  | +             | 13,98±1,26 <sup>h</sup>                       | 1,13±0,20 <sup>b-d</sup> | 0,94±0,16 <sup>b-d</sup> | 1,08±0,07 <sup>e</sup>   | +             |
| CT6       | 0,5                              | 0,5 | 28,76±1,20 <sup>fg</sup>               | 1,49±0,11 <sup>c-f</sup> | 1,43±0,09 <sup>b-e</sup> | 1,51±0,27 <sup>e-g</sup> | +             | 22,76±1,57 <sup>e-g</sup>                     | 1,39±0,13 <sup>bc</sup>  | 1,33±0,13 <sup>a-d</sup> | 1,31±0,17 <sup>de</sup>  | ++            |
| CT7       | 1,0                              | 0,5 | 63,62±2,58 <sup>bc</sup>               | 1,91±0,14 <sup>bc</sup>  | 1,85±0,33 <sup>ab</sup>  | 2,66±0,14 <sup>bc</sup>  | +++           | 58,62±2,58 <sup>b</sup>                       | 1,61±0,29 <sup>a-c</sup> | 1,72±0,40 <sup>ab</sup>  | 2,42±0,24 <sup>ab</sup>  | +++           |
| CT8       | 1,5                              | 0,5 | 70,29±0,83 <sup>a</sup>                | 2,35±0,10 <sup>a</sup>   | 2,34±0,12 <sup>a</sup>   | 3,32±0,23 <sup>a</sup>   | +++           | 65,29±0,83 <sup>a</sup>                       | 2,15±0,29 <sup>a</sup>   | 2,00±0,22 <sup>a</sup>   | 2,76±0,24 <sup>a</sup>   | +++           |
| CT9       | 2,0                              | 0,5 | 52,28±2,46 <sup>d</sup>                | 1,85±0,11 <sup>b-d</sup> | 1,70±0,44 <sup>a-d</sup> | 2,26±0,32 <sup>b-d</sup> | ++            | 52,28±2,46 <sup>c</sup>                       | 1,85±0,11 <sup>ab</sup>  | 1,70±0,44 <sup>ab</sup>  | 2,26±0,32 <sup>a-c</sup> | +++           |
| CT10      | 0,0                              | 1,0 | 23,12±1,53 <sup>hi</sup>               | 1,05±0,08 <sup>fg</sup>  | 0,77±0,15 <sup>e-g</sup> | 1,22±0,32 <sup>fg</sup>  | +             | 18,47±1,24 <sup>gh</sup>                      | 1,11±0,25 <sup>b-d</sup> | 0,64±0,21 <sup>cd</sup>  | 1,12±0,22 <sup>e</sup>   | +             |
| CT11      | 0,5                              | 1,0 | 33,73±2,50 <sup>f</sup>                | 1,38±0,24 <sup>d-f</sup> | 1,63±0,01 <sup>a-d</sup> | 1,64±0,15 <sup>d-g</sup> | +             | 28,06±2,66 <sup>e</sup>                       | 1,05±0,20 <sup>cd</sup>  | 1,33±0,34 <sup>a-d</sup> | 1,27±0,06 <sup>de</sup>  | +             |
| CT12      | 1,0                              | 1,0 | 41,47±2,07 <sup>e</sup>                | 1,77±0,14 <sup>b-d</sup> | 1,67±0,39 <sup>a-d</sup> | 2,18±0,08 <sup>b-e</sup> | ++            | 36,14±2,32 <sup>d</sup>                       | 1,54±0,26 <sup>a-c</sup> | 1,45±0,45 <sup>a-c</sup> | 1,85±0,26 <sup>b-e</sup> | ++            |
| CT13      | 1,5                              | 1,0 | 66,73±1,90 <sup>ab</sup>               | 2,08±0,27 <sup>ab</sup>  | 1,81±0,36 <sup>a-c</sup> | 2,79±0,33 <sup>ab</sup>  | +++           | 59,73±2,34 <sup>ab</sup>                      | 1,75±0,37 <sup>a-c</sup> | 1,55±0,31 <sup>a-c</sup> | 2,46±0,55 <sup>ab</sup>  | +++           |
| CT14      | 2,0                              | 1,0 | 31,90±2,37 <sup>f</sup>                | 1,06±0,13 <sup>fg</sup>  | 0,69±0,11 <sup>fg</sup>  | 1,04±0,21 <sup>g</sup>   | +             | 25,23±2,70 <sup>ef</sup>                      | 1,39±0,25 <sup>bc</sup>  | 0,63±0,16 <sup>cd</sup>  | 1,24±0,30 <sup>de</sup>  | +             |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

+: chồi thấp, nhỏ yếu, có màu xanh vàng, ít lá hoặc chưa có lá.

++: chồi thấp, nhỏ yếu, có màu xanh, có lá nhỏ và ít.

+++ : chồi cao, to khoẻ, có màu xanh đậm, lá nhiều và lớn.

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

Những chồi tái sinh từ protocorm, mô sẹo đã được xử lý colchicine và DMS được cấy vào môi trường nhân nhanh có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng BA và IAA. Các chỉ tiêu đánh giá được ghi lại sau 8 tuần nuôi cấy kết quả được trình bày ở bảng 3.11.

Khả năng nhân chồi của chồi xử lý colchicine khi cấy trên môi trường không sử dụng chất kích thích sinh trưởng là tương đối thấp, với hệ số nhân chồi 2,14 lần; với 4,07 lá/chồi, chồi cao 2,87 cm; đường kính thân chồi là 0,21 cm, chồi tương đối thấp, màu xanh vàng, ít lá, lá mảnh và nhỏ (ĐC). Trên môi trường có bổ sung kích thích sinh trưởng thì khả năng nhân chồi được cải thiện, khi chỉ bổ sung 1,5 mg/L BA đã cho thấy hiệu quả, với các kết quả tương ứng hệ số nhân chồi 2,73 lần; 3,37 lá/chồi; chồi cao 3,17 cm; đường kính thân chồi 0,31 cm (CT1). Môi trường dinh dưỡng được bổ sung đồng thời cả hai loại kích thích sinh trưởng thì hiệu quả nhân chồi tốt hơn. Ghi nhận kết quả tốt nhất ở môi trường được bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L IAA với hệ số nhân đạt được 4,47 lần; 5,27 lá/chồi; chiều cao chồi 5,55 cm; đường kính thân chồi đạt là 0,55 cm, chồi to khoẻ, xanh tốt, xanh đậm và nhiều lá (CT4). Bổ sung IAA vào môi trường cao hoặc thấp hơn 0,5 mg/L đều cho tác dụng nhân chồi không cao bằng (CT2, CT3, CT5) hệ số nhân chồi chỉ dao động từ 2,28 – 3,34 lần (Bảng 3.11).

Chồi xử lý bằng DMS có khả năng nhân nhanh chồi ở môi trường không có chất điều hoà sinh trưởng với hệ số nhân chồi 1,73 lần; chồi có số lá 2,33 lá, chiều cao 2,36 cm; đường kính thân chồi 0,18 cm (ĐC), với kết quả này kém hơn so với chồi được xử lý bằng colchicine. Môi trường được bổ sung thêm 1,5 mg/L BA có khả năng nhân nhanh tốt hơn so với đối chứng về hệ số nhân chồi 1,93 lần, số lá 3,00 lá, chiều cao chồi 2,84 cm, đường kính thân chồi 0,28 cm. Khả năng nhân nhanh chồi được cải thiện tốt hơn khi phối hợp hai loại kích thích sinh trưởng BA và IAA vào môi trường, cụ thể hệ số nhân chồi đạt từ 2,40 – 4,33 lần, số lá đạt 3,07-4,60 lá; chiều cao chồi đạt 2,8-3,48 cm; đường kính thân chồi dao động từ 0,33 – 0,50 cm, trong đó nghiệm thức tốt nhất là CT4 với môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L IAA, chồi có đặc điểm cao to, khoẻ, có màu xanh tốt.

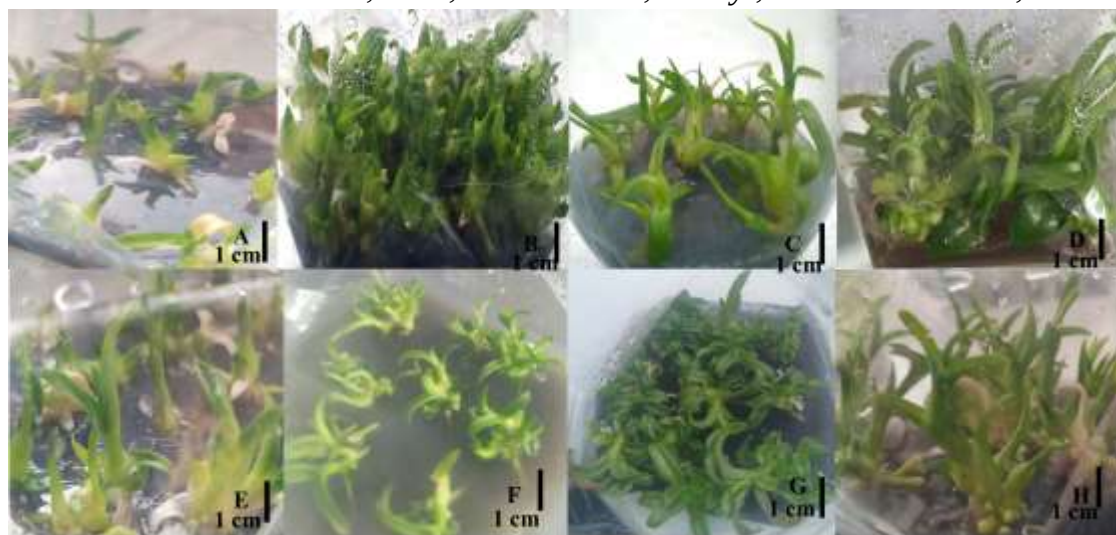
**Bảng 3.11.** Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân của chồi xử lý đột biến sau 8 tuần

| Công thức | Chất điều hoà sinh trưởng (mg/L) |     | Chỉ tiêu theo dõi       |                         |                        |                           |               |                              |                         |                         |                           |               |
|-----------|----------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|---------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|
|           |                                  |     | Chồi xử lý colchicine   |                         |                        |                           |               | Chồi xử lý dimethyl sulphate |                         |                         |                           |               |
|           | BA                               | IAA | Hệ số nhân chồi         | Số lá/chồi              | Chiều cao/chồi (cm)    | Đường kính thân chồi (cm) | Đặc điểm chồi | Hệ số nhân chồi              | Số lá/chồi              | Chiều cao/chồi (cm)     | Đường kính thân chồi (cm) | Đặc điểm chồi |
| ĐC        | 0,0                              | 0,0 | 2,13±0,24 <sup>c</sup>  | 4,07±0,18 <sup>bc</sup> | 2,87±0,10 <sup>d</sup> | 0,21±0,02 <sup>d</sup>    | +             | 1,73±0,18 <sup>d</sup>       | 2,33±0,13 <sup>d</sup>  | 2,36±0,05 <sup>d</sup>  | 0,18±0,02 <sup>d</sup>    | +             |
| CT1       | 1,5                              | 0,0 | 2,73±0,23 <sup>bc</sup> | 3,37±0,15 <sup>cd</sup> | 3,17±0,19 <sup>d</sup> | 0,31±0,03 <sup>c</sup>    | +             | 1,93±0,18 <sup>d</sup>       | 3,00±0,20 <sup>c</sup>  | 2,84±0,07 <sup>c</sup>  | 0,28±0,03 <sup>c</sup>    | ++            |
| CT2       | 1,5                              | 0,1 | 3,00±0,28 <sup>b</sup>  | 4,40±0,25 <sup>b</sup>  | 4,49±0,26 <sup>b</sup> | 0,37±0,02 <sup>b</sup>    | +++           | 2,40±0,21 <sup>cd</sup>      | 3,07±0,18 <sup>c</sup>  | 2,80±0,07 <sup>c</sup>  | 0,33±0,02 <sup>bc</sup>   | ++            |
| CT3       | 1,5                              | 0,3 | 3,40±0,21 <sup>b</sup>  | 4,13±0,27 <sup>bc</sup> | 3,77±0,26 <sup>c</sup> | 0,40±0,02 <sup>b</sup>    | +++           | 3,27±0,18 <sup>b</sup>       | 3,53±0,19 <sup>bc</sup> | 2,95±0,10 <sup>bc</sup> | 0,35±0,02 <sup>bc</sup>   | +++           |
| CT4       | 1,5                              | 0,5 | 4,47±0,26 <sup>a</sup>  | 5,27±0,18 <sup>a</sup>  | 5,55±0,23 <sup>a</sup> | 0,55±0,02 <sup>a</sup>    | ++++          | 4,33±0,27 <sup>a</sup>       | 4,60±0,24 <sup>a</sup>  | 3,48±0,15 <sup>a</sup>  | 0,50±0,02 <sup>a</sup>    | ++++          |
| CT5       | 1,5                              | 0,7 | 2,80±0,22 <sup>bc</sup> | 3,40±0,13 <sup>d</sup>  | 3,03±0,10 <sup>d</sup> | 0,39±0,02 <sup>b</sup>    | ++            | 2,93±0,31 <sup>bc</sup>      | 3,80±0,17 <sup>b</sup>  | 3,13±0,17 <sup>b</sup>  | 0,37±0,03 <sup>b</sup>    | +++           |

Chú thích: Các chữ (a, b, c...) khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

+: Chồi thấp, nhỏ yếu, màu xanh vàng, ít lá, lá mảnh, nhỏ.; ++: Chồi cao trung bình, cây nhỏ yếu, có màu xanh nhạt, lá mảnh, nhỏ.;

+++ : Chồi cao, khoẻ, có màu xanh, lá dày.; ++++ : Chồi cao, to khoẻ, có màu xanh đậm, lá nhiều và dày.



**Hình 3.16.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng nhân chồi đã xử lý hoá chất.

(A. chồi xử lý hoá chất trong môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng (ĐC); B. Chồi xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,3 mg/L IAA; C. chồi xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,1 mg/L IAA; D. chồi xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L IAA; E. chồi xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,7 mg/L IAA; F. chồi xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA ; G. chồi xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L IAA; H. chồi xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,3 mg/L IAA.)

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

Những chồi đạt tiêu chuẩn có 4-5 lá và cao từ 3-4 cm được lựa chọn để thử nghiệm. Chồi được lựa chọn có 2 loại đó là chồi được xử lý bằng colchicine và chồi xử lý bằng DMS. Các chỉ tiêu được theo dõi sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.12, bảng 3.13.

**Bảng 3.12.** 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 <sup>c</sup> | 3,53±0,46 <sup>bc</sup> | 1,51±0,21 <sup>d</sup>  | 3,47±0,07 <sup>d</sup> | 4,53±0,27 <sup>bc</sup> | +                       |
| CT1       | 0,1                | 91,19±1,21 <sup>b</sup> | 3,97±0,29 <sup>bc</sup> | 2,42±0,17 <sup>c</sup>  | 3,96±0,17 <sup>c</sup> | 4,79±0,23 <sup>bc</sup> | ++                      |
| CT2       | 0,3                | 93,82±0,92 <sup>b</sup> | 4,07±0,38 <sup>b</sup>  | 3,02±0,31 <sup>bc</sup> | 4,19±0,12 <sup>c</sup> | 5,07±0,25 <sup>b</sup>  | +++                     |
| CT3       | 0,5                | 100±0,00 <sup>a</sup>   | 4,47±0,24 <sup>b</sup>  | 3,25±0,18 <sup>b</sup>  | 4,71±0,12 <sup>b</sup> | 5,00±0,20 <sup>b</sup>  | +++                     |
| CT4       | 0,7                | 100±0,00 <sup>a</sup>   | 5,73±0,25 <sup>a</sup>  | 4,54±0,18 <sup>a</sup>  | 5,81±0,21 <sup>a</sup> | 6,27±0,23 <sup>a</sup>  | ++++                    |
| CT5       | 1                  | 81,71±1,15 <sup>d</sup> | 2,93±0,48 <sup>c</sup>  | 2,53±0,36 <sup>bc</sup> | 4,21±0,11 <sup>c</sup> | 4,20±0,15 <sup>c</sup>  | +                       |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

+: 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.

Khả năng ra rễ của chồi Giả hạc tím Huế đã được xử lý colchicine là rất tốt, tỷ lệ ra rễ thấp nhất đạt 81,71 %, với số rễ trung bình 2,93 rễ/chồi, chiều dài trung bình của rễ đạt là 2,53 cm, chồi đạt chiều cao 4,21 cm (CT5). Khả năng ra rễ đạt tốt nhất ở công thức thí nghiệm CT4 khi bổ sung vào môi trường 0,7 mg/L NAA với tỷ lệ ra rễ đạt 100 %, số rễ trung bình 5,73 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 4,54 cm, chiều cao của chồi đạt 5,81 cm, có 6,27 lá/chồi, rễ to mập, có màu trắng xanh, có nhiều tơ lông bao phủ, cây xanh tốt, nhiều lá, xanh to khỏe. Các thí nghiệm đều cho kết quả rất tốt kể cả công thức đối chứng khi không dùng chất điều hoà sinh trưởng bổ sung vào môi trường với kết quả được ghi nhận là tỷ lệ ra rễ đạt 87,29 %, số rễ đạt được 3,53 rễ/chồi, chiều dài của rễ đạt 1,51 cm, chiều cao cây là 3,47 cm và có 4,53 lá/cây (Bảng 3.12).



**Hình 3.17.1** Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy.

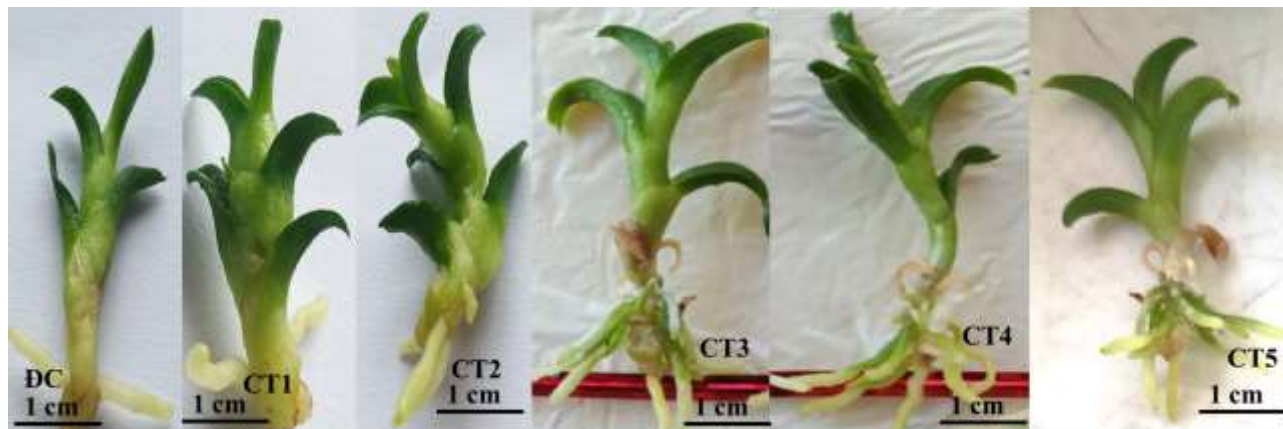
**Bảng 3.13.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi đột biến xử lý bằng DMS sau 8 tuần nuôi cấy

| 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 <sup>e</sup> | 2,20±0,28 <sup>d</sup>  | 1,05±0,20 <sup>d</sup> | 2,25±0,05 <sup>d</sup>  | 4,07±0,21 <sup>b</sup> | +                       |
| CT1       | 0,1                | 80,04±2,23 <sup>d</sup> | 2,23±0,27 <sup>d</sup>  | 1,68±0,30 <sup>c</sup> | 3,52±0,07 <sup>cd</sup> | 4,07±0,21 <sup>b</sup> | +                       |
| CT2       | 0,3                | 86,86±0,95 <sup>c</sup> | 3,07±0,23 <sup>c</sup>  | 2,47±0,20 <sup>b</sup> | 3,68±0,10 <sup>bc</sup> | 4,37±0,26 <sup>b</sup> | ++                      |
| CT3       | 0,5                | 93,79±0,93 <sup>b</sup> | 3,60±0,39 <sup>bc</sup> | 3,37±0,13 <sup>a</sup> | 3,81±0,13 <sup>bc</sup> | 5,13±0,21 <sup>a</sup> | +++                     |
| CT4       | 0,7                | 100±0,00 <sup>a</sup>   | 4,67±0,27 <sup>a</sup>  | 3,73±0,22 <sup>a</sup> | 4,47±0,19 <sup>a</sup>  | 5,60±0,16 <sup>a</sup> | ++++                    |
| CT5       | 1,0                | 95,78±1,54 <sup>b</sup> | 4,13±0,26 <sup>ab</sup> | 3,27±0,15 <sup>a</sup> | 4,05±0,17 <sup>b</sup>  | 3,87±0,19 <sup>b</sup> | ++                      |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test. +: 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.

Khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng DMS ở môi trường không có bổ sung kích thích sinh trưởng NAA có tỷ lệ ra rễ đạt 73,63 % có số rễ đạt 2,20 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 1,05 cm, chiều cao của cây hoàn chỉnh 2,25 cm và có 4,07 lá/cây (ĐC), rễ nhỏ, ngắn, có màu trắng hơi xanh, cây màu xanh hơi vàng, thân nhỏ, lá mảnh. Khả năng ra rễ đạt hiệu quả tốt nhất là CT4 với môi trường dinh dưỡng được bổ sung là 0,7 mg/L NAA, kết quả tỷ lệ ra rễ, số rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, số lá cây tương ứng là 100 %; 4,67 rễ/chồi; 3,73 cm; 4,47 cm; 5,60 lá cây, rễ có đặc điểm to mập,

có màu trắng xanh, có nhiều tơ lông bao quanh, thân chồi xanh tốt. Bổ sung hàm lượng NAA ít hơn hay nhiều hơn 0,7 mg/L đều có hiệu quả không tốt bằng (Bảng 3.13).



**Hình 3.17.2** Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng DMS sau 8 tuần nuôi cấy.

Nghiên cứu của Srivastava và cộng sự (2018) trên lan *Aerides crispa* Lindl., tác giả dùng colchicine, EMS và tia gama xử lý đột biến, chồi tạo ra nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung 8,88  $\mu\text{M}$  BA và 2,45  $\mu\text{M}$  IBA, sau 120 ngày đã ghi nhận khả năng ra rễ của lan này là 100% chồi có rễ và chiều dài rễ từ 0,5 – 2,3 cm [166]. Khả năng ra rễ của chồi đột biến cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Aziz và cộng sự (2019) trên chồi lan *Phalaenopsis amabilis* được xử lý colchicine và nuôi cấy trên môi trường có bổ sung TDZ và BA với nồng độ 0 - 1 mg/L, sau 8 tuần nuôi cấy số rễ mỗi chồi có được từ 2 – 10 rễ/chồi, và tất cả các chồi thí nghiệm đều có rễ [52]. Theo công bố của Lê Thiên Vinh và cộng sự (2022), khả năng ra rễ của chồi lan *D. anosmum* đột biến tự nhiên là rất tốt trên môi trường có bổ sung 1 mg/L IBA hoặc 1 mg/L NAA với tỷ lệ ra rễ đạt 97,08-99,06 %, số rễ là từ 7,73-8,53 rễ/chồi [45].

Như vậy, từ kết quả nghiên cứu và các công bố trước đây đã cho thấy khả năng ra rễ của cây lan con Giả hạc (*D. anosmum*) *in-vitro* là rất cao, đặc biệt là khi môi trường nuôi cấy có bổ sung thêm chất điều hoà sinh trưởng và NAA là chất phù hợp cho lan này.

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

Từ kết quả thí nghiệm tạo dòng đột biến, đã lựa chọn ra một số dòng triển vọng để đánh giá sâu hơn về những biến đổi hình thái, đa dạng di truyền. Nghiên cứu lựa chọn 1 dòng tạo ra từ mô sẹo không xử lý hoá chất, 27 dòng tạo ra từ protocorm hoặc mô sẹo có xử lý hoá chất đột biến và 6 dòng tạo ra từ gieo hạt *in-vitro* không xử lý hoá chất đột biến (Phụ lục 15). Thu

lấy mẫu protocorm, mô sẹo, thân, lá, rễ của những dòng lan đột biến để quan sát đặc điểm, hình thái bên ngoài (hình dạng, màu sắc, kích thước), đặc điểm tế bào.

### 3.3.1. Đặc điểm hình thái của cây đột biến

Các mẫu được xử lý colchicine và DMS có xuất hiện những biến dị hình thái từ giai đoạn đầu tiên (mô sẹo, protocorm) sau 6-8 tuần nuôi cấy. Mẫu biến dị này lựa chọn và làm nguyên liệu nhân giống. Các đặc điểm biến dị khác với cây đối chứng về thân, lá, rễ và hoa được mô tả lại, đây là một trong những chỉ tiêu để đánh giá mức độ đột biến và nhận dạng những dòng này. Kết quả được thể hiện chi tiết qua bảng Bảng 3.14.



**Hình 3.18.** Một số hình dạng bất thường của protocorm xử lý hoá chất. (A. không xử lý hoá chất; B. Xử lý colchicine 50 ppm trong 2 giờ; C. Xử lý colchicine 50 ppm trong 4 giờ; D. Xử lý colchicine 100 ppm trong 2 giờ; E. Xử lý colchicine 100 ppm trong 4 giờ; F. Xử lý colchicine 200 ppm trong 2 giờ; G. Xử lý colchicine 200 ppm trong 4 giờ; H. Xử lý colchicine 200 ppm trong 6 giờ; I. Xử lý colchicine 400 ppm trong 2 giờ; J. Xử lý colchicine 400 ppm

trong 4 giờ; **K.** Xử lý colchicine 400 ppm trong 6 giờ; **L.** Xử lý DMS 50 ppm trong 2 giờ; **M.** Xử lý DMS 50 ppm trong 4 giờ; **N.** Xử lý DMS 50 ppm trong 6 giờ; **O.** Xử lý DMS 100 ppm trong 2 giờ; **P.** Xử lý DMS 100 ppm trong 4 giờ; **Q.** Xử lý DMS 100 ppm trong 6 giờ; **R.** Xử lý DMS 200 ppm trong 2 giờ; **S.** Xử lý DMS 200 ppm trong 4 giờ; **T.** Xử lý DMS 200 ppm trong 6 giờ; **U.** Xử lý DMS 400 ppm trong 2 giờ; **W.** Xử lý DMS 400 ppm trong 4 giờ; **X.** Xử lý colchicine 50 ppm trong 6 giờ.)

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 protocorm được xử lý bằng colchicine lớn hơn so với protocorm xử lý bằng DMS và đối chứng. Hình dạng cũng thay đổi nhiều, không còn giữ hình dạng bầu tròn như protocorm đối chứng, lá mầm bị xoắn, sần xù. Quá trình tăng sinh tạo ra các thể giống PLBs không đồng đều, phát triển toả tròn ra xung quanh, hình thành nên khối hình dạng không ổn định (Bảng 3.14, Hình 3.18).



**Hình 3.19.** Một số hình dạng bất thường của mô sẹo xử lý hoá chất. (**A.** Không xử lý hoá chất; **B.** Xử lý colchicine 50 ppm trong 2 giờ; **C.** Xử lý colchicine 50 ppm trong 4 giờ; **D.** Xử lý

*colchicine 50 ppm trong 6 giờ; E. Xử lý colchicine 100 ppm trong 2 giờ; F. Xử lý colchicine 100 ppm trong 4 giờ; G. Xử lý colchicine 100 ppm trong 8 giờ; H. Xử lý colchicine 200 ppm trong 2 giờ; I. Xử lý colchicine 200 ppm trong 4 giờ; J. Xử lý colchicine 200 ppm trong 8 giờ; K. Xử lý colchicine 400 ppm trong 2 giờ; L. Xử lý colchicine 400 ppm trong 4 giờ; M. Xử lý DMS 50 ppm trong 4 giờ; N. Xử lý DMS 50 ppm trong 8 giờ; O. Xử lý DMS 50 ppm trong 10 giờ; P. Xử lý DMS 100 ppm trong 2 giờ; Q. Xử lý DMS 100 ppm trong 4 giờ; R. Xử lý DMS 100 ppm trong 6 giờ; S. Xử lý DMS 200 ppm trong 2 giờ; T. Xử lý DMS 200 ppm trong 4 giờ; U. Xử lý DMS 200 ppm trong 6 giờ; W. Xử lý DMS 400 ppm trong 2 giờ; X. Xử lý DMS 400 ppm trong 4 giờ.)*

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 như thay đổi về màu sắc, có màu trắng, vàng, nâu những mô sẹo này cũng bắt đầu chết ở tuần thứ 4-5. Quá trình sinh trưởng ở một số mô sẹo có xuất hiện các phiến mỏng, màu trắng hơi xanh bao bên ngoài, các phiến này uốn lượn và gấp khúc, và nó không có khả năng phát triển thành chồi, sẽ úa vàng, chết sau đó 1-2 tuần. Những mô sẹo này phát triển có lá mầm to và dày hơn so với đối chứng, có màu xanh lá đậm (Bảng 3.14, hình 3.19).

Từ các mô sẹo, protocorm và PLB biến dị này có mầm chồi phát triển thành chồi, những chồi này có những biểu hiện ngoại hình khác so với chồi đối chứng không xử lý hoá chất. Những đặc điểm khác này chủ yếu tập trung vào hình dạng, màu sắc, kích thước của lá và thân của chồi. (Bảng 3.14, hình 3.20).

Số lượng chồi biến dị tạo ra tương đối lớn, tuy nhiên để phát triển thành cây hoàn chỉnh lại chiếm số lượng thấp. Những chồi “bạch tạng”, chồi có lá ngắn và bề mặt xù xì bị chết sau khi cấy sang môi trường nhân nhanh hoặc ra rễ, một số chồi khác lại phát triển chậm sau tuần thứ 8 nuôi cấy, lá chồi bắt đầu úa héo, chồi bước vào trạng thái thất vọng và các mầm ngủ ở thân bắt đầu phát triển. (Bảng 3.14, hình 3.20).



**Hình 3.20.** Hình thái chồi tái sinh từ mô sẹo và protocorm xử lý hoá chất.(A. Chồi không xử lý hoá chất; B. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 50 ppm trong 2 giờ; C. Chồi từ protocorm xử lý DMS 50 ppm trong 2 giờ; D. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 50 ppm trong 4 giờ; E. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 50 ppm trong 8 giờ; F. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 200 ppm trong 6 giờ ; G. Chồi từ mô sẹo xử lý DMS 100 ppm trong 4 giờ; H. Chồi từ mô sẹo xử lý DMS 100 ppm trong 8 giờ; I. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 200 ppm trong 2 giờ; J. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 400 ppm trong 2 giờ; K. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 100 ppm trong 4 giờ; L. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 400 ppm trong 4 giờ; M. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 100 ppm trong 6 giờ; N. Chồi từ mô sẹo xử lý DMS 200 ppm trong 2 giờ; O. Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 50 ppm trong 10 giờ; P. Chồi từ mô sẹo xử lý DMS 50 ppm trong 8 giờ, Q. Chồi từ protocorm xử lý DMS 100 ppm trong 4 giờ; R. Chồi từ protocorm xử lý DMS 200 ppm trong 4 giờ; S. Chồi từ protocorm xử lý cochicine 50 ppm trong 4 giờ; T; U. Chồi từ protocorm xử lý DMS 200 ppm trong 6 giờ; W. Chồi từ mô sẹo xử lý DMS 100 ppm trong 6 giờ.)

**Bảng 3.14.** Một số đặc điểm hình thái của mẫu được xử lý hoá chất và mẫu đối chứng

| Mẫu xử lý         | Đặc điểm          | Giai đoạn/bộ phận                                                                                            |                                                                                |                                                                                           |                                                                                          |                                                                          |                                                                                                                                                      | Ghi chú                                                                                                 |
|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |                   | Protocorm/ mô sẹo                                                                                            | Chồi                                                                           | Lá                                                                                        | Thân                                                                                     | Rễ                                                                       | Hoa                                                                                                                                                  |                                                                                                         |
| <b>Đối chứng</b>  | <i>Hình dạng</i>  | Protocorm có dạng tròn. Mô sẹo có dạng khối, hơi tròn, bề mặt hơi phẳng đều, bên trong đặc và mọng nước.     | Lên thẳng, thuôn dài                                                           | Hình mũi mác nhọn, thuôn dài                                                              | Dạng trụ tròn, các đốt đều nhau.                                                         | Dạng trụ tròn, có lớp lông trắng phủ bên ngoài.                          | khuôn hoa hình sao, đều, cân đối, hương thơm dịu                                                                                                     | Hình dạng ổn định, sự sai khác ở các mẫu rất ít.                                                        |
|                   | <i>Màu sắc</i>    | Protocorm có màu xanh lá. Mô sẹo Màu xanh lá nhạt có hơi vàng, phần mới hình thành có màu xanh trắng.        | Có màu xanh lá, phần gốc hơi trắng                                             | Có màu xanh                                                                               | Có màu xanh lá                                                                           | Màu xanh, gần phần đầu rễ có màu xanh nhạt hoặc trắng                    | Màu tím hồng, tím nhạt, cánh có viền tím.                                                                                                            | Ít có sự thay đổi.                                                                                      |
|                   | <i>Kích thước</i> | Protocorm: Đồng đều, đường kính 1-1,5 mm. Mô sẹo: 0,5-1 cm                                                   | Nhỏ, cao 1-2 cm, đường kính 0,2-0,4 cm                                         | Lá dài 1-1,5cm, rộng 0,2-0,3 cm                                                           | Cao 4-5 cm, đường kính từ 0,3-0,4 cm, và có 4-5 đốt                                      | Có đường kính 0,3-1,5 mm, dài 2-4 cm                                     | Đường kính hoa 8-11cm                                                                                                                                | Hoa quan sát ở cây 3-4 năm tuổi                                                                         |
| <b>Colchicine</b> | <i>Hình dạng</i>  | Không ổn định, dạng khối, dạng tấm, bề mặt sần xù. Bên trong đặc một số trường hợp là xốp, có khoang trống.  | Có nhiều hình dạng: hơi dẹp, tròn bị xoắn.                                     | Không ổn định, nhiều biến đổi dạng xoắn, lá dày, bề mặt bóng, một số có sè thủy ở chóp lá | Dạng trụ tròn, đốt thưa, nhưng không đều nhau, một số ít có đốt ngắn và phình to.        | To, đầu rễ bóng, mọng nước, có lớp lông phủ bên ngoài, rễ xuất hiện sớm. | Khuôn hoa hình sao, cân đối. cánh hoa thuôn dài và nhọn, hương thơm hơi nồng gắt.                                                                    | Có sự biến đổi nhiều và không ổn định.                                                                  |
|                   | <i>Màu sắc</i>    | Có nhiều dạng màu sắc như xanh lá, hơi vàng, trắng, vàng, nâu                                                | Màu xanh đậm hoặc nhạt, có chồi màu trắng hoặc màu tím, một số có màu hơi vàng | Xanh đậm hoặc nhạt, và có cả màu trắng màu tím. Một số có màu hơi vàng.                   | Có màu xanh lá, một số trường hợp có màu trắng xanh hoặc màu hơi tím                     | Màu xanh hơi trắng.                                                      | Có nhiều biến đổi như màu tím hồng, hồng hơi trắng, viền tím cánh hoa rộng hơn và màu nhạt hơn, hoặc không còn. một số hoa có đốm tím đậm trên cánh. | Mô sẹo/ protocorm có màu trắng, vàng hoặc nâu đều bị chết sau khi cấy chuyển, chồi có màu này cũng vậy. |
|                   | <i>Kích thước</i> | Không đồng đều, 0,5-1,5 cm                                                                                   | Thường lớn, cao từ 1-3cm, đường kính 0,3-0,6 cm                                | Dài 1,5-2cm, rộng 0,3-0,5 cm                                                              | Cao 4-6 cm, đường kính 0,3-0,6 cm và có 4-5 đốt                                          | Dài 3-5 cm. đường kính 1-1,5 mm.                                         | Đường kính mặt hoa 9-13 cm                                                                                                                           | Các mẫu có sự biến động lớn.                                                                            |
| <b>DMS</b>        | <i>Hình dạng</i>  | Không ổn định, dạng khối, dạng tấm, bề mặt sần xù. Bên trong đặc, mọng nước, một số có phiến mỏng bao quanh. | Thường ngắn, có dạng tròn hoặc hơi dẹp, một số bị xoắn cuộn.                   | Bề mặt sần xù, lá dày, đầu lá hơi bo tròn, một số lá cuộn tròn dạng ống.                  | Dạng trụ tròn, thân thường ngắn, nhiều đốt, phình to, thân có nhiều mầm phát triển chồi. | To, đầu rễ bóng, bề mặt hơi khô, có lớp lông trắng phủ bên ngoài         | Cơ bản hoa vẫn hình sao nhưng không đều, một số trường hợp hoa bị biến dạng, cánh xoắn hoặc cuộn lại, hương thơm dịu.                                | Có sự biến đổi nhiều và không ổn định.                                                                  |
|                   | <i>Màu sắc</i>    | Có màu xanh nhạt, hoặc màu xanh hơi vàng hoặc nâu.                                                           | Có màu xanh đậm hoặc màu hơi ngả vàng.                                         | Màu xanh đậm hoặc hơi ngả vàng                                                            | Màu xanh đậm hoặc hơi ngả vàng                                                           | Màu xanh hơi trắng hoặc vàng nhạt                                        | Màu tím hồng, hoặc hồng nhạt                                                                                                                         | Thay đổi nhiều về độ đậm nhạt của màu sắc.                                                              |
|                   | <i>Kích thước</i> | Không đồng đều, 0,5-1 cm                                                                                     | cao 1-2 cm, đường kính 0,3-0,5 cm                                              | Dài 1-1,5cm, rộng 0,3-0,5cm                                                               | Cao 3-5 cm đường kính 0,3-0,6 cm                                                         | Dài 3-4cm. đường kính 1-1,5 mm.                                          | Đường kính hoa 8-9 cm                                                                                                                                | Tương đối ổn định.                                                                                      |



**Hình 3.21.** 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)

Ngoài các đặc điểm hình thái cơ quan sinh dưỡng biến đổi khác với cây đối chứng. Một điểm khác biệt rất quan trọng cũng xuất hiện đó là những thay đổi về màu sắc, hình dạng và kích thước của hoa. Trong 28 dòng đột biến được lựa chọn nhân giống và trồng thử nghiệm ở vườn đã có 11 dòng cho ra hoa, với mặt hoa có đặc điểm khác với hoa của cây ban đầu. Có 2 dòng M9, M11 có hoa xuất hiện cánh hoa bị biến dạng, làm cho cánh hoa bị uốn xoắn cong lại, sắc tím của hoa nhạt, mắt hoa không phân biệt rõ. Dòng M17, M8, M2 ra hoa có kích thước to nhưng màu sắc nhạt hơn so với hoa cây đối chứng, viền tím ở cánh hoa cũng không còn xuất hiện. Hoa của dòng M5, M7 có màu hoa bị biến đổi, viền tím ở cánh hoa không còn xuất hiện, cánh hoa còn xuất hiện những đốm nhỏ màu tím, mắt hoa cũng không thấy rõ. Có 2 dòng HX4, HX5 hoa có cánh hoa trở nên thuần, dài hơn và không còn căng bóng như hoa cây đối chứng.

Hoa của dòng M14 có kích thước nhỏ, nhưng cánh hoa trở nên dày, giòn, bẻ rất dễ gãy. Ngoài ra còn có hoa của dòng M16 cánh hoa mỏng, màu hoa nhạt, viền tím cánh hoa không còn, mắt hoa cũng không phân biệt rõ, màu mắt hoá lại đậm hơn (Bảng 3.14, hình 3.21).

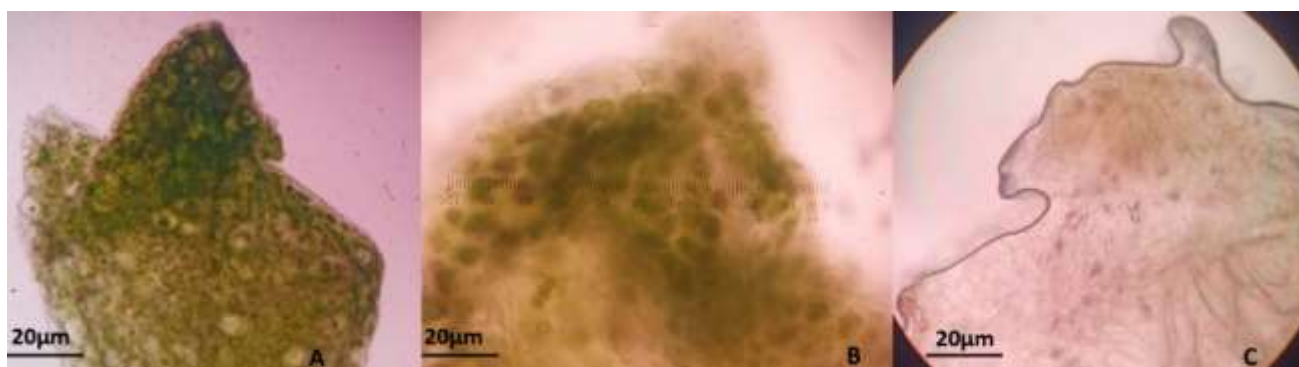
Nghiên cứu của Zhang và Gao (2020), về tạo cây tứ bội *in-vitro* từ protocorm ở loài *D. officinale*, có kết luận các đặc điểm kiểu hình của cây con lưỡng bội và tứ bội có sự khác biệt. Cây tứ bội thể hiện sự khác biệt ở một số đặc điểm kiểu hình như chiều cao cây con, chiều dài lá và chiều dài rễ là lớn hơn so với cây con lưỡng bội. Các đặc điểm đường kính thân, đường kính rễ, kích thước hoa ở cây tứ bội lớn hơn nhiều so với cây lưỡng bội. Tuy nhiên, số lá, chiều rộng lá, số đốt thân, chiều dài đốt, số rễ, kích thước lá, chiều dài trụ hoa là tương tự nhau giữa hai thể [188]. Một nghiên cứu khác của Srivastava và cộng sự (2018), tạo đột biến *in-vitro* lan *Aerides crispera* Lindl bằng colchicine, EMS và bức xạ gamma, kết quả nghiên cứu tạo ra các dòng biến dị về hình dạng lá, màu sắc, sọc trắng, độ dày, chiều dài, rộng cũng như chiều dài và độ dày của rễ [166].

### **3.3.2. Đặc điểm tế bào cây đột biến**

#### **3.3.2.1. Đặc điểm tế bào biểu mô lá, thân và rễ**

Thực hiện làm tiêu bản quan sát tế bào đỉnh sinh trưởng, thân non, đầu rễ và biểu mô lá của các mẫu thí nghiệm. Đỉnh sinh trưởng ở các mẫu đối chứng, xử lý colchicine và xử lý DMS về hình thái có sự biến đổi khác nhau, đỉnh sinh trưởng xử lý colchicine có tế bào kích thước lớn, sắp xếp rời rạc, không theo hệ thống. Đối với đỉnh sinh trưởng xử lý DMS có hình dạng không ổn định, tế bào có xu hướng kéo dài. Mẫu đối chứng có màu xanh đậm, tế bào xếp chặt chẽ, hình dạng tròn và ổn định hơn, ít có sự thay đổi (Hình 3.22). Kết quả này cho thấy 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.

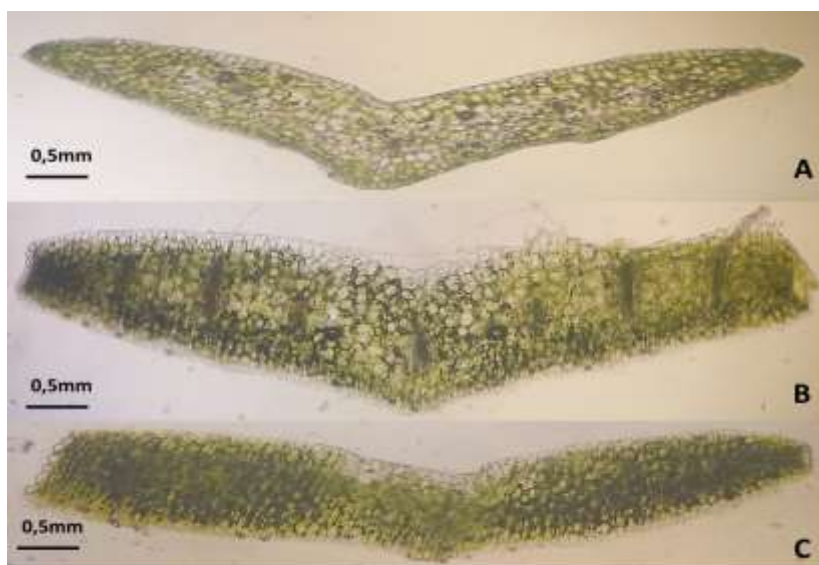
Quan sát mặt cắt ngang phiến lá của các mẫu thí nghiệm nhận thấy phiến lá của cây đột biến bằng colchicine và DMS là dày hơn so với cây không được xử lý, đặc biệt ở mẫu lá xử lý colchicine có tế bào lớn, lớp tế bào ngoài cùng của lá rất dày và lá có nhiều mạch dẫn, chiều dày của phiến lá của những mẫu xử lý bằng colchicine dao động trong khoảng 0,81 mm đến 0,97 mm, đạt cao nhất là ở mẫu M17 (0,97 mm) (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.23B, 3.24).



**Hình 3.22.** Đỉnh sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế được quan sát dưới kính hiển vi.

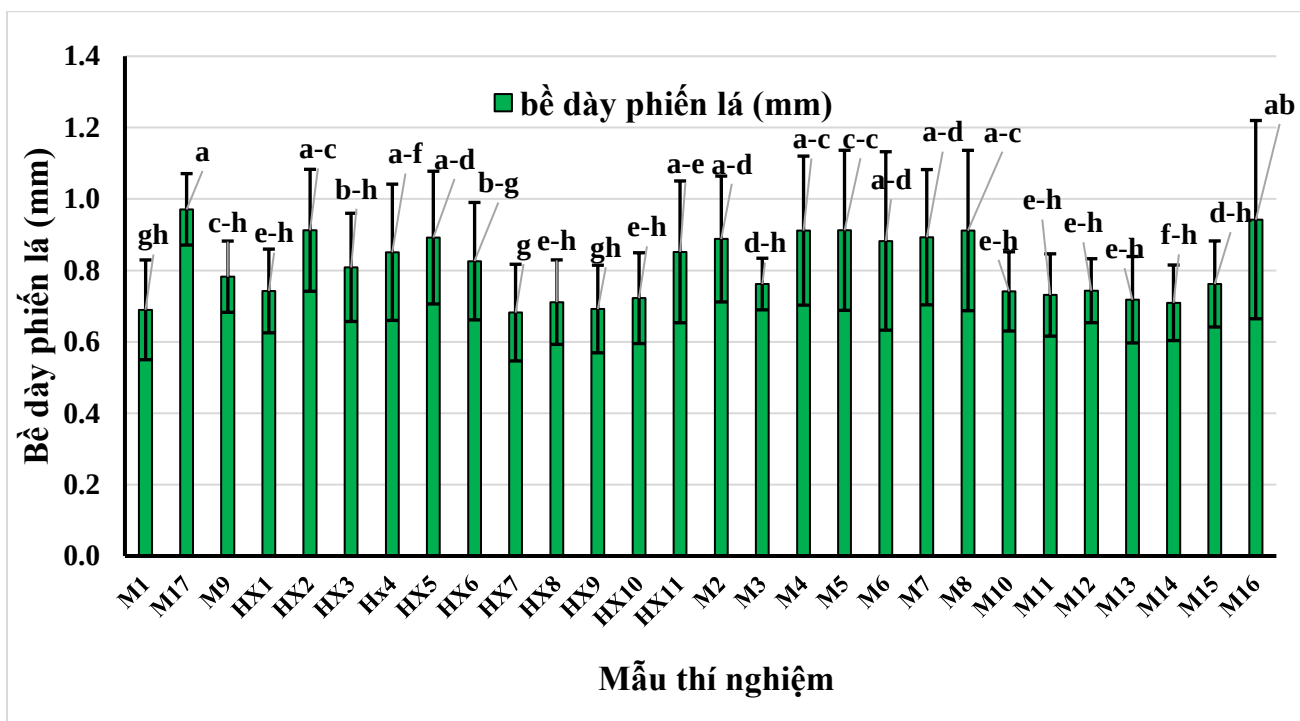
**A.** Mẫu đối chứng không xử lý hoá chất; **B.** mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17); **C** Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9).

Ở mẫu lá của cây xử lý DMS không thấy rõ mạch dẫn, lá có màu xanh đậm, các tế bào có xu hướng kéo dài, điều này khác với mẫu không xử lý và mẫu xử lý bằng colchicine. Chiều dày phiến lá mẫu xử lý bằng DMS đạt từ 0,68 mm đến 0,78 mm, cao nhất là ở mẫu M9 (0,78 mm) (Bảng P13-3.5 phụ lục 13, hình 3.23C, 3.24). So với lá của cây đối chứng các lớp tế bào đều nhau, tế bào biểu bì hình dạng như nhau, dạng hình tròn, phiến lá mỏng dần về hai bên mép, chiều dày của phiến lá đạt là 0,69 mm, lượng diệp lục phân bố đều hai bên mặt lá (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.23A, 3.24).



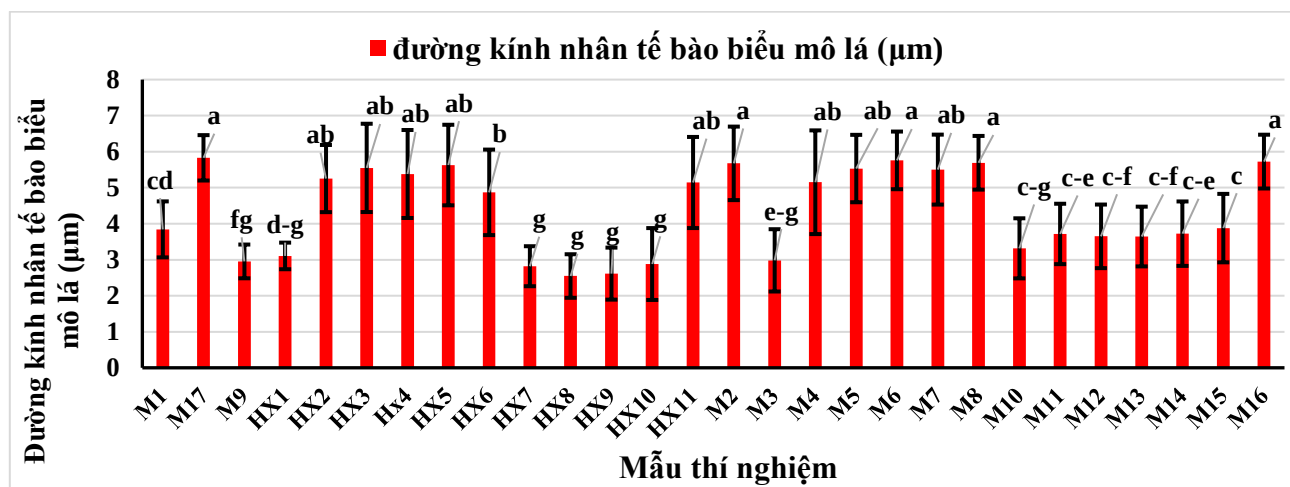
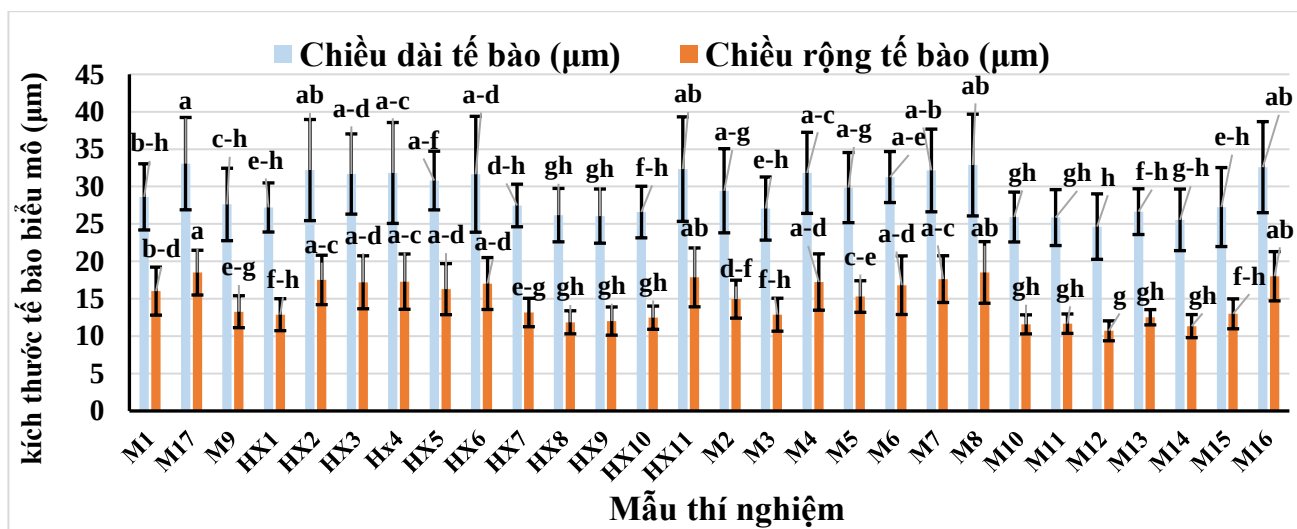
**Hình 3.23.** Mặt cắt ngang của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi.

**A:** 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).

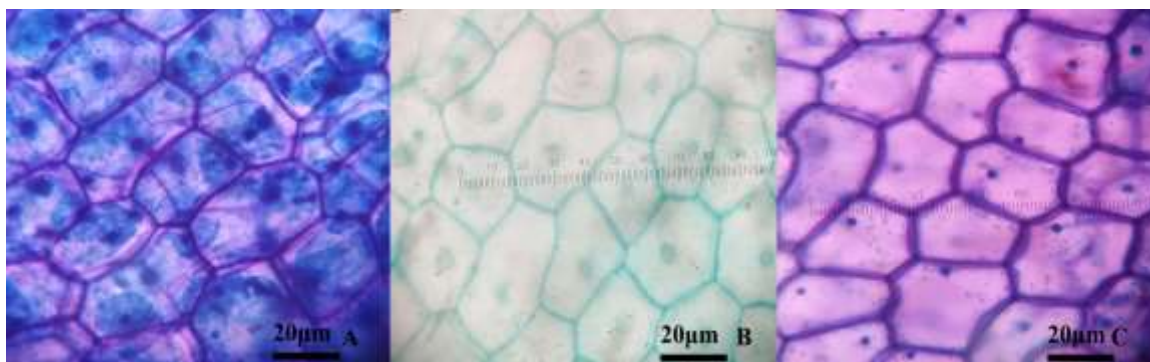


**Hình 3.24:** Biểu đồ bề dày của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi. (Các chữ cái khác nhau (a, b, c... trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test))

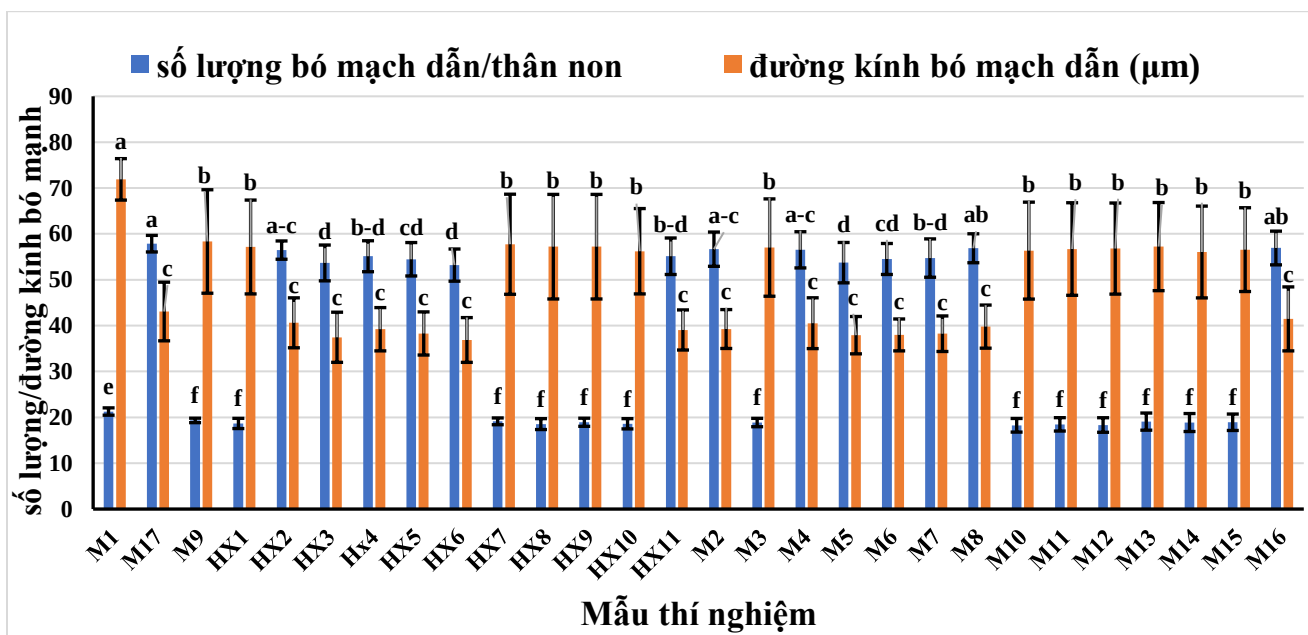
Các tế bào biểu mô lá quan sát từ mẫu xử lý bằng colchicine có kích thước lớn với chiều dài từ 29,44 - 33,06  $\mu\text{m}$ ; chiều rộng các tế bào là từ 14,94 - 18,49  $\mu\text{m}$ , thành tế bào dày, nhân tế bào lớn đường kính nhân từ 4,87 - 5,83  $\mu\text{m}$ ; tế bào sắp xếp không trật tự, hình dạng tế bào có sự biến đổi không ổn định (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.25; 3.26B) điều này khác với các tế bào mẫu đối chứng có kích thước tế bào trung bình có chiều dài 28,62  $\mu\text{m}$ , chiều rộng 16,02  $\mu\text{m}$ , đường kính nhân 3,84  $\mu\text{m}$  (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.25; 3.26A). Mẫu được xử lý bằng DMS, các tế bào có sự thay đổi lớn về hình dạng và trật tự sắp xếp, kích thước tế bào không thay đổi nhiều so với đối chứng, chiều dài tế bào từ 24,64 - 27,60  $\mu\text{m}$ , chiều rộng tế bào từ 10,71 - 13,27  $\mu\text{m}$ , tế bào có thành tế bào dày, đường kính nhân từ 2,55 - 3,88  $\mu\text{m}$  (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.25; 3.26C). Kết quả cho thấy Colchicine và DMS đã tác động làm thay cấu trúc, hình dạng, kích thước tế bào biểu mô lá, từ đó dẫn đến những thay đổi về hình thái lá lan Giả hạc tím Huế.



**Hình 3.25:** Biểu đồ kích thước (chiều dài, chiều rộng) và đường kính nhân của tế bào biểu mô lá. (Các chữ cái (a, b, c...) khác nhau trên cột cùng màu chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test)).

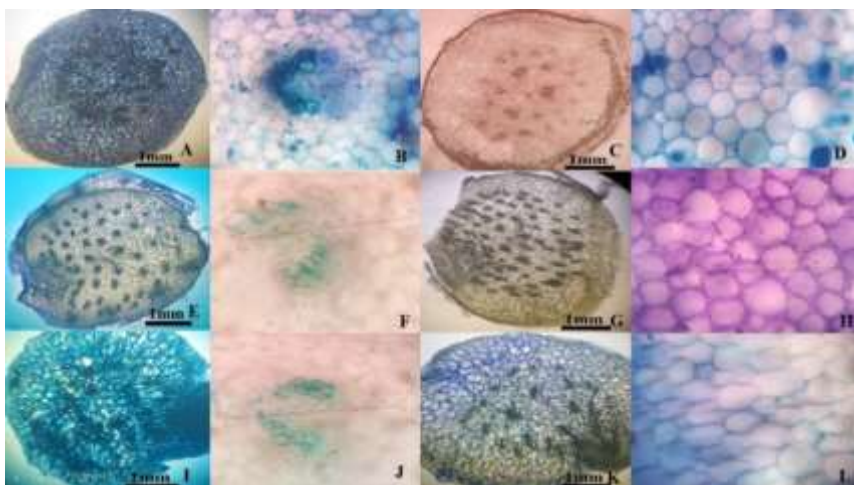


**Hình 3.26.** Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế. (A. Tế bào lá đối chứng không xử lý hoá chất; B. mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17) ; C. Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9).)



**Hình 3.27:** Biểu đồ số lượng bó mạch và đường kính bó mạch dẫn trong thân non của lan Giả hạc tím Huế. (Các chữ cái (a,b,c...) khác nhau trên cột cùng màu chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test))

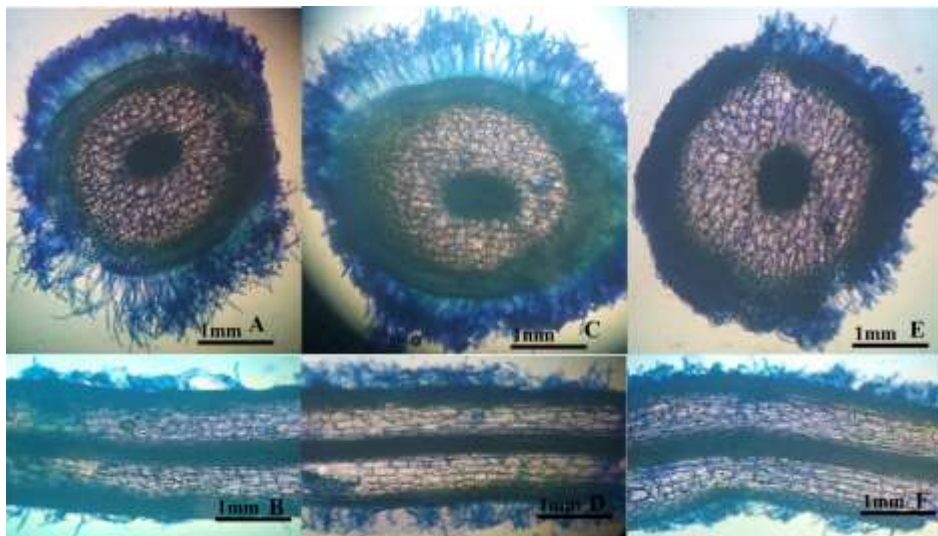
Hình 3.29 giải phẫu phần thân non cho thấy rõ sự khác biệt giữa cây đột biến và cây đối chứng. Số lượng bó mạch trong cấu trúc thân non của cây đối chứng trung bình là 21,27 bó mạch/thân, dao động trong khoảng 20-22 bó mạch, sắp xếp thành nhiều vòng tròn từ ngoài vào trong đồng tâm, bó mạch tròn và kích thước tương đồng nhau, có đường kính 71,89  $\mu\text{m}$ . Các tế bào xung quanh có hình tròn sắp xếp trật tự, kích thước tương đồng nhau (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.27, 3.28A, B, C, D). Mẫu chồi xử lý colchicine, có số lượng bó mạch rất nhiều, đạt từ 53,20 – 57,87 bó mạch, kích thước bó mạch nhỏ, đẹp, đường kính bó mạch dao động từ 36,87 – 43,08  $\mu\text{m}$ . Ngoài ra, các bó mạch sắp xếp không theo trật tự, thường thay đổi, có xu hướng phân bố đều trong thân, và các tế bào xung quanh có kích thước lớn, tế bào không đồng đều nhau (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.27, 3.28E, F, G, H). Số lượng bó mạch trong thân ở chồi xử lý bằng DMS dao động từ 18,27-19,33 bó mạch, các bó mạch sắp xếp thưa, không đều nhau, bó mạch đẹp, đường kính từ 56,06- 58,35  $\mu\text{m}$ , tế bào mô xung quanh có xu hướng thay đổi hình dạng nhiều, không đồng đều, lớp vỏ ngoài thân mỏng hơn so với đối chứng (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.27, 3.28I, J, K, L).



**Hình 3.28.** Hình thái giải phẫu mặt cắt ngang của thân chồi lan Giả hạc tím Huế.

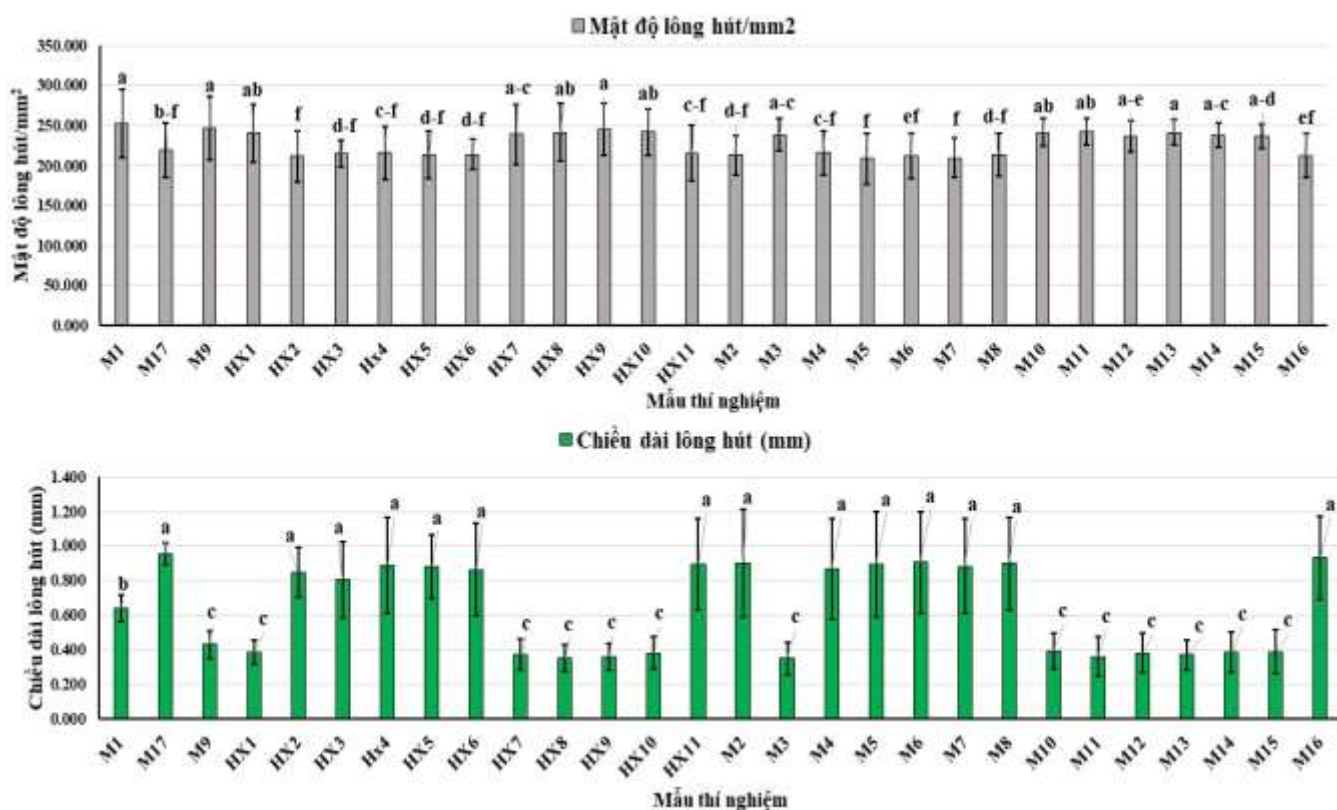
*A, B, C, D: mẫu thân chồi đối chứng ; E, F, G, H: mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17); I, J, K, L: Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9); A, E, I, C, G, K: mặt cắt ngang; B, F, J: bó mạch dẫn; D, H, L: Tế bào xung quanh mạch dẫn.*

Quan sát hình thái giải phẫu của rễ ở các mẫu cây thí nghiệm (đối chứng, mẫu xử lý colchicine và xử lý DMS) cũng thể hiện sự sai khác. Tuy nhiên mức độ sai khác ở rễ không nhiều, điểm sai khác chủ yếu tập trung vào hình thái và số lượng lông hút. Rễ cây đối chứng lông hút phân bố đều, số lượng đạt 252,47 lông hút/mm<sup>2</sup> ở miền lông hút và có chiều dài 0,64 mm (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.29A, B; 3.30). Rễ cây được xử lý bằng colchicine có kích thước to, dài, chiều dài lông hút đạt trong khoảng 0,81 – 0,96 mm, tuy nhiên mật độ lông hút từ 209,93 – 219,13 lông hút/mm<sup>2</sup> (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.29C, D, 3.30). Cây xử lý DMS rễ có kích thước to, lớp tế bào bao bên ngoài dày, lông hút nhỏ, lại mật độ lông hút từ 237,33 – 247,13 lông hút/mm<sup>2</sup>, nhưng chiều dài lông hút đạt từ 0,35 – 0,43 mm ngắn hơn rất nhiều so với đối chứng (0,64 mm) (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.29E, F; 3.30).



**Hình 3.29.** Hình giải phẫu rễ lan Giả hạc tím Huế.

*A, B: mặt cắt ngang và dọc của rễ cây đối chứng; C, D: mặt cắt ngang và dọc của rễ cây xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17); E, F: mặt cắt ngang và dọc của rễ cây xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9)*

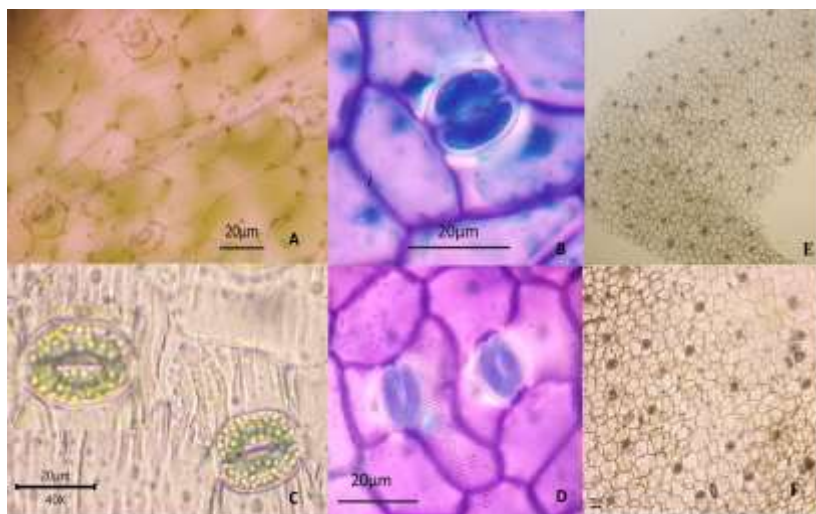


**Hình 3.30:** Biểu đồ thể hiện mật độ và chiều dài lông hút của rễ lan Giả hạc tím Huế (Các chữ cái (a,b,c...) khác nhau trên cột cùng màu chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test))

### 3.3.2.2. Đặc điểm tế bào khí khổng

Các mẫu quan sát được thu vào thời điểm 8-10 giờ sáng, sự thay đổi đặc điểm của khí khổng được coi là một trong những dấu hiệu thường gặp ở thể đa bội. Theo kết quả quan sát tế bào khí khổng của các mẫu cây được xử lý colchicine có hình dạng bầu dục, phân bố rải rác, số lượng ít, hình dạng không đồng đều, tế bào có kích thước lớn, chiều dài khí khổng đạt từ 27,57 – 29,47  $\mu\text{m}$ , chiều rộng đạt từ 23,03 – 24,79  $\mu\text{m}$ , kết quả này lớn hơn so với khí khổng cây lưỡng bội đối chứng (dài 15,79  $\mu\text{m}$  ; rộng 13,33  $\mu\text{m}$ ). Tuy nhiên mật độ khí khổng của cây xử lý colchicine chỉ từ 157,02 – 196,73 khí khổng/ $\text{mm}^2$  trong khi cây đối chứng đạt 235,80 khí khổng/ $\text{mm}^2$ . Diện tích khí khổng ở cây xử lý colchicine dao động ở khoảng 506,58 – 594,28  $\mu\text{m}^2$ , kết quả này cao hơn nhiều so với cây đối chứng là 168,66  $\mu\text{m}^2$  (Bảng 3.15). Một điểm khác biệt nữa là khi ở trạng thái mở khe hở của khí khổng cây lưỡng bội to, tròn đều; ngược lại

đối với tế bào khí khổng của cây đa bội khe hở tạo ra hẹp và nhỏ, điều này có thể do thành tế bào của tế bào hạt đậu mỏng hơn so với thành tế bào ở cây lưỡng bội. Đối với cây xử lý DMS đặc điểm của khí khổng được quan sát cho thấy số lượng nhiều, kích thước tế bào nhỏ, hình dạng không ổn định, khe hở khí khổng khi mở hẹp so với khí khổng cây đối chứng. Những chỉ tiêu như chiều dài (13,32 – 14,84  $\mu\text{m}$ ), chiều rộng (10,83 – 12,52  $\mu\text{m}$ ), diện tích (115,06 - 158,82  $\mu\text{m}^2$ ), mật độ (212,73 – 230,87 tế bào/ $\text{mm}^2$ ) của khí khổng cây xử lý DMS là không có sự khác biệt quá lớn so với cây đối chứng về mặt thống kê là giống nhau (Bảng 3.15, hình 3.31).



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

Kết quả phân tích tế bào khí khổng của cây xử lý colchicine có phần tương đồng với nghiên cứu của Taratima và cộng sự (2023) về tạo đa bội trên lan *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw bằng colchicine, phân tích tế bào trên mẫu lá đa bội (4n) cho thấy tế bào biểu bì, khí khổng có kích thước lớn hơn ở mẫu đối chứng 2n, tuy nhiên mật độ khí khổng thấp hơn rất nhiều so với cây lưỡng bội, kích thước và số lượng tế bào khí khổng có mối tương quan nghịch [170]. Các dòng đột biến tạo trong nghiên cứu của Srivastava và cộng sự (2018), ở loài lan *Aerides crista* Lindl. bằng tác nhân colchicine, EMS và bức xạ gamma cũng cho thấy sự thay đổi tăng lên hoặc giảm đi về kích thước, mật độ của khí khổng so với đối chứng tùy vào cường độ của tác nhân và thời gian xử lý đột biến [166].

Việc đánh giá bội thể được thực hiện bằng cách sử dụng các đặc điểm khí khổng rất thuận tiện và nhanh chóng, đồng thời nó cho phép các nhà tạo giống sàng lọc trước các thể đa bội tạm ở giai đoạn đầu. Tuy nhiên, phương pháp này dễ bị cản trở bởi các thể hỗn bội hoặc

thể khảm [177].

**Bảng 3.15.** Đặc điểm của tế bào khí khổng trên biểu bì lá sau 3 tháng nuôi cấy.

| TT | Mẫu  | Hoá chất xử lý | Tế bào khí khổng              |                               |                                 |                                   |
|----|------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
|    |      |                | Chiều dài ( $\mu\text{m}$ )   | Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )  | Diện tích ( $\mu\text{m}^2$ )   | Mật độ tế bào/ $\text{mm}^2$      |
| 1  | M1   | -              | 15,79 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup> | 13,33 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup> | 168,66 $\pm$ 13,29 <sup>b</sup> | 235,80 $\pm$ 4,30 <sup>a</sup>    |
| 2  | HX2  | Colchicine     | 28,85 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup> | 24,36 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup> | 561,64 $\pm$ 43,36 <sup>a</sup> | 177,20 $\pm$ 6,39 <sup>e-g</sup>  |
| 3  | HX3  | Colchicine     | 28,52 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup> | 24,09 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup> | 547,83 $\pm$ 39,46 <sup>a</sup> | 179,80 $\pm$ 5,91 <sup>e-g</sup>  |
| 4  | HX4  | Colchicine     | 28,72 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup> | 24,29 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup> | 554,13 $\pm$ 40,28 <sup>a</sup> | 167,73 $\pm$ 8,82 <sup>fg</sup>   |
| 5  | HX5  | Colchicine     | 28,35 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup> | 23,55 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup> | 537,05 $\pm$ 47,93 <sup>a</sup> | 186,87 $\pm$ 8,73 <sup>ef</sup>   |
| 6  | HX6  | Colchicine     | 28,15 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup> | 23,68 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup> | 529,79 $\pm$ 40,51 <sup>a</sup> | 181,53 $\pm$ 6,86 <sup>e-g</sup>  |
| 7  | HX11 | Colchicine     | 28,47 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup> | 24,02 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup> | 544,23 $\pm$ 41,40 <sup>a</sup> | 192,07 $\pm$ 11,09 <sup>d-f</sup> |
| 8  | M2   | Colchicine     | 27,57 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup> | 23,03 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup> | 506,58 $\pm$ 44,54 <sup>a</sup> | 190,60 $\pm$ 9,86 <sup>d-f</sup>  |
| 9  | M4   | Colchicine     | 28,85 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup> | 24,29 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup> | 553,62 $\pm$ 38,85 <sup>a</sup> | 180,20 $\pm$ 9,40 <sup>e-g</sup>  |
| 10 | M5   | Colchicine     | 27,79 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup> | 23,29 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup> | 508,02 $\pm$ 32,00 <sup>a</sup> | 195,23 $\pm$ 11,29 <sup>c-e</sup> |
| 11 | M6   | Colchicine     | 28,36 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup> | 23,63 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup> | 528,19 $\pm$ 35,58 <sup>a</sup> | 198,80 $\pm$ 10,75 <sup>b-e</sup> |
| 12 | M7   | Colchicine     | 27,64 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup> | 23,32 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup> | 514,07 $\pm$ 38,58 <sup>a</sup> | 187,20 $\pm$ 10,46 <sup>ef</sup>  |
| 13 | M8   | Colchicine     | 28,62 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup> | 24,11 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup> | 537,46 $\pm$ 28,67 <sup>a</sup> | 196,73 $\pm$ 11,69 <sup>c-e</sup> |
| 14 | M16  | Colchicine     | 29,09 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup> | 24,79 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup> | 575,98 $\pm$ 45,52 <sup>a</sup> | 178,87 $\pm$ 12,18 <sup>e-g</sup> |
| 15 | M17  | Colchicine     | 29,47 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup> | 25,03 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup> | 594,28 $\pm$ 49,76 <sup>a</sup> | 157,20 $\pm$ 4,00 <sup>g</sup>    |
| 16 | HX1  | DMS            | 14,33 $\pm$ 0,78 <sup>b</sup> | 12,12 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup> | 140,44 $\pm$ 13,88 <sup>b</sup> | 223,40 $\pm$ 5,33 <sup>ab</sup>   |
| 17 | HX7  | DMS            | 14,13 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup> | 12,10 $\pm$ 0,79 <sup>b</sup> | 150,48 $\pm$ 17,97 <sup>b</sup> | 219,40 $\pm$ 3,99 <sup>a-c</sup>  |
| 18 | HX8  | DMS            | 13,86 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup> | 11,50 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup> | 126,64 $\pm$ 11,42 <sup>b</sup> | 227,53 $\pm$ 4,69 <sup>a</sup>    |
| 19 | HX9  | DMS            | 13,77 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup> | 11,35 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup> | 122,77 $\pm$ 8,46 <sup>b</sup>  | 226,60 $\pm$ 4,77 <sup>a</sup>    |
| 20 | HX10 | DMS            | 14,11 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup> | 11,22 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup> | 126,55 $\pm$ 11,78 <sup>b</sup> | 221,73 $\pm$ 5,32 <sup>a-c</sup>  |
| 21 | M3   | DMS            | 14,06 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup> | 11,63 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup> | 127,86 $\pm$ 14,50 <sup>b</sup> | 228,53 $\pm$ 4,53 <sup>a</sup>    |
| 22 | M9   | DMS            | 14,84 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup> | 12,52 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup> | 148,82 $\pm$ 11,47 <sup>b</sup> | 212,73 $\pm$ 3,90 <sup>a-d</sup>  |
| 23 | M10  | DMS            | 13,86 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup> | 11,65 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup> | 129,43 $\pm$ 11,13 <sup>b</sup> | 230,87 $\pm$ 4,98 <sup>a</sup>    |
| 24 | M11  | DMS            | 13,72 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup> | 11,45 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup> | 125,48 $\pm$ 10,86 <sup>b</sup> | 217,20 $\pm$ 7,36 <sup>a-c</sup>  |
| 25 | M12  | DMS            | 13,32 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup> | 10,83 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup> | 115,06 $\pm$ 9,58 <sup>b</sup>  | 225,20 $\pm$ 8,49 <sup>a</sup>    |
| 26 | M13  | DMS            | 14,05 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup> | 11,72 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup> | 134,72 $\pm$ 15,33 <sup>b</sup> | 223,33 $\pm$ 7,24 <sup>ab</sup>   |
| 27 | M14  | DMS            | 13,72 $\pm$ 0,76 <sup>b</sup> | 11,47 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup> | 126,75 $\pm$ 11,82 <sup>b</sup> | 226,93 $\pm$ 5,06 <sup>a</sup>    |
| 28 | M15  | DMS            | 14,26 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup> | 11,77 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup> | 134,52 $\pm$ 12,16 <sup>b</sup> | 220,47 $\pm$ 6,30 <sup>a-c</sup>  |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c... trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

### 3.3.2.3. Hàm lượng chất diệp lục và caroten

Ở thực vật các sắc tố quang hợp được tổ chức thành những phức hệ quang hợp gắn trên màng thylakoid trong lục lạp của tế bào, gồm có phân tử chlorophyll a (Chla), chlorophyll b

(Chlb) và các carotenoid. Khi xử lý đột biến, các hoá chất đã làm biến đổi cấu trúc và làm thay đổi hàm lượng các chất trong tế bào, trong đó có chất diệp lục và caroten. Kết quả kiểm tra hàm lượng diệp lục và caroten được thực hiện trên 28 mẫu lan trong đó có 27 mẫu lan Giả hạc tím Huế xử lý đột biến và 1 mẫu đối chứng không xử lý hoá chất (M1), mẫu thu vào thời gian 8-10 giờ sáng được trình bày ở bảng 3.16.

Phân tích 27 mẫu lá của cây có xử lý hoá chất đột biến cho kết quả hàm lượng Chl cao nhất là cây M17 với hàm lượng Chla là 0,870 mg/g, Chlb là 0,447 mg/g, Chl tổng số 1,317 mg/L, hàm lượng caroten chỉ đạt 0,226 mg/g, và tỷ lệ Chla/Chlb là 1,948 lần, kết quả này cao hơn so với đối chứng của cây không xử lý hoá chất (0,770 mg/g, 0,416 mg/g, 1,186 mg/g, 0,193 mg/g, 1,853 lần) (M1). Hàm lượng carotenoid cao nhất qua phân tích đạt được là 0,231 mg/g (M14) và đạt thấp nhất là 0,053 mg/g ở mẫu HX5. Hàm lượng Chla và Chlb chênh lên cao nhất ở mẫu M2 với tỷ lệ Chla/Chlb là 2,238 lần. Trong các mẫu phân tích hàm lượng Chla thấp nhất là 0,146 mg/g (M6), Chlb thấp nhất là 0,091 mg/g (HX2), (Bảng 3.16).

Công bố của Cao Phi Bằng (2018) về những biến đổi sinh lý, hoá sinh của lan *D. anosmum* Lindl. trong quá trình luyện *ex-vitro* cho thấy hàm lượng diệp lục của cây con được trồng ở vườn sau 56 ngày là đạt giá trị cao nhất với Chla 0,733 mg/g, Chlb 0,480 mg/g, chl tổng số đạt 1,217 mg/g, hàm lượng carotenoid đạt 0,125 mg/g và tỷ lệ Chla/Chlb là 1,55 [3]. Một nghiên cứu khác của Đào Quốc Hưng và cộng sự (2021) về quy trình vi nhân giống lan Giả hạc Di Linh TaLy (*D. anosmum*) cho thấy hàm lượng Chla cao nhất là 0,652 mg/g, Chlb 0,341 mg/g, Chl tổng số 0,994 mg/g và hàm lượng carotenoid là 0,313 ở giai đoạn 6 tuần nuôi chồi với ánh sáng xanh và đỏ [19], những kết quả này khá tương đồng với kết quả của luận án. Theo Mustika và Semiarti (2021) về nuôi cấy *in-vitro* cây lan *D. lineale* Rolfe để nhân giống, tác giả đã phân tích hàm lượng diệp lục trong lá và đạt giá trị cao nhất là 1,58 mg/g, cụ thể hàm lượng Chla là 1,11 mg/g và Chlb là 0,47 mg/g, trong khi hàm lượng diệp lục trong rễ cao nhất là 0,34 mg/g [130]. Trong công bố của Sekhi và cộng sự (2022) trên cây dâu tây (*fragaria ananassa*) được làm biến đổi bằng DMS thì kết quả phân tích hàm lượng Chla, Chlb và Chl tổng số có giảm đi so với cây đối chứng và khác nhau giữa các dòng biến dị [156].

**Bảng 3.16.** Hàm lượng chlorophyll và carotenoid của một số dòng lan Giả hạc tím Huế xử lý hoá chất (mẫu lá thu ở giai đoạn sau khi cấy chồi *in-vitro* được 8 tuần)

| TT | Mẫu  | Hoá chất xử lý | Chlorophyll a (mg/g)     | Chlorophyll b (mg/g)     | Chlorophyll tổng (mg/g)   | Carotenoid (mg/g)        | Chla/Chlb                 |
|----|------|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1  | M1   | -              | 0,770±0,015 <sup>b</sup> | 0,416±0,004 <sup>b</sup> | 1,186±0,012 <sup>b</sup>  | 0,193±0,001 <sup>d</sup> | 1,853±0,001 <sup>e</sup>  |
| 2  | HX2  | Colchicine     | 0,183±0,002 <sup>p</sup> | 0,091±0,007 <sup>s</sup> | 0,274±0,013 <sup>j</sup>  | 0,072±0,005 <sup>m</sup> | 2,011±0,018 <sup>c</sup>  |
| 3  | HX3  | Colchicine     | 0,721±0,003 <sup>d</sup> | 0,412±0,001 <sup>b</sup> | 1,134±0,009 <sup>b</sup>  | 0,201±0,001 <sup>d</sup> | 1,749±0,001 <sup>f</sup>  |
| 4  | HX4  | Colchicine     | 0,215±0,014 <sup>o</sup> | 0,173±0,011 <sup>n</sup> | 0,388±0,010 <sup>i</sup>  | 0,102±0,012 <sup>m</sup> | 1,241±0,002 <sup>k</sup>  |
| 5  | HX5  | Colchicine     | 0,150±0,016 <sup>r</sup> | 0,105±0,012 <sup>q</sup> | 0,255±0,010 <sup>j</sup>  | 0,053±0,013 <sup>n</sup> | 1,427±0,004 <sup>i</sup>  |
| 6  | HX6  | Colchicine     | 0,512±0,016 <sup>i</sup> | 0,368±0,011 <sup>e</sup> | 0,880±0,011 <sup>e</sup>  | 0,134±0,013 <sup>j</sup> | 1,393±0,001 <sup>ij</sup> |
| 7  | HX11 | Colchicine     | 0,481±0,012 <sup>k</sup> | 0,222±0,013 <sup>l</sup> | 0,704±0,012 <sup>f</sup>  | 0,213±0,013 <sup>c</sup> | 2,168±0,002 <sup>b</sup>  |
| 8  | M2   | Colchicine     | 0,518±0,013 <sup>i</sup> | 0,231±0,004 <sup>k</sup> | 0,750±0,009 <sup>f</sup>  | 0,205±0,011 <sup>d</sup> | 2,238±0,003 <sup>a</sup>  |
| 9  | M4   | Colchicine     | 0,438±0,014 <sup>l</sup> | 0,271±0,011 <sup>i</sup> | 0,709±0,008 <sup>f</sup>  | 0,131±0,003 <sup>j</sup> | 1,620±0,002 <sup>g</sup>  |
| 10 | M5   | Colchicine     | 0,745±0,004 <sup>c</sup> | 0,408±0,010 <sup>c</sup> | 1,153±0,009 <sup>b</sup>  | 0,227±0,001 <sup>b</sup> | 1,826±0,001 <sup>e</sup>  |
| 11 | M6   | Colchicine     | 0,146±0,016 <sup>s</sup> | 0,094±0,001 <sup>r</sup> | 0,240±0,010 <sup>k</sup>  | 0,117±0,003 <sup>l</sup> | 1,547±0,004 <sup>h</sup>  |
| 12 | M7   | Colchicine     | 0,282±0,001 <sup>n</sup> | 0,148±0,001 <sup>o</sup> | 0,429±0,013 <sup>h</sup>  | 0,147±0,004 <sup>i</sup> | 1,905±0,004 <sup>d</sup>  |
| 13 | M8   | Colchicine     | 0,406±0,002 <sup>m</sup> | 0,223±0,013 <sup>l</sup> | 0,629±0,013 <sup>g</sup>  | 0,163±0,004 <sup>g</sup> | 1,821±0,007 <sup>e</sup>  |
| 14 | M16  | Colchicine     | 0,190±0,008 <sup>p</sup> | 0,135±0,011 <sup>p</sup> | 0,325±0,007 <sup>i</sup>  | 0,156±0,011 <sup>h</sup> | 1,404±0,003 <sup>ij</sup> |
| 15 | M17  | Colchicine     | 0,870±0,007 <sup>a</sup> | 0,447±0,012 <sup>a</sup> | 1,317±0,012 <sup>a</sup>  | 0,226±0,015 <sup>b</sup> | 1,948±0,001 <sup>d</sup>  |
| 16 | HX1  | DMS            | 0,155±0,005 <sup>r</sup> | 0,097±0,011 <sup>r</sup> | 0,252±0,008 <sup>j</sup>  | 0,076±0,010 <sup>m</sup> | 1,593±0,005 <sup>gh</sup> |
| 17 | HX7  | DMS            | 0,587±0,018 <sup>h</sup> | 0,331±0,001 <sup>f</sup> | 0,917±0,011 <sup>d</sup>  | 0,173±0,003 <sup>f</sup> | 1,774±0,002 <sup>f</sup>  |
| 18 | HX8  | DMS            | 0,581±0,003 <sup>h</sup> | 0,385±0,001 <sup>d</sup> | 0,965±0,009 <sup>d</sup>  | 0,144±0,012 <sup>i</sup> | 1,511±0,001 <sup>h</sup>  |
| 19 | HX9  | DMS            | 0,396±0,012 <sup>m</sup> | 0,202±0,003 <sup>m</sup> | 0,598±0,010 <sup>gh</sup> | 0,152±0,012 <sup>h</sup> | 1,962±0,003 <sup>d</sup>  |
| 20 | HX10 | DMS            | 0,693±0,017 <sup>f</sup> | 0,311±0,010 <sup>g</sup> | 1,005±0,011 <sup>c</sup>  | 0,216±0,013 <sup>c</sup> | 2,226±0,002 <sup>a</sup>  |
| 21 | M3   | DMS            | 0,446±0,014 <sup>l</sup> | 0,236±0,012 <sup>k</sup> | 0,682±0,009 <sup>g</sup>  | 0,153±0,012 <sup>h</sup> | 1,890±0,002 <sup>de</sup> |
| 22 | M9   | DMS            | 0,450±0,013 <sup>l</sup> | 0,240±0,003 <sup>k</sup> | 0,690±0,011 <sup>g</sup>  | 0,161±0,011 <sup>g</sup> | 1,876±0,002 <sup>de</sup> |
| 23 | M10  | DMS            | 0,449±0,002 <sup>l</sup> | 0,261±0,004 <sup>j</sup> | 0,710±0,011 <sup>f</sup>  | 0,128±0,007 <sup>k</sup> | 1,718±0,002 <sup>f</sup>  |
| 24 | M11  | DMS            | 0,509±0,013 <sup>j</sup> | 0,314±0,004 <sup>g</sup> | 0,823±0,011 <sup>e</sup>  | 0,211±0,007 <sup>c</sup> | 1,625±0,001 <sup>g</sup>  |
| 25 | M12  | DMS            | 0,497±0,013 <sup>j</sup> | 0,225±0,014 <sup>l</sup> | 0,721±0,012 <sup>f</sup>  | 0,172±0,011 <sup>f</sup> | 2,212±0,003 <sup>a</sup>  |
| 26 | M13  | DMS            | 0,606±0,015 <sup>g</sup> | 0,309±0,004 <sup>h</sup> | 0,914±0,009 <sup>d</sup>  | 0,182±0,001 <sup>e</sup> | 1,962±0,002 <sup>d</sup>  |
| 27 | M14  | DMS            | 0,701±0,012 <sup>e</sup> | 0,333±0,001 <sup>f</sup> | 1,034±0,009 <sup>c</sup>  | 0,231±0,011 <sup>a</sup> | 2,104±0,002 <sup>b</sup>  |
| 28 | M15  | DMS            | 0,178±0,008 <sup>q</sup> | 0,098±0,010 <sup>r</sup> | 0,275±0,011 <sup>j</sup>  | 0,058±0,012 <sup>n</sup> | 1,821±0,005 <sup>e</sup>  |

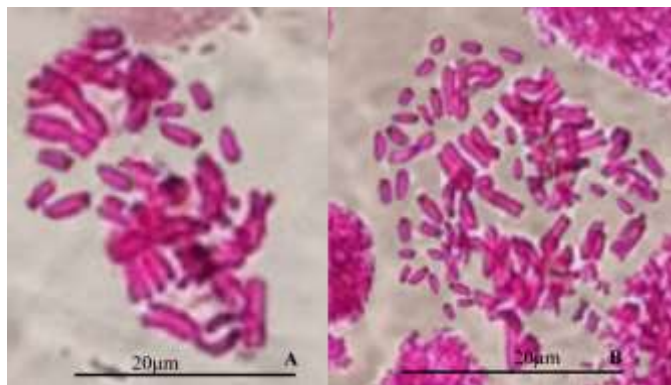
Chú thích: Chữ cái (a, b, c...) khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

#### 3.3.2.4. Đặc điểm bộ nhiễm sắc thể

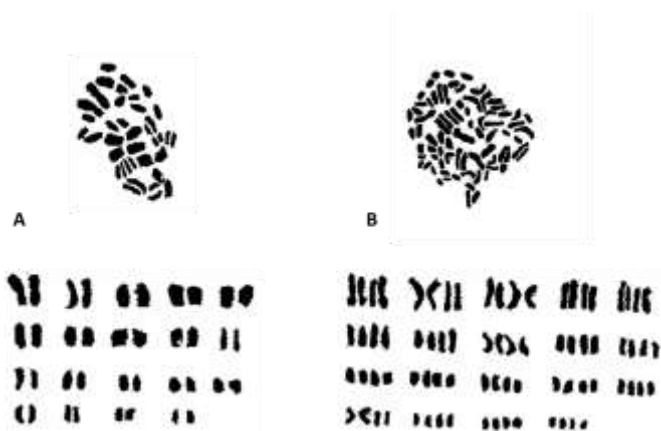
Đếm số lượng NST là phương pháp xác định mức độ đa bội đáng tin cậy và rõ ràng nhất, đây cũng là phương pháp khẳng định lại các đặc điểm tế bào (tế bào biểu bì, khí khổng) đã quan sát được [177], trong nghiên cứu này, số lượng NST trong các đầu rễ của cây con biến dị được đếm để xác định dạng đột biến đa bội. Kết quả quan sát cho thấy các thể tứ bội và tạp

bội đã hình thành dưới tác động của colchicine, tuy nhiên, tỷ lệ cảm ứng đa bội của cây con phụ thuộc nhiều vào nồng độ và thời gian xử lý.

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 3.32).



**Hình 3.32.** Bộ nhiễm sắc thể lan Giả hạc tím Huế quan sát dưới kính hiển vi (100x). **A:** Bộ NST cây đối chứng  $2n=38$ ; **B:** Bộ NST cây xử lý bằng colchicine, tứ bội  $4n=76$  (M17).



**Hình 3.33.** Hình thái NST và sơ đồ karyotype của lan Giả hạc tím Huế. **A:** Cây lưỡng bội  $2n=38$ . **B:** cây xử lý colchicine (tứ bội  $4n=76$ ) dòng M17.

Phân tích karyotype được thực hiện trên các NST trên 2 mẫu cây lan Giả hạc tím Huế là cây đối chứng không xử lý hoá chất đột biến (lưỡng bội  $2n=38$ ), cây xử lý colchicine (tứ bội  $4n=76$ ). Các NST được đo, ghép lại thành đôi để tạo ra sơ đồ karyotype (Hình 3.33) của NST ở kì giữa của phân chia tế bào.

Chi *Dendrobium*, hầu hết các loài đều có  $2n=38$  nhiễm sắc thể, ở một số loài như *D. leonis* và *D. dixanthum* có  $2n=40$  [176], và 8 loài thuộc nhóm *Lautoria* có  $2n=36$ . Ở *Dendrobium*, các thể đa bội được liên kết với một số loài và giống lai. Ở *Phalaenopsis*, hầu hết các loài đều có  $2n=38$  nhiễm sắc thể, ngoại trừ nhóm *Aphyllae* có  $2n=34$  và  $36$  nhiễm sắc thể. Tuy nhiên, đã quan sát thấy sự khác biệt đáng kể về kích thước của nhiễm sắc thể và bộ

gen của các loài và giống lai từ chi này [125]. Yang Liu và cộng sự (2023), cũng đã có kết quả tương tự khi phân tích NST của *D. officinale*, cây lưỡng bội có bộ NST  $2n = 2x = 38$  và cây tứ bội tạo ra bằng cách xử lý colchicine là  $4n = 4x = 76$ , [114].

Tuy nhiên, phương pháp đếm số lượng nhiễm sắc thể trong kì giữa cũng có những hạn chế do nhiễm sắc thể có thể bị chồng lên nhau, do đó gây khó khăn cho việc đếm. Vì vậy, việc xác định số lượng nhiễm sắc thể hiệu quả của thực vật là vô cùng khó khăn [177]. Kết quả nghiên cứu hiện tại còn cần được xác nhận thêm qua các phân tích phân tử hoặc trồng thử nghiệm qua các thế hệ. Xác định các biến thể nhiễm sắc thể là rất quan trọng cho việc phân tích tiến hóa, nghiên cứu và nhân giống các giống cây trồng mới. Các thông số karyotype là một trong những chỉ số quan trọng để phân loại và xác định thực vật, từ đó cho phép nghiên cứu sự đa dạng di truyền của chúng về mặt tế bào học [186].

### **3.3.3. Đa dạng di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử RAPD**

Các mẫu lan Giả hạc tím Huế (34 mẫu) được chúng tôi chọn lọc trong quá trình nghiên cứu bao gồm: 01 mẫu lan là cây mẹ ban đầu; 06 mẫu là cây được hình thành từ hạt trong *in vitro*; 11 mẫu là cây phát triển từ hạt trong *in vitro* có xử lý hoá chất gây đột biến và 16 mẫu là cây phát triển từ mô sẹo có xử lý hoá chất đột biến. Tất cả các mẫu được chúng tôi mã hoá ở phụ lục 16.

Kết quả sàng lọc 63 mẫu RAPD trên 2 mẫu chọn ngẫu nhiên cho thấy có 10 mẫu RAPD cho hệ số các band DNA hình thành cao nhất (Hình 3.34, Bảng 3.17). Kết quả này chúng tôi chọn để đánh giá đa dạng di truyền của 34 mẫu lan trong quần thể nghiên cứu.

Kết quả khuếch đại PCR-RAPD của 34 mẫu lan Giả hạc với 10 mẫu RAPD cho tỷ lệ band DNA đa hình cao trong kết quả sàng lọc mẫu được chúng tôi trình bày ở bảng 3.17. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu lan Giả hạc cho tỷ lệ khuếch đại PCR thành công đạt 100%. Tổng số 10 mẫu RAPD sử dụng trong nghiên cứu đã tạo ra 70 band DNA/34 mẫu lan Giả hạc, trung bình đạt 7 band DNA/mỗi mẫu, kích thước các band DNA dao động từ 350 – 1600 bp. Tổng số band DNA đa hình thu được là 53 band, chiếm 75,71 % trên tổng số band DNA hình thành. Các mẫu RAPD khác nhau thì số band DNA đa hình thu được cũng khác nhau, dao động từ 3 đến 9 band DNA, tương ứng với tỷ lệ band DNA đa hình dao động trong mỗi mẫu RAPD là 50 đến 100%. Hai mẫu RAPD có ký hiệu P6 và P9 cho tỷ lệ band DNA đa hình lớn nhất, đạt 100

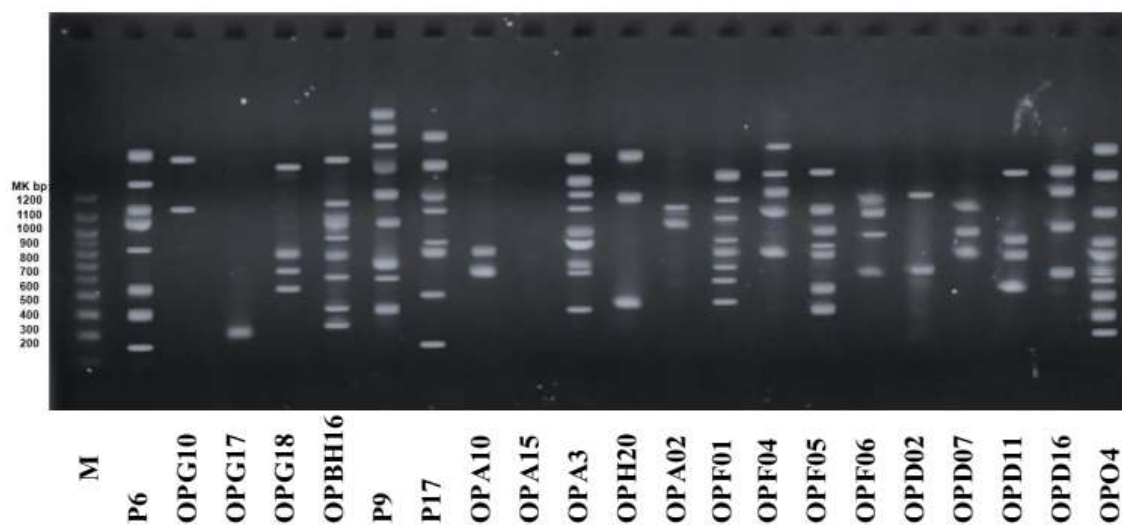
%, và môi OPA-03 cho tỷ lệ band DNA đa hình thấp nhất, đạt 50 % (Bảng 3.17). Theo nghiên cứu của Basavaraj và cộng sự (2020) cho rằng do đặc điểm trình tự bộ gene của lan có nhiều vùng lặp lại cho phép nhiều vị trí bắt cặp ngẫu nhiên nên số lượng band DNA hình thành trên mỗi môi thường dao động từ 5 đến 9 băng [56]. Kết quả này tương đương với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi khi thực hiện trên loài lan Giả hạc tím Huế. Mặt khác, theo nghiên cứu của Nei và cộng sự (1978) cho thấy rằng, để các mẫu trong quần thể nghiên cứu có sự phân nhóm cao khi sử dụng chỉ thị phân tử RAPD nhằm xây dựng cây phả hệ thì cần số lượng các band DNA khuếch đại càng lớn và số band DNA đa hình tối thiểu phải đạt 50 băng [134]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 10 môi RAPD và thu được 53 band DNA đa hình/70 band DNA hình thành của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế. Với kết quả này, chúng tôi tiếp tục tiến hành xây dựng cây phả hệ cho 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế và phân tích đa dạng di truyền của chúng.

**Bảng 3.17.** Kết quả khuếch đại PCR dựa trên mỗi môi RAPD của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế

| TT                                    | Môi     | Tỷ lệ cá thể khuếch đại PCR thành công (%) | Số band DNA hình thành/môi | 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                      |
| <b>Tổng số band DNA</b>               |         | -                                          | <b>70</b>                  | <b>53</b>           | -                            | -                          |
| <b>Số band DNA trung bình/mỗi môi</b> |         | <b>100</b>                                 | <b>7</b>                   | <b>5,3</b>          | -                            | <b>75,71</b>               |

Nghiên cứu gây đột biến trên cây lan với nhiều tác nhân khác nhau, sau đó sử dụng chỉ thị RAPD để kiểm tra biến đổi di truyền đã được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới thực hiện.

Thông và cộng sự (2010) và Sherpa và cộng sự (2022), sử dụng tác nhân đột biến vật lý bằng tia gamma trên loài lan *Dendrobium* sp. và loài lan *Dendrobium* 'Emma White', sau đó kiểm tra sự sai khác di truyền bằng chỉ thị phân tử RAPD. Kết quả thu được tỷ lệ số lượng band DNA đa hình cũng cho thấy khác nhau, tương ứng 88,89 % (*Dendrobium* 'Emma White') [159] và 19,7 % (*Dendrobium* sp.) [39]. Tỷ lệ các band DNA đa hình thu được có sự khác nhau lớn và nằm trong tỷ lệ các band DNA đa hình chúng tôi thu được khi xử lý bằng tác nhân hoá học. Trong khi đó, Khosravi và cộng sự (2009), đã tiến hành xử lý đột biến trên loài lan *Dendrobium* Serdang Beauty trên mô sẹo bằng tác nhân hoá học Colchicine. Kết quả thu được tỷ lệ các band DNA đa hình thấp hơn (tương ứng 45,08% ) [103] so với nghiên cứu của chúng tôi thu được là 75,71 %.



**Hình 3.34.** Kết quả sàng lọc môi PCR-RAPD trên mẫu lan được xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 8 giờ có ký hiệu mẫu là M5. M: Khối lượng thang chuẩn DNA (200-1200 bp, Biobase)

Phân tích sự đa dạng của các mẫu lan Giả hạc tím Huế trong quần thể, chỉ số  $i_0$  cho thấy có sự đa dạng trong các mẫu được nghiên cứu, tuy nhiên mức độ đa dạng không cao, hệ số đa dạng trong từng môi ngẫu nhiên dao động từ khoảng 0,082 đến 0,541, trung bình cho các môi đạt 0,300. Trong 10 môi được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR-RAPD cho 34 mẫu lan này, kết quả môi P9 thể hiện sự đa dạng cao nhất với giá trị  $i_0$  đạt trung bình 0,541, tiếp đến là môi P6 ( $i_0 = 0,505$ ). Môi thể hiện sự đa dạng thấp nhất là OPBH-16 với giá trị  $i_0 = 0,082$  (Bảng 3.18).

**Bảng 3.18:** Chỉ số đa dạng di truyền quần thể lan Giả hạc tím Huế cho mỗi môi RAPD

| TT | Môi                | Cỡ mẫu | na*   | ne*   | h*    | io*   |
|----|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | P6                 | 34     | 2,000 | 1,521 | 0,328 | 0,505 |
| 2  | P9                 | 34     | 2,000 | 1,628 | 0,364 | 0,541 |
| 3  | P16                | 34     | 1,800 | 1,352 | 0,226 | 0,358 |
| 4  | P17                | 34     | 1,667 | 1,335 | 0,211 | 0,327 |
| 5  | P18                | 34     | 1,667 | 1,266 | 0,173 | 0,274 |
| 6  | OPA-03             | 34     | 1,500 | 1,075 | 0,063 | 0,120 |
| 7  | OPF-01             | 34     | 1,857 | 1,242 | 0,174 | 0,292 |
| 8  | OPF-05             | 34     | 1,600 | 1,062 | 0,056 | 0,116 |
| 9  | OPO-04             | 34     | 1,444 | 1,201 | 0,132 | 0,206 |
| 10 | OPBH-16            | 34     | 1,500 | 1,041 | 0,037 | 0,082 |
| 11 | Trung bình/mỗi môi | 34     | 1,714 | 1,296 | 0,189 | 0,300 |
| 12 | ±SD                |        | 0,455 | 0,305 | 0,170 | 0,244 |

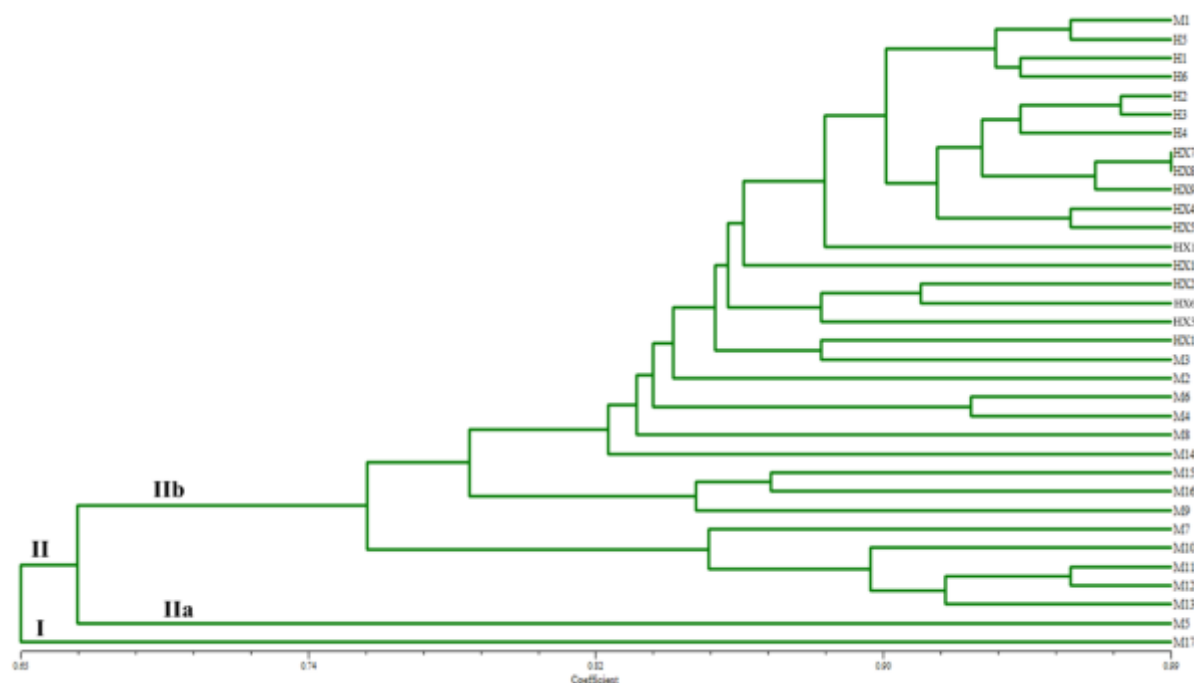
**Ghi chú:** na\* = số lượng allele được quan sát; ne\* = số lượng allele có hiệu quả [Kimura and Crow (1964)]; h\* = Đa dạng gen Nei's (1973); io\* = Chỉ số đa dạng di truyền Shannon [Lewontin (1972)]; SD: độ lệch chuẩn

Phân tích tương quan di truyền giữa các mẫu được thực hiện bằng phần mềm NTSYS-pc 2.1 dựa trên hệ số tương quan đơn giản SM (simple matching coefficient). Hệ số tương đồng di truyền phản ánh mối quan hệ di truyền của các mẫu lan với nhau. Các mẫu lan có giá trị hệ số di truyền tương ứng càng tiến đến 0 thì sự khác biệt về di truyền càng lớn và khả năng sử dụng trong lựa chọn tạo giống càng cao, còn các mẫu có hệ số di truyền giống nhau tương ứng càng gần tới 1 thì càng gần nhau về mặt di truyền, trong nghiên cứu này hệ số tương đồng di truyền của 34 mẫu phân tích này tương đối cao, dao động từ 0,580 – 0,986 (Phụ lục 17).

Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Khosravi và cộng sự (2009) với hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu xử lý hoá chất với mẫu đối chứng dao động từ 0,6 – 0,94 [103]. Trong 34 mẫu phân tích có hệ số tương đồng cao nhất là 0,986 ở cặp mẫu HX7 và HX8, cặp mẫu M2 và M5 có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,580 (Phụ lục 17). Kết quả hệ số tương quan này được dùng làm cơ sở dữ liệu để xây dựng một sơ đồ hình cây nhằm phân nhóm di truyền cho 34 mẫu được phân tích. Sơ đồ này xếp nhóm dựa trên thuật toán UPGMA, theo phương pháp SAHN (Hình 3.35)

Cây phân nhóm cho thấy, 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế sử dụng trong nghiên cứu phân thành hai nhóm chính ở mức độ tương đồng di truyền 65%. Nhóm I chỉ có 1 mẫu lan có ký

hiệu M17 trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đây là mẫu lan có tiềm năng cao trong việc lựa chọn để làm giống. Nhóm II gồm 33 mẫu lan còn lại và phân thành 2 nhóm phụ (IIa, IIb) ở mức độ tương đồng di truyền 66,8%. Nhóm phụ thứ nhất (IIa) chỉ có 1 mẫu lan Giả hạc tím Huế có ký hiệu M5 và trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đây là mẫu lan có tiềm năng cao trong việc lựa chọn để làm giống; nhóm phụ thứ hai (IIb) bao gồm 32 mẫu lan Giả hạc còn lại (hình 3.35).



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

Kết quả cũng cho thấy 6 mẫu lan tạo ra từ hạt không xử lý hoá chất (H1, H2,..., H6) với mẫu đối chứng (M1) có hệ số tương đồng rất cao, dao động từ 0,884 – 0,971. Cặp mẫu có hệ số tương đồng cao nhất là 0,971 ở mẫu H3 và H2, cặp mẫu có hệ số tương đồng thấp nhất 0,884 là H3 và M1; (Phụ lục 17, hình P14-3.1 phụ lục 14).

Những 11 mẫu lan Giả hạc tím Huế được tạo ra phương pháp gieo hạt *in-vitro* và có xử lý hoá chất đột biến ở giai đoạn protocorm (HX1, HX2,... HX11) có mức độ tương đồng với một mẫu đối chứng (M1) dao động từ 0,812 - 0,889, điều này cho thấy mức độ tương đồng cũng rất cao, tuy nhiên so với 6 mẫu không xử lý hoá chất thì thấp hơn. (Phụ lục 17, hình P14-3.2 phụ lục 14).

Nhóm 16 mẫu lan Giả hạc tím Huế tạo ra từ mô sẹo có xử lý hoá chất (M2, M3,...M17) là nhóm có hệ số tương đồng thấp nhất so với mẫu đối chứng (M1), với hệ số tương đồng từ 0,661-0,899 trong đó có mẫu M17 có hệ số tương đồng với M1 là thấp nhất 0,661, tiếp đến là mẫu M5 là 0,663 (Phụ lục 17, hình P14-3.3 phụ lục 14).

Kết quả phân tích 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế bằng chỉ thị RAPD chúng tôi đã xác định các dòng HX1, XH3, HX10, M2, M5, M7, M8, M9, M10, M13, M14, và M17 có tiềm năng sử dụng làm vật liệu khởi đầu cho chọn tạo giống mới, trong đó M5, M17 là 2 dòng tiềm năng cao nhất.

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

Qua kết quả phân tích biến dị của các dòng được xử lý colchicine và DMS và kết quả theo dõi khả năng thích nghi với môi trường, khả năng sinh trưởng, phát triển của cây, và dựa trên các biến đổi về hình thái (thân, lá, màu sắc), đồng thời cũng dựa trên kết quả phân tích di truyền chúng tôi lựa chọn 6 dòng (HX3; HX10, M5, M13, M14, M17) có triển vọng và một dòng đối chứng (M1) để tiến hành tái sinh và nhân giống trở lại, nhằm khảo sát lại khả năng nhân giống *in-vitro* và bảo lưu các dòng này. Môi trường, điều kiện nuôi cấy và chất kích thích sinh trưởng được sử dụng từ những công thức cho kết quả tốt nhất ở các nội dung nghiên cứu trước.

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

Sử dụng môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA để thực hiện thí nghiệm. Sau 3 tháng nuôi cấy kết quả cụ thể được thể hiện ở bảng 3.19, phụ lục 20 hình P20-3.1.

Trong các dòng đột biến được lựa chọn để thực hiện tái sinh có dòng M17 cho kết quả tốt nhất với thời gian hình thành mô sẹo hay chồi là 27,40 ngày, tỷ lệ sống của mẫu đạt 96,44 %, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là 82,00 %, kích thước mô sẹo là 1,62 cm, tỷ lệ hình thành chồi 10,89 % và chồi có kích thước 2,41 cm, kết quả không khác biệt so với mẫu đối chứng (M1). Khả năng tái sinh của M1 kết quả rất ổn định cụ thể thời gian tạo mô sẹo là 29,45 ngày, tỷ lệ sống của mẫu 90,67 %, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo 71,78 %, kích thước mô sẹo 1,13 cm, tỷ lệ tạo chồi 15,56 % và chiều cao chồi 1,73 cm. Những mẫu còn lại khả năng tái sinh chồi hoặc mô sẹo luôn cao hơn 50 % (Bảng 3.19).

**Bảng 3.19.** 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)     |
|-------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>M1</b>   | 29,45±0,90 <sup>a</sup>          | 90,67±1,90 <sup>b</sup>  | 71,78±2,54 <sup>b</sup>  | 1,13±0,07 <sup>b</sup>  | 15,56±2,94 <sup>a</sup>  | 1,73±0,08 <sup>b</sup>  |
| <b>HX3</b>  | 33,27±0,92 <sup>b</sup>          | 95,33±1,20 <sup>a</sup>  | 78,44±1,45 <sup>a</sup>  | 1,58±0,11 <sup>a</sup>  | 11,56±1,02 <sup>ab</sup> | 2,24±0,11 <sup>a</sup>  |
| <b>HX10</b> | 41,40±1,69 <sup>c</sup>          | 82,22±1,80 <sup>c</sup>  | 62,67±2,46 <sup>c</sup>  | 0,94±0,09 <sup>bc</sup> | 11,56±1,38 <sup>ab</sup> | 1,81±0,09 <sup>b</sup>  |
| <b>M5</b>   | 35,27±0,69 <sup>b</sup>          | 92,89±1,62 <sup>ab</sup> | 76,44±1,70 <sup>ab</sup> | 1,63±0,14 <sup>a</sup>  | 12,22±1,01 <sup>ab</sup> | 2,35±0,09 <sup>a</sup>  |
| <b>M13</b>  | 47,87±1,68 <sup>d</sup>          | 75,56±1,41 <sup>d</sup>  | 53,56±1,54 <sup>d</sup>  | 0,76±0,06 <sup>c</sup>  | 7,33±0,58 <sup>b</sup>   | 1,37±0,05 <sup>c</sup>  |
| <b>M14</b>  | 44,47±1,50 <sup>cd</sup>         | 78,67±1,48 <sup>cd</sup> | 64,22±2,19 <sup>c</sup>  | 1,14±0,07 <sup>b</sup>  | 9,33±1,96 <sup>b</sup>   | 1,61±0,10 <sup>bc</sup> |
| <b>M17</b>  | 27,40±0,79 <sup>a</sup>          | 96,44±1,19 <sup>a</sup>  | 82,00±1,21 <sup>a</sup>  | 1,62±0,11 <sup>a</sup>  | 10,89±0,69 <sup>ab</sup> | 2,41±0,11 <sup>a</sup>  |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

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

Sử dụng môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA để thực hiện thí nghiệm. Sau 8 tuần nuôi cấy kết quả được trình bày ở bảng 3.20.

**Bảng 3.20.** Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo dòng đột biến ở các dòng đột biến được chọn sau 8 tuần nuôi cấy

| Mẫu         | Tỷ lệ tái sinh chồi (%)   | Số chồi/mẫu             | Chiều cao chồi (cm)      | Số lá/chồi              |
|-------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>M1</b>   | 80,67±2,45 <sup>cd</sup>  | 3,12±0,37 <sup>bc</sup> | 2,15±0,337 <sup>bc</sup> | 3,16±0,49 <sup>bc</sup> |
| <b>HX3</b>  | 89,33±1,94 <sup>ab</sup>  | 4,12±0,45 <sup>ab</sup> | 3,13±0,24 <sup>a</sup>   | 4,58±0,40 <sup>a</sup>  |
| <b>HX10</b> | 77,33±2,21 <sup>c-e</sup> | 3,16±0,18 <sup>bc</sup> | 2,78±0,25 <sup>ab</sup>  | 2,47±0,22 <sup>c</sup>  |
| <b>M5</b>   | 83,33±2,36 <sup>bc</sup>  | 3,27±0,18 <sup>bc</sup> | 3,26±0,39 <sup>a</sup>   | 4,15±0,29 <sup>ab</sup> |
| <b>M13</b>  | 71,33±1,70 <sup>e</sup>   | 2,62±0,31 <sup>c</sup>  | 1,76±0,17 <sup>c</sup>   | 2,31±0,26 <sup>c</sup>  |
| <b>M14</b>  | 74,67±1,70 <sup>de</sup>  | 2,87±0,31 <sup>c</sup>  | 2,08±0,29 <sup>bc</sup>  | 2,51±0,39 <sup>c</sup>  |
| <b>M17</b>  | 94,67±2,26 <sup>a</sup>   | 4,76±0,50 <sup>a</sup>  | 3,52±0,42 <sup>a</sup>   | 4,72±0,40 <sup>a</sup>  |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

Khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của các mẫu HX3, M5, M17 đều có kết quả cao hơn đối chứng M1 trong đó tốt nhất là khả năng tái sinh của mẫu M17 với tỷ lệ tái sinh chồi 94,67 %, số chồi 4,76 chồi/mẫu, chiều dài chồi 3,52 cm, và chồi có số lá là 4,72 lá/chồi, kết quả này ở M1 là 80,67 %, 3,12 chồi/mẫu, 2,15 cm, 3,16 lá/chồi. Các mẫu còn lại đều có tỷ lệ tái sinh chồi

từ mô sẹo trên 70%. Như vậy với kết quả tái sinh chồi từ mô sẹo của các mẫu đột biến cho kết quả cao và chất lượng chồi tốt, chồi to khỏe, lá màu xanh đậm (Bảng 3.20).

### 3.5.3. Nhân nhanh chồi của các dòng đột biến

Chồi các dòng đột biến sau khi được tái sinh được tiến hành nhân nhanh chồi. Chồi đạt tiêu chuẩn cao từ 2 – 3 cm và có 2-3 lá được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA. Kết quả nhân nhanh sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện qua bảng 3.21.

Khả năng nhân chồi của chồi đột biến M17 là cao nhất với hệ số nhân chồi 7,53 lần, chiều cao chồi 4,61 cm, đường kính thân chồi 0,65 cm, số lá chồi 5,87 lá/chồi, kết quả này cao hơn so với mẫu M1 kết quả lần lượt là 6,20 lần, 3,36 cm, 0,54 cm, 4,93 lá/chồi. Những mẫu còn lại có hệ số nhân chồi từ 4,73 đến 6,60 lần. Chồi đều khỏe mạnh, xanh, cao, lá dày và có khả năng sinh trưởng tốt (Bảng 3.21).

**Bảng 3.21.** Khả năng nhân nhanh chồi của các chồi đột biến sau 8 tuần nuôi cấy

| Mẫu  | Hệ số nhân chồi         | Chiều cao chồi (cm)     | Đường kính thân chồi (cm) | Số lá của chồi          | Đặc điểm |
|------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|
| M1   | 6,20±0,33 <sup>bc</sup> | 3,36±0,18 <sup>c</sup>  | 0,54±0,04 <sup>b</sup>    | 4,93±0,32 <sup>bc</sup> | +        |
| HX3  | 7,13±0,29 <sup>ab</sup> | 4,15±0,18 <sup>ab</sup> | 0,57±0,03 <sup>ab</sup>   | 5,33±0,29 <sup>ab</sup> | ++       |
| HX10 | 5,47±0,39 <sup>cd</sup> | 3,49±0,25 <sup>bc</sup> | 0,58±0,04 <sup>ab</sup>   | 4,33±0,25 <sup>c</sup>  | +        |
| M5   | 6,60±0,31 <sup>ab</sup> | 3,71±0,24 <sup>bc</sup> | 0,61±0,03 <sup>ab</sup>   | 4,73±0,33 <sup>bc</sup> | ++       |
| M13  | 4,73±0,25 <sup>d</sup>  | 3,29±0,31 <sup>c</sup>  | 0,54±0,01 <sup>b</sup>    | 4,13±0,29 <sup>c</sup>  | +        |
| M14  | 5,07±0,37 <sup>d</sup>  | 3,69±0,14 <sup>bc</sup> | 0,57±0,03 <sup>ab</sup>   | 4,67±0,32 <sup>bc</sup> | +        |
| M17  | 7,53±0,26 <sup>a</sup>  | 4,61±0,22 <sup>a</sup>  | 0,65±0,04 <sup>a</sup>    | 5,87±0,31 <sup>a</sup>  | ++       |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

+: chồi cao, khỏe, có màu xanh, lá dày.

++: chồi cao, to khỏe, có màu xanh đậm, lá nhiều và dày.

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

Các chồi đạt kích thước 3-4 cm và có 4-5 lá được lựa chọn cấy vào môi trường ra rễ. Su dụng môi trường MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 + 0,7 mg/L NAA. Sau 8 tuần nuôi cấy kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.22.

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, rễ có chiều dài 5,84 cm, chiều cao cây đạt 7,01 cm và số lá đạt 6,63 lá/cây. Các mẫu thử nghiệm còn lại cũng cho kết quả rất tốt với mức khác biệt không quá cao cụ thể số rễ đạt từ 3,77 – 5,72 rễ/chồi, chiều dài rễ trong khoảng 3,64 – 5,28 cm, chiều cao cây đạt 4,53 – 6,72 cm, số lá đạt 5,87 – 6,51 lá/cây (Bảng 3.22).

**Bảng 3.22.** Khả năng ra rễ của chồi ở một số dòng lan đột biến sau 8 tuần nuôi cấy

| Mẫu chồi    | Tỷ lệ ra rễ (%) | Số rễ/chồi               | Dài rễ (cm)             | Cao cây (cm)             | Số lá                  | Đặc điểm rễ |
|-------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------|
| <b>M1</b>   | 100±0,00        | 4,82±0,55 <sup>a-c</sup> | 4,25±0,32 <sup>bc</sup> | 5,89±0,40 <sup>a-c</sup> | 6,51±0,54 <sup>a</sup> | ++          |
| <b>HX3</b>  | 100±0,00        | 5,72±0,34 <sup>ab</sup>  | 5,28±0,29 <sup>ab</sup> | 6,72±0,40 <sup>ab</sup>  | 6,06±0,52 <sup>a</sup> | ++          |
| <b>HX10</b> | 100±0,00        | 5,22±0,30 <sup>a-c</sup> | 4,31±0,47 <sup>bc</sup> | 5,55±0,41 <sup>b-d</sup> | 6,42±0,41 <sup>a</sup> | ++          |
| <b>M5</b>   | 100±0,00        | 5,56±0,35 <sup>ab</sup>  | 4,62±0,33 <sup>bc</sup> | 6,11±0,53 <sup>a-c</sup> | 6,26±0,44 <sup>a</sup> | ++          |
| <b>M13</b>  | 100±0,00        | 3,77±0,51 <sup>c</sup>   | 3,64±0,38 <sup>c</sup>  | 4,53±0,33 <sup>d</sup>   | 5,87±0,18 <sup>a</sup> | +           |
| <b>M14</b>  | 100±0,00        | 4,68±0,54 <sup>bc</sup>  | 4,08±0,18 <sup>bc</sup> | 4,94±0,16 <sup>cd</sup>  | 6,13±0,33 <sup>a</sup> | +           |
| <b>M17</b>  | 100±0,00        | 6,31±0,67 <sup>a</sup>   | 5,84±0,58 <sup>a</sup>  | 7,01±0,44 <sup>a</sup>   | 6,63±0,34 <sup>a</sup> | ++          |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$ , Duncan's test.

+: 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.

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

Từ kết quả đã có của nội dung 3.5, chúng tôi xây dựng nên một quy trình tái sinh của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến gồm có 5 bước (Quy trình 1, phụ lục 18):

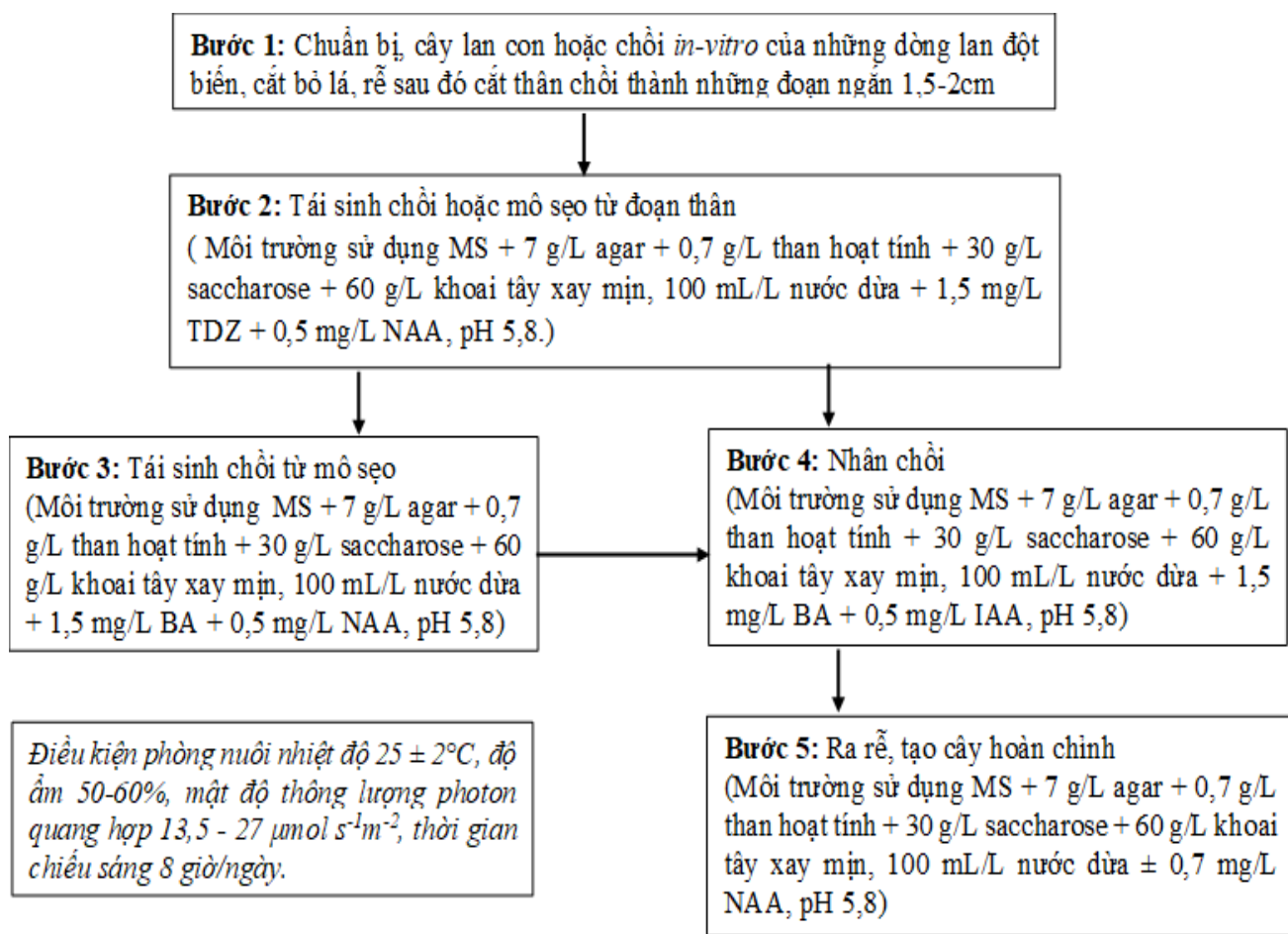
**Bước 1:** Chuẩn bị, chọn cây lan con hoặc chồi *in-vitro* của những dòng lan đột biến

**Bước 2:** Tái sinh chồi hoặc mô sẹo từ đoạn thân

**Bước 3:** Tái sinh chồi từ mô sẹo

**Bước 4:** Nhân chồi

**Bước 5:** Ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh



**Hình 3.37.** Sơ đồ các bước thực hiện tái sinh một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến

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

#### 3.5.1. Nghiên cứu giá thể phù hợp để ra bầu cây con.

Nghiên cứu tìm ra được hỗn hợp giá thể phù hợp để ra cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế giai đoạn vườn ươm, sau 3 tháng chăm sóc kết quả được trình bày ở bảng 3.23.

Kết quả tốt nhất về tỷ lệ sống 97,8%, chiều cao cây 9,9 cm, đường kính thân cây 0,9 cm, số lá 11,3 lá, chiều rộng 1,5 cm, chiều dài lá 5 cm và số lá mới 5,8 lá là thu được ở CT1 và CT6 có tỷ lệ sống đạt 95,6%, chiều cao cây 9,3 cm, đường kính thân cây 0,8 cm, số lá 10,7 lá, chiều rộng của lá 1,4 cm, chiều dài lá 4,7 cm, và số lá mới là 5,3 lá (Bảng 3.23, Hình 3.38). Ở các nghiệm thức khác đều có tỷ lệ sống đạt trên 80%, cho thấy khả năng thích nghi của cây lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* ở vườn ươm là rất tốt.

Tỷ lệ sống của lan Giả hạc tím Huế trong nghiên cứu này dao động từ 80 đến 97,83% tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Oanh và cộng sự (2022), đã báo cáo tỷ lệ

sống đạt 94,8% của lan *D. thyrsiflorum* Rchb. f. ex Andre được trồng trên giá thể bảng dương xỉ và có phủ rêu [138]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2021) về cây lan *D. anosmum* Lindl. thì có tỷ lệ sống thấp hơn từ 40 - 86,67% trồng trên giá thể đơn hoặc giá thể hỗn hợp rêu, xơ dừa và than củi [11]. Nguyên nhân có thể là do sự khác biệt về thời tiết, chế độ chăm sóc, độ ẩm và dinh dưỡng của giá thể [122].



**Hình 3.38.** Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây con lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* ở vườn ươm (Nguyễn Hữu Thọ, 2023)

Tỷ lệ sống sót cao nhất của *D. anosmum* Lindl trong nghiên cứu của chúng tôi được trồng trong hỗn hợp giá thể xơ dừa và than trấu (1:1) là 97,83% sau 12 tuần, kết quả này khá tương đồng với kết quả công bố của Lê Thiên Vinh và cộng sự (2022), với tỷ lệ sống đạt 93,5% của lan *D. anosmum* Lindl. ở Quảng Trị được trồng trên cùng loại giá thể [45]. Hơn nữa, lan Giả hạc tím Huế và *D. thyrsiflorum* Rchb.f. Ex Andre trồng trên bảng dương xỉ có phủ rêu cũng cho kết quả rất tốt có tỷ lệ sống tốt lần lượt là 95,6% và 94,8%. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy lan Giả hạc tím Huế phát triển tốt trong hỗn hợp có 2 loại giá thể này, nhưng các giá thể đều phải đảm bảo duy trì độ thông thoáng và độ ẩm, đó là điều cần thiết để cho cây con *in-vitro* trồng thành công trong điều kiện vườn ươm.

**Bảng 3.23.** Ảnh hưởng của giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con *in-vitro* Giả hạc tím Huế trong vườn ươm sau 12 tuần trồng

| Thí nghiệm  | Tỷ lệ cây con sống (%)   | cao cây (cm)            | Đường kính cây (cm)    | Số lá                   | Chiều rộng lá (cm)      | Chiều dài lá (cm)       | Lá mới                 |
|-------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Cây ban đầu | -                        | 5,2 ± 0,5 <sup>d</sup>  | 0,3 ± 0,0 <sup>d</sup> | 5,5 ± 0,4 <sup>c</sup>  | 0,6 ± 0,1 <sup>e</sup>  | 3,2 ± 0,2 <sup>e</sup>  | 0,0 ± 0,0 <sup>c</sup> |
| CT1         | 97,8 ± 0,4 <sup>a</sup>  | 9,9 ± 0,3 <sup>a</sup>  | 0,9 ± 0,0 <sup>a</sup> | 11,3 ± 0,4 <sup>a</sup> | 1,5 ± 0,0 <sup>a</sup>  | 5,0 ± 0,2 <sup>a</sup>  | 5,8 ± 0,2 <sup>a</sup> |
| CT2         | 90,7 ± 1,7 <sup>b</sup>  | 7,5 ± 0,6 <sup>c</sup>  | 0,6 ± 0,0 <sup>c</sup> | 9,5 ± 0,2 <sup>b</sup>  | 1,3 ± 0,1 <sup>cd</sup> | 3,8 ± 0,2 <sup>d</sup>  | 4,1 ± 0,2 <sup>b</sup> |
| CT3         | 87,7 ± 1,3 <sup>bc</sup> | 7,7 ± 0,8 <sup>c</sup>  | 0,7 ± 0,0 <sup>b</sup> | 9,5 ± 0,4 <sup>b</sup>  | 1,4 ± 0,1 <sup>ab</sup> | 4,3 ± 0,2 <sup>c</sup>  | 4,0 ± 0,3 <sup>b</sup> |
| CT4         | 80,7 ± 1,8 <sup>d</sup>  | 7,8 ± 0,5 <sup>c</sup>  | 0,7 ± 0,0 <sup>b</sup> | 9,1 ± 0,2 <sup>b</sup>  | 1,2 ± 0,0 <sup>d</sup>  | 4,1 ± 0,1 <sup>cd</sup> | 3,6 ± 0,2 <sup>b</sup> |
| CT5         | 85,9 ± 1,5 <sup>c</sup>  | 7,6 ± 0,2 <sup>c</sup>  | 0,7 ± 0,0 <sup>b</sup> | 9,3 ± 0,2 <sup>b</sup>  | 1,2 ± 0,0 <sup>d</sup>  | 4,2 ± 0,1 <sup>cd</sup> | 3,8 ± 0,2 <sup>b</sup> |
| CT6         | 95,6 ± 0,5 <sup>a</sup>  | 9,3 ± 0,4 <sup>ab</sup> | 0,8 ± 0,0 <sup>a</sup> | 10,7 ± 0,3 <sup>a</sup> | 1,4 ± 0,0 <sup>ab</sup> | 4,7 ± 0,1 <sup>ab</sup> | 5,3 ± 0,2 <sup>a</sup> |
| CT7         | 88,9 ± 1,2 <sup>bc</sup> | 8,3 ± 0,3 <sup>bc</sup> | 0,5 ± 0,0 <sup>d</sup> | 9,1 ± 0,3 <sup>b</sup>  | 1,3 ± 0,0 <sup>cd</sup> | 4,4 ± 0,1 <sup>bc</sup> | 3,7 ± 0,2 <sup>b</sup> |

Trung bình ± sai số chuẩn (SE); trong cùng một cột có cùng một chữ cái theo sau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan với  $p \leq 0,05$ .

Chú thích: CT1: Xơ dừa: Trấu hun (tỷ lệ 1 : 1, w : w); CT2: Xơ dừa : dón (tỷ lệ 1 : 1, w : w); CT3: Xơ dừa: vỏ thông (tỷ lệ 1 : 1, w : w); CT4: dón (100%); CT5: Xơ dừa (100%); CT6: Gắn trên bảng dương xỉ (20 × 15 cm) có phủ rêu; CT7: Gắn trên gỗ vú sữa (20×15 cm) có phủ dón.

### 3.5.2. Ảnh hưởng giá thể trồng đến các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến giai đoạn vườn ươm

Kết quả nội dung 3.5.1 cho thấy cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế phát triển rất tốt trong trong hỗn hợp giá thể xơ dừa : trấu hun (1:1; w/w). Do đó chúng tôi sử dụng hỗn hợp giá thể này trồng thử nghiệm cây con *in-vitro* của 6 dòng đột biến được lựa chọn, sau 3 tháng chăm sóc ở điều kiện vườn ươm kết quả được trình bày ở bảng 3.24.

Kết quả bảng 3.30 cho thấy tỷ lệ sống của cây con *in-vitro* ở các dòng đột biến tương đối thấp, kết quả cao nhất là dòng M17 với tỷ lệ sống đạt 56,60 %, thấp nhất là 36,80 % ở dòng M13, các dòng HX3, HX10, M5, M14 có tỷ lệ sống cây con từ 41,47 – 53,07 %, kết quả này thấp hơn nhiều so với cây không xử lý đột biến (80,7%-97,8%) ở Bảng 3.24.

**Bảng 3.24.** Ảnh hưởng của giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con *invitro* Giả hạc tím Huế đột biến trong vườn ươm sau 12 tuần.

| Mẫu             | Tỷ lệ cây con sống (%)   | Cao cây (cm)            | Đường kính cây (cm)     | Số lá                    | Chiều rộng lá (cm)     | Chiều dài lá (cm)        | Lá mới                  |
|-----------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Cây con ban đầu | -                        | 5,32±0,27 <sup>d</sup>  | 0,47±0,02 <sup>d</sup>  | 4,73±0,27 <sup>e</sup>   | 0,63±0,02 <sup>c</sup> | 3,42±0,17 <sup>d</sup>   | -                       |
| HX3             | 53,07±1,54 <sup>ab</sup> | 8,27±0,34 <sup>ab</sup> | 0,95±0,04 <sup>a</sup>  | 10,33±0,42 <sup>b</sup>  | 1,45±0,05 <sup>a</sup> | 4,56±0,20 <sup>ab</sup>  | 6,07±0,23 <sup>ab</sup> |
| HX10            | 50,67±1,78 <sup>bc</sup> | 7,74±0,28 <sup>bc</sup> | 0,82±0,04 <sup>b</sup>  | 10,53±0,38 <sup>ab</sup> | 1,22±0,07 <sup>b</sup> | 4,18±0,19 <sup>bc</sup>  | 5,93±0,27 <sup>ab</sup> |
| M5              | 47,33±1,72 <sup>c</sup>  | 7,44±0,26 <sup>bc</sup> | 0,75±0,04 <sup>bc</sup> | 9,53±0,35 <sup>bc</sup>  | 1,14±0,07 <sup>b</sup> | 4,07±0,16 <sup>c</sup>   | 5,53±0,27 <sup>b</sup>  |
| M13             | 36,80±1,32 <sup>e</sup>  | 7,10±0,23 <sup>c</sup>  | 0,72±0,03 <sup>bc</sup> | 7,93±0,37 <sup>d</sup>   | 1,25±0,06 <sup>b</sup> | 4,22±0,06 <sup>bc</sup>  | 3,93±0,23 <sup>c</sup>  |
| M14             | 41,47±1,32 <sup>d</sup>  | 7,68±0,26 <sup>bc</sup> | 0,67±0,02 <sup>c</sup>  | 8,73±0,40 <sup>cd</sup>  | 1,17±0,06 <sup>b</sup> | 4,39±0,08 <sup>a-c</sup> | 4,20±0,26 <sup>c</sup>  |
| M17             | 56,60±1,34 <sup>a</sup>  | 12,80±0,34 <sup>a</sup> | 1,45±0,46 <sup>a</sup>  | 11,53±0,35 <sup>a</sup>  | 1,81±0,05 <sup>a</sup> | 5,83±0,16 <sup>a</sup>   | 6,27±0,18 <sup>a</sup>  |

Trung bình ± sai số chuẩn (SE); trong cùng một cột có cùng một chữ cái theo sau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan với  $p \leq 0,05$ .

Chú thích: **HX3:** Cây từ dòng protocorm xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong thời gian 6 giờ;

**HX10:** Cây từ dòng protocorm xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong thời gian 4 giờ;

**M5:** Cây từ dòng mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 8 giờ;

**M13:** Cây từ dòng mô sẹo xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong thời gian 4 giờ;

**M14:** Cây từ dòng mô sẹo xử lý DMS nồng độ 400 ppm trong thời gian 2 giờ;

**M17:** Cây từ dòng mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ

Khả năng sinh trưởng của cây con *in-vitro* các dòng đột biến tương đối đồng đều với các chỉ tiêu chiều cao cây, đường kính thân cây, số lá, chiều rộng lá, chiều dài lá và số lá mới, tuy vậy kết quả sinh trưởng của dòng M17 là nổi bật nhất kết quả cụ thể tương ứng là 12,80 cm; 1,45 cm; 11,53 lá; 1,51 cm; 5,83 cm; 6,27 lá.

Kết quả này cho thấy, với các dòng đột biến khả năng thích nghi với giá thể trồng kém hơn so với cây bình thường, điều này có thể do những biến đổi bên trong như về cấu trúc mạch dẫn, cấu trúc tế bào, hàm lượng diệp lục, khả năng quang hợp, khả năng hấp thụ dinh dưỡng... đã tác động đến tỷ lệ sống sót của cây con đột biến, tuy vậy một số chỉ tiêu sinh trưởng (chiều cao cây, dài lá, đường kính thân) lại tốt hơn so với cây bình thường đặc biệt là những dòng đột biến đa bội.

### **3.5.3. Điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng) ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến ra vườn**

Cây con *in-vitro* đủ tiêu chuẩn (cao 4-5 cm, có 4-5 lá), không nhiễm nấm bệnh được trồng trên giá thể hỗn hợp sơ dừa: trấu hun (1:1, w/w), nhiệt độ được điều chỉnh ở mức 28-35°C, độ ẩm điều chỉnh ở mức 70-85 % bằng hệ thống tưới nước dạng phun sương. Ánh sáng được điều chỉnh theo các thí nghiệm không che nắng (CT1), che nắng 25 % (CT2), Che nắng 50 % (CT3), che nắng 75 % (CT4), che nắng 100 % (CT5). Kết quả điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng) ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến ra vườn được trình bày ở bảng 3.25, hình 3.39.

Ánh sáng có tác động lớn đến khả năng sinh trưởng của cây lan, đặc biệt là cây lan con *in-vitro* mới trồng. Ánh sáng còn là tác nhân chính kéo theo sự thay đổi các yếu tố môi trường khác như nhiệt độ, độ ẩm.

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy khi không được che nắng cây lan con đột biến có tỷ lệ sống thấp nhất chỉ đạt 10,00 %, cây lan không có dấu hiệu sinh trưởng cụ thể lá đều héo vàng và khô, không có lá mới xuất hiện, rễ không sinh ra thêm ngược lại còn bị chết rễ, số rễ chỉ còn 2,47 rễ, ở công thức này nhận thấy cây và giá thể trồng bị nhiễm nấm bệnh là thấp nhất chỉ 6,67 % (CT1).

**Bảng 3.25.** Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng thích nghi, sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến sau 3 tháng ở vườn ươm.

| CT    | Tỷ lệ cây sống (%)      | Tỷ lệ cây nhiễm nấm bệnh (%) | Chiều cao cây (cm)      | Đường kính cây (cm)    | Số lá                   | Lá mới                 | Dài lá (cm)            | Rộng lá (cm)           | Số rễ (cm)             | Dài rễ (cm)             |
|-------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| start | -                       | -                            | 5,32±0,27 <sup>d</sup>  | 0,45±0,02 <sup>c</sup> | 4,73±0,27 <sup>c</sup>  | -                      | 3,42±0,17 <sup>d</sup> | 0,63±0,02 <sup>d</sup> | 5,83±0,30 <sup>b</sup> | 4,43±0,25 <sup>c</sup>  |
| CT1   | 10,00±1,24 <sup>d</sup> | 6,67±0,96 <sup>a</sup>       | 5,85±0,22 <sup>cd</sup> | 0,49±0,01 <sup>c</sup> | 0,00±0,00 <sup>d</sup>  | 0,00±0,00 <sup>d</sup> | 0,00±0,00 <sup>e</sup> | 0,00±0,00 <sup>e</sup> | 2,47±0,55 <sup>c</sup> | 2,40±0,43 <sup>d</sup>  |
| CT2   | 33,33±1,37 <sup>c</sup> | 16,67±0,90 <sup>b</sup>      | 6,58±0,20 <sup>c</sup>  | 0,57±0,02 <sup>c</sup> | 5,60±0,34 <sup>c</sup>  | 0,87±0,38 <sup>c</sup> | 4,16±0,23 <sup>c</sup> | 1,16±0,12 <sup>b</sup> | 6,17±0,30 <sup>b</sup> | 4,86±0,26 <sup>bc</sup> |
| CT3   | 56,67±1,63 <sup>a</sup> | 20,00±0,89 <sup>c</sup>      | 8,80±0,34 <sup>b</sup>  | 1,05±0,06 <sup>a</sup> | 11,53±0,35 <sup>a</sup> | 6,80±0,47 <sup>a</sup> | 4,83±0,16 <sup>b</sup> | 1,51±0,05 <sup>a</sup> | 7,73±0,33 <sup>a</sup> | 6,31±0,24 <sup>a</sup>  |
| CT4   | 43,33±2,13 <sup>b</sup> | 33,33±1,40 <sup>d</sup>      | 10,54±0,43 <sup>a</sup> | 0,74±0,06 <sup>b</sup> | 9,33±0,60 <sup>b</sup>  | 4,60±0,58 <sup>b</sup> | 5,23±0,19 <sup>b</sup> | 0,93±0,09 <sup>c</sup> | 6,03±0,26 <sup>b</sup> | 5,54±0,32 <sup>ab</sup> |
| CT5   | 36,67±1,16 <sup>c</sup> | 63,33±2,06 <sup>e</sup>      | 11,20±0,42 <sup>a</sup> | 0,57±0,05 <sup>c</sup> | 8,93±0,55 <sup>b</sup>  | 4,20±0,47 <sup>b</sup> | 6,36±0,24 <sup>a</sup> | 0,69±0,06 <sup>d</sup> | 5,83±0,21 <sup>b</sup> | 5,78±0,30 <sup>a</sup>  |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test)

Chú thích: CT1. không che nắng; CT2. Che nắng 25%; CT3. Che nắng 50%; CT4. Che nắng 75%; CT5. Che nắng 100%



**Hình 3.39.** Thí nghiệm ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng sinh trưởng của lan con *in-vitro* Giả hạc tím Huế đột biến đột biến ở vườn ươm.

Khi tỷ lệ che nắng tăng lên dẫn đến tỷ lệ sống của cây con cải thiện, có hiệu quả cao nhất khi tỷ lệ che nắng 50 %, cụ thể tỷ lệ sống đạt 56,67 %, chiều cao cây đạt 8,80 cm, đường kính thân cây có được là 1,05 cm, số lá đạt được 11,53 lá trong đó có 6,80 lá mới được sinh ra, chiều dài lá đạt 4,83 cm, chiều rộng lá là 1,51 cm, số rễ cây có được là 7,73 rễ, rễ dài trung bình 6,31 cm, tỷ lệ cây và giá thể bị nhiễm nấm bệnh tăng lên ở mức 20,00 % (CT3). Khi tỷ lệ che nắng lên 75 % (CT4), 100 % (CT5), các chỉ tiêu đánh giá lại giảm xuống cụ thể tỷ lệ sống của cây theo thứ tự là 43,33 %, 36,67 %, tỷ lệ nhiễm bệnh lại tăng cao 33,33 % và 63,33 %, chiều cao cây đạt 10,54 cm và 11,20 cm, đường kính thân đạt 0,74 cm và 0,57 cm, số lá đạt 9,33 lá và 8,93 trong đó số lá mới có được là 4,60 lá và 4,02 lá, chiều dài lá đạt 5,33 cm và 6,36 cm, chiều rộng của lá đạt 0,93 cm và 0,69 cm, số rễ của cây đạt 6,03 rễ và 5,83 rễ, và rễ có chiều dài trung bình là 5,54 cm và 5,78 cm. 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 %.

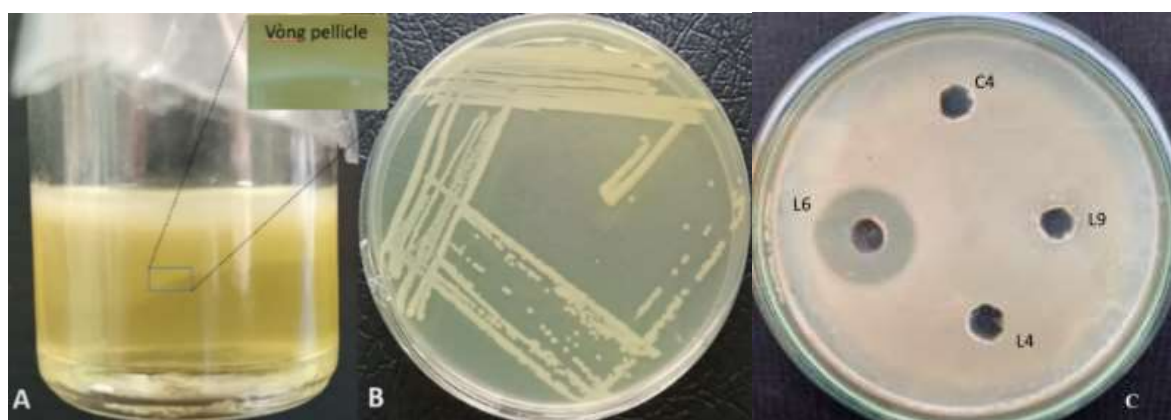
### **3.5.4 Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến**

#### **3.5.4.1 Kết quả phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ lan rừng**

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. Phần lớn các chủng phân lập được có hình thái khuẩn lạc là màu trắng (73,4 %) một số ít (26,6 %) là màu sắc khác (vàng, vàng nhạt, hồng hoặc cam). Ngoài ra, đặc điểm bề mặt khuẩn lạc có trơn nhầy, khô ráp, hoặc bóng nhẵn. Mép của khuẩn lạc qua quan sát thấy thường tròn đều hoặc lượn sóng. (Bảng P12-3.13 phụ lục 12). Các mô tả về đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh tương tự trong các nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh và Đỗ Minh Thu [31]; Nguyễn Thị Thúy Duy và cộng sự [38].

Kiểm tra hoạt tính của 30 chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập cụ thể có được 18 chủng có khả năng phân giải lân, đây là hoạt tính hòa tan tri-calcium phosphas (TCP) có trong môi trường Pikovaskya, 16 chủng có khả năng cố định đạm, có 15 chủng có khả năng sinh IAA, có được 18 chủng có khả năng sinh NH<sub>3</sub>, và có 1 chủng (L6) có khả năng đối kháng, ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh thối nhũn, vòng sáng kháng khuẩn hình thành với đường kính đạt 2,12 cm (Hình 3.40), (Bảng P12-3.13 phụ lục 12).

Nghiên cứu đã chọn lựa được 3 chủng có các hoạt tính hoá sinh mạnh nhất để định danh xác định loài đó là L4, L6 và C4. Xác định loài qua việc giải trình tự gen mã hóa vùng 16S rRNA, kết quả 3 chủng L4, L6 và C4 thứ tự được xác định là vi khuẩn *Burkholderia* sp., vi khuẩn *Bacillus cereus* và vi khuẩn *Pseudomonas boreopolis* (Hình P14-3.4 phụ lục 14). Kết quả có sự tương đồng với một số công bố trước đây về đặc điểm của những chủng vi sinh này như đặc tính hoá sinh của chi vi khuẩn *Pseudomonas* [139]. Những đặc điểm về hoạt tính hoá sinh của chủng *Bacillus cereus* cũng tương đồng với nghiên cứu của Akhtar Nosheen và cộng sự [47]. Đặc biệt chủng này có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối nhũn điều này đã ghi nhận bởi nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Mai và cộng sự (2020) về khả năng đối kháng của chi *Bacillus* đối với vi khuẩn gây bệnh thối nhũn [30]. Các hoạt tính của *Burkholderia* sp. trong nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của Hau-Hsuan Hwang và cộng sự [93].



**Hình 3.40.** Phân lập và tạo dòng thuần khiết các vi khuẩn nội sinh. (A. phân lập vi khuẩn nội sinh trong môi trường bán lỏng NA; B. Tạo dòng thuần khiết, C. Thử nghiệm khả năng đối kháng của vi sinh vật nội sinh với vi khuẩn gây thối nhũn trên lan.

Như vậy, 3 chủng vi khuẩn được lựa chọn để định danh có mức tương đồng khá cao với các chủng liên quan đã được công bố trước đó, và cũng là những chi vi khuẩn có các loài vi khuẩn nội sinh phổ biến, được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực sản xuất phân bón, chế phẩm vi sinh.

#### 3.5.4.2. Chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh

Ba chủng vi sinh vật nội sinh *Pseudomonas boreopolis*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia* sp. tiến hành nuôi thu sinh khối. Sinh khối này trộn với dung dịch dinh dưỡng theo tỷ lệ 1:50;

1:100, 1:500 (chế phẩm kí hiệu CP2, CP3, CP4). Hỗn hợp lên men trong thời gian 3 tháng được chiết dịch sử dụng, liều lượng sử dụng là 10 ml/L nước, phun 2 lần/tuần, ở các thí nghiệm. Kết quả thử nghiệm được thể hiện qua bảng 3.26.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* là rất cao, trên 90% ở tất cả các thí nghiệm. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh thể hiện rõ ở tỷ lệ cây nhiễm nấm bệnh, với công thức sử dụng chế phẩm luôn có tỷ lệ nhiễm nấm bệnh thấp hơn so với đối chứng. Ở công thức CP2 tỷ lệ nhiễm nấm bệnh giảm xuống còn 7,56% so với 21,56% đối chứng (CP1). Ngoài ra, các chỉ tiêu sinh trưởng đều có kết quả tốt khi sử dụng chế phẩm (Bảng 3.26). Hiệu quả sử dụng chế phẩm ở CP3 và CP4 tương đối tốt, cao hơn đối chứng tuy nhiên không hiệu quả bằng công thức CP2 (Bảng 3.26). Như vậy, với kết quả thí nghiệm đã cho thấy chế phẩm vi sinh từ vi sinh vật nội sinh có hiệu quả rất tốt đối với sự sinh trưởng phát triển và khả năng đề kháng bệnh của cây lan con *in-vitro* ở giai đoạn vườn ươm.

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy 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%, kết quả này chứng tỏ ba loại chế phẩm vi sinh CP2, CP5, CP6 đem lại hiệu quả rất tốt tương đương nhau cho lan Giả hạc tím Huế (Bảng 3.26). Như vậy kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm vi sinh từ vi sinh vật nội sinh do nhóm nghiên cứu tạo ra có hiệu quả rất tốt và tương đương với những sản phẩm hiện có trên thị trường.

Kết quả này cũng có sự tương đồng với những nghiên cứu trước đây như nghiên cứu của Nguyễn Văn Hồng và cộng sự (2022) [17], De Medeiros và cộng sự (2023) [120] sử dụng chế phẩm vi sinh đều cho kết quả tác dụng tốt đến sinh trưởng và sinh khối của lan trong điều kiện nhà kính. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Diễm và cộng sự (2021), trên lan *D. anosmum* ‘Di Linh’, kết quả cho thấy sử dụng chế phẩm vi sinh không những hỗ trợ cho *D. anosmum* ‘Di Linh’ sinh trưởng, phát triển, tăng sinh khối tốt, có hiệu quả tương đương với phân hoá học, chế phẩm vi sinh còn giúp cây khoẻ hơn, giảm được sâu bệnh [7]. Như vậy có thể thấy chế phẩm vi sinh có tác động tốt đến sinh trưởng của lan *D. anosmum* và có thể được ứng dụng rộng rãi cho nhiều loài lan khác.

**Bảng 3.26.** Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng.

| CP    | Tỷ lệ cây sống (%)       | Tỷ lệ cây nhiễm nấm bệnh (%) | Chiều cao cây (cm)      | Đường kính cây (cm)     | Số lá                   | Lá mới                  | Dài lá (cm)             | Rộng lá (cm)           | Số rễ (rễ)              | Dài rễ (cm)             |
|-------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| start | -                        | -                            | 4,71±0,27 <sup>d</sup>  | 0,34±0,02 <sup>d</sup>  | 4,53±0,22 <sup>c</sup>  | -                       | 3,29±0,17 <sup>d</sup>  | 0,55±0,03 <sup>d</sup> | 6,21±0,34 <sup>c</sup>  | 4,10±0,24 <sup>c</sup>  |
| CP1   | 97,78±0,70 <sup>a</sup>  | 21,56±0,85 <sup>d</sup>      | 7,78±0,51 <sup>c</sup>  | 0,55±0,04 <sup>c</sup>  | 8,33±0,35 <sup>b</sup>  | 3,80±0,36 <sup>c</sup>  | 4,29±0,26 <sup>c</sup>  | 0,73±0,06 <sup>d</sup> | 6,71±0,23 <sup>bc</sup> | 5,10±0,29 <sup>b</sup>  |
| CP2   | 98,22±0,64 <sup>ab</sup> | 7,56±0,76 <sup>a</sup>       | 12,25±0,67 <sup>a</sup> | 1,20±0,10 <sup>a</sup>  | 10,80±0,55 <sup>a</sup> | 6,27±0,49 <sup>a</sup>  | 5,56±0,27 <sup>a</sup>  | 1,74±0,04 <sup>a</sup> | 8,11±0,39 <sup>a</sup>  | 6,70±0,39 <sup>a</sup>  |
| CP3   | 97,56±0,89 <sup>a</sup>  | 13,78±1,25 <sup>bc</sup>     | 10,65±0,59 <sup>b</sup> | 0,85±0,09 <sup>b</sup>  | 10,40±0,68 <sup>a</sup> | 5,67±0,65 <sup>ab</sup> | 4,76±0,28 <sup>bc</sup> | 1,32±0,09 <sup>b</sup> | 7,35±0,30 <sup>ab</sup> | 6,04±0,34 <sup>ab</sup> |
| CP4   | 97,78±0,70 <sup>a</sup>  | 19,56±0,79 <sup>d</sup>      | 8,78±0,38 <sup>c</sup>  | 0,72±0,07 <sup>bc</sup> | 9,47±0,50 <sup>ab</sup> | 4,73±0,44 <sup>bc</sup> | 4,43±0,26 <sup>b</sup>  | 1,05±0,09 <sup>c</sup> | 6,85±0,34 <sup>bc</sup> | 5,34±0,30 <sup>b</sup>  |
| CP5   | 97,56±0,61 <sup>a</sup>  | 14,67±1,02 <sup>c</sup>      | 12,53±0,59 <sup>a</sup> | 0,68±0,02 <sup>bc</sup> | 10,20±0,45 <sup>a</sup> | 5,67±0,37 <sup>ab</sup> | 5,55±0,23 <sup>a</sup>  | 1,56±0,09 <sup>a</sup> | 7,65±0,29 <sup>ab</sup> | 6,48±0,33 <sup>a</sup>  |
| CP6   | 98,67±0,54 <sup>ab</sup> | 11,56±1,17 <sup>b</sup>      | 12,20±0,51 <sup>a</sup> | 0,76±0,02 <sup>b</sup>  | 10,40±0,42 <sup>a</sup> | 5,87±0,39 <sup>ab</sup> | 5,09±0,18 <sup>ab</sup> | 1,54±0,09 <sup>a</sup> | 8,24±0,35 <sup>a</sup>  | 6,83±0,34 <sup>a</sup>  |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test))



**Hình 3.41.** Ảnh hưởng của các chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng.

- CP1. Đối chứng, không sử dụng chế phẩm vi sinh.
- CP2. Sử dụng chế phẩm vi sinh với tỷ lệ vi sinh vật nội sinh và chất nền phụ gia 1/50.
- CP3. Sử dụng chế phẩm vi sinh với tỷ lệ vi sinh vật nội sinh và chất nền phụ gia 1/100
- CP4. Sử dụng chế phẩm vi sinh với tỷ lệ vi sinh vật nội sinh và chất nền phụ gia 1/500
- CP5: Dùng chế phẩm GE
- CP6: Dùng chế phẩm bán trên thị trường

### 3.5.4.3. Ảnh hưởng của chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến

Khảo sát ảnh hưởng của chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến từ đó làm cơ sở ứng dụng chế phẩm này trong quy trình huấn luyện cây lan đột biến ra vườn ươm. Thí nghiệm sử dụng 6 dòng đột biến (HX3, HX10, M5, M13, M14, M17) và một dòng đối chứng (M1), chế phẩm CP2 sử dụng liều lượng 10ml/Lít nước, phun 2 lần/tuần. Kết quả trình bày ở bảng 3.27, hình 3.43.

Tỷ lệ cây bị nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm từ 7,11 – 8,89 %. Các dòng đột biến sinh trưởng tốt hơn khi có sử dụng chế phẩm, Trong 6 dòng đột biến, M17 có phản ứng tốt nhất với chế phẩm (tỷ lệ sống 67,56 %, chiều cao cây 14,16 cm) chứng tỏ đây là dòng có tiềm năng. Các dòng đột biến còn lại khi có sử dụng chế phẩm để chăm sóc cũng hiệu quả tương đối tốt có tỷ lệ sống từ 43,78 – 61,11 %; chiều cao cây dao động từ 10,51 – 13,25 cm (Bảng 3.33). Kết quả đã cho thấy chế phẩm chứa vi sinh vật nội sinh được tạo ra trong nghiên cứu có tác động tốt đến khả năng sinh trưởng và kháng bệnh của các dòng đột biến được lựa chọn. Điều này góp phần giảm sử dụng phân hóa học, thuốc bảo vệ thực vật, đồng thời nâng cao tỷ lệ sống của cây lan đột biến.



**Hình 3.42.** Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh CP2 đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến sau 3 tháng ở vườn ươm.

**Bảng 3.27.** Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* đợt biên giai đoạn vườn ươm.

| CP    | Tỷ lệ cây sống (%)      | Tỷ lệ cây nhiễm nấm bệnh (%) | Chiều cao cây (cm)        | Đường kính cây (cm)     | Số lá                    | Lá mới                  | Dài lá (cm)             | Rộng lá (cm)            | Số rễ (rễ)               | Dài rễ (cm)             |
|-------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| start | -                       | -                            | 4,71±0,27 <sup>e</sup>    | 0,34±0,02 <sup>f</sup>  | 4,53±0,22 <sup>c</sup>   | -                       | 3,29±0,17 <sup>d</sup>  | 0,55±0,03 <sup>e</sup>  | 6,21±0,34 <sup>e</sup>   | 4,10±0,24 <sup>c</sup>  |
| M1    | 98,22±0,64 <sup>a</sup> | 7,56±0,76 <sup>a</sup>       | 12,25±0,67 <sup>b-d</sup> | 1,20±0,10 <sup>ab</sup> | 10,80±0,55 <sup>ab</sup> | 6,27±0,49 <sup>ab</sup> | 5,56±0,27 <sup>ab</sup> | 1,74±0,04 <sup>b</sup>  | 8,11±0,39 <sup>a-c</sup> | 6,70±0,39 <sup>b</sup>  |
| HX3   | 61,11±2,25 <sup>c</sup> | 8,44±0,79 <sup>a</sup>       | 13,25±0,66 <sup>ab</sup>  | 1,35±0,11 <sup>b</sup>  | 11,13±0,51 <sup>ab</sup> | 6,60±0,46 <sup>ab</sup> | 5,83±0,23 <sup>a</sup>  | 1,88±0,10 <sup>ab</sup> | 8,37±0,36 <sup>ab</sup>  | 7,25±0,39 <sup>ab</sup> |
| HX10  | 57,56±2,63 <sup>c</sup> | 8,22±0,72 <sup>a</sup>       | 11,25±0,67 <sup>cd</sup>  | 1,12±0,10 <sup>c</sup>  | 11,07±0,61 <sup>ab</sup> | 6,34±0,67 <sup>ab</sup> | 5,49±0,24 <sup>ab</sup> | 1,39±0,09 <sup>c</sup>  | 7,17±0,38 <sup>c-e</sup> | 7,12±0,48 <sup>ab</sup> |
| M5    | 60,89±1,82 <sup>c</sup> | 7,33±0,67 <sup>a</sup>       | 12,85±0,61 <sup>a-c</sup> | 0,87±0,09 <sup>d</sup>  | 11,09±0,38 <sup>bc</sup> | 6,36±0,50 <sup>ab</sup> | 5,54±0,28 <sup>ab</sup> | 1,36±0,13 <sup>c</sup>  | 7,45±0,41 <sup>b-d</sup> | 7,76±0,38 <sup>ab</sup> |
| M13   | 43,78±1,75 <sup>e</sup> | 7,11±0,72 <sup>a</sup>       | 10,51±0,64 <sup>d</sup>   | 0,58±0,06 <sup>e</sup>  | 10,02±0,46 <sup>b</sup>  | 5,29±0,46 <sup>b</sup>  | 4,53±0,25 <sup>c</sup>  | 0,81±0,10 <sup>de</sup> | 6,81±0,41 <sup>de</sup>  | 6,61±0,34 <sup>b</sup>  |
| M14   | 52,44±1,82 <sup>d</sup> | 8,89±0,84 <sup>a</sup>       | 10,78±0,66 <sup>d</sup>   | 0,64±0,05 <sup>e</sup>  | 10,29±0,33 <sup>b</sup>  | 5,56±0,35 <sup>b</sup>  | 4,86±0,22 <sup>bc</sup> | 0,88±0,11 <sup>d</sup>  | 7,35±0,35 <sup>b-e</sup> | 6,97±0,39 <sup>b</sup>  |
| M17   | 67,56±1,51 <sup>b</sup> | 7,11±1,02 <sup>a</sup>       | 14,16±0,67 <sup>a</sup>   | 1,63±0,07 <sup>a</sup>  | 12,00±0,58 <sup>a</sup>  | 7,27±0,61 <sup>a</sup>  | 6,09±0,26 <sup>a</sup>  | 2,08±0,11 <sup>a</sup>  | 8,88±0,41 <sup>a</sup>   | 8,17±0,37 <sup>a</sup>  |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test))

### 3.5.5 Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế

Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế thực hiện 7 bước (Quy trình 2, phụ lục 17):

**Bước 1:** Lấy mẫu. Mẫu lan Giả hạc tím Huế được thu thập, nuôi dưỡng.

**Bước 2:** Khử trùng mẫu. Khử trùng đoạn thân hoặc quả.

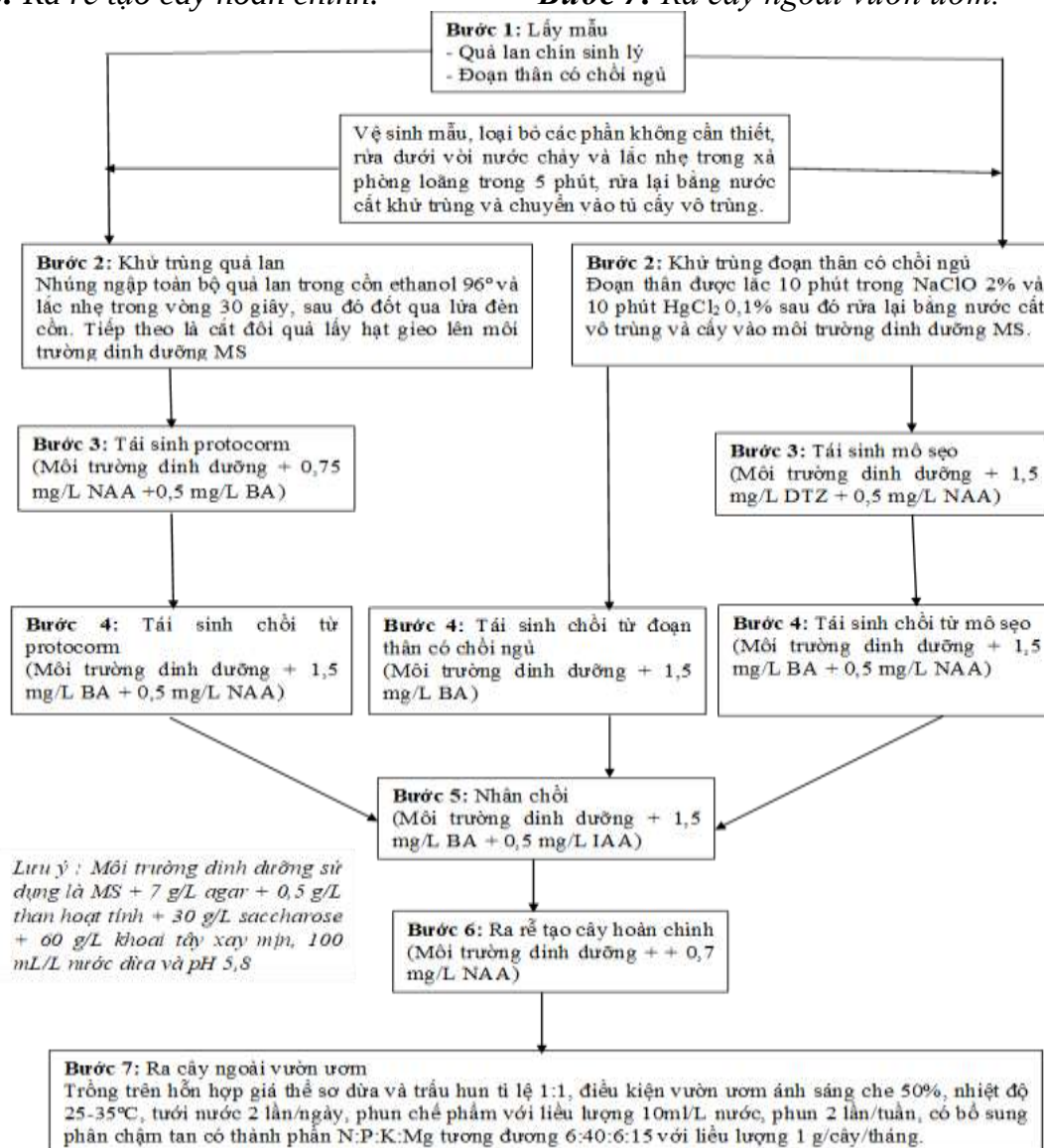
**Bước 4:** Tái sinh chồi.

**Bước 6:** Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

**Bước 3:** Tái sinh mô sẹo hoặc protocorm tạo vật liệu khởi đầu.

**Bước 5:** Nhân chồi.

**Bước 7:** Ra cây ngoài vườn ươm.



**Hình 3.43.** Sơ đồ quy trình nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế

## 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.

### 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 BÀI BÁO, CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, Pham Thanh, Hoang Khanh Linh, 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, 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, Lê Thị Thu Hằng, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024). *Nghiên cứu ảnh hưởng của Dimethyl sulphate (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*. Tạp chí Đại học Huế, Tập 133, số 1C.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu tiếng Việt

- [1] Nguyễn Tiến Bản, Trần Đình Lý, Nguyễn Tập, Vũ Văn Dũng, Nguyễn Nghĩa Thìn, Nguyễn Văn Tiến, Nguyễn Khắc Khôi, ‘Phần II: Thực vật’, in *sách đỏ Việt Nam*, Nguyễn Tiến Bản, Trần Đình Lý, Eds., Hà Nội, Việt Nam: Nhà xuất bản khoa học tự nhiên và Công nghệ, 2007, p. 115.
- [2] Nguyễn Tiến Bản, *Danh lục các loài Thực vật Việt Nam (Tập III)*. Hà Nội: Nhà xuất bản Nông nghiệp., 2005.
- [3] Cao Phi Bằng, ‘Những biến đổi sinh lý, hoá sinh của cây Phong lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) trong quá trình luyện ex vitro’, *Phát triển khoa học và công nghệ*, vol. 2, no. 3, pp. 59–67, 2018.
- [4] Trần Văn Bảo, *Kỹ thuật nuôi trồng phong lan. Thành Phố Hồ Chí Minh*, Việt Nam: Nhà xuất bản trẻ, 1999.
- [5] Hoàng Việt Cường, Mai Thị Hoàng Anh, Tử Quang Tân, Chu Hoàng Mậu ‘phân tích vùng gene lục lạp, rbcL, phân lập từ cây lan tai cáo (*Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight)’, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, vol. 228, no. 01, pp. 474–481, 2023.
- [6] Đ.Ph.Pêtrôp, *Di truyền học và cơ sở chọn giống*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà xuất bản Nông nghiệp., 1984.
- [7] N Nguyễn Thị Diễm, Nguyễn Thị Oanh, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Hữu Thọ, Nguyễn Thị Kim Cúc, ‘Một số biện pháp kỹ thuật trồng và chăm sóc cây lan giả hạc Di Linh (*Dendrobium anosmum* DL.) từ cây con In vitro’, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế Khoa học Tự nhiên*, vol. 130, no. 1A, pp. 107–115, 2021, doi: 10.26459/hueunijns.v130i1a.5907.
- [8] Lê Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thanh Điềm, Nguyễn Như Hoa, Trần Hoàng Dũng, Vũ Thị Huyền Trang, ‘Đánh giá đa dạng di truyền của một số loài Lan *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam’, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường ĐH Nguyễn Tất Thành*, vol. 3, no. 3, pp. 1–12, 2020, doi: <https://doi.org/10.55401/jst.v3i3.113>.
- [9] Nguyễn Thị Diệp, Huỳnh Thị Kim., ‘Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống in vitro lan kiếm Phan Trí (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.)’, *TNU J. Sci. Technol.*, vol. 8, no. 225, pp. 479–486, 2020.
- [10] Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Dương Hoa Xô, ‘Phân tích sự đa dạng di truyền giữa các giống lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) dựa trên chỉ thị phân tử SSR’, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, pp. 112–117, 2020.
- [11] Nguyễn Thị Mỹ Duyên, ‘Quy trình nhân giống lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*.)’, *AGU Int. J. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 73 – 82, 2021.
- [12] Nguyễn Văn Giang, Phạm Phương Thu, Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Thanh Mai, ‘Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên’, Bản B của *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, vol. 60, no. 5, 2018, [Online]. Available: [https://b.vjst.vn/index.php/ban\\_b/article/view/480](https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/480)
- [13] Đặng Thị Thu Hà, Phạm Thu Hà, ‘Nghiên cứu nhân giống lan phi điệp tím (*D.anosmum* Lindl) bằng kỹ thuật nuôi cây in-vitro’, *Khoa học công nghệ nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, vol. 2, no. 7, pp. 101–120, 2020.

- [14] Ngọc Hà, ‘Mỗi héc ta trồng hoa lan mang về cho nhà vườn 1 tỉ đồng’, Kinh tế Sài Gòn online, 2023, [Online]. Available: <https://thesaigontimes.vn/moi-hec-ta-trong-hoa-lan-mang-ve-cho-nha-vuon-1-ti-dong/>
- [15] Trương Thị Hồng Hải, Hoàng Văn Nam, Dương Thanh Thủy, Trần Thị Triều Hà, Trần Thị Phương Nhung, *Công nghệ sinh học ứng dụng trong cây trồng*. Huế, Việt Nam: Nhà xuất bản Đại học Huế, 2018.
- [16] Trương Thị Hồng Hải, Trần Bảo Nga, ‘Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn giống mướp hương (*Luffa cylindrica* (L.) Roem) bằng chỉ thị RAPD’, *Hue Univ. J. Sci. Nat. Sci.*, vol. 127, no. 1C, pp. 43–51, 2018.
- [17] Nguyễn Văn Hồng, Nguyễn Thị Tình, Đoàn Tiến Dũng, Vũ Thị Huệ, Nguyễn Thế Hùng, Nguyễn Hữu Thọ, ‘Ảnh hưởng của chế phẩm sinh học đến sinh trưởng và sinh khối lan Thạch học tía trồng trong nhà lưới’, *Tạp chí khoa học và công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, vol. 7, no. 140, pp. 57–64, 2022.
- [18] Trần Hợp, *Phong lan Việt Nam*. Khoa học và kỹ thuật, 1990.
- [19] Đào Quốc Hưng, Đỗ Đăng Giáp, Trần Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Kim Khoa, Nguyễn Văn Đệ, Đỗ Đức Thăng, ‘Nghiên cứu ảnh hưởng của đèn led trong quy trình vi nhân giống lan giả hạc di linh Taly’, *Khoa học và công nghệ*, vol. 53B, pp. 48–55, 2021.
- [20] Đào Quốc Hưng, Đỗ Đăng Giáp, Trần Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Kim Khoa, Nguyễn Văn Đệ, Đỗ Đức Thăng, ‘Hiệu quả của đèn phát sáng trong vi sinh sản *Dendrobium anosmum* di linh taly’, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* -, vol. 53, no. 5, pp. 1–8, 2021, doi: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v53i05.4186>.
- [21] Trần Công Khánh, *Phương pháp nghiên cứu với kính hiển vi*. Hà Nội, Việt Nam: NXB Y Học, 2005.
- [22] Dương Công Kiên, *Nuôi cấy mô thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh., 2002.
- [23] Nguyễn Thị Lại, Phạm Hương Sơn, Vũ Mạnh Hải, Tống Xuân Trung, ‘Nghiên cứu nhân giống lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào’, *Vietnam J. Sci. Technol.*, vol. 60, no. 5, 2018.
- [24] Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Thanh Xuân, Ngô Thị Bảo Châu, ‘Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai’, *tạp chí khoa học và công nghệ, Trường đại học khoa học Huế, ĐH Huế*, vol. 17, no. 2, pp. 169–179, 2020.
- [25] Trần Thị Ngọc Lan, Trần Thị Hoàng Anh, ‘Sự hình thành mô sẹo phát sinh phôi sinh dưỡng và cây con từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống địa lan lai vàng hoàng hậu (*Cymbidium hybrid* “fx750” )’, *Tạp chí khoa học Yersin*, vol. 3, pp. 24–33, 2017.
- [26] Nguyễn Thị Thu Liên, Hoàng Tấn Quảng, Chỉ Thị Phân Tử. Huế, Việt Nam: Nhà xuất bản Đại học Huế, 2015.
- [27] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc ở Việt Nam*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà Xuất bản Y học , Hanoi, Vietnam, 2004.
- [28] Phan Văn Hoài Luân, Mai Thị Phương Hoa, Đỗ Tiến Vinh, ‘Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và hợp chất hữu cơ đến quá trình nhân giống in vitro cây Lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.)’, *J. Sci. Technol.*, vol. 7, no. 4, 2024.
- [29] Lê Đình Lương, *Di truyền học: Những vấn đề nguyên lý và thực tiễn*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà Xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 2019.

- [30] Nguyễn Thị Thanh Mai, Trương Thị Chiên, Vũ Xuân Tạo, Phan Xuân Bình Minh, Ngô Thị Hoa, Trần Bảo Trâm, ‘Nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *Erwinia carotovora* của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* B45 phân lập từ đất trồng đinh lăng’, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, pp. 409–413, 2020.
- [31] Nguyễn Thị Minh, Đỗ Minh Thu, ‘Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất mặn huyện giao thủy, tỉnh Nam Định’, *Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, pp. 1022–1032, 2017, doi: <http://www1.vnua.edu.vn/tapchi/upload/8-2017/4.pdf>.
- [32] Nguyễn Công Nghiệp, *Trồng hoa lan. Thành Phố Hồ Chí Minh*, Việt Nam: Nhà xuất bản trẻ, 2004.
- [33] Hồng Nhung, ‘Cây hoa lan, một trong 6 sản phẩm nông nghiệp chủ lực của Tp. Hồ Chí Minh’, Trang thông tin kinh tế TTXVN online, 2019, [Online]. Available: <https://bnews.vn/cay-hoa-lan-mot-trong-6-san-pham-nong-nghiep-chu-luc-cua-tp-ho-chi-minh/120999.html>
- [34] Công ty nhà nước MTV Lâm Nghiệp Tiền Phong, ‘Xây dựng mô hình sản xuất một số loài hoa lan bản địa giá trị cao tại tỉnh Thừa Thiên Huế’, <https://lamnghieptienphong.com.vn>, 2018, [Online]. Available: [http://lamnghieptienphong.com.vn/upload/file/du-an-lan-nghinh-xuan-gia-hac-hoang-thao-\(5\).compressed.pdf](http://lamnghieptienphong.com.vn/upload/file/du-an-lan-nghinh-xuan-gia-hac-hoang-thao-(5).compressed.pdf)
- [35] Huỳnh Thị Trúc Phương, Hồ Viết Thế, ‘Nghiên cứu đặc điểm trình tự vùng ITS trong định danh và xác định mối quan hệ di truyền một số loài lan thuộc chi hoàng thảo (*Dendrobium*)’, *tạp chí công nghệ và thực phẩm*, vol. 21(4), pp. 31–38, 2021.
- [36] Trương Thị Bích Phượng, Tống Văn Bảo Thanh, Phan Thị Thoá Nguyên, Nguyễn Đức Tuấn, Lâm Thị Ngọc Thuý, Hoàng Thị Kim Hồng, Nguyễn Thị Thu Liên., ‘Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn lam đến nhân giống in vitro cây lan hoàng thảo giả hạc (*Dendrobium anosmum* lindl.)’, *Hue Univ. J. Sci. Nat. Sci.*, vol. 131, no. 1C, pp. 73–82, 2022.
- [37] Lê Duy Thành, *Cơ sở di truyền chọn giống thực vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 2001.
- [38] Nguyễn Thị Duy Thụy, Đinh Thị Thái Hà, Đỗ Thị Nhứt, Nguyễn Hữu Hiệp, ‘Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh trong cây Thù lù cạnh (*Physalis angulata* L.) có khả năng kháng khuẩn ở khu vực thành phố Cần Thơ’, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol. 55, no. 4, pp. 10–20, 2019, [Online]. Available: doi: 10.22144/ctu.jvn.2019.103
- [39] Lâm Văn Thông, Trần Nhân Dũng, Lê Văn Hòa, ‘Xác định phương thức truyền biến của lan *Dendrobium* sp. sau xử lý biến đột biến in vitro bằng kỹ thuật RAPD.’, in *Phát triển nông nghiệp bền vững thích ứng với sự biến đổi khí hậu*, 2010, pp. 209–216.
- [40] Vì Thị Xuân Thủy, Phạm Hồng Sơn, Trần Thị Mừng, Trần Thị Hồng Xuân, Phạm Hoàng Đan, và Hà Đăng Chiến, ‘Nghiên cứu quy trình nhân giống in vitro lan phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* lindl.) từ mắt ngủ ở thân’, *Tạp chí khoa học và công nghệ*, vol. 26, pp. 48–56, 2022.
- [41] Trần Hợp, *Phong lan Việt Nam*. Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam: Nhà xuất bản Nông nghiệp., 1998.
- [42] Nguyễn Quỳnh Trang, Vũ Thị Huệ, Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thị Thơ, ‘Nhân giống in-vitro lan phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*)’, *Công nghệ sinh học và giống cây trồng*, vol. 3, no. 1, pp. 16–22, 2013.

- [43] Nguyễn Văn Việt, ‘Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy in vitro trong nhân giống lan Hoàng Thảo Vôi (*Dendrobium cretaceum* Lindley)’ , *Khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, vol. 6, no. 79, pp. 55–61, 2017.
- [44] Tri Thức Việt, Hướng dẫn chọn giống và chăm sóc hoa lan dành cho người mới bắt đầu. Hà Nội, Việt Nam: Nhà Xuất Bản Hà Nội, 2021.
- [45] Lê Thiên Vinh, Trương Thị Ly Na, Nguyễn Thị Bích Thu, Nguyễn Thị Diễm, Nguyễn Thị Oanh, Nguyễn Thị Kim Cúc, ‘Nhân giống lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) đột biến bằng phương pháp nuôi cấy in-vitro’, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế Khoa học Tự nhiên*, vol. 131, pp. 5–15, 2022.
- [46] Nguyễn Thị Hải Yến, Nguyễn Thu Hương, ‘Nghiên cứu nhân giống in-vitro lan hoàng thảo phi điệp tím’, *TNU J. Sci. Technol.*, vol. 226, no. 10, pp. 39–46, 2021, doi: 10.34238/tnu-jst.4286.

#### **Tài liệu tiếng anh**

- [47] N. Akhtar et al., ‘Role of *Bacillus cereus* in Improving the Growth and Phytoextractability of *Brassica nigra* (L.) K. Koch in Chromium Contaminated Soil.’, *Molecules*, vol. 26, no. 6, Mar. 2021, doi: 10.3390/molecules26061569.
- [48] M. K. Alam, M. H. Rashid, M. S. Hossain, M. A. Salam, and M. A. Rouf, ‘In vitro seed propagation of *Dendrobium* (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media’, *Biotechnology*, vol. 1, no. 2–4, pp. 111–115, 2002.
- [49] K. D. Ardiyanti and L. Nuraini, ‘Opportunities and challenges for orchid plant cultivation and development in Indonesia’, *Open Sci. Technol.*, vol. 4, no. 1, pp. 19–26, 2024, doi: <https://doi.org/10.33292/ost.v4i1.112>.
- [50] P. Atichart, ‘Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*.’, *Thai J. Agric. Sci.*, vol. 64, no. 1, pp. 59–63, 2013.
- [51] B. F. Awotedu, T. O. Omolola, A. O. Akala, O. L. Awotedu, and S. O. Olaoti-Laaro, ‘Vegetative propagation: A unique technique of improving plants growth’, *World News Nat. Sci.*, vol. 35, pp. 83–101, 2021.
- [52] S. A. Aziz, A. A. Putri, D. Sukma, and M. Syukur, ‘Enhanced growth of in vitro plantlets by cytokinin and pre-colchicine application in *Phalaenopsis amabilis* Blume protocorms’, in *III International Orchid Symposium* 1262, 2019, pp. 205–212.
- [53] K. N. Babu et al., ‘Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques’, *Mol. Plant Taxon. Methods Protoc.*, pp. 219–247, 2021.
- [54] G. C. Baker, J. J. Smith, and D. A. Cowan, ‘Review and re-analysis of domain-specific 16S primers.’, *J. Microbiol. Methods*, vol. 55, no. 3, pp. 541–555, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.009.
- [55] K. Balilashaki et al., ‘Progress and prospect of orchid breeding: An overview’, *Adv. Orchid Biol. Biotechnol. Omi.*, pp. 261–283, 2023.
- [56] B. Basavaraj, N. Nagesha, and M. Jadeyegowda, ‘Molecular characterization of *Dendrobium* orchid species from western Ghat region of Karnataka using RAPD and SSR Markers’, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 2157–2169, 2020.
- [57] D. S. Batista et al., ‘Light quality in plant tissue culture: does it matter?’, *Vitr. Cell. Dev. Biol.*, vol. 54, pp. 195–215, 2018.
- [58] C. A. Beyl, ‘Getting started with tissue culture—media preparation, sterile technique, and laboratory equipment’, in *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*, C. A.

- Beyl, Ed., New York: Routledge, 2018, pp. 21–38. doi: <https://doi.org/10.1201/9780203743133>.
- [59] T. K. Bhowmik and M. M. Rahman, ‘In vitro mass scale propagation and seedlings development of medicinal orchid *Dendrobium transparens* Wall ex Lindl’, *J. Med. Plant Stud.*, vol. 8, no. 3, pp. 141–146, 2020.
- [60] B. Bremer et al., ‘An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III’, *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 161, no. 2, pp. 105–121, 2009, doi: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x.
- [61] J. M. Bric, R. M. Bostock, and S. E. Silverstone, ‘Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane’, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 535–538, 1991, [Online]. Available: doi: <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991%0A>
- [62] S. Bunnag and J. Hongthongkham, ‘Polyploid induction of *Dendrobium draconis* Rchb. f’, in XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: *Crossing Borders* 1087, 2015, pp. 445–451.
- [63] K. Burg, ‘Molecular Markers for Genetic Diversity’, *Prog. Bot.*, vol. 79, pp. 33–47, 2018.
- [64] A. Burzacka-Hinz, M. Narajczyk, M. Dudek, and D. L. Szlachetko, ‘Micromorphology of Labellum in Selected *Dendrobium* Sw.(Orchidaceae, Dendrobieae)’, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 17, pp. 1–27, 2022.
- [65] R. Casanova-Sáez, E. Mateo-Bonmatí, and K. Ljung, ‘Auxin Metabolism in Plants.’, Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.*, vol. 13, no. 3, Mar. 2021, doi: 10.1101/cshperspect.a039867.
- [66] J. B. Castro and R. B. Singer, ‘A literature review of the pollination strategies and breeding systems in Oncidiinae orchids’, *Acta Bot. Brasilica*, vol. 33, pp. 618–643, 2019, doi: DOI: 10.1590/0102-33062019abb0111.
- [67] K. Chadipiralla, P. Gayathri, V. Rajani, and P. V. B. Reddy, Plant tissue culture and crop improvement. *Springer*, 2020.
- [68] C. Chu, H. Yin, L. Xia, D. Cheng, J. Yan, and L. Zhu, ‘Discrimination of *Dendrobium officinale* and its common adulterants by combination of normal light and fluorescence microscopy’, *Molecules*, vol. 19, no. 3, pp. 3718–3730, 2014.
- [69] P. Cuénoud, V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Grayer, and M. W. Chase, ‘Molecular phylogenetics of *Caryophyllales* based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences’, *Am. J. Bot.*, vol. 89, no. 1, pp. 132–144, 2002.
- [70] T. T. Dang et al., ‘Micropropagation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl’, *J. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 127–135, 2018.
- [71] D. David, N. A. Rusdi, R. A. Mohd Mokhtar, A. A. Mohd Faik, and J. A. Gansau, ‘Establishment of in vitro regeneration protocol for Sabah’s Jewel orchid, *Macodes limii* J.J. Wood et lamb’, *Horticulturae*, vol. 8, no. 2, pp. 155–165, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020155>.
- [72] L. C. De, ‘Morphological diversity in orchids’, *Int. J. Bot. Stud.*, vol. 5, pp. 229–238, 2020.
- [73] S. Dohling, S. Kumaria, and P. Tandon, ‘Multiple shoot induction from axillary bud cultures of the medicinal orchid, *Dendrobium longicornu*’, *AoB Plants*, p. pls032, 2012, doi: doi:10.1093/aobpla/pls032.

- [74] J. Doyle, 'DNA protocols for plants', in *Molecular techniques in taxonomy*, Springer, 1991, pp. 283–293.
- [75] S. P. Dube, R. Dey, S. Devi, and R. Raghuwanshi, 'Seed Quality, Chlorophyll and Carotene Content in *Brassica juncea* L. Leaves at Two Growth Stages in Response to Rhizospheric Bacteria.', *Curr. Agric. Res. J.*, vol. 12, no. 2, pp. 820–835, 2024.
- [76] S. C. M. Dumlao, M. L. K. Lacsento, P. V. L. Marquina, M. M. R. Nacario, and H. A. Pelayo, 'The comparative hypoglycemic effect of *Dendrobium anosmum* (Sanggumay) ethanolic extract on glucose powder-induced *Gallus galus domesticus* (Chick) embryo', *La Salle Med. Heal. Sci. J.*, pp. 1–12, 2019.
- [77] R. Edens-Meier and P. Bernhardt, *Darwin's orchids: then and now*. University of Chicago Press, 2019.
- [78] W.-H. Eng and W.-S. Ho, 'Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review', *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 246, pp. 604–617, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>.
- [79] S. Feng, H. Zhao, J. Lu, J. Liu, b o Shen, and H. Wang, 'Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme*', *J. Genet.*, vol. 92, no. 2, pp. 205–212, 2013, doi: 10.1007/s12041-013-0246-y.
- [80] E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk, 'Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors', in *Plant propagation by tissue culture*, Springer, 2008, pp. 175–204.
- [81] E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk, 'The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems', in *Plant Propagation by Tissue Culture*, E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk, Eds., Dordrecht: Springer, 2008, pp. 115–173. doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_4).
- [82] R. Govaerts, E. Nic Lughadha, N. Black, R. Turner, and A. Paton, 'The World Checklist of Vascular Plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity', *Sci. data*, vol. 8, no. 1, pp. 1–215, 2021.
- [83] M. S. Harahap, F. Harahap, and S. Edi, 'In vitro multification of *Dendrobium* sp. with plant growth regulator', in *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 2020, p. 12041.
- [84] S. Hartati, O. Cahyono, and A. N. Hariyadi, 'Morphological characterization of natural orchids *Dendrobium* spp.', in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 2021, pp. 1–6. doi: 10.1088/1755-1315/905/1/012139.
- [85] S. Hartati and E. S. Muliawati, 'Genetic variation of *Coelogyne pandurata*, *C. rumphii* and their hybrids based on RAPD markers', *Biodiversitas J. Biol. Divers.*, vol. 21, no. 10, 2020.
- [86] S. Hartati, Samanhudi, and O. Cahyono, 'Morphological characterization of five species of *Dendrobium* native to Indonesia for parent selection', *Biodiversitas J. Biol. Divers.*, vol. 23, no. 5, pp. 2648–2654, 2022.
- [87] S. Hartati, Samanhudi, and O. Cahyono, 'Chromosome and karyotype analysis of *Dendrobium* spp.', *Int. J. Agric. Technol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1917–1930, 2024.
- [88] S. N. Hashim, S. Z. Ghazali, N. J. Sidik, T. Chia-Chay, and A. Saleh, 'Surface sterilization method for reducing contamination of *Clinacanthus nutans* nodal explants

- intended for in-vitro culture’, in E3S Web of Conferences, S. Guéhot and I. Houlbert, Eds., *EDP Sciences - Web of Conferences*, 2021, pp. 1–8. doi: 10.1051/e3sconf/202130601004.
- [89] H.-W. Heldt and B. Piechulla, *Plant biochemistry. Elsevier Academic Press*, 2021.
  - [90] V. R. Hinge et al., ‘Assessment of genetic diversity and volatile content of commercially grown banana (*Musa* spp.) cultivars’, *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, p. 7979, 2022.
  - [91] G. R. Hoffmann, ‘Genetic effects of dimethyl sulfate, diethyl sulfate, and related compounds’, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, vol. 75, no. 1, pp. 63–129, 1980, doi: [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(80\)90028-7](https://doi.org/10.1016/0165-1110(80)90028-7).
  - [92] N. P. Huy et al., ‘In vitro polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine’, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 252, pp. 283–290, 2019.
  - [93] H.-H. Hwang et al., ‘A Plant Endophytic *Bacterium*, *Burkholderia seminalis* Strain 869T2, Promotes Plant Growth in Arabidopsis, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables’, *Microorganisms*, vol. 9, no. 8, p. 1703, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081703>
  - [94] C. M. Iiyama, J. A. Vilcherrez-Atoche, M. A. Germanà, W. A. Vendrame, and J. C. Cardoso, ‘Breeding of ornamental orchids with focus on *Phalaenopsis*: Current approaches, tools, and challenges for this century’, *Heredity (Edinb.)*, vol. 132, no. 4, pp. 163–178, 2024.
  - [95] P. Jadrná, F. Kobza, and O. Plavcová, ‘Polyploidization of *Pelargonium* × *hortorum* LH Bailey in greenhouse conditions’, *Hortic. Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 31–37, 2009.
  - [96] P. R. Joshi, S. Pandey, L. Maharjan, and B. Pant, ‘Micropropagation and assessment of genetic stability of *Dendrobium transparens* Wall. Ex Lindl. using RAPD and ISSR markers’, *Front. Conserv. Sci.*, vol. 3, p. 1083933, 2023.
  - [97] Ju S.M., W. L. Zhu, W. L. Wang, Y. Gao, and T. Ma, ‘Direct regeneration of seedling from stem fragments of *Dendrobium candidum*.’, *J. Gansu Agric. Univ.*, vol. 51(1), pp. 45–48, 2016, doi: (in Chinese with English abstract).
  - [98] H. Kamemoto, T. D. Amore, and A. R. Kuehnle, *Breeding Dendrobium orchids in Hawaii*. University of Hawaii Press, 1999.
  - [99] M. Kanellos and P. White, *Growing Orchids at Home: The Beginner’s Guide to Orchid Care*. Royal Botanic Gardens, Kew; Illustrated edition, 2021.
  - [100] S. Ketsa and I. J. Warrington, ‘The dendrobium orchid: Botany, horticulture, and utilization’, *Crop Sci.*, vol. 63, no. 4, pp. 1829–1888, 2023.
  - [101] E. Khare, J. Mishra, and N. K. Arora, ‘Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects’, *Front. Microbiol.*, vol. 9, p. 2732, 2018.
  - [102] M. C. Kharkwal, ‘History of plant mutation breeding and global impact of mutant varieties’, in *Mutation breeding for sustainable food production and climate resilience*, Springer, 2023, pp. 25–55.
  - [103] A. R. Khosravi, M. A. Kadir, S. B. Kadzemin, F. Q. Zaman, and A. E. De Silva, ‘RAPD analysis of colchicine induced variation of the *Dendrobium Serdang* beauty’, *African J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 8, pp. 1455–1465, 2009.
  - [104] T. T. Kien et al., ‘In vitro propagation of indigenous phu tho’s 5-petaled white orchid (*Dendrobium anosmum* lindl.)’, *J. Sci. Technol. Hung Vuong Univ.*, vol. 25, no. 4, pp. 85–93, 2021.

- [105]D. Kim and F. P. Guengerich, 'Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines', *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 45, no. 1, pp. 27–49, 2005.
- [106]I. Kirov, M. Divashuk, K. Van Laere, A. Soloviev, and L. Khrustaleva, 'An easy "SteamDrop" method for high quality plant chromosome preparation', *Mol. Cytogenet.*, vol. 7, pp. 1–10, 2014.
- [107]R. Kishor and G. J. Sharma, 'The use of the hypervariable P8 region of trn L (UAA) intron for identification of orchid species: Evidence from restriction site polymorphism analysis', *PLoS One*, vol. 13, no. 5, p. e0196680, 2018.
- [108]M. K. Konopiński, 'Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies', *PeerJ*, vol. 8, p. e9391, 2020.
- [109]A. Kumar, R. Singh, A. Yadav, D. D. Giri, P. K. Singh, and K. D. Pandey, 'Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L.', *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, p. 60, Jun. 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0393-y.
- [110]J. M. T. Lakshanthi and T. H. Seran, 'Survival rate and growth performance of in vitro raised plantlets of orchid (*Dendrobium* sp.) in different hardening substrates', *Int. J. Adv. Res. Rev.*, vol. 4, no. 3, pp. 1–9, 2019.
- [111]L. T. Le, Q. T. T. Nguyen, T. N. T. Lam, T. D. Nguyen, P. H. Nguyen, and P. B. T. Truong, 'A research on in vitro propagation of *Dendrobium adastra*.', in National Biotechnology Conference., T. T. H. Hai, N. D. Huy, L. T. Binh, N. N. Minh, D. H. Xo, T. T. B. Phuong, T. Q. Dung, D. T. B. Thuy, and T. D. Binh, Eds., Hue: Hue University Publishing house, 2020, pp. 897–902. [Online]. Available: <http://huib.hueuni.edu.vn/wp-content/uploads/2020/12/897-902.pdf>
- [112]S. Lengrand, L. Pesenti, C. Bragard, and A. Legrève, 'Bacterial endophytome sources, profile and dynamics—a conceptual framework', *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 8, p. 1378436, 2024.
- [113]C. Li, N. Dong, Y. Zhao, S. Wu, Z. Liu, and J. Zhai, 'A review for the breeding of orchids: current achievements and prospects', *Hortic. Plant J.*, vol. 7, no. 5, pp. 380–392, 2021.
- [114]Y. Liu et al., 'Polyploid Induction and Karyotype Analysis of *Dendrobium officinale*', *Horticulturae*, vol. 9, no. 3, pp. 329–344, 2023.
- [115]D. T. Long, H. T. K. Hong, L. T. T. Tram, N. T. Q. Trang, N. V Hiep, and N. T. T. Tien, 'Genetic diversity analysis of lotus species (*Nelumbo nucifera* gaertn.) in Thua Thien Hue based on ITS4-5 genetic region', *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 23&24, pp. 1160–1171, 2019.
- [116]T. B. Longchar and C. R. Deb, 'Optimization of in vitro propagation protocol of *Dendrobium heterocarpum* Wall. ex. Lindl. and clonal genetic fidelity assessment of the regenerates: An orchid of horticultural and medicinal importance', *South African J. Bot.*, vol. 149, pp. 67–78, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.058>.
- [117]V. Q. Luan et al., 'Diversity in Morphology and Growth Characteristics of *Dendrobium anosmum* Variations in Lam Dong, Vietnam', *Asian J. Plant Sci.*, vol. 21, no. 2, pp. 221–228, 2022, doi: 10.3923/ajps.2022.221.228.
- [118]N. L. Ma, S. C. Khoo, J. X. Lee, C. F. Soon, and N. A. A. Shukor, 'Efficient micropropagation of *Dendrobium aurantiacum* from shoot explant', *Plant Sci. Today*, vol. 7, no. 3, pp. 476–482, 2020.

- [119]S. Maharjan et al., ‘In vitro propagation of the endangered orchid *Dendrobium chryseum* Rolfe from protocorms culture’, *Nepal J. Sci. Technol.*, vol. 19, no. 1, pp. 39–47, 2020, doi: 10.3126/njst.v19i1.29737.
- [120]L. B. De Medeiros et al., ‘Growth-promoting microorganisms in the development of orchid seedlings of phalaenopsis, cymbidium, and *Dendrobium genera*’, *Biosci. J.*, vol. 39, no. e39092, pp. 1981–3163, 2023.
- [121]S. Mesfer ALshamrani, F. A. Safhi, D. S. Alshaya, A. A. Ibrahim, H. Mansour, and D. Abd El Moneim, ‘Genetic diversity using biochemical, physiological, karyological and molecular markers of *Sesamum indicum* L.’, *Front. Genet.*, vol. 13, pp. 1–19, 2022, doi: 10.3389/fgene.2022.1035977.
- [122]I. Mežaka, D. Kļaviņa, L. Kaļāne, and A. Kronberga, ‘Large-Scale In Vitro Propagation and Ex Vitro Adaptation of the Endangered Medicinal Plant *Eryngium maritimum* L.’, *Horticulturae*, vol. 9, no. 2, pp. 271–292, 2023, doi: 10.3390/horticulturae9020271.
- [123]A. S. Mir, M. Maria, S. Muhammad, and S. M. Ali, ‘Potential of Mutation Breeding to Sustain Food Security’, in Genetic Variation, R. T. Maia and M. de A. Campos, Eds., licensee *IntechOpen*, 2020, ch. 1, pp. 1–16. doi: 10.5772/intechopen.94087.
- [124]M. A. Mir, S. Mansoor, M. Sugapriya, M. N. Alyemeni, L. Wijaya, and P. Ahmad, ‘Deciphering genetic diversity analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) using RAPD and ISSR markers’, *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 28, no. 2, pp. 1308–1317, 2021.
- [125]M. Mohammadi, B. Kaviani, and S. Sedaghatthoor, ‘In vivo polyploidy induction of *Phalaenopsis amabilis* in a bubble bioreactor system using colchicine’, *Ornam. Hortic.*, vol. 27, pp. 204–212, 2021.
- [126]G. G. Mostafa, ‘Effect of some chemical mutagens on the growth, phytochemical composition and induction of mutations in *Khaya senegalensis*’, *Int. J. Plant Breed. Genet.*, vol. 9, no. 2, pp. 57–67, 2015, doi: 10.3923/ijpb.2015.57.67.
- [127]G. G. Mostafa and M. F. A. Alhamd, ‘Effect of Dimethyl Sulphate on the Growth, Induction of Mutations and Their Identification by Peroxidase Isozyme in *Tecoma stans*’, *Int. J. Plant Breed. Genet.*, vol. 10, no. 2, pp. 91–97, 2016, doi: 10.3923/ijpb.2016.91.97.
- [128]N. Mukkamula, N. Beema, S. Dasari, and B. K. Kumar, ‘Assessment of genetic diversity in *Maerua oblongifolia* (Forssk.) A. Rich. accessions based on RAPD markers’, *Ecol. Genet. Genomics*, vol. 27, p. 100171, 2023.
- [129]V. Muniappan, V. Prabakaran, S. Parvathi, and S. Palanivel, ‘in vitro mutagenic effect of dimethyl sulfate on direct multiple shoot induction and sds-page analysis in groundnut (*arachis hypogaea* l.)’, in 10th national level symposium on modern biological sciences, D. A. Ponnusamy, Ed., New Delhi, India: Shri Nehru Maha Vidyalaya, 2017, pp. 10–15.
- [130]N. D. Mustika and E. Semiarti, ‘In vitro culture of *Dendrobium lineale* Rolfe orchid for plant breeding and propagation’, in IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, *IOP Publishing*, 2021, p. 12066.
- [131]N. Nadzifah, S. Fauzia, L. Budyghifari, and D. Darmawan, ‘The Impact of Covid-19 Pandemic on Consumer’s Interest in Purchasing Orchids (Orchidaceae)’, *KAPITA J. Agribisnis Pambang. Pertan.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2022.
- [132]S. K. Naik and U. Bharathi, *Production Technology of Dendrobium Cultivation*, no. July 2016. New Patel Nagar, New Delhi: *ICAR Research Complex for Eastern Region*, 2012. doi: 10.13140/RG.2.1.1437.8482.

- [133]B. Nam et al., ‘Chemical and biological profiles of *Dendrobium* in two different species, their hybrid, and gamma-irradiated mutant lines of the hybrid based on LC-QToF MS and cytotoxicity analysis’, *Plants*, vol. 10, no. 7, pp. 1376–1388, 2021.
- [134]M. Nei, ‘Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals’, *Genetics*, vol. 89, no. 3, pp. 583–590, 1978.
- [135]D. T. Nguyen, O. T. Nguyen, T. T. Ho, T. H. Nguyen, H. T. T. La, and C. K. T. Nguyen, ‘Effects of hormone and fertilizers on early flower induction of *Dendrobium anosmum* hybrid seedlings under ex vitro condition’, *J. Exp. Biol. Agric. Sci.*, vol. 10(5), pp. 1168 – 1179, 2022, [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.18006/2022.10\(5\).1168.1179](http://dx.doi.org/10.18006/2022.10(5).1168.1179)
- [136]H. T. Nguyen et al., ‘In vitro propagation of the *Dendrobium anosmum* Lindl. collected in Vietnam’, *Agronomy*, vol. 12, no. 2, pp. 324–338, 2022, [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/agronomy12020324>
- [137]J. D. Nugroho, A. Y. S. Arobaya, and E. A. Tanur, ‘Propagation of *Dendrobium antennatum* Lindl via seed culture in vitro using simple medium: fertilizer and complex organic based medium’, *Hayati J. Biosci.*, vol. 26, no. 3, pp. 133–138, 2019, doi: <https://doi.org/10.4308/hjb.26.3.133>.
- [138]N. T. Oanh, N. T. Diem, N. H. Tho, and N. T. K. Cuc, ‘Optimal condition for Propagation and Growing of *Dendrobium thyrsiflorum*’, *J. Exp. Biol. Agric. Sci.*, vol. 10, no. 3, pp. 524–532, 2022, doi: 10.18006/2022.10(3).524.532.
- [139]D. A. de Oliveira et al., ‘Characterization of *Pseudomonas* bacteria of *Piper tuberculatum* regarding the production of potentially bio-stimulating compounds for plant growth’, *Acta Amaz.*, vol. 51, pp. 10–19, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1590/1809-4392202002311>
- [140]M. N. Pari and M. H. Fotokian, ‘Evaluation of some characteristics of the fourth generation of common purslane (*Portulaca oleracea* L.) mutated from treatment with dimethyl sulfate.’, *Iran. J. Hortic. Sci.*, vol. 53, no. 4, pp. fa881–fa890, 2023.
- [141]T. P. Pasternak and D. Steinmacher, ‘Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro’, *Plants*, vol. 13, no. 2, p. 327, 2024.
- [142]D. T. K. Pham, B. Van Huynh, and T. Mai, ‘Genetic relationship analysis of *Dendrobium anosmum* Lindl. var. semialba based on the chloroplast matK and rbcL genes’, *J. Agric. Dev.*, vol. 20, no. 3, pp. 41–49, 2021, doi: 10.52997/jad.6.03.2021.
- [143]T. T. K. Phuong, P. M. Hac, T. T. Huong, and W. Sasanti, ‘Investigation of the genetic diversity of jewel orchid in Vietnam using RAPD and ISSR markers’, *Biodiversitas J. Biol. Divers.*, vol. 23, no. 9, 2022.
- [144]R. J. Porra, ‘The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b’, *Photosynth. Res.*, vol. 73, pp. 149–156, 2002.
- [145]Y. Prasetyo, K. Njudang, H. M. P. Wibowo, and A. H. Krisnawan, ‘Evaluasi Pertumbuhan Suspensi Sel *Dendrobium anosmum* var. gigantea dan Aktivitasnya sebagai Antioksidan’, *Media Pharm. Indones.*, vol. 3, no. 2, pp. 70–79, 2020.
- [146]A. N. Pyati, ‘In vitro Regeneration of an Endangered Medicinal Orchid *Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxton through the Development of Protocorm like Bodies’, *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–8, 2023, doi: [hhttps://doi.org/10.3329/ptcb.v33i1.66753](https://doi.org/10.3329/ptcb.v33i1.66753).

- [147]A. N. Pyati, 'In vitro regeneration of plantlets from direct and indirect organogenesis from axenic stem nodal explant culture of a rare orchid *Dendrobium jerdonianum* Wight.', *Indian J. Biotechnol.*, vol. 20, pp. 294–301, 2021.
- [148]E. M. Della Rahayu, 'Handling and propagation of *Dendrobium* 'Iriana Jokowi' in Bogor Botanic Gardens, Indonesia', *Nusant. Biosci.*, vol. 8, no. 2, pp. 258–263, 2016.
- [149]B. S. Revathi and B. Thomas, 'In vivo polyploidy induction in *Dendrobium crumenatum* through colchicine treatment', *J. Appl. Hortic.*, vol. 24, no. 3, pp. 317–321, 2022.
- [150]F. J. Rohlf, 'NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York 2. Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy', 2000, Freeman: San Francisco, CA, USA.
- [151]D. W. Russell and J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- [152]G. Russell, 'Stomatal guard cell measurements using leaf prints', *CSA J*, vol. 4, pp. 137–139, 2004.
- [153]A. I. M. Saad and A. M. Elshahed, 'Plant Tissue Culture Media', in *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva and L. M. R. Rinaldi, Eds., *Rijeka: IntechOpen*, 2012, ch. 2, p. Ch. 2. doi: 10.5772/50569.
- [154]K. . Sabastian, L. Hemanta, M. . S. Ariina, M. K. Mathukmi, and P. Devi, 'Micropropagation of orchids', *Biol. Conserv.*, vol. 68, no. 1, pp. 379–385, 2021, doi: 10.1016/0006-3207(94)90551-7.
- [155]M. Sabzehzari, S. Hoveidamanesh, M. Modarresi, and V. Mohammadi, 'Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of *Plantago psyllium*', *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, vol. 139, pp. 131–137, 2019.
- [156]Y. S. Sekhi, R. M. Hamad, and S. I. Neamah, 'Role of dimethyl sulfate on biochemical characteristics of *fragaria ananassa* duch under salinity stress *in vitro*', *Iraqi J. Agric. Sci.*, vol. 53, no. 1, pp. 111–121, 2022.
- [157]E. Semiarti, A. Purwanto, and I. Puspita Sari, 'Biotechnology approaches on characterization, mass propagation, and breeding of Indonesian orchids *Dendrobium lineale* (Rolfe.) and *Vanda tricolor* (Lindl.) with its phytochemistry', *Orchid. Phytochem. Biol. Hortic. Fundam. Appl.*, pp. 1–14, 2020.
- [158]V. Sharma, R. Salwan, and L. K. T. Al-Ani, *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*. Elsevier, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03869-4>.
- [159]R. Sherpa, R. Devadas, S. N. Bolbhat, T. D. Nikam, and S. Penna, 'Gamma radiation induced in-vitro mutagenesis and isolation of mutants for early flowering and phytomorphological variations in *Dendrobium* "Emma White"', *Plants*, vol. 11, no. 22, pp. 3168–3187, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/plants11223168>.
- [160]P. Silpa and T. D. Thomas, 'High-frequency shoot regeneration from flower bud derived callus of *Gymnostachyum febrifugum* Benth., an endemic medicinal plant to the Western Ghats', *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, vol. 147, no. 2, pp. 221–228, 2021.
- [161]B. Singer and D. Grunberger, *Molecular biology of mutagens and carcinogens*. Springer Science & Business Media, 1983.
- [162]L. Soetopo and D. Hosnia, 'In vivo polyploid-induction by colchicine on orchids *Phalaenopsis pulcherrima* (Lindl.) JJ Smith', *Biosci. Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 941–949, 2018.

- [163]C. Song et al., ‘Natural Composition and Biosynthetic Pathways of Alkaloids in Medicinal *Dendrobium* Species.’, *Front. Plant Sci.*, vol. 13, p. 850949, 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.850949.
- [164]S. Song, Y. Xu, B. Z. Wang, Y. D. Liu, H. Y. Qin, and W. H. Ma, ‘Different media on the tissue culture of *Dendrobium officinale*’, *Chin Agric Sci Bull*, vol. 29, no. 13, pp. 133–139, 2013.
- [165]J. C. Sorgato, J. S. Soares, C. R. Damiani, and L. M. Ribeiro, ‘Effects of light, agar, activated charcoal, and culture medium on the germination and early development of *Dendrobium*’ seedlings’, *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 557–564, 2020.
- [166]D. Srivastava, M. C. Gayatri, and S. K. Sarangi, ‘In vitro mutagenesis and characterization of mutants through morphological and genetic analysis in orchid *Aerides crispa* Lindl.’, *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 56, pp. 385–394, 2018.
- [167]D. De Stefano, B. N. S. Costa, J. Downing, E. Fallahi, and A. A. Khoddamzadeh, ‘In-vitro micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements’, *Am. J. Plant Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 380–393, 2022, doi: 10.4236/ajps.2022.133023.
- [168]G. Subrahmanyam, A. Kumar, S. P. Sandilya, M. Chutia, and A. N. Yadav, ‘Diversity, plant growth promoting attributes, and agricultural applications of rhizospheric microbes’, *Plant microbiomes Sustain. Agric.*, pp. 1–52, 2020.
- [169]W. N. Sudheer, N. Praveen, J. M. Al-Khayri, and S. M. Jain, ‘Chapter 3 - Role of plant tissue culture medium components’, in *Advances in Plant Tissue Culture*, A. Chandra Rai, A. Kumar, A. Modi, and M. B. T.-A. in P. T. C. Singh, Eds., Academic Press, 2022, ch. 3, pp. 51–83. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00012-6>.
- [170]W. Taratima, K. N. Rohmah, K. Plaikhuntod, P. Maneerattananarungroj, and A. Trunjaruen, ‘Optimal protocol for in vitro polyploid induction of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw’, *BMC Plant Biol.*, vol. 23, no. 1, p. 295, 2023.
- [171]A. A. Tawfik, G. G. Mostafa, and M. S. Gad, ‘Effect of ethyl methane sulphonate and dimethyl sulphate on some growth characters of *Senna occidentalis*’, *Asian J Res Rev Agric*, pp. 23–31, 2021.
- [172]J. Thakur, M. D. Dwivedi, N. Singh, P. L. Uniyal, S. Goel, and A. K. Pandey, ‘Applicability of Start Codon Targeted (SCoT) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers in assessing genetic diversity in *Crepidium acuminatum* (D. Don) Szlach.’, *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, vol. 23, p. 100310, 2021.
- [173]A. V Tigova, A. I. Soroka, and P. G. Dulnev, ‘Directions of genetic changes induced by new dimethyl sulfate derivatives in oil flax’, *Cytol. Genet.*, vol. 56, no. 1, pp. 37–45, 2022.
- [174]K. T. Tran et al., ‘In vitro propagation of indigenous Phu Tho’s 5-petaled white orchid (*Dendrobium anosmum* Lindl.)’, *J. Sci. Technol. hung vuong Univ.*, vol. 25, no. 4, pp. 85–93, 2021.
- [175]V. Vasko and V. Kyrychenko, ‘Variability of valuable economic traits in M1 and M2 sunflower generations influenced by dimethyl sulfate and  $\gamma$ -rays’, *žemės ūkio Moksl.*, vol. 23, no. 4, pp. 168–177, 2016.
- [176]J. A. Vilcherrez-Atoche, C. M. Iiyama, and J. C. Cardoso, ‘Polyploidization in orchids: From cellular changes to breeding applications’, *Plants*, vol. 11, no. 4, pp. 469–490, 2022.

- [177]F. Wang et al., ‘In Vitro Induction of Polyploidy by Colchicine in the Protocorm of the Orchid *Dendrobium wardianum* Warner’, *HortScience*, vol. 58, no. 11, pp. 1368–1375, 2023.
- [178]S. S. Wang et al., ‘Analysis of Endophytic Bacterial Diversity From Different *Dendrobium* Stems and Discovery of an Endophyte Produced Dendrobine-Type Sesquiterpenoid Alkaloids’, *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. January, pp. 1–15, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2021.775665.
- [179]Y.-T. Wang, ‘*Dendrobium anosmum* - Every One Should Have One’, Oct. 1999.
- [180]G. J. Wilfret, ‘Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae)’, 1968, University of Hawaii.
- [181]G. J. Wilfret and H. Kamemoto, ‘Genome and Karyotype Relationships in the Genus *Dendrobium* (Orchidaceae)’, *Cytologia (Tokyo)*., vol. 36, no. 4, pp. 604–613, 1971, doi: 10.1508/cytologia.36.604.
- [182]J. G. K. Williams, M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S. V Tingey, ‘Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers’, in *Methods in enzymology*, vol. 218, Elsevier, 1993, pp. 704–740. doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)18053-F](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)18053-F).
- [183]J. Wraith, P. Norman, and C. Pickering, ‘Orchid conservation and research: An analysis of gaps and priorities for globally Red Listed species.’, *Ambio*, vol. 49, no. 10, pp. 1601–1611, Oct. 2020, doi: 10.1007/s13280-019-01306-7.
- [184]J. Wyatt, ‘Grain and Plant Morphology of Cereals and how characters can be used to identify varieties’, in Plant Morphology, C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, and J. B. T.-E. of F. G. (Second E. Faubion, Eds., Oxford: Academic Press, 2016, pp. 51–72. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00009-7>.
- [185]S.-C. Yuan et al., ‘The Global Orchid Market’, in The Orchid Genome, F.-C. Chen and S.-W. Chin, Eds., New Delhi, India: Springer, 2021, p. 174. doi: 10.1007/978-3-030-66826-6\_1.
- [186]J. Zeng, D. Wang, Y. Wu, X. Guo, Y. Zhang, and X. Lu, ‘Karyotype analysis of *Gazania rigens* varieties’, *Hortic. plant J.*, vol. 2, no. 5, pp. 279–283, 2016.
- [187]D. Zhai, X. Lv, J. Chen, M. Peng, and J. Cai, ‘Recent Research Progress on Natural Stilbenes in *Dendrobium* Species’, *Molecules*, vol. 27, no. 21, pp. 1–38, 2022.
- [188]X. Zhang and J. Gao, ‘In vitro tetraploid induction from multigenotype protocorms and tetraploid regeneration in *Dendrobium officinale*’, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 141, pp. 289–298, 2020.

**PHỤ LỤC**  
**DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC**

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| PHỤ LỤC 1: GIẤY GIÁM ĐỊNH GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM ( <i>Dendrobium anosmum</i> Lindl.)                           | 1  |
| PHỤ LỤC 2: THÀNH PHẦN CÁC MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU.....                                 | 2  |
| I. Môi trường nuôi cấy mô .....                                                                               | 2  |
| II. Môi trường nuôi cấy vi sinh .....                                                                         | 4  |
| PHỤ LỤC 3: SƠ ĐỒ HOÁ CÁC NỘI DUNG NGHIÊN CỨU .....                                                            | 5  |
| PHỤ LỤC 4: PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT VÀ ĐIỆN DI KIỂM TRA DNA TỔNG SỐ .....                                       | 7  |
| I. Phương pháp tách chiết DNA tổng số .....                                                                   | 7  |
| II. Các bước thực hiện phương pháp kỹ thuật điện di kiểm tra DNA .....                                        | 8  |
| PHỤ LỤC 5: QUY TRÌNH TẠO GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐỘT BIẾN BẰNG TÁC NHÂN HOÁ HỌC.....                        | 9  |
| PHỤ LỤC 6: PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN KÍNH HIỂN VI VÀ CHIẾT XUẤT DIỆP LỤC, CAROTEN .....                        | 10 |
| I. Phương pháp làm tiêu bản thực vật kính hiển vi tạm thời.....                                               | 10 |
| II. Phương pháp chiết xuất diệp lục và caroten .....                                                          | 11 |
| PHỤ LỤC 7: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN PHẢN ỨNG PCR-RAPD.....                                                          | 12 |
| PHỤ LỤC 8: PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH..                                          | 14 |
| PHỤ LỤC 9: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT NỘI SINH.....                          | 15 |
| PHỤ LỤC 10: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN LÀM CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG CÓ CHỨA VI SINH VẬT NỘI SINH.....                      | 18 |
| PHỤ LỤC 11: ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ NHẬN DIỆN LOÀI LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ( <i>Dendrobium anosmum</i> Lindl.)..... | 19 |
| PHỤ LỤC 12. MỘT SỐ BẢNG DỮ LIỆU ĐƯỢC THU THẬP TRONG NGHIÊN CỨU .....                                          | 26 |
| PHỤ LỤC 13: TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE.....                                                                          | 33 |
| I. Trình tự nucleotide của các vùng gene nghiên cứu thu được từ cây lan giả hạc tím Huế.....                  | 33 |
| II. Trình tự nucleotide của vùng 16s trên 3 chủng vi khuẩn nội sinh ở cây lan rừng.....                       | 35 |
| PHỤ LỤC 14: MỘT SỐ CÂY DI TRUYỀN TRONG NGHIÊN CỨU .....                                                       | 37 |
| PHỤ LỤC 15: SO SÁNH TRÌNH TỰ NU CỦA CÁC VÙNG GEN .....                                                        | 39 |
| PHỤ LỤC 16: KÍ HIỆU CỦA NHỮNG DÒNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐƯỢC LỰA CHỌN LẤY MẪU PHÂN TÍCH.....                   | 48 |
| PHỤ LỤC 17: BẢNG HỆ SỐ TƯƠNG ĐỒNG.....                                                                        | 49 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| PHỤ LỤC 18: XÂY DỰNG QUY TRÌNH .....                                                             | 50 |
| Quy trình 1: Quy trình tái sinh của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến .....               | 50 |
| Quy trình 2: Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con <i>in-vitro</i> lan Giả hạc tím Huế..... | 51 |
| PHỤ LỤC 19: CÁC BƯỚC XÁC ĐỊNH MẬT ĐỘ VI KHUẨN (CFU/mL).....                                      | 53 |
| PHỤ LỤC 20: MỘT SỐ HÌNH ẢNH ĐƯỢC CHỤP LẠI TRONG THỜI GIAN NGHIÊN CỨU .....                       | 54 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO PHẦN PHỤ LỤC.....                                                             | 55 |

## PHỤ LỤC 1: GIẤY GIÁM ĐỊNH GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM (*Dendrobium anosmum* Lindl.)

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ  
THÀNH PHỐ HUẾ  
BẢO TÀNG THIÊN NHIÊN  
DUYÊN HẢI MIỀN TRUNG  
Số: 01 /BT-NCKH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Kính gửi: ThS. Nguyễn Hữu Thọ, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Chúng tôi nhận được đề nghị giám định tên khoa học cho mẫu cây tươi của ThS. Nguyễn Hữu Thọ hiện đang là nghiên cứu sinh của Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Bảo tàng Thiên nhiên duyên hải miền Trung đã tiến hành phối hợp với chuyên gia TS. Hoàng Xuân Thảo, TS. Phan Thị Thúy Hằng để giám định.

Người giám định: 1. TS. Hoàng Xuân Thảo  
2. TS. Phan Thị Thúy Hằng  
3. Th.S Lê Nguyễn Thới Trung

### Các thông tin về mẫu vật:

Mẫu vật mang số hiệu VNCC-MAG-001, ở dạng mẫu cây tươi, có đủ tiêu chuẩn để định danh loài gồm cơ quan sinh sản (hoa, quả) và cơ quan sinh dưỡng (lá, thân, rễ) và các thông tin ghi chép được tại thực địa.

Nơi thu mẫu: TP. Huế, Tỉnh Thừa Thiên Huế, ngày thu hái: 19/02/2025, người thu hái: Nguyễn Hữu Thọ.

Ngày nhận mẫu: 20/02/2025

### Kết quả giám định tên khoa học:

Mẫu hiệu VNCC-MAG-001 là mẫu cây lan Giả hạc tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) thuộc chi Hoàng thảo (*Dendrobium*), họ Phong lan (Orchidaceae), bộ Măng tây (Asparagales), ngành Ngọc lan (Magnoliophyta). Một số tên gọi khác của loài này: Lưỡng điểm hạc; Phi điệp; Giả hạc; Một số danh pháp đồng nghĩa bao gồm: *Callista anosma* (Lindl.) Kuntze, *Dendrobium dayanum* B.S.Williams, *Dendrobium macranthum* Hook., *Dendrobium macrophyllum* Lindl., *Dendrobium superbum* Rchb.f., *Dendrobium superbum* var. *giganteum* Rchb.f., *Dendrobium superbum* var. *velutinum* Rchb.f..

Chúng tôi xin gửi tới ThS. Nguyễn Hữu Thọ, Nghiên cứu sinh của Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế kết quả giám định trên.

Huế, ngày 27 tháng 02 năm 2025

KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC



Lê Nguyễn Thới Trung

## PHỤ LỤC 2: THÀNH PHẦN CÁC MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

### I. Môi trường nuôi cấy mô

#### a) Môi trường MS- *Murashige and Skoog Medium*

##### - đa lượng:

- + Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) : 1650 mg/L
- + Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) : 440 mg/L
- + Magnesium sulphate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) : 370 mg/L
- + Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : 170 mg/L
- + Potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ ) : 1,900 mg/L

##### - Vi lượng:

- + Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) : 6,2 mg/L
- + Cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) : 0,025 mg/L
- + Cupric sulphate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) : 0,025 mg/L
- + Ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) : 27,8 mg/L
- + Manganese sulphate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) : 22,3 mg/L
- + Potassium iodide (KI) : 0,83 mg/L
- + Sodium molybdate ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) : 0,25 mg/L
- + Zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) : 8,6 mg/L
- +  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 37,2 mg/L

##### - Vitamins và chất hữu cơ

- + i-Inositol : 100 mg/L
- + Niacin : 0,5 mg/L
- + Pyridoxine : HCl 0,5 mg/L
- + Thiamine : HCl 0,1 mg/L
- + Glycine : 2 mg/L
- + Edamin (có hoặc không) : 1 g/L

Môi trường  $\frac{1}{2}$  MS là môi trường MS có thành phần đa lượng và vi lượng được giảm đi  $\frac{1}{2}$ .

#### b) Môi trường Knudson C

**- Vi lượng**

- + Ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): 25,00 mg/L
- + Manganese sulphate monohydrate ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): 5,68 mg/L

**- Đa lượng**

- + Calcium nitrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) : 241,30 mg/L
- + Kali chloride ( $\text{KCl}$ ) : 250,00 mg/L
- + Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 250,00 mg/L
- + Magnesium sulphate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) : 122,15 mg/L
- + Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 500,00 mg/L
- + Ammonium Sunfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 500,00 mg/L

**c) Môi trường Vacin Went**

**- Vi lượng**

- + Ferric Tartrate ( $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$ ): 23,13 mg/L
- + Manganese Sulphate Monohydrate ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) : 5,68 mg/L

**- Đa lượng**

- + Tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) : 200,00 mg/L
- + Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 250,00 mg/L
- + Potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ ) : 525,00 mg/L
- + Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): 122,00 mg/L
- + Amoni sulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) : 500,00 mg/L

**d) Môi trường Hyponex**

**- Đa lượng**

- + Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ): 1 g/L.
- + Potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ ): 1 g/L.
- + Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 0,25 g/L.
- + Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): 0,25 g/L.
- + Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): 0,25 g/L.

**- Vi lượng**

- + Manganese(II) sulfate tetrahydrate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ): 22,3 mg/L.
- + Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ): 6,2 mg/L.

- + Zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ): 8,6 mg/L.
- + Potassium iodide (KI): 0.83 mg/L.
- + Sodium molybdate ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): 0,25 mg/L.
- + Cupric sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ): 0,025 mg/L.
- + Cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ): 0,025 mg/L.

## **II. Môi trường nuôi cấy vi sinh**

Môi trường Luria-Bertani (LB) dùng nuôi cấy vi khuẩn gồm 10 g/L Tryptone, 5 g/L cao nấm men, 10 g/L NaCl (trong thí nghiệm sử dụng LB dạng đặc thì bổ sung agar 15 g/L.)

Nước Peptone gồm có Peptone: 10 g/L; NaCl: 5 g/L.

Môi trường Pikovskaya (PVK) (dùng để phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải lân khó tan) gồm glucose (10 g),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (5 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5 g), KCl (0,2 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g),  $\text{MnSO}_4$  (0,002 g),  $\text{FeSO}_4$  (0,002 g), cao nấm men (0,5 g), agar (20 g) và nước cất 1.000 mL.

Môi trường Nutrient agar (NA) gồm có nước thịt bò: 200 g/L; Peptone: 5 g/L; cao nấm men: 3 g/L; NaCl: 5 g/L; 18 g/L agar, pH: 7,0.

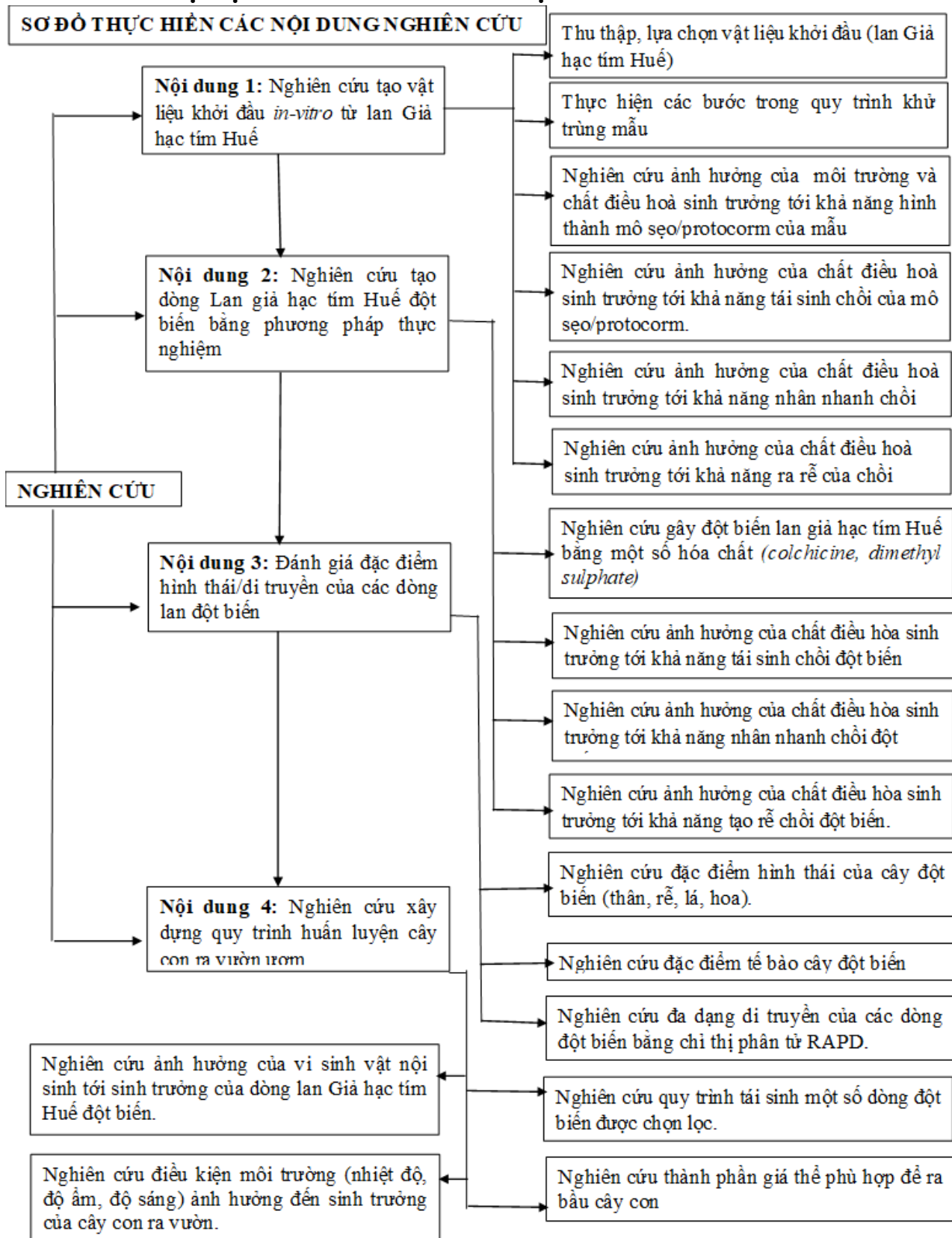
Môi trường NA bán lỏng gồm có nước chiết thịt bò: 200 g/L; Peptone: 5 g/L; cao nấm men: 3 g/L; NaCl: 5 g/L; 4 g/L agar, pH: 7,0.

Môi trường Starch casein agar (SCA) gồm có Tinh bột: 10 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 2 g/L;  $\text{KNO}_3$ : 2 g/L; casein: 0,3 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,05 g/L;  $\text{CaCO}_3$ : 0,02 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,01 g/L; NaCl: 2 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

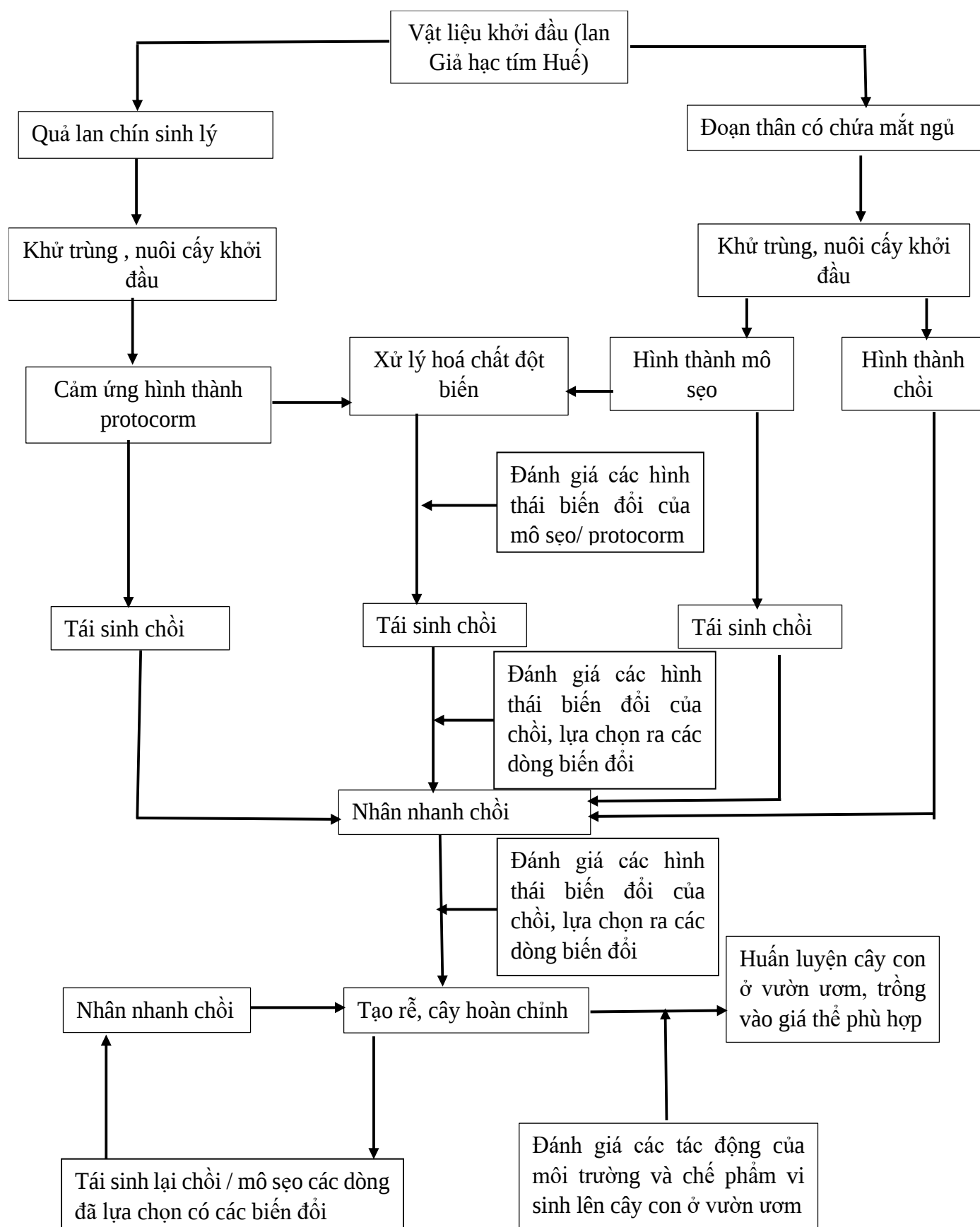
Môi trường International streptomyces project 2 (ISP2) gồm có cao nấm men: 4 g/L; chiết xuất mạch nha: 10 g/L; dextrose (hoặc glucose): 4 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,3.

Môi trường Ashby xác định khả năng cố định đạm của vi sinh vật gồm có Glucose (nguồn carbon): 20 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 0,2 g/L; NaCl: 0,2 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,2 g/L;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ : 0,1 g/L;  $\text{CaCO}_3$ : 5 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

### PHỤ LỤC 3: SƠ ĐỒ HOÁ CÁC NỘI DUNG NGHIÊN CỨU



**Hình P.1.** Sơ đồ tóm lược các nội dung nghiên cứu.



**Hình P.2.** Sơ đồ tóm lược quá trình thực hiện thí nghiệm

## **PHỤ LỤC 4: PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT VÀ ĐIỆN DI KIỂM TRA DNA TỔNG SỐ**

### **I. Phương pháp tách chiết DNA tổng số**

#### **1. Chuẩn bị:**

- Đệm CTAB: 2% cetyl trimethylammonium bromide, 1% polyvinylpyrrolidone, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0), hoặc đệm chiết xuất CTAB.
- Ống eppendorf 1,5 mL, máy ly tâm lạnh (ít nhất 14.000 vòng/phút), bể ổn nhiệt, chày cối.
- Dung dịch RNase A (10 mg/ml trong nước, không chứa DNase).
- Isopropanol, 70% Etanol, đệm TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA).
- Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (tỷ lệ 25:24:1) được lưu trữ trong đệm TE, pH 8.

#### **2. Các bước thực hiện**

**Bước 1:** Mẫu lá/mô lan giả hạc tím Huế được chuẩn bị được chuẩn bị bằng cách cắt nhỏ và nghiền mô đông lạnh bằng cối và chày sau khi làm lạnh trong nitơ lỏng. Mẫu được nghiền ở nhiệt độ phòng, nghiền nhanh thành bột mịn là tốt nhất để chiết xuất DNA.

**Bước 2:** Lấy 100 mg mẫu đã nghiền cho vào ống eppendorf 1,5 mL, thêm 500  $\mu$ L đệm CTAB. Trộn đều và lắc kỹ, sau đó ủ ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút, trong thời gian ủ có lắc nhẹ.

**Bước 3:** Ly tâm hỗn hợp sau khi ủ trong 5 phút ở tốc độ 14.000 vòng/phút ở 4°C, hút dịch nổi chuyển sang ống eppendorf 1,5 mL mới. Thêm 5  $\mu$ L dung dịch RNase A và ủ ở 37°C trong 20 phút.

**Bước 4:** Thêm một lượng phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) bằng thể tích dịch mẫu đang có trong ống eppendorf vào ống. Lắc mạnh trong 5 giây rồi ly tâm mẫu trong 1 phút ở tốc độ 14.000 vòng/phút ở 4°C để tách các pha.

**Bước 5:** Chuyển pha dịch nổi phía trên sang ống eppendorf 1,5 mL mới. Lặp lại quá trình chiết này cho đến khi pha nước phía trên trong suốt.

**Bước 6:** Chuyển phần nước ở trên sang ống mới. Thêm 0,7 thể tích isopropanol lạnh và ủ ở -20°C trong 15 phút để kết tủa DNA.

**Bước 7:** Ly tâm dịch mẫu ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, đổ bỏ phần dịch trong bên trên mà không làm xáo trộn phân kết tủa và sau đó rửa bằng 500  $\mu$ L etanol 70% lạnh. sau đó Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C loại dịch nổi (lặp lại 2 lần).

**Bước 8:** Kết tủa sẽ được làm khô ở 37°C và sau đó hòa tan kết tủa trở lại trong 20  $\mu\text{L}$  đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 8,0). Bảo quản DNA ở nhiệt độ -30°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

## **II. Các bước thực hiện phương pháp kỹ thuật điện di kiểm tra DNA**

**Bước 1:** Chuẩn bị gel agarose 1%: lấy 0,4 g thạch agarose nguyên chất cho vào cốc đong thủy tinh chịu nhiệt, đổ vào đó 40 mL đệm TAE 1X (40 mM Tris pH 7,6; 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA). Chuyển cốc đong vào lò vi sóng (Microwave) đặt nóng chảy trong 3 phút sao cho agarose tan hoàn toàn, để nguội đến nhiệt độ 50 - 60°C sau đó bổ sung thêm 4  $\mu\text{L}$  ethidium bromide (0,5  $\mu\text{g/L}$ ). Gài lược có nhiều răng vào khay của hệ thống điện di, đổ thạch ngập răng lược khoảng 0,5 cm và để nguội ở nhiệt độ phòng.

**Bước 2:** Đặt ngập khay có chứa gel agarose trong hộp điện di chứa dung dịch đệm TAE 1X, sau đó rút lược ra khỏi khay, lúc này gel agarose sẽ tạo các giếng để tra mẫu vào.

**Bước 3:** Tra mẫu: lấy 5 - 10  $\mu\text{L}$  sản phẩm mỗi loại, trộn với 1 - 2  $\mu\text{L}$  chỉ thị màu (Loading dye 6X) (thường là hỗn hợp xanh Bromophenol và Glycerol) với mẫu và tra riêng biệt vào từng giếng trong thạch.

**Bước 4:** Tra chỉ thị phân tử: trong một giếng riêng biệt khác cho 5 - 10  $\mu\text{L}$  chỉ thị phân tử (DNA marker), thang chuẩn DNA có kích thước dao động từ 100-1500 bp plus của Fermentas.

**Bước 5:** Nối hệ thống điện di với nguồn điện, cực âm ở phía đầu của bản thạch, cực dương ở phía cuối, DNA tổng số, và DNA của sản phẩm PCR sẽ chuyển dịch từ cực âm đến cực dương. Chạy điện di ở hiệu thế 100 V trong 15 - 30 phút.

**Bước 6:** Rửa thạch bằng nước, sau đó soi qua đèn UV, chụp lại hình và đọc kết quả.

## PHỤ LỤC 5: QUY TRÌNH TẠO GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐỘT BIẾN BẰNG TÁC NHÂN HOÁ HỌC

Quy trình tạo giống đột biến bằng phương pháp hoá học kết hợp nuôi cấy *in-vitro*, có các bước cơ bản sau:

**Bước 1:** Lựa chọn dòng tế bào mẹ: Đây là các dòng tế bào từ protocorm hoặc mô sẹo được tạo ra từ nuôi cấy *in-vitro* hạt hoặc chồi lan. Protocorm hay mô sẹo phải đảm bảo không bị nhiễm bệnh, khoẻ mạnh có kích thước đồng đều  $\leq 0,5\text{cm}$ , có khối lượng từ 0,02-0,1 g.

**Bước 2:** Gây đột biến: Sử dụng các tác nhân hoá học như hoá chất DMS, colchicine để gây đột biến vào tế bào mẹ. Điều này sẽ tạo ra các biến đổi trong gen, NST của tế bào mẹ.

**Bước 3:** Nuôi cấy *in-vitro* : Tế bào mẹ sau khi đã trải qua đột biến được nuôi cấy *in-vitro* trong điều kiện lý tưởng để tạo ra các dòng giống mới chứa đột biến mong muốn.

**Bước 4:** Xác định dòng giống chứa đột biến: Sau khi nuôi cấy, các tế bào con tiếp tục được phân chia để tạo ra các dòng giống mới, phát triển thành chồi, cây con và bắt đầu biểu hiện các hình thái ra bên ngoài. Sử dụng một số chỉ thị hình thái, tế bào, phân tử để xác định dòng giống chứa đột biến.

**Bước 5:** Lưu giữ và nhân giống: Khi đã xác định được dòng giống chứa đột biến mong muốn, tiếp tục nhân lên và nuôi cấy trong môi trường *in-vitro* để tạo cây hoàn chỉnh.

**Bước 6:** Thử nghiệm giống đột biến: Các cây giống được tạo ra từ phòng thí nghiệm, mang những biến đổi về hình thái được trồng và theo dõi các chỉ tiêu nghiên cứu tại vườn.

## **PHỤ LỤC 6: PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN KÍNH HIỂN VI VÀ CHIẾT XUẤT DIỆP LỤC, CAROTEN**

### **I. Phương pháp làm tiêu bản thực vật kính hiển vi tạm thời**

#### **1. Chuẩn bị**

- Kính hiển vi quang học, dao mổ, kim mũi mác, đĩa đồng hồ, giấy thấm, bản kính, lá kính.
- Nước cất, thuốc nhuộm xanh methylen/fuchsin/ đỏ carmin, acid acetic 10%, Javel, glycerin.
- Mẫu thực vật: thân, lá, rễ của lan giả hạc tím Huế

#### **2. Các bước thực hiện**

**Bước 1:** Dùng dao/kim mũi mác cắt, bóc một lát (ngang/dọc) mỏng của mẫu thực vật (càng mỏng càng dễ quan sát). Mẫu lấy có kích thước khoảng 0,4x0,4 cm.

Vị trí cắt:

- + Rễ: Vùng lông hút
- + Thân: Lóng, không cắt sát và ngay máu
- + Lá: 1/3 ở phía dưới, nếu phiến rộng quá thì có thể bỏ bớt thịt lá, chỉ chừa lại 1cm phần thịt lá ở 2 bên gân giữa

**Bước 2:** Nhỏ 1 giọt nước cất lên bản kính, sau đó đặt mẫu đã cắt vào giọt nước. Đặt lá kính nghiêng 1 góc 45° từ từ đẩy xuống giọt nước có mẫu cần quan sát. Tránh không tạo ra bọt khí khi đẩy lá kính.

**Bước 3:** Thực hiện quan sát. Đặt tiêu bản lên bàn kính hiển vi, điều chỉnh kính hiển vi để quan sát.

#### **3. Các bước nhuộm tế bào thực vật làm tiêu bản**

Để có thể quan sát thấy rõ hơn thành phần, hình dạng cấu trúc tế bào, chúng tôi tiến hành nhuộm tế bào, các bước thực hiện như sau:

1. Ngâm trong dung dịch Javel 15 – 20 phút (cho đến khi mẫu vi phẫu trắng, nếu quá 30 phút mà vi phẫu chưa trắng thì thay nước Javen mới).
2. Rửa sạch 3 – 4 lần bằng nước cất.
3. Ngâm trong dung dịch acid acetic 10% trong 5 phút.
4. Rửa sạch 3 – 4 lần bằng nước cất.
5. Ngâm trong dung dịch xanh methylen 0,5% trong 10 giây.
6. Rửa sạch bằng nước cất.

7. Ngâm trong dung dịch carmine son phèn (đỏ carmine) 1% trong 15 – 20 phút.
8. Rửa sạch và quan sát trong nước hoặc glycerin.

#### **4. Làm tiêu bản quan sát nhiễm sắc thể đầu rễ lan Giả hạc tím Huế**

Tiêu bản được thực hiện bằng cách:

**Bước 1:** Cắt đầu rễ dài 5 mm của những cây lan Giả hạc tím Huế biến dị cho vào các ống eppendorf 1,5 ml có bổ sung 100  $\mu$ L dung dịch colchicine 0,1%.

**Bước 2:** Ủ trong dung dịch colchicine 30 phút.

**Bước 4:** Loại bỏ colchicine và thêm vào ống eppendorf 200  $\mu$ L sodium acetat 0,5%.

**Bước 5:** Ủ mẫu trong 30 phút ở nhiệt độ phòng.

**Bước 6:** Mẫu được lấy ra và cố định trong dung dịch carnoy trong 4 giờ.

**Bước 7:** Loại bỏ carnoy và rửa mẫu nhiều lần bằng cồn 70%, nhuộm bằng dung dịch xanh methylen 1% hoặc đỏ carmine ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

**Bước 8:** Làm tiêu bản mẫu bằng cách cắt đầu rễ 1-2 mm và lên lam kính, đẩy lamên lên mẫu và ấn nhẹ để mẫu trải đều ra.

**Bước 9:** Đưa lên kính hiển vi quan sát ở độ phóng đại vật kính 100x và thị kính là 10x, dùng dầu cho lên tiêu bản để quan sát.

## **II. Phương pháp chiết xuất diệp lục và caroten**

Chiết xuất bằng phương pháp chuẩn của Porra RJ (2002) [10]. Lấy 0,25 gam lá còn tươi cắt nhỏ cho vào cối sứ (bỏ gân lá), thêm 0,2 gam bột  $\text{CaCO}_3$  để trung hoà dịch acid của tế bào, có thể cho một ít bột thủy tinh nghiền. Nghiền các mẫu lá đến khi thành một thể đồng nhất, cho vào ống nghiệm có chứa 10 ml aceton 80% hoặc cồn etylic 90<sup>0</sup> lắc đều, bịt kín và để 5 phút rồi lọc bằng bông trên phễu thủy tinh, dung dịch thu được có màu xanh. Tiến hành đo mật độ quang dịch mẫu ở các bước sóng 470 nm, 645 nm và 663 nm bằng máy đo UV-VIS.

## PHỤ LỤC 7: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN PHẢN ỨNG PCR-RAPD

### Bước 1: Chuẩn bị thiết, dụng cụ, hoá chất cần thiết

- Tube khoảng 200 µl, micropipet 10 µl, 20 µl, máy luân nhiệt (MJ – Mini™ Persanol Thermal Cycle, Bio - Rad)
- Thành phần phản ứng PCR gồm có:
  - + DNA mẫu (template) chứa mảnh DNA cần khuếch đại.
  - + Mồi RAPD (primer) là các đoạn DNA ngắn (10-15 nu) để xác định điểm bắt đầu và kết thúc vùng cần khuếch đại ( *đều được cung cấp bởi hãng Operon Technologies* )
  - + DNA-polymerase enzym (Taq polymerase, hãng Bioline ) xúc tác cho việc nhân lên của DNA.
  - + Nucleotides (dNTP, hãng Thermo Fisher Scientific Inc) là nguyên liệu cho DNA-polymerase tổng hợp DNA mới.
  - + Dung dịch đệm (Buffer [Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>], hãng ABT Việt Nam) cung cấp môi trường hóa học cho DNA-polymerase.
  - + Nước cất

### Bước 2: Pha Master Mix cho phản ứng PCR

Phụ thuộc vào số lượng phản ứng thực hiện để pha Master Mix với lượng vừa đủ. Thành phần Master Mix là những thành phần chung cho các phản ứng ( Buffe, dNTP, Taq polymerase, nước cất)

### Bước 3: Pha hỗn hợp cho mỗi phản ứng PCR

Tổng thể tích cho mỗi phản ứng là 25 µl gồm có:

|            |          |            |           |
|------------|----------|------------|-----------|
| - Buffe    | : 2,5 µl | - Taq      | : 2 µl    |
| - Mồi RAPD | : 1 µl   | - Template | : 1 µl    |
| - dNTP     | : 2 µl   | - Nước cất | : 16,5 µl |

(Chú ý, các thành phần buffe, dNTP, Taq polymerase, nước cất đã có trong Master Mix nên chỉ cần lấy 23 µl Master Mix cho mỗi phản ứng.)

### Bước 3: Cài đặt chương trình cho máy luân nhiệt

Phản ứng PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt (MJ – Mini™ Persanal Thermal Cycle, Bio - Rad) được cài đặt theo chu trình nhiệt như sau: Chương trình gia nhiệt cho phản ứng PCR khởi đầu bằng giai đoạn biến tính DNA ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, theo sau là 40 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: Biến tính DNA ở 94°C trong 15 giây, gắn mồi ở 35°C trong 15 giây, tổng hợp DNA ở 72°C trong 1 phút 20 giây và kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72°C trong 10 phút và lưu trữ ở 4°C.

#### **Bước 4: Thực hiện điện di sản phẩm PCR-RAPD**

Sản phẩm PCR-RAPD của các mẫu DNA được chạy điện di trên agarose gel 1,5% ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút với thang chuẩn DNA có kích thước dao động từ 100-1500 bp plus của Thermo Scientific. (Thang đo DNA GeneRuler 1 kb- SM0311, Thermo Scientific)

## **PHỤ LỤC 8: PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH**

Sử dụng mẫu rễ, thân, lá của lan rừng được thu thập về xử lý khử trùng bề mặt. Để loại trừ các vi sinh vật trên bề mặt, mẫu (thân, rễ, lá) sau khi thu thập được xử lý như sau: Loại bỏ các phần bị hỏng, úa vàng, rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy; tiếp tục rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt mẫu thành những đoạn nhỏ 1 - 2 cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm; sau đó khử trùng mẫu bằng cồn 96% trong 3 phút, Sodium hypochloride 1% trong 5 phút, hydrogen peroxide 3% ( $H_2O_2$ ) trong 5 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để tẩy rửa các loại hóa chất còn thừa. Để kiểm tra khả năng các vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, lấy 200  $\mu$ L nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần cuối cấy trải trên môi trường LB agar và ủ ở 30°C trong 24h để quan sát ngoại nhiễm (mẫu nào có ngoại nhiễm thì không sử dụng vi sinh vật từ mẫu đó cho các nghiên cứu tiếp theo). Các mẫu sau khi khử trùng được cho vào các cối bằng sứ đã khử trùng và nghiền mịn mẫu, thêm 10 mL nước cất khử trùng, sau đó tất cả mẫu được cho vào một ống 50 mL vô trùng [7].

Dung dịch sau khi nghiền tiến hành pha loãng theo dãy nồng độ  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  sau đó hút 50  $\mu$ L dung dịch ở các nồng độ pha loãng được chuyển vào trong ống nghiệm có chứa 3 mL môi trường bán lỏng NA, rồi đem ủ ở 30°C trong 48 h, quan sát thấy các ống nghiệm chứa môi trường bán lỏng NA đã cấy dịch trích của mẫu có xuất hiện một lớp màng mỏng (vòng pellicle) cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh [5].

Lấy một ít vi khuẩn từ màng mỏng của các môi trường bán lỏng NA lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường NA, LB, SCA, ISP2 đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Sau vài lần cấy chuyển trên các môi trường đặc, chọn các khuẩn lạc rời và đều nằm trên đường cấy quan sát dưới kính hiển vi. Khi thấy vi khuẩn đã thuần nhất thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở 4°C và được xem như là một dòng.

## PHỤ LỤC 9: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT NỘI SINH

### - Phân tích hoạt tính hoá sinh

#### + Xác định khả năng phân giải lân

Lựa chọn các khuẩn lạc đã phân lập cấy chấm điểm lên môi trường Pikovaskya. Các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường sau 24 đến 72 giờ ủ, tiến hành khảo sát kích thước khuẩn lạc và khả năng hòa tan Phot pho trên môi trường Pikovaskya đặc thông qua vòng sáng phân giải tạo ra xung quanh khuẩn lạc trên môi trường [3]. Chỉ tiêu theo dõi là đường kính phát triển của khuẩn lạc (mm) và đường kính vòng sáng phân giải (mm).

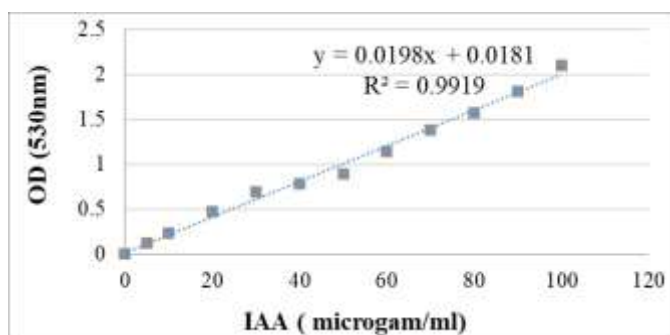
#### + Xác định khả năng cố định đạm

Lựa chọn các khuẩn lạc đã phân lập cấy chấm điểm lên môi trường Ashby mannitol agar, ủ ở 30°C trong 72 giờ. Xác định các khuẩn lạc phát triển được trên môi trường Ashby, đo đường kính (mm) khuẩn lạc phát triển [4].

#### + Xác định khả năng sinh IAA

Các chủng vi sinh vật đã phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường dịch thể Luria Bertani có bổ sung 0,1% L - Tryptophan trong máy lắc ổn nhiệt ở tốc độ 150 vòng/phút, trong thời gian từ 48-72 giờ, nhiệt độ từ 28°C đến 30°C. Ly tâm không ít hơn 3 mL dung dịch mẫu thử với tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Lấy 2 mL phần dung dịch trên bề mặt (phần nước trong) cho vào ống định mức dung tích 10 mL. Thêm thuốc thử Salkowski đến vạch định mức, trộn đều. Ủ tối trong vòng 25 phút và tiến hành so sánh màu sắc của các chủng vi sinh vật, màu càng đỏ thì hàm lượng IAA tổng hợp được càng cao [6]. Hàm lượng IAA sinh ra được xác định bằng đồ thị đường chuẩn (Hình P1). Đo cường độ màu trên máy quang phổ so màu ở bước sóng 530 nm.

**Hình P1. sơ đồ đường chuẩn IAA được xây dựng ở dãy nồng độ iaa từ 0 đến 100 mg/l**



#### + *Xác định khả năng sinh NH<sub>3</sub>*

Xác định khả năng sinh NH<sub>3</sub> của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập bằng phương pháp định tính của Cappuccino & Sherman. Các dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi trong ống 10 mL nước peptone, nuôi lắc 150 vòng/phút, trong 48-72 giờ ở  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau đó cho 0,5 mL thuốc thử Nessler (K<sub>2</sub>HgI<sub>4</sub>) vào mỗi ống. Quan sát sự thay đổi màu sắc trong khoảng màu vàng sang nâu sẫm là chứng tỏ chủng vi khuẩn đó có sinh amoniac, màu sắc phụ thuộc vào hàm lượng amoniac sinh ra [8].

#### - **Định loại phân tử chủng vi sinh vật**

Trong số những chủng phân lập được, lựa chọn chủng có hoạt tính tốt nhất để định danh vi khuẩn bằng cách giải trình tự gen 16S rRNA. DNA tổng số từ vi khuẩn được tách chiết theo mô tả của Sambrook và Russell.

Các dòng phân lập được xác định bằng giải trình tự một phần của vùng 16S đối với vi khuẩn. Các vùng 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn môi thuận 27F (5'-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG-3') và môi ngược 1492R (5'-ACGG (CT) TACCTTGTTACGACTT-3').

Phản ứng PCR được thực hiện 30 chu kỳ với sự biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút. Biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn môi ở 60°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 30 giây. Lần kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%, và tinh sạch trước khi được giải trình tự tại Viện Công nghệ ADN và Phân tích di truyền GENLAB (Hà Nội). Trình tự thu được sau đó được so sánh và phân tích với trình tự đã được công bố trên cơ sở dữ liệu (NCBI) bằng chương trình BLAST. Cùng với đó trình tự được so sánh bằng CLUSTAL X. Các chủng được dựng cây phân loại xác định họ hàng gần bằng phần mềm Mega 7.

#### - *Xác định khả năng đối kháng của vi sinh vật với vi sinh vật gây bệnh*

Các chủng vi sinh vật nội sinh sẽ được dùng để đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên lan.

*Thí nghiệm 1:* Phân lập vi khuẩn gây bệnh thối nhũn từ các mẫu bệnh thối nhũn trên lan (mẫu bệnh được thu thập trên lan Giả hạc tím Huế, lan Hồ điệp (*Phalaenopsis amabilis*) và lan *Dendrobium mini* có ở vườn lan Viện công nghệ sinh học, Đại học Huế tại thời điểm nghiên cứu). Chủng vi khuẩn này được lưu giữ để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

*Thí nghiệm 2:* Sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng kháng được vi khuẩn gây bệnh thối nhũn được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Bổ sung 50  $\mu$ L dịch nuôi cấy mỗi chủng vi khuẩn vào mỗi lỗ trên đĩa thạch LB đã được cấy trải 50  $\mu$ L dịch vi khuẩn gây bệnh thối nhũn (10<sup>6</sup> cfu/mL), ủ ở 4°C trong 2 giờ để dịch nuôi vi khuẩn khuếch tán vào môi trường, sau đó giữ trong tủ ẩm 30°C. Đường kính (mm) vòng kháng khuẩn được xác định sau 24 giờ nuôi cấy. Cách xác định mật độ vi khuẩn (cfu/mL) thực hiện theo mô tả phụ lục 19.

## **PHỤ LỤC 10: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN LÀM CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG CÓ CHỨA VI SINH VẬT NỘI SINH.**

### **Bước 1. Chuẩn bị nguyên liệu cho dung dịch dinh dưỡng**

5 kg trùn quế thịt, xay nhuyễn.

1,2 kg mật rỉ đường.

1 kg bột đậu nành xay nhuyễn

0,5 kg vỏ dừa xay nhuyễn

0,5 kg đu đủ xanh xay nhuyễn

0,5 kg chuối chín lột vỏ, bóp nhuyễn

1 gói men vi sinh EMZEO (200g/ gói).

### **Bước 2. Trộn hỗn hợp**

Trộn đều các nguyên liệu trên với nhau. Thêm 2,5 lít nước sạch và khuấy đều hỗn hợp.

### **Bước 3. Ủ hỗn hợp:**

Cho hỗn hợp vào thùng ủ và vặn nắp kín khí, tạo lỗ thoát hơi bằng cách đục lỗ nhỏ trên nắp thùng ủ và dùng bông và băng dính bịt băng lại ( băng dính 1 chiều vẫn để thoát khí trong thùng ủ ra ngoài ).

Định kỳ sau 7 ngày mở nắp thùng ủ kiểm tra, khuấy đảo đều rồi lại đậy kín ủ, để đảm bảo quá trình lên men diễn ra đều.

### **Bước 4. Bổ sung vi sinh vật nội sinh**

Sau khi ủ được 25 – 30 ngày, bổ sung sinh khối vi sinh vật nội sinh (3 chủng được phân lập trong nghiên cứu) theo tỷ lệ thí nghiệm + 0,2 kg mật rỉ đường + 1 lít nước sạch. Ủ tiếp 15 – 20 ngày sau đó chiết lấy dịch và sử dụng.

### **Bước 5. Sử dụng chế phẩm:**

Sử dụng dịch chiết để tưới cây hoặc làm phân bón lá. Pha loãng dịch chiết này với nước theo tỷ lệ thích hợp và phun lên cây vào lúc trời râm mát.

## PHỤ LỤC 11: ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ NHẬN DIỆN LOÀI LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ (*Dendrobium anosmum* Lindl.)

### I. Đặc điểm hình thái lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.)

-Nhận diện bằng đặc điểm hình thái:

Nghiên cứu đã thực hiện khảo sát ngẫu nhiên 30 cây lan Giả hạc tím Huế mỗi loại ở hai thời điểm là cây lan từ 2-3 năm tuổi và cây lan trên 3 năm tuổi về một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển, kết quả được thể hiện ở bảng P11-3.1 và P11-3.2

**Bảng P11-3.1.** Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) 2-3 năm tuổi.

| STT | Đặc điểm                       | Nội dung ghi nhận                                  | Ghi chú                                                                                                |
|-----|--------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Vị trí thu mẫu                 | Nhà vườn ở TP. Huế                                 | Cây lan để lấy mẫu cho nghiên cứu được lấy tại nhà vườn Lan Đô Nguyễn, 18 Thạch Hãn, TP. Huế (5/2021). |
| 2   | Môi trường sống                | Sống bám trên cây, thường gặp ở độ cao dưới 750 m. | Ghi nhận ở hệ sinh thái tự nhiên.                                                                      |
| 3   | Kiểu sinh trưởng               | Phát triển không liên tục (sympodial)              | Chồi ngọn phát triển một thời gian ngừng sinh trưởng, thay thế bằng chồi bên hoặc chồi gốc phát triển. |
| 3   | <b>Hoa</b>                     |                                                    |                                                                                                        |
|     | Thời gian ra hoa               | Tháng 5-6                                          |                                                                                                        |
|     | Thời gian nở hoa               | 8-12 ngày                                          | Phụ thuộc vào thời tiết.                                                                               |
|     | Độ bền của hoa                 | 7-10 ngày                                          | Phụ thuộc vào thời tiết.                                                                               |
|     | Vị trí phát hoa                | Tại các đốt giả hành                               | Có thể lên phát hoa hoặc mầm chồi.                                                                     |
|     | Dạng phát hoa                  | Dạng chùm                                          |                                                                                                        |
|     | Kích thước hoa                 | 7-11 cm                                            | Đo chiều dài nhất của cánh.                                                                            |
|     | Số lượng hoa trên mỗi phát hoa | 1-3 hoa                                            | Phổ biến nhất là 2 hoa.                                                                                |
|     | Hình dạng tổng thể hoa         | Hình sao                                           | Khi hoa đã nở hoàn toàn                                                                                |
|     | Màu sắc cánh hoa               | Màu tím hồng, có viền tím ở các cánh hoa           | Màu rõ nhất khi hoa đã nở bung các cánh.                                                               |
|     | Hình dạng cánh hoa             | Thuôn dài                                          |                                                                                                        |

|   |                     |                                                                                                                                         |                                                        |
|---|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|   | Môi hoa (labellum)  | Có vùng màu tím đậm tạo thành mắt hoa, có lông tơ mịn, uốn cong ở giữa, dài 3-4 cm.                                                     |                                                        |
|   | Cánh đài trên       | 1 cánh, thuôn dài, chóp nhọn hơi bo tròn, dài 3-4 cm, tím hồng nhạt, có những đường gân chạy dọc cánh, rìa nguyên.                      |                                                        |
|   | Cánh đài dưới       | 2 cánh, phần gốc lớn, nhỏ dần về chóp, chóp cánh nhọn, có đường gân, cánh hơi uốn về sau, màu tím hồng nhạt, dài 4- 5,5 cm, rìa nguyên. |                                                        |
|   | Cánh vai            | 2 cánh, thuôn dài giống mũi mác, màu tím hồng, không có gân, rìa có răng cưa nhẹ, dài 3,5-5 cm.                                         |                                                        |
|   | Cựa (spur)          | Không có                                                                                                                                |                                                        |
|   | Trụ hoa (column)    | Dài 1-1,5 cm, trật trên trắng hồng, mặt dưới có màu tím hồng, hơi cong xuống, phần đầu có lớp chất nhầy dính màu trắng.                 |                                                        |
|   | Bao phấn (Pollinia) | Có 2 khối, có màu vàng                                                                                                                  | Mỗi khối có thể chia ra làm 2 phần như nhau.           |
|   | Hương thơm          | Có mùi thơm dịu nhẹ                                                                                                                     | Sáng sớm và chiều tối hương thơm mạnh hơn.             |
| 4 | <b>Lá</b>           |                                                                                                                                         |                                                        |
|   | Cách mọc            | Mọc cách so le nhau                                                                                                                     |                                                        |
|   | Hình dạng lá        | Lá không có cuốn lá, phiến lá hình thoi, thuôn dài.                                                                                     |                                                        |
|   | Đầu lá              | Nhọn                                                                                                                                    |                                                        |
|   | Mép lá              | Nguyên vẹn, không sẻ thùy hay răng cưa                                                                                                  |                                                        |
|   | Kích thước lá       | Dài 8-17 cm, rộng 3-4 cm                                                                                                                | Cây lâu năm kích thước lá thường lớn hơn cây mới trồng |
|   | Màu sắc lá          | Có màu xanh lục, mặt trên nhẵn bóng, mặt dưới không bóng hơi ngả vàng. Một số lá cây non có sắc tím.                                    |                                                        |
|   | Bẹ lá               | Ôm sát thân, sau khi lá rụng thì bẹ lá vẫn ôm sát thân và khô có màu trắng bạc.                                                         |                                                        |
| 5 | <b>Giả hành</b>     |                                                                                                                                         |                                                        |

|   |                      |                                                                               |                                                     |
|---|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|   | Hình dạng giả hành   | Thân trụ tròn, mọng nước. có phân đốt, mỗi đốt mang 1 chồi ngủ hoặc phát hoa. |                                                     |
|   | Kích thước giả hành  | Dài 50- 110 cm, đường kính 0,5-1,5 cm.                                        | Kích thước phụ thuộc vào thời gian trồng            |
|   | Màu sắc giả hành     | Có màu xanh, gần đốt có các tia màu trắng hoặc tím                            | Màu sắc đậm nhạt khác nhau giữa giả hành non và già |
|   | Bề mặt giả hành      | Trơn nhẵn                                                                     |                                                     |
| 6 | <b>Rễ</b>            |                                                                               |                                                     |
|   | Hình dạng rễ         | Dạng tròn, rễ có màu trắng xanh                                               |                                                     |
|   | Đặc điểm rễ non      | Có màu xanh nhạt, đầu rễ bo tròn, mọng nước, nhẵn bóng.                       |                                                     |
|   | Kiểu rễ              | Bám dính                                                                      |                                                     |
| 7 | <b>Quả</b>           |                                                                               |                                                     |
|   | Loại quả             | Quả nang                                                                      | Khi khô có thể nứt vỏ bung ra ở vị trí các cạnh.    |
|   | Hình dạng            | Có hình trụ, phình to ở giữa, thuôn nhỏ 2 đầu, có 5-6 cạnh.                   |                                                     |
|   | Kích thước           | Dài 7-8 cm, đường kính 1-1,5 cm.                                              |                                                     |
|   | Màu sắc              | Có màu xanh nhạt, về già có màu hơi ngả sang tím.                             |                                                     |
| 8 | <b>Đặc điểm khác</b> | Rụng lá hàng năm                                                              | Tháng 10-11 bắt đầu rụng lá                         |
|   |                      | Tuổi thọ giả hành ngắn                                                        | Sau khi ra hoa hoặc lên chồi sẽ khô dần.            |
|   |                      | Chồi con có thể phát triển thành cây con hoàn chỉnh ngay trên giả hành.       |                                                     |

**Bảng P11-3.2.** Một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của lan Giả hạc tím Huế ở cây lớn hơn 3 năm tuổi và cây 2-3 năm tuổi.

| Đặc điểm                    | Cây lan > 3 năm tuổi       | Cây lan từ 2-3 năm      |
|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Chiều cao cây (cm)          | 102,00 ± 2,78 <sup>a</sup> | 58,53±2,0 <sup>b</sup>  |
| Đường kính cây (cm)         | 1,16 ± 0,06 <sup>a</sup>   | 0,83±0,0 <sup>b</sup>   |
| Chiều dài lóng (cm)         | 3,67 ± 0,11 <sup>a</sup>   | 2,38±0,07 <sup>b</sup>  |
| Số lá                       | 34,47 ± 0,69 <sup>a</sup>  | 24,67±0,54 <sup>b</sup> |
| Chiều dài lá (cm)           | 16,14 ± 0,58 <sup>a</sup>  | 10,38±0,34 <sup>b</sup> |
| Chiều rộng lớn nhất lá (cm) | 3,42 ± 0,09 <sup>a</sup>   | 2,17±0,09 <sup>b</sup>  |
| Đường kính hoa (cm)         | 10,36±0,59                 |                         |

*Ghi chú: Các chữ cái giống nhau trong cùng một hàng cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )*

- Đặc điểm Thân (Giả hành): Thân lan Giả hạc tím Huế dạng giả hành bao gồm nhiều đốt nối lại với nhau có dạng hình cung buồng xuống với chiều dài thân từ 58,53-102 cm tùy thời gian trồng. Đốt thân nhẵn, mọng nước, bên trong là một khối mô đặc, mỗi đốt thân có chiều dài 2,38-3,67 cm tùy tuổi cây, thân có 4 đến 5 đường sọc màu trắng chạy song song bắt đầu từ gốc, thân có màu xanh nhạt, phần tiếp nối giữa hai đốt thân là nơi sẽ phát sinh mầm hoa hoặc chồi ngủ (Bảng P11-3.1, P11-3.2 phụ lục 11; Hình 2.1B).

- Đặc điểm Lá: Lan Giả hạc tím Huế có lá thuôn dài, có màu xanh nhạt, cổ lá có vân màu tím đen. Lá già trên bề mặt có gân nổi rõ chạy dọc hai bên phiến lá, lá bánh tẻ gân lá hơi mờ và nhẵn. Lá lan Giả hạc tím Huế không mọng nước và dễ bị gãy khi gấp lại. Bẹ lá có sắc tố tím đen, thường là các chấm hoặc vết. Lan Giả hạc tím Huế có tổng số lá/thân, chiều dài và chiều rộng lá có sự khác nhau ở lá già và lá bánh tẻ (Bảng P11-3.2). Đối với lá già, số lá/thân, chiều dài và chiều rộng lá thu được đạt giá trị trung bình lần lượt là 34,47 (lá/thân), 16,14 cm (chiều dài lá) và 3,42 cm (chiều rộng lá). Trong khi đó các giá trị này thu được ở lá bánh tẻ lần lượt là 24,67 (lá/thân), 10,38 cm (chiều dài lá) và 2,17 cm (chiều rộng lá) (Bảng P11-3.1, P11-3.2 phụ lục 11) (Hình 3.1 C1, C2).

- Rễ: Rễ được hình thành từ gốc thân giả hành, rễ phát triển liên tục và có thể phân nhánh. Rễ non có màu xanh lá nhạt, có lớp lông mịn, phần chóp rễ sáng bóng, càng về gần gốc rễ có màu sẫm hơn, giòn dễ gãy.

- Đặc điểm Hoa: Lan Giả hạc tím Huế có đường kính hoa trung bình 10,36 cm (Bảng 3.1). Hoa được hình thành bởi 5 cánh tạo nên cấu trúc hoa cân đối bao gồm: một cánh đài trên, hai cánh đài dưới và hai cánh vai. Cánh đài trên có hình mũi mác thuôn dài với đỉnh nhọn hơi bo tròn, bên trong có gân mờ thể hiện cân đối hai bên và chạy dọc theo cánh hoa, khi hoa nở cánh đài trên thường uốn cong về phía sau và có màu trắng phớt hồng (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1H). Cánh đài dưới có hình thuôn dài với đỉnh nhọn, bên trong có gân chạy dọc cánh hoa nhưng không rõ nét, khi hoa nở cánh đài dưới thường uốn cong về phía sau và có màu tím phớt hồng. Cánh đài dưới có kích thước lớn hơn cánh đài trên (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1K). Cánh vai có hình mũi mác thuôn dài hơi bầu và có đỉnh nhọn, không có gân, khi nở cánh vai thường uốn cong về phía sau với màu tím phớt hồng và xuất

hiện các đường sọc có màu tím mờ dần từ gốc lên đỉnh. Kích thước cánh vai lớn hơn cánh đài trên và dưới (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1I).

Hoa có môi hoa hình bầu hơi tròn với cánh môi uốn cong ở giữa lên hai bên ôm lấy trụ hoa, môi hoa có lông tơ mịn màu tím trắng và ngả về màu tím khi ở gần mắt hoa đây là đặc điểm đặc trưng chỉ có ở loài *Dendrobium anosmum* [11]. Hai mắt hoa có màu tím đậm với thể hiện qua các đường gân hoa. Họng thủy sạch, không lem màu với màu tím trắng phớt hồng đặc trưng. Họng thủy có 3-4 đường vân sọc màu tím hồng chạy dọc theo họng và mờ dần từ gốc lên (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1 D5, L). Hoa có trụ hoa nằm sau mũi hoa và có màu tím trắng chứa nhụy hoa. Mũi hoa có màu tím hồng mang nhị và nhụy hoa (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1 E, F). Hoa có mùi thơm đặc trưng.

- Quả: Quả lan Giả hạc tím Huế thuộc loại quả nang, nở ra theo 3-6 đường nứt dọc, có dạng hình trụ thon dài nhỏ hai đầu, phình ra ở giữa, có 5-6 cạnh. Khi chín, quả mở ra và mảnh vỏ còn dính lại với nhau ở phía đỉnh và phía gốc (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 2.1A).



**Hình 3.1.** Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) (Nguyễn Hữu Thọ, 2022).

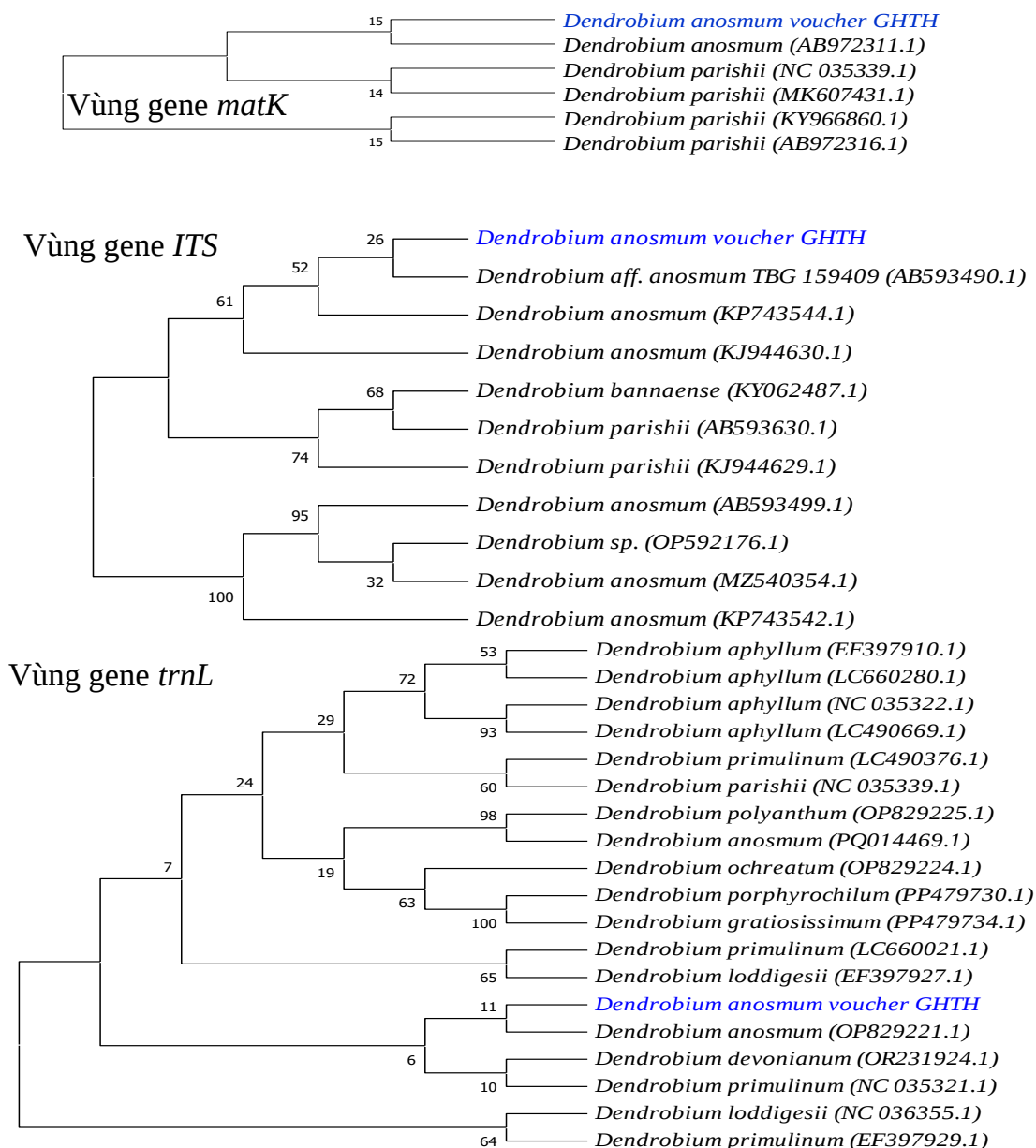
(A. Cây lan Giả hạc tím Huế; B. Vị trí cụm hoa trên thân; C1,2. Mặt trên và dưới của lá; D1,2,3,4,5. Mặt hoa nhìn theo các hướng (D1. mặt trước, D2. mặt trên, D3. mặt dưới, D4. mặt bên, D5. hoa được dàn trải trên mặt phẳng); E. Trụ hoa (chứa nhụy hoa); F. Nắp bao phấn (mũi hoa); G. Bao phấn (Pollinia); H. Cánh đài trên, I. Hai cánh vai; K. Hai cánh đài dưới, L. Cánh môi.)

## II. Nhận diện bằng chỉ thị phân tử

Kết quả phân tích BLAST trên NCBI trong nghiên cứu này cho thấy trình tự nucleotide vùng gen *rbcL* thu được từ loài lan Giả hạc tím Huế có mức độ tương đồng 100% với trình tự nucleotide của các loài thuộc chi *Dendrobium*. Một số nghiên cứu báo cáo rằng, vùng gen *rbcL* có thể sử dụng làm mã vạch cho phép nhận diện ở mức độ chi [1]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, khi so sánh với 100 dữ liệu gen *rbcL* thuộc các loài khác nhau của chi *Dendrobium* trên GenBank đã cho thấy vùng gen *rbcL* có tính bảo thủ cao, không thể sử dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt được ở mức độ loài. Trong khi đó đối với vùng gen *matK* thể hiện được sự sai khác lớn hơn giữa các loài thuộc chi *Dendrobium* khi phân tích BLAST trên NCBI, trong 100 trình tự hiện diện trên Genbank thì có 5 trình tự công bố thuộc hai loài *D. parishii* (NC\_035339.1; MK607431.1; KY966860.1 và AB972316.1) và loài *D. anosmum* (AB972311.1) độ tương đồng đạt 100%. Căn cứ trên cây phân loại (Hình P13-3.1 phụ lục 13) cho thấy loài lan Giả hạc tím Huế nằm cùng nhánh với loài lan có tên khoa học *D. anosmum* (AB972311.1). Nhiều nghiên cứu trước đây khi sử dụng cặp mồi 390F/1326R để nhân bản vùng gen *matK* trong định danh loài cũng đã khuyến cáo sử dụng vùng gen này làm mã vạch trong phân loại thực vật. Điều này thể hiện trong nghiên cứu của Phạm và cộng sự (2021) trên 12 mẫu của loài *D. anosmum* Lindl. var. *Semi alba* thu được từ nhiều địa phương ở Việt Nam, cặp mồi này được đánh giá là hiệu quả cao trong định danh loài *D. anosmum* Lindl. var. *Semi alba* [9]; Lê Thị Ngọc Diệp và cộng sự (2020) sử dụng cặp mồi này nhằm xác định 30 mẫu thuộc chi *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam. Kết quả nhận diện được 10/16 loài thuộc chi *Dendrobium* [2].

Tương tự vùng gen *matK*, vùng gen *trnL* cho thấy có sự sai khác lớn hơn giữa các loài thuộc chi *Dendrobium* khi phân tích BLAST trên NCBI (Phụ lục 14), trong 100 trình tự hiện diện trên Genbank thì có 2 trình tự công bố thuộc hai loài *D. devonianum* (OR231924.1 ) và *D. anosmum* voucher UGDA.0073096 (OP829221.1). Tuy nhiên, kết quả cây phân loại (Hình P13-3.1 phụ lục 13) cho thấy loài lan Giả hạc tím Huế nằm cùng nhánh với loài *D. anosmum* (OP829221.1). Kết quả xác định tên khoa học cho loài lan Giả hạc tím Huế càng thể hiện rõ khi sử dụng cặp mồi *ITS4* /*ITS5* nhân bản vùng gen *ITS* thuộc hệ gen nhân. Kết quả BLAST trên NCBI cho thấy có hai trình tự vùng gen tương ứng thuộc loài *D. anosmum* (KP743544.1) và *D. aff. anosmum* TBG 159409 (AB593490.1) cho kết quả tương đồng đạt 100% (Phụ lục 14). Cây phân loại di truyền (Hình P13-3.1 phụ lục 13) cho thấy loài lan này

nằm cùng nhánh với loài *D. anosmum* với hai mã số công bố nêu trên. Theo nghiên cứu của Lê Thị Ngọc Diệp và cộng sự (2020) cho thấy vùng gen *ITS* có khả năng nhận diện loài cao nhất với 16/16 loài thuộc chi *Dendrobium* với 30 mẫu lan thu ở khu vực phía Nam Việt Nam [2]. Kết quả phân tích 4 vùng gen khẳng định mẫu lan Giả hạc tím Huế thuộc loại *D. anosmum*. Chúng tôi kí hiệu mẫu chuẩn này là *D. anosmum* voucher GHTH.



**Hình P15-3.1.** Cây phân nhóm dựa trên vùng gen *ITS*, *trnL*, *matK* của của mẫu lan Giả hạc tím Huế (GHTH) nghiên cứu so với trình tự vùng gen tương ứng của các mẫu được công bố trên ngân hàng gen Mỹ (Genbank).

## PHỤ LỤC 12. MỘT SỐ BẢNG DỮ LIỆU ĐƯỢC THU THẬP TRONG NGHIÊN CỨU

**Bảng P12-3.1.** Ảnh hưởng của khử trùng và chiếu sáng đến nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần nuôi cấy

| CT | Thời gian chiếu sáng (giờ) | Thời gian nảy mầm của hạt (ngày) | Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%) | Tỷ lệ hình thành protocorm (%) | Tỷ lệ hạt chết (%)      | Tỷ lệ nhiễm (%)        |
|----|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1  | 0                          | 69,53±0,95 <sup>c</sup>          | 20,93±0,95 <sup>c</sup>   | 20,00±0,79 <sup>c</sup>        | 76,00±0,56 <sup>c</sup> | 4,89±1,21 <sup>a</sup> |
| 2  | 4                          | 57,07±0,45 <sup>b</sup>          | 46,13±0,40 <sup>b</sup>   | 41,96±0,38 <sup>b</sup>        | 44,40±0,90 <sup>b</sup> | 4,44±1,06 <sup>a</sup> |
| 3  | 8                          | 41,33±0,96 <sup>a</sup>          | 64,76±0,96 <sup>a</sup>   | 60,89±0,9 <sup>a</sup>         | 20,36±0,96 <sup>a</sup> | 4,00±1,09 <sup>a</sup> |
| 4  | 12                         | 42,67±0,79 <sup>a</sup>          | 45,24±0,45 <sup>b</sup>   | 43,78±0,57 <sup>b</sup>        | 22,58±0,89 <sup>a</sup> | 4,36±0,85 <sup>a</sup> |

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

**Bảng P12-3.2.** Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần theo dõi

| Công thức | Thời gian nảy mầm của hạt (ngày) | Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%) | Tỷ lệ hình thành protocorm (%) | Tỷ lệ hạt chết (%)      |
|-----------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| CT1       | 41,33±0,96 <sup>a</sup>          | 64,76±0,96 <sup>a</sup>   | 60,89±0,91 <sup>a</sup>        | 20,36±0,96 <sup>a</sup> |
| CT2       | 54,00±0,70 <sup>b</sup>          | 50,42±1,19 <sup>b</sup>   | 44,73±1,62 <sup>b</sup>        | 45,63±1,61 <sup>b</sup> |
| CT3       | 57,53±0,48 <sup>c</sup>          | 47,44±1,11 <sup>b</sup>   | 36,87±1,44 <sup>c</sup>        | 42,07±1,49 <sup>b</sup> |
| CT4       | 42,87±0,65 <sup>a</sup>          | 63,08±1,68 <sup>a</sup>   | 59,62±1,79 <sup>a</sup>        | 22,71±0,67 <sup>a</sup> |
| CT5       | 63,93±0,49 <sup>d</sup>          | 40,27±1,08 <sup>c</sup>   | 29,29±1,13 <sup>d</sup>        | 52,65±1,88 <sup>c</sup> |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE)); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

**Bảng P12-3.3.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | chất điều hoà sinh trưởng (mg/L) |      | Thời gian nảy mầm của hạt (ngày) | Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%) | Tỷ lệ hình thành protocorm (%) | Tỷ lệ hạt chết (%)       |
|-----------|----------------------------------|------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------|
|           | NAA                              | BA   |                                  |                           |                                |                          |
| CT1       | 0,0                              | 0,0  | 41,33±0,96 <sup>g</sup>          | 64,76±0,96 <sup>h</sup>   | 60,89±0,91 <sup>g</sup>        | 20,36±0,96 <sup>e</sup>  |
| CT2       | 0,0                              | 0,25 | 36,60±0,49 <sup>ef</sup>         | 73,53±0,51 <sup>g</sup>   | 70,81±0,87 <sup>f</sup>        | 19,33±0,74 <sup>e</sup>  |
| CT3       | 0,25                             | 0,25 | 37,47±0,70 <sup>f</sup>          | 75,39±0,77 <sup>f</sup>   | 72,91±0,45 <sup>ef</sup>       | 18,60±0,77 <sup>e</sup>  |
| CT4       | 0,5                              | 0,25 | 35,33±0,62 <sup>de</sup>         | 81,63±0,63 <sup>d</sup>   | 76,20±0,40 <sup>d</sup>        | 14,68±0,67 <sup>cd</sup> |
| CT5       | 0,75                             | 0,25 | 28,27±0,92 <sup>b</sup>          | 87,64±0,64 <sup>b</sup>   | 82,04±0,61 <sup>b</sup>        | 10,49±0,54 <sup>b</sup>  |
| CT6       | 1,0                              | 0,25 | 31,33±0,69 <sup>c</sup>          | 81,40±0,69 <sup>d</sup>   | 77,41±0,44 <sup>cd</sup>       | 13,13±0,52 <sup>c</sup>  |

|      |      |     |                          |                          |                          |                         |
|------|------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| CT7  | 0,0  | 0,5 | 34,13±0,52 <sup>d</sup>  | 75,84±0,57 <sup>f</sup>  | 71,26±0,84 <sup>ef</sup> | 18,83±0,70 <sup>e</sup> |
| CT8  | 0,25 | 0,5 | 33,67±0,80 <sup>d</sup>  | 78,76±0,81 <sup>e</sup>  | 73,35±0,53 <sup>e</sup>  | 13,79±0,36 <sup>c</sup> |
| CT9  | 0,5  | 0,5 | 33,93±0,63 <sup>d</sup>  | 77,09±0,55 <sup>ef</sup> | 73,20±0,54 <sup>e</sup>  | 15,80±0,83 <sup>d</sup> |
| CT10 | 0,75 | 0,5 | 23,27±0,27 <sup>a</sup>  | 93,46±0,47 <sup>a</sup>  | 88,75±0,55 <sup>a</sup>  | 4,43±0,37 <sup>a</sup>  |
| CT11 | 1,0  | 0,5 | 29,53±0,93 <sup>bc</sup> | 84,68±0,49 <sup>c</sup>  | 78,66±0,56 <sup>c</sup>  | 13,61±0,43 <sup>c</sup> |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , Duncan's test)

**Bảng P12-3.4** Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Điều hoà sinh trưởng (mg/L) |     | Tỷ lệ tái sinh chồi (%)   | Số chồi/mẫu              | Chiều cao chồi (cm)     | Số lá/chồi               |
|-----------|-----------------------------|-----|---------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|           | BA                          | NAA |                           |                          |                         |                          |
| CT1       | 0,0                         | 0,0 | 65,33±2,26 <sup>g</sup>   | 1,03±0,11 <sup>h</sup>   | 0,55±0,03 <sup>g</sup>  | 1,44±0,23 <sup>de</sup>  |
| CT2       | 0,5                         | 0,0 | 72,67±2,45 <sup>f</sup>   | 1,36±0,06 <sup>e-g</sup> | 1,29±0,15 <sup>cd</sup> | 1,74±0,17 <sup>c-e</sup> |
| CT3       | 1,0                         | 0,0 | 75,33±1,70 <sup>ef</sup>  | 1,56±0,11 <sup>c-e</sup> | 1,49±0,09 <sup>bc</sup> | 1,89±0,14 <sup>b-d</sup> |
| CT4       | 1,5                         | 0,0 | 76,67±2,36 <sup>d-f</sup> | 1,62±0,10 <sup>cd</sup>  | 1,53±0,09 <sup>b</sup>  | 2,16±0,28 <sup>a-c</sup> |
| CT5       | 2                           | 0,0 | 73,33±1,83 <sup>ef</sup>  | 1,52±0,09 <sup>d-f</sup> | 1,29±0,15 <sup>cd</sup> | 1,72±0,13 <sup>c-e</sup> |
| CT6       | 0,0                         | 0,5 | 74,00±1,94 <sup>ef</sup>  | 1,22±0,05 <sup>e-g</sup> | 0,75±0,04 <sup>fg</sup> | 1,64±0,21 <sup>c-e</sup> |
| CT7       | 0,5                         | 0,5 | 79,33±1,94 <sup>de</sup>  | 1,52±0,06 <sup>d-f</sup> | 1,26±0,03 <sup>cd</sup> | 2,12±0,10 <sup>bc</sup>  |
| CT8       | 1,0                         | 0,5 | 85,33±1,70 <sup>bc</sup>  | 1,78±0,03 <sup>c</sup>   | 1,57±0,05 <sup>b</sup>  | 2,38±0,20 <sup>ab</sup>  |
| CT9       | 1,5                         | 0,5 | 96,00±1,25 <sup>a</sup>   | 2,76±0,04 <sup>a</sup>   | 1,83±0,03 <sup>a</sup>  | 2,76±0,32 <sup>a</sup>   |
| CT10      | 2                           | 0,5 | 88,00±2,71 <sup>b</sup>   | 1,54±0,03 <sup>c-f</sup> | 1,45±0,00 <sup>bc</sup> | 2,22±0,24 <sup>a-c</sup> |
| CT11      | 0,0                         | 1,0 | 72,00±1,70 <sup>f</sup>   | 1,01±0,06 <sup>h</sup>   | 0,82±0,02 <sup>f</sup>  | 1,36±0,12 <sup>de</sup>  |
| CT12      | 0,5                         | 1,0 | 76,00±1,25 <sup>d-f</sup> | 1,31±0,10 <sup>fg</sup>  | 1,10±0,06 <sup>de</sup> | 1,72±0,12 <sup>c-e</sup> |
| CT13      | 1,0                         | 1,0 | 82,00±1,70 <sup>cd</sup>  | 1,59±0,05 <sup>c-e</sup> | 1,26±0,09 <sup>cd</sup> | 1,86±0,14 <sup>b-e</sup> |
| CT14      | 1,5                         | 1,0 | 90,67±2,21 <sup>ab</sup>  | 2,03±0,11 <sup>b</sup>   | 1,58±0,04 <sup>b</sup>  | 2,48±0,25 <sup>ab</sup>  |
| CT15      | 2,0                         | 1,0 | 73,33±1,83 <sup>ef</sup>  | 1,23±0,05 <sup>gh</sup>  | 0,90±0,05 <sup>ef</sup> | 1,24±0,10 <sup>e</sup>   |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test)

**Bảng P12-3.5.** Ảnh hưởng của chất khử trùng và thời gian khử trùng đến hiệu quả vào mẫu từ đoạn thân của lan Giả hạc tím Huế sau 1 tuần.

| Công thức | Thời gian khử trùng (phút) |                                  |                        | Tỷ lệ mẫu sạch (%)       | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)       | Tỷ lệ mẫu chết (%)       |
|-----------|----------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
|           | NaClO 2%                   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% | HgCl <sub>2</sub> 0,1% |                          |                           |                          |
| CT1       | 10                         | -                                | -                      | 0,00 ± 0,1 <sup>e</sup>  | 100,00 ± 0,1 <sup>f</sup> | 0,00 ± 0,0 <sup>a</sup>  |
| CT2       | 10                         | 10                               | -                      | 0,00 ± 0,0 <sup>e</sup>  | 88,89 ± 2,6 <sup>e</sup>  | 11,11 ± 2,6 <sup>b</sup> |
| CT3       | 10                         | 15                               | -                      | 11,11 ± 2,0 <sup>d</sup> | 66,67 ± 2,0 <sup>d</sup>  | 22,22 ± 1,0 <sup>c</sup> |
| CT4       | 10                         | 20                               | -                      | 33,33 ± 2,0 <sup>b</sup> | 44,44 ± 2,2 <sup>c</sup>  | 22,22 ± 0,6 <sup>c</sup> |

|     |    |   |    |                          |                          |                          |
|-----|----|---|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| CT5 | 10 | - | 5  | 22,22 ± 2,6 <sup>c</sup> | 66,67 ± 2,4 <sup>d</sup> | 22,22 ± 0,9 <sup>c</sup> |
| CT6 | 10 | - | 10 | 66,67 ± 1,5 <sup>a</sup> | 11,11 ± 1,1 <sup>b</sup> | 22,22 ± 0,9 <sup>c</sup> |
| CT7 | 10 |   | 15 | 31,33 ± 1,9 <sup>b</sup> | 4,67 ± 0,9 <sup>a</sup>  | 64,08 ± 1,6 <sup>d</sup> |

Ghi chú: -: Không có tham gia; Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test)

**Bảng P12-3.6.** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng hình thành mô sẹo từ đoạn thân của lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần nuôi cấy

| Môi trường | Thời gian hình thành mô sẹo (ngày) | Tỷ lệ sống của mẫu (%)   | Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%) | Kích thước mô sẹo (cm) |
|------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|------------------------|
| CT1        | 69,60±1,59 <sup>a</sup>            | 66,33±3,00 <sup>a</sup>  | 17,67±1,22 <sup>a</sup>         | 0,65±0,03 <sup>a</sup> |
| CT2        | 89,70±1,04 <sup>c</sup>            | 55,67±1,22 <sup>b</sup>  | 7,67±1,12 <sup>bc</sup>         | 0,32±0,02 <sup>c</sup> |
| CT3        | 94,50±0,50 <sup>d</sup>            | 45,67±1,41 <sup>c</sup>  | 6,33±0,92 <sup>c</sup>          | 0,29±0,01 <sup>c</sup> |
| CT4        | 75,80±0,55 <sup>b</sup>            | 71,00±1,86 <sup>a</sup>  | 14,67±1,13 <sup>a</sup>         | 0,67±0,01 <sup>a</sup> |
| CT5        | 88,20±0,49 <sup>c</sup>            | 50,67±1,20 <sup>bc</sup> | 10,33±0,92 <sup>b</sup>         | 0,42±0,01 <sup>b</sup> |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , Duncan's test)

**Bảng P12-3.7.** Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng hình thành mô sẹo của mẫu lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Kích thích sinh trưởng (mg/L) |     |     | Thời gian hình thành mô sẹo (ngày) | Tỷ lệ sống của mẫu (%)   | Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%) | Kích thước mô sẹo (chiều dài cm) |
|-----------|-------------------------------|-----|-----|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|           | BA                            | TDZ | NAA |                                    |                          |                                 |                                  |
| CT1       | 0,0                           | 0,0 | 0,0 | 69,60±1,59 <sup>h</sup>            | 66,33±3,00 <sup>f</sup>  | 17,67±1,22 <sup>h</sup>         | 0,65±0,03 <sup>cd</sup>          |
| CT2       | 0,5                           | 0,0 | 0,5 | 61,00±0,92 <sup>g</sup>            | 71,67±1,67 <sup>de</sup> | 26,00±1,30 <sup>g</sup>         | 0,69±0,02 <sup>cd</sup>          |
| CT3       | 1,0                           | 0,0 | 0,5 | 35,10±0,74 <sup>b</sup>            | 83,67±1,36 <sup>ab</sup> | 57,33±1,85 <sup>b</sup>         | 0,94±0,01 <sup>a</sup>           |
| CT4       | 1,5                           | 0,0 | 0,5 | 41,10±0,53 <sup>c</sup>            | 76,67±1,11 <sup>cd</sup> | 50,00±1,32 <sup>d</sup>         | 0,72±0,01 <sup>cd</sup>          |
| CT5       | 2,0                           | 0,0 | 0,5 | 56,30±0,47 <sup>f</sup>            | 69,67±1,36 <sup>ef</sup> | 34,67±1,13 <sup>f</sup>         | 0,64±0,00 <sup>e</sup>           |
| CT6       | 0,0                           | 0,5 | 0,5 | 51,80±0,55 <sup>e</sup>            | 76,33±1,36 <sup>cd</sup> | 32,67±1,09 <sup>f</sup>         | 0,71±0,01 <sup>cd</sup>          |
| CT7       | 0,0                           | 1,0 | 0,5 | 42,90±0,67 <sup>c</sup>            | 80,67±1,30 <sup>bc</sup> | 53,33±0,86 <sup>c</sup>         | 0,82±0,01 <sup>b</sup>           |
| CT8       | 0,0                           | 1,5 | 0,5 | 32,70±0,56 <sup>a</sup>            | 86,67±1,57 <sup>a</sup>  | 64,33±1,22 <sup>a</sup>         | 0,97±0,08 <sup>a</sup>           |
| CT9       | 0,0                           | 2,0 | 0,5 | 47,20±0,68 <sup>d</sup>            | 75,33±1,33 <sup>d</sup>  | 45,33±1,02 <sup>e</sup>         | 0,74±0,01 <sup>bc</sup>          |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , Duncan's test)

**Bảng P12-3.8.** 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.

| Công thức | Điều hoà sinh trưởng (mg/L) |  | Số chồi/mẫu | Chiều cao chồi (cm) | Số lá/chồi |
|-----------|-----------------------------|--|-------------|---------------------|------------|
|-----------|-----------------------------|--|-------------|---------------------|------------|

|      | BA  | NAA | Tỷ lệ tái sinh chồi (%)   |                          |                         |                         |
|------|-----|-----|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| CT1  | 0,0 | 0,0 | 14,67±1,82 <sup>k</sup>   | 0,76±0,16 <sup>j</sup>   | 0,51±0,05 <sup>h</sup>  | 1,34±0,21 <sup>c</sup>  |
| CT2  | 0,5 | 0,0 | 24,00±1,25 <sup>ij</sup>  | 1,54±0,20 <sup>d-g</sup> | 0,73±0,05 <sup>g</sup>  | 1,72±0,31 <sup>bc</sup> |
| CT3  | 1,0 | 0,0 | 29,33±1,94 <sup>g-i</sup> | 1,74±0,09 <sup>c-e</sup> | 1,10±0,11 <sup>de</sup> | 1,74±0,22 <sup>bc</sup> |
| CT4  | 1,5 | 0,0 | 55,33±1,70 <sup>c</sup>   | 2,01±0,11 <sup>bc</sup>  | 1,52±0,06 <sup>b</sup>  | 2,15±0,34 <sup>b</sup>  |
| CT5  | 2,0 | 0,0 | 42,67±1,94 <sup>e</sup>   | 1,62±0,05 <sup>d-f</sup> | 1,28±0,09 <sup>cd</sup> | 1,71±0,18 <sup>bc</sup> |
| CT6  | 0,0 | 0,5 | 21,33±3,59 <sup>j</sup>   | 1,05±0,12 <sup>i</sup>   | 0,67±0,06 <sup>gh</sup> | 1,46±0,23 <sup>bc</sup> |
| CT7  | 0,5 | 0,5 | 32,67±2,21 <sup>fg</sup>  | 1,36±0,08 <sup>f-h</sup> | 0,85±0,05 <sup>fg</sup> | 1,72±0,21 <sup>bc</sup> |
| CT8  | 1,0 | 0,5 | 47,33±2,21 <sup>de</sup>  | 1,46±0,06 <sup>e-g</sup> | 1,23±0,07 <sup>cd</sup> | 2,12±0,20 <sup>b</sup>  |
| CT9  | 1,5 | 0,5 | 78,67±3,09 <sup>a</sup>   | 2,58±0,06 <sup>a</sup>   | 1,71±0,03 <sup>a</sup>  | 2,92±0,31 <sup>a</sup>  |
| CT10 | 2,0 | 0,5 | 50,67±1,25 <sup>cd</sup>  | 2,00±0,07 <sup>bc</sup>  | 1,56±0,08 <sup>ab</sup> | 2,17±0,34 <sup>b</sup>  |
| CT11 | 0,0 | 1,0 | 26,00±1,25 <sup>h-j</sup> | 1,11±0,04 <sup>hi</sup>  | 0,81±0,03 <sup>fg</sup> | 1,51±0,20 <sup>bc</sup> |
| CT12 | 0,5 | 1,0 | 36,67±1,05 <sup>f</sup>   | 1,32±0,04 <sup>f-i</sup> | 1,17±0,05 <sup>d</sup>  | 1,37±0,13 <sup>c</sup>  |
| CT13 | 1,0 | 1,0 | 45,33±2,71 <sup>de</sup>  | 1,80±0,06 <sup>cd</sup>  | 1,37±0,06 <sup>bc</sup> | 1,43±0,04 <sup>bc</sup> |
| CT14 | 1,5 | 1,0 | 64,67±1,70 <sup>b</sup>   | 2,14±0,08 <sup>b</sup>   | 1,49±0,02 <sup>b</sup>  | 1,22±0,11 <sup>c</sup>  |
| CT15 | 2,0 | 1,0 | 32,00±2,71 <sup>f-h</sup> | 1,25±0,05 <sup>g-i</sup> | 0,95±0,05 <sup>ef</sup> | 1,13±0,05 <sup>c</sup>  |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test))

**Bảng P12-3.9.** Ảnh hưởng BA đến khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân sau 8 tuần nuôi cấy

| Công thức | Nồng độ BA (mg/L) | Tỷ lệ tái sinh chồi (%)  | Số chồi/mẫu             | Chiều cao chồi (cm)      | Số lá của chồi          |
|-----------|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| CT1       | 0,0               | 12,67 ± 1,1 <sup>e</sup> | 0,67 ± 0,1 <sup>e</sup> | 0,56 ± 0,1 <sup>c</sup>  | 1,89±0,21 <sup>c</sup>  |
| CT2       | 0,5               | 33,33 ± 1,4 <sup>d</sup> | 1,00 ± 0,1 <sup>d</sup> | 0,77 ± 0,1 <sup>bc</sup> | 2,34±0,28 <sup>bc</sup> |
| CT3       | 1,0               | 44,44 ± 1,3 <sup>c</sup> | 1,33 ± 0,1 <sup>c</sup> | 1,00 ± 0,1 <sup>b</sup>  | 2,65±0,31 <sup>ab</sup> |
| CT4       | 1,5               | 88,89 ± 2,1 <sup>a</sup> | 2,33 ± 0,1 <sup>a</sup> | 1,57 ± 0,2 <sup>a</sup>  | 3,24±0,21 <sup>a</sup>  |
| CT5       | 2,0               | 55,56 ± 1,8 <sup>b</sup> | 1,67 ± 0,1 <sup>b</sup> | 1,07 ± 0,1 <sup>b</sup>  | 2,21±0,22 <sup>bc</sup> |

(Trung bình ± sai số chuẩn (SE); Các chữ cái giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Duncan's test))

**Bảng P12-3.10.** Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập từ rễ lan.

| Hàm lượng IAA (µg/ml) | Số chủng  | Tỷ lệ chủng có khả năng sinh IAA (%) |
|-----------------------|-----------|--------------------------------------|
| 0                     | 15        | 50,00                                |
| 1 - 10                | 4         | 13,33                                |
| 11 - 20               | 5         | 16,67                                |
| 21 - 30               | 2         | 6,67                                 |
| >30                   | 4         | 13,33                                |
| <b>Tổng số</b>        | <b>30</b> | <b>100</b>                           |

**Bảng P12-3.11.** Kích thước, đường kính nhân tế bào biểu mô lá và chiều dày của phiến lá.

| TT | Mẫu thí nghiệm | Hoá chất xử lý | Kích thước tế bào biểu mô       |                                 | Đường kính nhân tế bào biểu mô lá ( $\mu\text{m}$ ) | Bề dày phiến lá (mm)           |
|----|----------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------|
|    |                |                | Chiều dài ( $\mu\text{m}$ )     | Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )    |                                                     |                                |
| 1  | M1             | -              | 28,62 $\pm$ 1,14 <sup>b-h</sup> | 16,02 $\pm$ 0,83 <sup>b-d</sup> | 3,84 $\pm$ 0,20 <sup>cd</sup>                       | 0,69 $\pm$ 0,04 <sup>gh</sup>  |
| 2  | HX2            | Colchicine     | 32,20 $\pm$ 1,75 <sup>ab</sup>  | 17,51 $\pm$ 0,85 <sup>a-c</sup> | 5,25 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>                       | 0,91 $\pm$ 0,04 <sup>a-c</sup> |
| 3  | HX3            | Colchicine     | 31,67 $\pm$ 1,38 <sup>a-d</sup> | 17,20 $\pm$ 0,91 <sup>a-d</sup> | 5,55 $\pm$ 0,32 <sup>ab</sup>                       | 0,81 $\pm$ 0,04 <sup>b-h</sup> |
| 4  | HX4            | Colchicine     | 31,82 $\pm$ 1,74 <sup>a-c</sup> | 17,29 $\pm$ 0,95 <sup>a-c</sup> | 5,38 $\pm$ 0,32 <sup>ab</sup>                       | 0,85 $\pm$ 0,05 <sup>a-f</sup> |
| 5  | HX5            | Colchicine     | 30,80 $\pm$ 1,01 <sup>a-f</sup> | 16,28 $\pm$ 0,88 <sup>a-d</sup> | 5,63 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup>                       | 0,89 $\pm$ 0,05 <sup>a-d</sup> |
| 6  | HX6            | Colchicine     | 31,64 $\pm$ 2,00 <sup>a-d</sup> | 17,03 $\pm$ 0,90 <sup>a-d</sup> | 4,87 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>                        | 0,83 $\pm$ 0,04 <sup>b-g</sup> |
| 7  | HX11           | Colchicine     | 32,33 $\pm$ 1,80 <sup>ab</sup>  | 17,86 $\pm$ 1,02 <sup>ab</sup>  | 5,14 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>                       | 0,85 $\pm$ 0,05 <sup>a-e</sup> |
| 8  | M2             | Colchicine     | 29,44 $\pm$ 1,45 <sup>a-g</sup> | 14,94 $\pm$ 0,66 <sup>d-f</sup> | 5,68 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>                        | 0,89 $\pm$ 0,05 <sup>a-d</sup> |
| 9  | M4             | Colchicine     | 31,83 $\pm$ 1,40 <sup>a-c</sup> | 17,23 $\pm$ 0,97 <sup>a-d</sup> | 5,15 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>                       | 0,91 $\pm$ 0,05 <sup>a-c</sup> |
| 10 | M5             | Colchicine     | 29,86 $\pm$ 1,21 <sup>a-g</sup> | 15,29 $\pm$ 0,55 <sup>c-e</sup> | 5,53 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>                       | 0,91 $\pm$ 0,06 <sup>a-c</sup> |
| 11 | M6             | Colchicine     | 31,27 $\pm$ 0,88 <sup>a-e</sup> | 16,81 $\pm$ 1,01 <sup>a-d</sup> | 5,76 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>                        | 0,88 $\pm$ 0,06 <sup>a-d</sup> |
| 12 | M7             | Colchicine     | 32,15 $\pm$ 1,43 <sup>ab</sup>  | 17,63 $\pm$ 0,81 <sup>a-c</sup> | 5,50 $\pm$ 0,25 <sup>ab</sup>                       | 0,89 $\pm$ 0,05 <sup>a-d</sup> |
| 13 | M8             | Colchicine     | 32,87 $\pm$ 1,76 <sup>ab</sup>  | 18,32 $\pm$ 1,04 <sup>ab</sup>  | 5,69 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>                        | 0,91 $\pm$ 0,06 <sup>a-c</sup> |
| 14 | M16            | Colchicine     | 32,59 $\pm$ 1,57 <sup>ab</sup>  | 18,01 $\pm$ 0,85 <sup>ab</sup>  | 5,72 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>                        | 0,94 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>  |
| 15 | M17            | Colchicine     | 33,06 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup>   | 18,49 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>   | 5,83 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>                        | 0,97 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>   |
| 16 | HX1            | DMS            | 27,20 $\pm$ 0,85 <sup>e-h</sup> | 12,87 $\pm$ 0,55 <sup>f-h</sup> | 3,11 $\pm$ 0,10 <sup>d-g</sup>                      | 0,74 $\pm$ 0,03 <sup>e-h</sup> |
| 17 | HX7            | DMS            | 27,47 $\pm$ 0,73 <sup>d-h</sup> | 13,16 $\pm$ 0,49 <sup>e-g</sup> | 2,82 $\pm$ 0,14 <sup>g</sup>                        | 0,68 $\pm$ 0,03 <sup>g</sup>   |
| 18 | HX8            | DMS            | 26,18 $\pm$ 0,92 <sup>gh</sup>  | 11,85 $\pm$ 0,40 <sup>gh</sup>  | 2,55 $\pm$ 0,16 <sup>g</sup>                        | 0,71 $\pm$ 0,03 <sup>e-h</sup> |
| 19 | HX9            | DMS            | 26,05 $\pm$ 0,94 <sup>gh</sup>  | 12,01 $\pm$ 0,49 <sup>gh</sup>  | 2,61 $\pm$ 0,19 <sup>g</sup>                        | 0,69 $\pm$ 0,03 <sup>gh</sup>  |
| 20 | HX10           | DMS            | 26,59 $\pm$ 0,89 <sup>f-h</sup> | 12,46 $\pm$ 0,40 <sup>gh</sup>  | 2,88 $\pm$ 0,26 <sup>g</sup>                        | 0,72 $\pm$ 0,03 <sup>e-h</sup> |
| 21 | M3             | DMS            | 27,06 $\pm$ 1,09 <sup>e-h</sup> | 12,86 $\pm$ 0,57 <sup>f-h</sup> | 2,98 $\pm$ 0,22 <sup>e-g</sup>                      | 0,76 $\pm$ 0,02 <sup>d-h</sup> |
| 22 | M9             | DMS            | 27,60 $\pm$ 1,25 <sup>c-h</sup> | 13,27 $\pm$ 0,55 <sup>e-g</sup> | 2,95 $\pm$ 0,12 <sup>fg</sup>                       | 0,78 $\pm$ 0,03 <sup>c-h</sup> |
| 23 | M10            | DMS            | 25,92 $\pm$ 0,86 <sup>gh</sup>  | 11,57 $\pm$ 0,33 <sup>gh</sup>  | 3,32 $\pm$ 0,22 <sup>c-g</sup>                      | 0,74 $\pm$ 0,03 <sup>e-h</sup> |
| 24 | M11            | DMS            | 25,85 $\pm$ 0,97 <sup>gh</sup>  | 11,67 $\pm$ 0,34 <sup>gh</sup>  | 3,72 $\pm$ 0,22 <sup>c-e</sup>                      | 0,73 $\pm$ 0,03 <sup>e-h</sup> |
| 25 | M12            | DMS            | 24,64 $\pm$ 1,13 <sup>h</sup>   | 10,71 $\pm$ 0,34 <sup>g</sup>   | 3,65 $\pm$ 0,23 <sup>c-f</sup>                      | 0,74 $\pm$ 0,02 <sup>e-h</sup> |
| 26 | M13            | DMS            | 26,64 $\pm$ 0,79 <sup>f-h</sup> | 12,53 $\pm$ 0,26 <sup>gh</sup>  | 3,64 $\pm$ 0,21 <sup>c-f</sup>                      | 0,72 $\pm$ 0,03 <sup>e-h</sup> |
| 27 | M14            | DMS            | 25,55 $\pm$ 1,06 <sup>gh</sup>  | 11,34 $\pm$ 0,40 <sup>gh</sup>  | 3,72 $\pm$ 0,23 <sup>c-e</sup>                      | 0,71 $\pm$ 0,03 <sup>f-h</sup> |
| 28 | M15            | DMS            | 27,25 $\pm$ 1,36 <sup>e-h</sup> | 12,98 $\pm$ 0,52 <sup>f-h</sup> | 3,88 $\pm$ 0,25 <sup>c</sup>                        | 0,76 $\pm$ 0,03 <sup>d-h</sup> |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c... trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

**Bảng P12-3.12.** Đặc điểm bó mạch trong thân non và lông hút của rễ lan Giả hạc tím Huế

| TT | Mẫu Thí nghiệm | Hoá chất xử lý | Bó mạch dẫn trong thân non      |                               | Lông hút của rễ                  |                              |
|----|----------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
|    |                |                | Số lượng (bó mạch/thân)         | Đường kính ( $\mu\text{m}$ )  | Mật độ/ $\text{mm}^2$            | Chiều dài (mm)               |
| 1  | M1             | -              | 21,27 $\pm$ 0,21 <sup>e</sup>   | 71,89 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup> | 252,47 $\pm$ 10,90 <sup>a</sup>  | 0,64 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> |
| 2  | HX2            | Colchicine     | 56,47 $\pm$ 0,52 <sup>a-c</sup> | 40,61 $\pm$ 1,41 <sup>c</sup> | 211,67 $\pm$ 8,09 <sup>f</sup>   | 0,85 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup> |
| 3  | HX3            | Colchicine     | 53,67 $\pm$ 1,01 <sup>d</sup>   | 37,46 $\pm$ 1,41 <sup>c</sup> | 214,87 $\pm$ 4,20 <sup>d-f</sup> | 0,81 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> |
| 4  | HX4            | Colchicine     | 55,13 $\pm$ 0,87 <sup>b-d</sup> | 39,21 $\pm$ 1,22 <sup>c</sup> | 216,07 $\pm$ 8,52 <sup>c-f</sup> | 0,89 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> |
| 5  | HX5            | Colchicine     | 54,47 $\pm$ 0,94 <sup>cd</sup>  | 38,29 $\pm$ 1,21 <sup>c</sup> | 213,47 $\pm$ 7,56 <sup>d-f</sup> | 0,88 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup> |
| 6  | HX6            | Colchicine     | 53,20 $\pm$ 0,91 <sup>d</sup>   | 36,87 $\pm$ 1,26 <sup>c</sup> | 214,27 $\pm$ 4,89 <sup>d-f</sup> | 0,86 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> |
| 7  | HX11           | Colchicine     | 55,13 $\pm$ 1,03 <sup>b-d</sup> | 39,05 $\pm$ 1,13 <sup>c</sup> | 215,53 $\pm$ 8,95 <sup>c-f</sup> | 0,90 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> |
| 8  | M2             | Colchicine     | 56,67 $\pm$ 0,96 <sup>a-c</sup> | 39,26 $\pm$ 1,10 <sup>c</sup> | 213,07 $\pm$ 6,38 <sup>d-f</sup> | 0,90 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> |
| 9  | M4             | Colchicine     | 56,53 $\pm$ 1,02 <sup>a-c</sup> | 40,53 $\pm$ 1,43 <sup>c</sup> | 216,07 $\pm$ 7,01 <sup>c-f</sup> | 0,87 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> |
| 10 | M5             | Colchicine     | 53,73 $\pm$ 1,14 <sup>d</sup>   | 37,92 $\pm$ 1,05 <sup>c</sup> | 209,00 $\pm$ 8,16 <sup>f</sup>   | 0,90 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> |
| 11 | M6             | Colchicine     | 54,53 $\pm$ 0,87 <sup>cd</sup>  | 37,97 $\pm$ 0,90 <sup>c</sup> | 212,47 $\pm$ 7,31 <sup>ef</sup>  | 0,91 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> |
| 12 | M7             | Colchicine     | 54,73 $\pm$ 1,08 <sup>b-d</sup> | 38,24 $\pm$ 1,00 <sup>c</sup> | 209,93 $\pm$ 6,28 <sup>f</sup>   | 0,88 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> |
| 13 | M8             | Colchicine     | 56,87 $\pm$ 0,82 <sup>ab</sup>  | 39,79 $\pm$ 1,21 <sup>c</sup> | 213,93 $\pm$ 6,86 <sup>d-f</sup> | 0,90 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> |
| 14 | M16            | Colchicine     | 56,93 $\pm$ 0,95 <sup>ab</sup>  | 41,47 $\pm$ 1,80 <sup>c</sup> | 212,47 $\pm$ 7,09 <sup>ef</sup>  | 0,93 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> |
| 15 | M17            | Colchicine     | 57,87 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>   | 43,08 $\pm$ 1,65 <sup>c</sup> | 219,13 $\pm$ 8,71 <sup>b-f</sup> | 0,96 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> |
| 16 | HX1            | DMS            | 18,67 $\pm$ 0,29 <sup>f</sup>   | 57,15 $\pm$ 2,64 <sup>b</sup> | 240,47 $\pm$ 9,45 <sup>ab</sup>  | 0,39 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 17 | HX7            | DMS            | 19,13 $\pm$ 0,19 <sup>f</sup>   | 57,75 $\pm$ 2,82 <sup>b</sup> | 239,13 $\pm$ 9,77 <sup>a-c</sup> | 0,37 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 18 | HX8            | DMS            | 18,53 $\pm$ 0,31 <sup>f</sup>   | 57,22 $\pm$ 2,94 <sup>b</sup> | 241,87 $\pm$ 9,20 <sup>ab</sup>  | 0,35 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 19 | HX9            | DMS            | 18,93 $\pm$ 0,23 <sup>f</sup>   | 57,21 $\pm$ 2,94 <sup>b</sup> | 245,27 $\pm$ 8,32 <sup>a</sup>   | 0,36 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 20 | HX10           | DMS            | 18,60 $\pm$ 0,29 <sup>f</sup>   | 56,22 $\pm$ 2,40 <sup>b</sup> | 242,07 $\pm$ 7,49 <sup>ab</sup>  | 0,38 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 21 | M3             | DMS            | 18,87 $\pm$ 0,24 <sup>f</sup>   | 57,02 $\pm$ 2,74 <sup>b</sup> | 238,87 $\pm$ 5,15 <sup>a-c</sup> | 0,35 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 22 | M9             | DMS            | 19,33 $\pm$ 0,13 <sup>f</sup>   | 58,35 $\pm$ 2,91 <sup>b</sup> | 247,13 $\pm$ 10,16 <sup>a</sup>  | 0,43 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 23 | M10            | DMS            | 18,27 $\pm$ 0,38 <sup>f</sup>   | 56,35 $\pm$ 2,73 <sup>b</sup> | 241,53 $\pm$ 4,52 <sup>ab</sup>  | 0,39 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup> |
| 24 | M11            | DMS            | 18,47 $\pm$ 0,38 <sup>f</sup>   | 56,70 $\pm$ 2,61 <sup>b</sup> | 242,47 $\pm$ 4,29 <sup>ab</sup>  | 0,36 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup> |
| 25 | M12            | DMS            | 18,33 $\pm$ 0,41 <sup>f</sup>   | 56,80 $\pm$ 2,57 <sup>b</sup> | 236,60 $\pm$ 5,10 <sup>a-e</sup> | 0,38 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup> |
| 26 | M13            | DMS            | 19,07 $\pm$ 0,48 <sup>f</sup>   | 57,24 $\pm$ 2,48 <sup>b</sup> | 241,33 $\pm$ 4,07 <sup>ab</sup>  | 0,37 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> |
| 27 | M14            | DMS            | 18,87 $\pm$ 0,51 <sup>f</sup>   | 56,06 $\pm$ 2,58 <sup>b</sup> | 238,87 $\pm$ 3,94 <sup>a-c</sup> | 0,39 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup> |
| 28 | M15            | DMS            | 18,93 $\pm$ 0,46 <sup>f</sup>   | 56,57 $\pm$ 2,36 <sup>b</sup> | 237,33 $\pm$ 3,86 <sup>a-d</sup> | 0,39 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup> |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a, b, c... trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

**Bảng P12-3.13.** Một số đặc điểm khuẩn lạc và đặc tính hoá sinh của các chủng vi khuẩn phân lập sau 72 giờ nuôi cấy.

| Kí hiệu<br>chủng | Đặc điểm khuẩn lạc |                 |                  | Đặc tính hoá sinh                          |                     |                                   |                         |                                   |                                  |
|------------------|--------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                  | Màu sắc            | Mép             | Bề mặt           | Phân giải lân                              |                     |                                   | Sinh<br>NH <sub>3</sub> | Ø khuẩn lạc trên<br>MT Ashby (mm) | Hàm lượng IAA<br>sinh ra (µg/ml) |
|                  |                    |                 |                  | Ø vòng sáng phân giải<br>và khuẩn lạc (mm) | Ø khuẩn<br>lạc (mm) | Ø vòng sáng phân<br>giải lân (mm) |                         |                                   |                                  |
| L1               | Vàng               | Lượn sóng       | Trơn bóng        | 15                                         | 11                  | 4                                 | +                       | 2                                 | 0,00                             |
| L2               | Trắng đục          | Lượn sóng       | Trơn bóng        | 13                                         | 10                  | 3                                 | -                       | -                                 | 0,00                             |
| L3               | Trắng sữa          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 16                                         | 8                   | 8                                 | +                       | 11                                | 0,00                             |
| <b>L4</b>        | <b>Trắng sữa</b>   | <b>Tròn đều</b> | <b>Khô ráp</b>   | <b>20</b>                                  | <b>5</b>            | <b>15</b>                         | <b>+++</b>              | <b>16</b>                         | <b>34,10</b>                     |
| L5               | Trắng sữa          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 14                                         | 7                   | 7                                 | +                       | 6                                 | 0,00                             |
| <b>L6</b>        | <b>Trắng trong</b> | <b>Tròn đều</b> | <b>Trơn nhầy</b> | <b>19</b>                                  | <b>6</b>            | <b>13</b>                         | <b>+++</b>              | <b>16</b>                         | <b>38,44</b>                     |
| L7               | Vàng nhạt          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 16                                         | 5                   | 11                                | +++                     | -                                 | 11,68                            |
| L8               | Trắng sữa          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 17                                         | 8                   | 9                                 | ++                      | 7                                 | 0,00                             |
| L9               | Trắng sữa          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 17                                         | 6                   | 11                                | +                       | 10                                | 13,19                            |
| C1               | Trắng trong        | Lượn sóng       | Khô ráp          | 5                                          | 5                   | 0                                 | -                       | -                                 | 0,00                             |
| C2               | Vàng               | Lượn sóng       | Trơn nhầy        | 4                                          | 4                   | 0                                 | +                       | 5                                 | 6,58                             |
| C3               | Trắng đục          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 7                                          | 5                   | 2                                 | +                       | 9                                 | 26,83                            |
| <b>C4</b>        | <b>Trắng trong</b> | <b>Tròn đều</b> | <b>Trơn nhầy</b> | <b>21</b>                                  | <b>6</b>            | <b>15</b>                         | <b>+++</b>              | <b>15</b>                         | <b>41,47</b>                     |
| C5               | Trắng đục          | Lượn sóng       | Khô ráp          | 10                                         | 10                  | 0                                 | -                       | -                                 | 16,22                            |
| C6               | Trắng trong        | Lượn sóng       | Trơn nhầy        | 6                                          | 6                   | 0                                 | ++                      | -                                 | 0,00                             |
| C7               | Vàng nhạt          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 3                                          | 3                   | 0                                 | -                       | -                                 | 11,73                            |
| C8               | Trắng đục          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 7                                          | 7                   | 0                                 | -                       | 6                                 | 7,33                             |
| C9               | Trắng sữa          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 16                                         | 10                  | 6                                 | +                       | -                                 | 36,98                            |
| C10              | Vàng nhạt          | Tròn đều        | Khô ráp          | 2                                          | 2                   | 0                                 | +                       | 8                                 | 0,00                             |
| C11              | Vàng               | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 15                                         | 6                   | 9                                 | +++                     | 4                                 | 0,00                             |
| C12              | Trắng trong        | Tròn đều        | Trơn bóng        | 6                                          | 6                   | 0                                 | -                       | -                                 | 7,13                             |
| C13              | Trắng sữa          | Lượn sóng       | Trơn bóng        | 4                                          | 4                   | 0                                 | -                       | 4                                 | 0,00                             |
| C14              | Trắng sữa          | Lượn sóng       | Khô ráp          | 5                                          | 5                   | 0                                 | -                       | -                                 | 17,48                            |
| C15              | Trắng sữa          | Lượn sóng       | Trơn nhầy        | 8                                          | 4                   | 4                                 | -                       | 6                                 | 0,00                             |
| C16              | Trắng đục          | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 10                                         | 6                   | 4                                 | +                       | 6                                 | 4,61                             |
| C17              | Trắng trong        | Tròn đều        | Trơn bóng        | 4                                          | 4                   | 0                                 | -                       | -                                 | 0,00                             |
| N1               | Trắng trong        | Tròn đều        | Trơn bóng        | 5                                          | 2                   | 3                                 | -                       | 3                                 | 22,89                            |
| N2               | Trắng trong        | Tròn đều        | Trơn nhầy        | 5                                          | 3                   | 2                                 | +                       | 8                                 | 0,00                             |
| X1               | Cam                | Lượn sóng       | Trơn nhầy        | 5                                          | 5                   | 0                                 | -                       | 2                                 | 0,00                             |
| X2               | Trắng hồng         | Lượn sóng       | Trơn bóng        | 18                                         | 7                   | 11                                | +++                     | 13                                | 0,00                             |

Chú thích: +: có hoạt tính; ++: hoạt tính tốt; +++: hoạt tính rất tốt

-: không có hoạt tính; Ø: đường kính



TTTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAATAGGAAAATCCGTCGAATTTTT  
AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAGCCATTTTACTTCCTCGCTCT  
TTATTTATCCTCATCCTCTTTCTTTTTTTTTTTCATCAGTGGCTCAGTTTAAACAAAATGA  
AATATTTTCTCATTTTCATTCACTCTGTTCTTTCACAA

| National Library of Medicine              |                                                                                                             |             |                       |             |          |          |            | Log in |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|----------|----------|------------|--------|
| Rows selection                            |                                                                                                             |             |                       |             |          |          |            | X      |
| Anchor row Query_3292627 cannot be hidden |                                                                                                             |             |                       |             |          |          |            |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Name                                                                                                        | Sequence ID | Organism              | Country     | Identity | Coverage | Mismatches |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium anousmum voucher UGDA.0073096 rRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic ...   | OR829221.1  | Dendrobium anousmum   |             | 99.89    | 100      | 0          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium devonianum chloroplast, complete genome                                                          | OR231924.1  | Dendrobium devonianum | China       | 99.89    | 100      | 0          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium primulinum mitochondrial DNA, scaffold23                                                         | LC660021.1  | Dendrobium primulinum | China       | 99.22    | 99.89    | 1          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium loddigesii trnL gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequence; chloroplast              | EF397927.1  | Dendrobium loddigesii |             | 97.79    | 100      | 5          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium primulinum chloroplast DNA, complete genome                                                      | NC_035321.1 | Dendrobium primulinum |             | 97.69    | 99.89    | 0          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium polyanthum voucher UGDA.0073073 rRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic ... | OR829225.1  | Dendrobium polyanthum |             | 97.47    | 99.78    | 4          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium aphyllum trnL gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequence; chloroplast                | EF397910.1  | Dendrobium aphyllum   |             | 97.26    | 100      | 4          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium aphyllum trnL-trnF intergenic spacer region, partial sequence; chloroplast                       | PQ014470.1  | Dendrobium aphyllum   | Indonesi... | 97.15    | 99.89    | 4          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium loddigesii chloroplast DNA, complete genome                                                      | NC_036355.1 | Dendrobium loddigesii |             | 96.42    | 99.89    | 1          |        |
| <input checked="" type="checkbox"/>       | Dendrobium parishii chloroplast DNA, complete genome                                                        | NC_035339.1 | Dendrobium parishii   |             | 96.42    | 100      | 3          |        |

### 3. Trình tự vùng gen matK

TATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAAATCTT  
GGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCTTCTTTGCATTTATTGCGATTGTTT  
TTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCTTTACTTCAAAGAAATCCATTTACGTATTTT  
CAAAAAGAAAGAAAAGAGATTCTTTTGTTTCCTACATAATTCTTATGTATATGAATGCGAATA  
TCTATTCTGTTTCTTCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTT  
CTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAATATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATTCTT  
TTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAAGGATACTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAA  
AGCAATTCTGGCTTCAAAGGAACCTCTTATTCTGATGAAAAAATGGGAATTTTCATCTTGTG  
AATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAAGCAAT  
TACCCAACTATTCCTTCTCTTTTCTGGGGTTCTTTTCAAGTGTACTGAAAAATCCTTTGGT  
AGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATACTCTATCTAAGAAATTAGAT  
ACCATAGCCCCAGTTATTTCTCTTATTGGATCATTGTGCGAAAGCTCAATTTTGTACTGTAT  
TGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATGTGGACTGATTTATCGGATTCTGATATTCTTGATCG  
ATTTTGTGCGATATGCAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATCCTCAAAGAAAC

| Rows selection                           |                                                                                            |             |                          |            |             |            |          |          |            | X |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|------------|-------------|------------|----------|----------|------------|---|
| Anchor row Query_777372 cannot be hidden |                                                                                            |             |                          |            |             |            |          |          |            |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Name                                                                                       | Sequence ID | Organism                 | Date       | Country     | Source     | Identity | Coverage | Mismatches |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium parishii chloroplast DNA, complete genome                                       | NC_035339.1 | Dendrobium parishii      |            |             |            | 100      | 100      | 0          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium parishii voucher KFB02616 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid          | KY968660.1  | Dendrobium parishii      |            |             |            | 100      | 100      | 0          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium parishii isolate H923 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast          | MX807431.1  | Dendrobium parishii      | 22-Feb-2   | India       | forest     | 100      | 99.76    | 0          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium parishii chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, isolate: W16        | AB972316.1  | Dendrobium parishii      |            | Thailand    |            | 100      | 99.76    | 0          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium anousmum chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, isolate: W16        | AB972311.1  | Dendrobium anousmum      |            | Thailand    |            | 100      | 99.76    | 0          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium primulinum isolate M93 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast         | MX803116.1  | Dendrobium primulinum    | 13-Feb-2   | India       | forest     | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium devonianum chloroplast, complete genome                                         | OR231924.1  | Dendrobium devonianum    |            | China       |            | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium primulinum voucher 3m KH 10793 rRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence           | KF143706.1  | Dendrobium primulinum    |            |             |            | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium bannaense voucher Z.3.14 7819 rRNA-Lys (trnK) gene, intron; and matura...       | KY062488.1  | Dendrobium bannaense     |            |             |            | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium aff. anousmum TBG 159409 chloroplast matK gene for maturase K, partial c...     | AB847085.1  | Dendrobium aff. anousmum |            |             |            | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium parishii chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, bio_material: TB... | AB847634.1  | Dendrobium parishii      |            |             |            | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium primulinum strain B24 maturase K (matK) pseudogene and rRNA-Lys (trnK)...       | F7794064.1  | Dendrobium primulinum    |            | China: Y... |            | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium anousmum voucher KFB027888 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid         | KY968667.1  | Dendrobium anousmum      |            |             |            | 99.88    | 100      | 1          |   |
| <input checked="" type="checkbox"/>      | Dendrobium ituriflorum isolate vmt16 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast      | MG490222.1  | Dendrobium ituriflorum   | 31-Aug-... | Viet Nam    | open field | 99.88    | 99.76    | 1          |   |

#### 4. Trình tự vùng gen rbcL

AAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAAGATAC  
TGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTTCCGCCTGAAGAAGCGGGG  
GCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGTGGACTGATGGACTTA  
CCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAA  
TCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAAC  
ATGTTTACTTCCATTGTGGGTAAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCTGG  
AAGATCTGCGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACCTTCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCA  
AGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCA  
AAATTGGGATTATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGCGGTGGAC  
TTGGATTTTAC

## II. Trình tự nucleotide của vùng 16s trên 3 chủng vi khuẩn nội sinh ở cây lan rừng

### 1. Chủng L6

CACAAATGCGCGGAGACTGATCATGCAGTCGAGCGGAGTGTGAATGCGGAGCTTGCTCTTA  
TGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC  
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG  
CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG  
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG  
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAA  
GAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG  
TAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGG  
GTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA  
CACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAG  
CACTCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACA  
TCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCGTCTTTCGGGAGCAGAGTGACAGTGATGCATG  
GATTGTCGGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGATTAAGGTCCCGGCAACGAGCGCAACC  
CCTTTGATCGTAGTTGCCATTCAATAGTCGGTCACTCTAAGCTGACTTGCGGTTGACAACC  
TGTAAGGAACGATGGAGATGA

### 2. Chủng L4

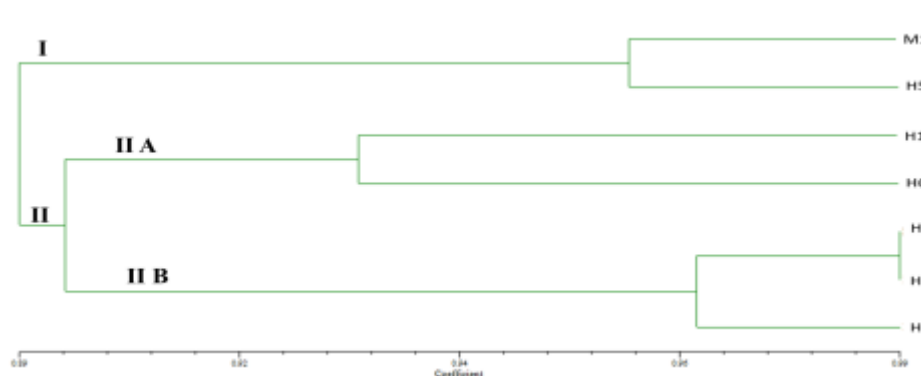
TCCCCAGTGGAGGCGCAGACTGCCATGCAGTCGAACGGCAGTCACCGCGGTGCTTGACCT  
GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCC  
CGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCC  
TCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG

CGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAAT  
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTG  
GCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG  
CAGGCGGTTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTGGTGA  
CTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAG  
AGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCAC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAA  
CTAGTTGTTGGGGATTTCATTTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGG  
GGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAT  
GATGTGGATTAATTTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATC  
CTGCTGAAGAAGCGGGAGTGCTCGAAAGAAGAACCGGCGCACAGTGCTGCATGGCTGTCGT  
CAGCTCGTGTTCGGTGGAAGAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCGTGTTTCGTA  
GTGCTACGCAGAGCCACTCTAGAGACTGGCGTTGACAAATCGCAGAATGGTGGGGAATGAC  
GGTCAAGTTCCTCAATG

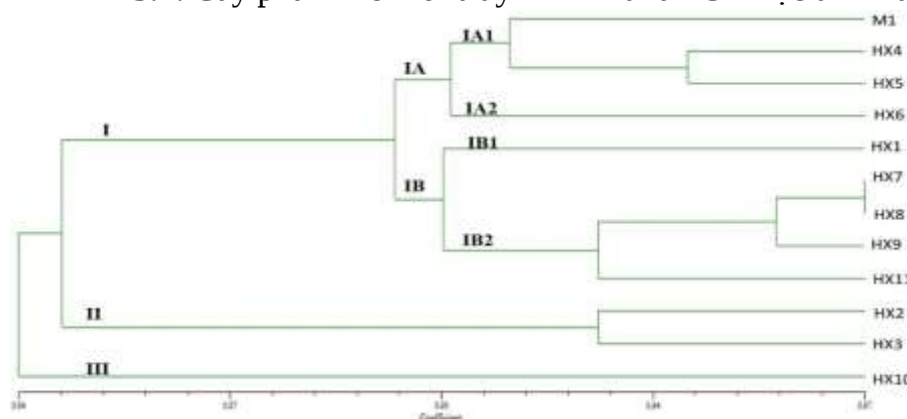
### 3. Chủng C4

GCTAACTTTGGATCGCAGACTGCACATGCAGTCGAACGGCAGCACCGGAGAGCTTGCTCTC  
TGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTGTCGTGGGGGATAA  
CGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACG  
GGTGAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAG  
TTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  
ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA  
ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGC  
CCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAATCGGTTAATACCCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGA  
ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTC  
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGATTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGG  
CTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCCTAGAAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATT  
CCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACC  
TGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  
TAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAACTTGGCACGCAGTATCGAA  
GCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT  
ACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGGATTGGTTGCCTTCGGAACCCGTG  
AGACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTTGTCGTGAGATTGTTGGGTTTAAGTCCCGC  
AACGAGCGCATCCTTGTCCGTAGTTGCCAGCACGGTATGGTGGAC  
TCTAAGGAACGCAGTGACAACCGGAGGAAGGGTGGGGGAT

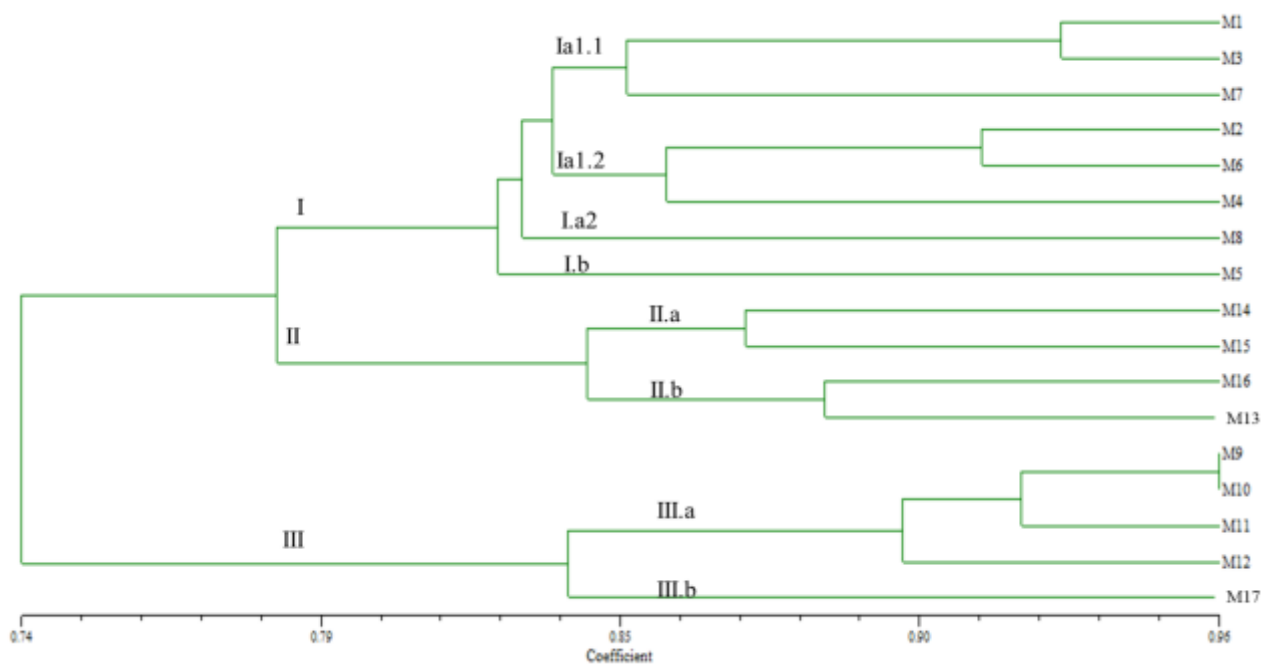
## PHỤ LỤC 14: MỘT SỐ CÂY DI TRUYỀN TRONG NGHIÊN CỨU



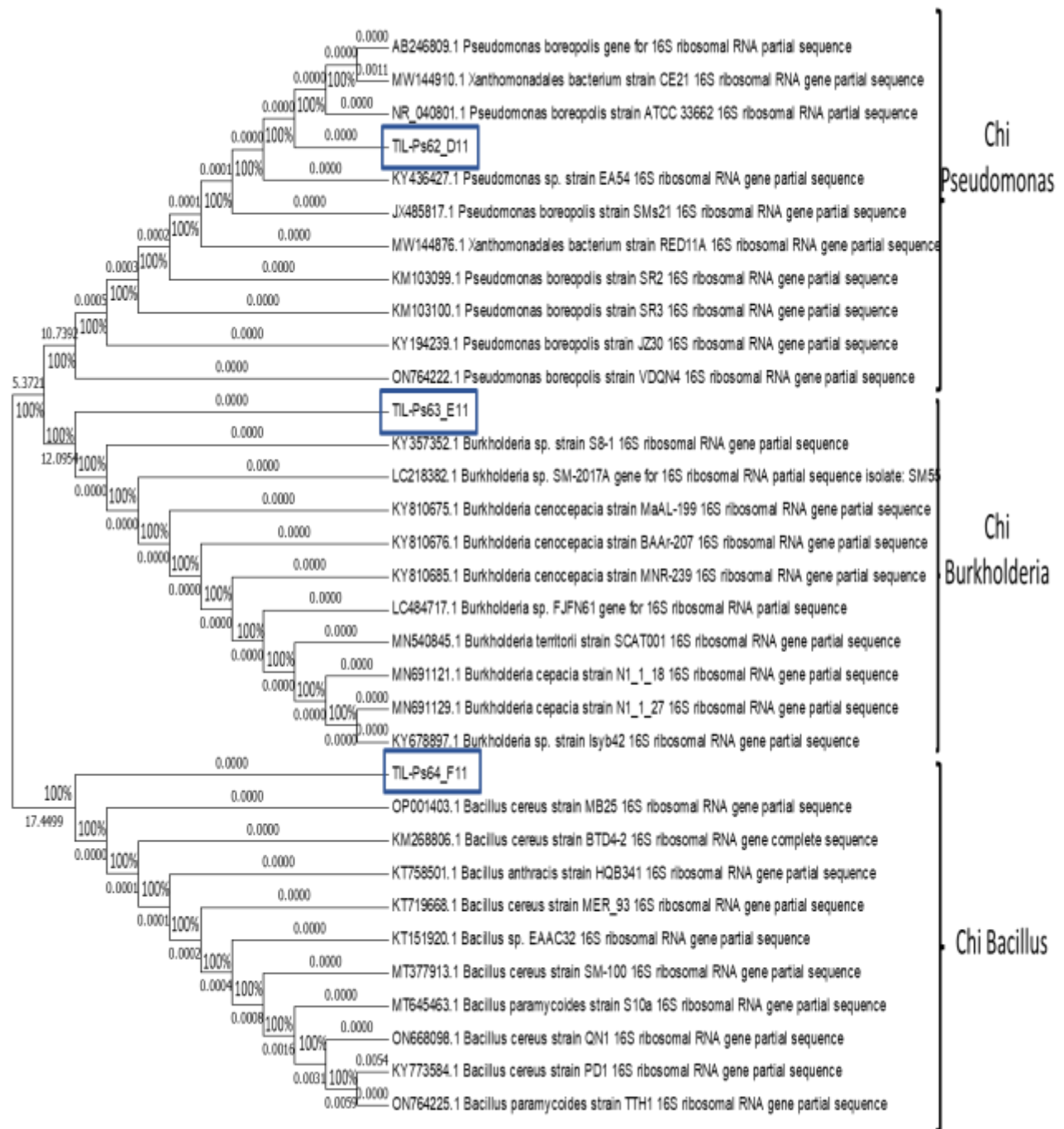
**Hình P14-3.1.** Cây phân nhóm di truyền 7 mẫu lan Giả hạc tím Huế



**Hình P14-3.2.** Cây phân nhóm di truyền 12 mẫu lan Giả hạc tím Huế tạo ra từ hạt có xử lý hoá chất đột biến.



**Hình P14-3.3.** Sơ đồ cây phân nhóm thể hiện mối tương quan di truyền giữa 17 mẫu lan Giả hạc tím Huế tạo ra từ mô sẹo có xử lý đột biến được phân tích theo phương pháp UPGMA.



**Hình P14-3.4:** Cây phân loại của các chủng thuộc chi *Burkholderia*.; chi *Bacillus*.; chi *Pseudomonas* và 3 chủng thuộc 3 chi này theo thứ tự L4 được kí hiệu TIL-Ps63\_E11; L6 được kí hiệu TIL-Ps64\_F11; Chủng C4 được kí hiệu TIL-Ps62\_D11

## PHỤ LỤC 15: SO SÁNH TRÌNH TỰ NU CỦA CÁC VÙNG GEN

### 1. Vùng gen ITS4-5

|                                                             |     |     |     |     |    |                                                        |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|----|--------------------------------------------------------|
| 1                                                           | 10  | 20  | 30  | 40  | 50 |                                                        |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    |                                                        |
| CATCCTGGGGTCGCATTCAAAGCGCCATCCATGGATCAGCGCATGATTTG          |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> voucher GHTH                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium aff. anosmum</i> TBG 159409 (AB593490.1) |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743544.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KJ944630.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium bannaense</i> (KY062487.1)               |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (AB593630.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (KJ944629.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (AB593499.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium sp.</i> (OP592176.1)                     |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (MZ540354.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743542.1)                 |
| 60                                                          | 70  | 80  | 90  | 100 |    |                                                        |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    |                                                        |
| GGATCACCTCAATGGTGTGATCATCTTCTTAGGCATGCACGACACAATAGC         |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> voucher GHTH                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium aff. anosmum</i> TBG 159409 (AB593490.1) |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743544.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KJ944630.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium bannaense</i> (KY062487.1)               |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (AB593630.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (KJ944629.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (AB593499.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium sp.</i> (OP592176.1)                     |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (MZ540354.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743542.1)                 |
| 110                                                         | 120 | 130 | 140 | 150 |    |                                                        |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    |                                                        |
| ATAGGCCCTCATTTAATCCACCCCTTATTGTTTCGAGCCAACAGACGAT           |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> voucher GHTH                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium aff. anosmum</i> TBG 159409 (AB593490.1) |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743544.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KJ944630.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium bannaense</i> (KY062487.1)               |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (AB593630.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (KJ944629.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (AB593499.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium sp.</i> (OP592176.1)                     |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (MZ540354.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743542.1)                 |
| 160                                                         | 170 | 180 | 190 | 200 |    |                                                        |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    |                                                        |
| GATCCGCTCTTCAGCCCCCGCGCCGAGGGGCACGACGAGCCACCATGCA           |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> voucher GHTH                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium aff. anosmum</i> TBG 159409 (AB593490.1) |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743544.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KJ944630.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium bannaense</i> (KY062487.1)               |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (AB593630.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (KJ944629.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (AB593499.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium sp.</i> (OP592176.1)                     |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (MZ540354.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743542.1)                 |
| 210                                                         | 220 | 230 | 240 | 250 |    |                                                        |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    |                                                        |
| CATCCGAGCCCTCGCCAGCACATCCATCGATGGGTGGCTAGGCACGAAGC          |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> voucher GHTH                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium aff. anosmum</i> TBG 159409 (AB593490.1) |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KP743544.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium anosmum</i> (KJ944630.1)                 |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium bannaense</i> (KY062487.1)               |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (AB593630.1)                |
| ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |    | <i>Dendrobium parishii</i> (KJ944629.1)                |

..... Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
..... Dendrobium sp. (OP592176.1)  
..... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

260 270 280 290 300  
.....|.....|.....|.....|.....|  
GACCAAAATGCCTGACGCCAGGCGGACGTGCCCTTGGCCGATTGGCCTCG Dendrobium anosmum voucher GHTH  
..... Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
..... Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
..... Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
..... Dendrobium parishii (AB593630.1)  
..... Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
..... Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
..... Dendrobium sp. (OP592176.1)  
..... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

310 320 330 340 350  
.....|.....|.....|.....|.....|  
GGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCCGCGGATTCTGCAATTCTG Dendrobium anosmum voucher GHTH  
..... Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
..... Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
..... Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
..... Dendrobium parishii (AB593630.1)  
..... Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
..... Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
..... Dendrobium sp. (OP592176.1)  
..... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

360 370 380 390 400  
.....|.....|.....|.....|.....|  
CACCATATATCGCATTTTCGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGAT Dendrobium anosmum voucher GHTH  
..... Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
..... Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
..... Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
..... Dendrobium parishii (AB593630.1)  
..... Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
..... C..... Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
..... C..... Dendrobium sp. (OP592176.1)  
..... C..... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
..... C..... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

410 420 430 440 450  
.....|.....|.....|.....|.....|  
ATCCATTGCCGAGAGTCGTGTCAATCCATATGGCATGCAACAGCAACCCA Dendrobium anosmum voucher GHTH  
..... Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
..... Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
..... T..... Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
..... T..... Dendrobium parishii (AB593630.1)  
..... T..... Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
..... A..... Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
..... A..... Dendrobium sp. (OP592176.1)  
..... A..... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
..... A..... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

460 470 480 490 500  
.....|.....|.....|.....|.....|  
TTCCACAAATCCATTTAAGGGCTTGTGCTACGATATTTCTTGGCGCGAC Dendrobium anosmum voucher GHTH  
..... Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
..... Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
..... Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
..... Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
..... Dendrobium parishii (AB593630.1)  
..... Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
..... T..... Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
..... T..... Dendrobium sp. (OP592176.1)  
..... T..... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
..... T..... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

510 520 530 540 550  
 .....|.....|.....|.....|.....|  
 GCTGCGCGATTGGGGTTCATCCATCCTTCATCACGTCCACACCCCGA Dendrobium anosmum voucher GHTH  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (AB593630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium sp. (OP592176.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743542.1)

560 570 580 590 600  
 .....|.....|.....|.....|.....|  
 AGAGGGGATGAGGCGAAGATTGGGATGAATTTTATCTCGGAAGCTATAGC Dendrobium anosmum voucher GHTH  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (AB593630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium sp. (OP592176.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743542.1)

610 620 630 640 650  
 .....|.....|.....|.....|.....|  
 CACCGATTATTTTGACGGGTCTCAAGATCACTCAATGTATTTTAATCTC Dendrobium anosmum voucher GHTH  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (AB593630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium sp. (OP592176.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743542.1)

660 670 680 690  
 .....|.....|.....|.....|.....|  
 GACAAATGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGA Dendrobium anosmum voucher GHTH  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743544.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KJ944630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium bannaense (KY062487.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (AB593630.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (KJ944629.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (AB593499.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium sp. (OP592176.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (MZ540354.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (KP743542.1)

## 2. Vùng gen matK

1 10 20 30 40 50 60  
 .....|.....|.....|.....|.....|  
 TATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAAATCT Dendrobium anosmum voucher GHT  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (NC\_035339)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (KY966860.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (AB972316.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (AB972311.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium devonianum (OR23192)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (MK607431.1)

70 80 90 100 110 120  
 .....|.....|.....|.....|.....|  
 TGGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAGATGTTCCCTCTTTGCAATTATTGCGATTGT Dendrobium anosmum voucher GHT  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (NC\_035339)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (KY966860.1)  
 .....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (AB972316.1)

```

..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

130      140      150      160      170      180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTCCACGAATATCATAATTGAAAGTCTCTTACTTCAAGAAATCCATTACGTAT Dendrobium anosmum voucher GHT
..... Dendrobium parishii (NC_035339)
..... Dendrobium parishii (KY966860.)
..... Dendrobium parishii (AB972316.)
..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

190      200      210      220      230      240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTCAAAAAGAAAGAAAAGATTCTTTTGTTCCTACATAATTCTTATGTATATGAATGCG Dendrobium anosmum voucher GHT
..... Dendrobium parishii (NC_035339)
..... Dendrobium parishii (KY966860.)
..... Dendrobium parishii (AB972316.)
..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

250      260      270      280      290      300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATATCTATTCTGTTTCTTCGTAAACAGTCTTCTTATTACGATCAATATCTCTGGAG Dendrobium anosmum voucher GHT
..... Dendrobium parishii (NC_035339)
..... Dendrobium parishii (KY966860.)
..... Dendrobium parishii (AB972316.)
..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

310      320      330      340      350      360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAATATCTTATAGTCGTGTGTTGA Dendrobium anosmum voucher GHT
..... Dendrobium parishii (NC_035339)
..... Dendrobium parishii (KY966860.)
..... Dendrobium parishii (AB972316.)
..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

370      380      390      400      410      420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTCTTTTCAGAGGATCCATGGTTCCTCAAGGATACTTTCATACATTATGTTTCGATATC Dendrobium anosmum voucher GHT
..... Dendrobium parishii (NC_035339)
..... Dendrobium parishii (KY966860.)
..... Dendrobium parishii (AB972316.)
..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

430      440      450      460      470      480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAGGAAAAGCAATTCCTGGCTTCAAAAGGAACCTTATTCTGATGAAAAAATGGGAATTC Dendrobium anosmum voucher GHT
..... Dendrobium parishii (NC_035339)
..... Dendrobium parishii (KY966860.)
..... Dendrobium parishii (AB972316.)
..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

490      500      510
.....|.....|.....|.....|.....|.....
ATCTTGTAATTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGG Dendrobium anosmum voucher GHT
..... Dendrobium parishii (NC_035339)
..... Dendrobium parishii (KY966860.)
..... Dendrobium parishii (AB972316.)
..... Dendrobium anosmum (AB972311.1)
..... Dendrobium devonianum (OR23192)
..... Dendrobium parishii (MK607431).

```

### 3. Vùng gen trnL

```

1      10      20      30      40      50      60
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TTCAGAGAAACCTGGAACTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTTTGTGAGAGA Dendrobium anosmum voucher GHT
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium anosmum (OP829221.1
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium devonianum (OR23192
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (LC66002
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium loddigesii (EF39792
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (NC_0353
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium polyanthum (OP82922
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (EF397910.
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (|LC6353
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (LC49037
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium loddigesii (NC_0363
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium parishii (NC_035339
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (EF39792
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium ochreatum (OP829224
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (LC660280.
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (NC_035322
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (LC490669.
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium anosmum (PQ014469.1
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium porphyrochilum (PP4
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium gratiosissimum (PP4

70      80      90      100     110     120
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AAAAATGATGGAAATGAGAATAAAAGGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTTC Dendrobium anosmum voucher GHT
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium anosmum (OP829221.1
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium devonianum (OR23192
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (LC66002
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium loddigesii (EF39792
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (NC_0353
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium polyanthum (OP82922
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (EF397910.
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (|LC6353
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (LC49037
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium loddigesii (NC_0363
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium parishii (NC_035339
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (EF39792
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium ochreatum (OP829224
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (LC660280.
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (NC_035322
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (LC490669.
----- Dendrobium anosmum (PQ014469.1
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium porphyrochilum (PP4
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium gratiosissimum (PP4

130     140     150     160     170     180
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TAACGAATGAAATGACTACGTTACGTTAGTAGCTAAAAACCTTCTATCGAAATGACAGA Dendrobium anosmum voucher GHT
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium anosmum (OP829221.1
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium devonianum (OR23192
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (LC66002
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium loddigesii (EF39792
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (NC_0353
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium polyanthum (OP82922
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (EF397910.
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (|LC6353
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (LC49037
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium loddigesii (NC_0363
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium parishii (NC_035339
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium primulinum (EF39792
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium ochreatum (OP829224
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...| Dendrobium aphyllum (LC660280.

```

..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322)  
..... Dendrobium aphyllum (LC490669)  
..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1)  
..... Dendrobium porphyrochilum (PP4)  
..... Dendrobium gratiosissimum (PP4)

190 200 210 220 230 240  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
AAGGATAACCTTATATGCGCCTAATACGTACGTATACATACTGACATAGCAAACGATTAA Dendrobium anosmum voucher GHT  
..... Dendrobium anosmum (OP829221.1)  
..... Dendrobium devonianum (OR23192)  
..... Dendrobium primulinum (LC66002)  
..... Dendrobium loddigesii (EF39792)  
..... Dendrobium primulinum (NC\_0353)  
..... Dendrobium polyanthum (OP82922)  
..... Dendrobium aphyllum (EF397910)  
..... Dendrobium primulinum (LC6353)  
..... Dendrobium primulinum (LC49037)  
..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363)  
..... Dendrobium parishii (NC\_035339)  
..... Dendrobium primulinum (EF39792)  
..... Dendrobium ochreatum (OP829224)  
..... Dendrobium aphyllum (LC660280)  
..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322)  
..... Dendrobium aphyllum (LC490669)  
..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1)  
..... Dendrobium porphyrochilum (PP4)  
..... Dendrobium gratiosissimum (PP4)

250 260 270 280 290 300  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
TCACAACCCAAATCTGATATTGAATTCTATTCTGTATCTCTCTATATGAAAAATATGAAA Dendrobium anosmum voucher GHT  
..... Dendrobium anosmum (OP829221.1)  
..... Dendrobium devonianum (OR23192)  
..... Dendrobium primulinum (LC66002)  
..... Dendrobium loddigesii (EF39792)  
..... Dendrobium primulinum (NC\_0353)  
..... Dendrobium polyanthum (OP82922) G  
..... Dendrobium aphyllum (EF397910) T  
..... Dendrobium primulinum (LC6353)  
..... Dendrobium primulinum (LC49037) TC  
..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363)  
..... Dendrobium parishii (NC\_035339) TCT  
..... Dendrobium primulinum (EF39792)  
..... Dendrobium ochreatum (OP829224) A  
..... Dendrobium aphyllum (LC660280) T  
..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322) T TCT  
..... Dendrobium aphyllum (LC490669) T TCT  
..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1) G  
..... Dendrobium porphyrochilum (PP4) A T AA  
..... Dendrobium gratiosissimum (PP4) A T AA

310 320 330 340 350 360  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
ATAGAAATATTCTATATAGAATATATATTCTATTATCTTAAGAATTAGATTAGAATCTA Dendrobium anosmum voucher GHT  
..... Dendrobium anosmum (OP829221.1)  
..... Dendrobium devonianum (OR23192)  
..... Dendrobium primulinum (LC66002) G  
..... Dendrobium loddigesii (EF39792) G  
..... Dendrobium primulinum (NC\_0353)  
..... Dendrobium polyanthum (OP82922) G  
..... Dendrobium aphyllum (EF397910)  
..... Dendrobium primulinum (LC6353)  
..... Dendrobium primulinum (LC49037)  
..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363)  
..... Dendrobium parishii (NC\_035339)  
..... Dendrobium primulinum (EF39792)  
..... Dendrobium ochreatum (OP829224) C A A  
..... Dendrobium aphyllum (LC660280) T T A A T  
..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322)  
..... Dendrobium aphyllum (LC490669) G  
..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1)  
..... Dendrobium porphyrochilum (PP4) G A A T A  
..... Dendrobium gratiosissimum (PP4) G A A T

```

      370      380      390      400      410      420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATATTTCTTCATTCTATTATTCTAATTATTCTAGAACTCTAATAATTCTATGATTTTCTA Dendrobium anosmum voucher GHT
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (OP829221.1
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium devonianum (OR23192
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (LC66002
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium loddigesii (EF39792
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (NC_0353
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium polyanthum (OP82922
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (EF397910.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (|LC6353
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (LC49037
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium loddigesii (NC_0363
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (NC_035339
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (EF39792
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium ochreatum (OP829224
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (LC660280.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (NC_035322
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (LC490669.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (PQ014469.1
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium porphyrochilum (PP4
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium gratiosissimum (PP4

      430      440      450      460      470      480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATTCCTTCTTCTTATTATTTACTCTTAATATGAGATAGTATGAGATAGGACCT Dendrobium anosmum voucher GHT
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (OP829221.1
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium devonianum (OR23192
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (LC66002
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium loddigesii (EF39792
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (NC_0353
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium polyanthum (OP82922
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (EF397910.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (|LC6353
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (LC49037
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium loddigesii (NC_0363
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (NC_035339
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (EF39792
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium ochreatum (OP829224
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (LC660280.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (NC_035322
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (LC490669.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (PQ014469.1
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium porphyrochilum (PP4
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium gratiosissimum (PP4

      490      500      510      520      530      540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATAGAAACCCCTCTATTAAATTAGAAATCATAGAGATCAAAAAATCTATGAAAAATTGAAGAG Dendrobium anosmum voucher GHT
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (OP829221.1
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium devonianum (OR23192
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (LC66002
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium loddigesii (EF39792
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (NC_0353
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium polyanthum (OP82922
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (EF397910.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (|LC6353
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (LC49037
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium loddigesii (NC_0363
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium parishii (NC_035339
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium primulinum (EF39792
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium ochreatum (OP829224
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (LC660280.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (NC_035322
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium aphyllum (LC490669.
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (PQ014469.1
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium porphyrochilum (PP4
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium gratiosissimum (PP4

      550      560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTATTGTGAATCAATTCCAATTGAAGTTGAAAAAGAAATCGAATTCGAATATTTCAGTGAT Dendrobium anosmum voucher GHT
.....|.....|.....|.....|.....|.....| Dendrobium anosmum (OP829221.1

```

..... Dendrobium devonianum (OR23192)  
 ..... Dendrobium primulinum (LC66002)  
 ..... G.....A..... Dendrobium loddigesii (EF39792)  
 ..... Dendrobium primulinum (NC\_0353)  
 ..... T..... Dendrobium polyanthum (OP82922)  
 ..... Dendrobium aphyllum (EF397910.)  
 ..... Dendrobium primulinum (|LC6353)  
 ..... Dendrobium primulinum (LC49037)  
 ..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363)  
 ..... Dendrobium parishii (NC\_035339)  
 ..... A..... Dendrobium primulinum (EF39792)  
 ..... Dendrobium ochreatum (OP829224)  
 ..... T..... Dendrobium aphyllum (LC660280.)  
 ..... T..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322)  
 ..... T..... Dendrobium aphyllum (LC490669.)  
 ..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1)  
 ..... C..... Dendrobium porphyrochilum (PP4)  
 ..... C..... Dendrobium gratiosissimum (PP4)

610 620 630 640 650 660  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 AAAATGATTTCATTCCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAGATTAAATCGGACGAGAAATAAAGA Dendrobium anosmum voucher GHT  
 ..... Dendrobium anosmum (OP829221.1)  
 ..... Dendrobium devonianum (OR23192)  
 ..... Dendrobium primulinum (LC66002)  
 ..... Dendrobium loddigesii (EF39792)  
 ..... Dendrobium primulinum (NC\_0353)  
 ..... Dendrobium polyanthum (OP82922)  
 ..... Dendrobium aphyllum (EF397910.)  
 ..... Dendrobium primulinum (|LC6353)  
 ..... Dendrobium primulinum (LC49037)  
 ..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363)  
 ..... Dendrobium parishii (NC\_035339)  
 ..... Dendrobium primulinum (EF39792)  
 ..... R..... Dendrobium ochreatum (OP829224)  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC660280.)  
 ..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322)  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC490669.)  
 ..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1)  
 ..... Dendrobium porphyrochilum (PP4)  
 ..... Dendrobium gratiosissimum (PP4)

670 680 690 700 710 720  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 GAGAGTCCCATTTTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAATAGGAAAAATC Dendrobium anosmum voucher GHT  
 ..... Dendrobium anosmum (OP829221.1)  
 ..... Dendrobium devonianum (OR23192)  
 ..... Dendrobium primulinum (LC66002)  
 ..... Dendrobium loddigesii (EF39792)  
 ..... Dendrobium primulinum (NC\_0353)  
 ..... Dendrobium polyanthum (OP82922)  
 ..... Dendrobium aphyllum (EF397910.)  
 ..... Dendrobium primulinum (|LC6353)  
 ..... Dendrobium primulinum (LC49037)  
 ..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363)  
 ..... Dendrobium parishii (NC\_035339)  
 ..... Dendrobium primulinum (EF39792)  
 ..... Dendrobium ochreatum (OP829224)  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC660280.)  
 ..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322)  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC490669.)  
 ..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1)  
 ..... Dendrobium porphyrochilum (PP4)  
 ..... Dendrobium gratiosissimum (PP4)

730 740 750 760 770 780  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 CGTCGAATTTTTAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAGCCCATTTT Dendrobium anosmum voucher GHT  
 ..... Dendrobium anosmum (OP829221.1)  
 ..... Dendrobium devonianum (OR23192)  
 ..... Dendrobium primulinum (LC66002)  
 ..... C..... Dendrobium loddigesii (EF39792)  
 ..... Dendrobium primulinum (NC\_0353)  
 ..... G..... Dendrobium polyanthum (OP82922)

..... Dendrobium aphyllum (EF397910.  
 ..... Dendrobium primulinum (|LC6353  
 ..... Dendrobium primulinum (LC49037  
 ..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363  
 ..... Dendrobium parishii (NC\_035339  
 ..... Dendrobium primulinum (EF39792  
 ..... Dendrobium ochreatum (OP829224  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC660280.  
 ..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC490669.  
 ..... G..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1  
 ..... Dendrobium porphyrochilum (PP4  
 ..... Dendrobium gratiosissimum (PP4

790 800 810 820 830 840  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ACTTCCTCGCTCTTTATTTATCCTCATCCTCTTTCTTTTTTTTTCATCAGTGGCTCAG Dendrobium anosmum voucher GHT  
 ..... Dendrobium anosmum (OP829221.1  
 ..... Dendrobium devonianum (OR23192  
 ..... Dendrobium primulinum (LC66002  
 ..... Dendrobium loddigesii (EF39792  
 ..... Dendrobium primulinum (NC\_0353  
 ..... A..... Dendrobium polyanthum (OP82922  
 ..... Dendrobium aphyllum (EF397910.  
 ..... Dendrobium primulinum (|LC6353  
 ..... Dendrobium primulinum (LC49037  
 ..... T..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363  
 ..... Dendrobium parishii (NC\_035339  
 ..... T..... Dendrobium primulinum (EF39792  
 ..... Y..... G..... Dendrobium ochreatum (OP829224  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC660280.  
 ..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC490669.  
 ..... A..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1  
 ..... Dendrobium porphyrochilum (PP4  
 ..... Dendrobium gratiosissimum (PP4

850 860 870 880 890  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TTTAAACAAATGAAATATTTCTCATTTCATTCACTCTGTTCTTTCACAA Dendrobium anosmum voucher GHT  
 ..... Dendrobium anosmum (OP829221.1  
 ..... Dendrobium devonianum (OR23192  
 ..... Dendrobium primulinum (LC66002  
 ..... T..... Dendrobium loddigesii (EF39792  
 ..... Dendrobium primulinum (NC\_0353  
 ..... Dendrobium polyanthum (OP82922  
 ..... Dendrobium aphyllum (EF397910.  
 ..... Dendrobium primulinum (|LC6353  
 ..... Dendrobium primulinum (LC49037  
 ..... Dendrobium loddigesii (NC\_0363  
 ..... Dendrobium parishii (NC\_035339  
 ..... Dendrobium primulinum (EF39792  
 ..... Dendrobium ochreatum (OP829224  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC660280.  
 ..... Dendrobium aphyllum (NC\_035322  
 ..... Dendrobium aphyllum (LC490669.  
 ..... Dendrobium anosmum (PQ014469.1  
 ..... Dendrobium porphyrochilum (PP4  
 ..... Dendrobium gratiosissimum (PP4

**PHỤ LỤC 16: KÍ HIỆU CỦA NHỮNG DÒNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐƯỢC  
LỰA CHỌN LẤY MẪU PHÂN TÍCH**

| <b>TT</b> | <b>Kí hiệu dòng</b> | <b>Dòng lan được tạo ra</b>                                        |
|-----------|---------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1         | <b>HX1</b>          | Protocorm xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong thời gian 8 giờ.          |
| 2         | <b>HX2</b>          | Protocorm xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 6 giờ.  |
| 3         | <b>HX3</b>          | Protocorm xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong thời gian 6 giờ.  |
| 4         | <b>HX4</b>          | Protocorm xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong thời gian 2 giờ.  |
| 5         | <b>HX5</b>          | Protocorm xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 4 giờ.  |
| 6         | <b>HX6</b>          | Protocorm xử lý colchicine nồng độ 200 ppm, trong thời gian 8 giờ. |
| 7         | <b>HX7</b>          | Protocorm xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong thời gian 2 giờ.         |
| 8         | <b>HX8</b>          | Protocorm xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong thời gian 2 giờ.         |
| 9         | <b>HX9</b>          | Protocorm xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 6 giờ.    |
| 10        | <b>HX10</b>         | Protocorm xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 4 giờ.    |
| 11        | <b>HX11</b>         | Protocorm xử lý colchicine nồng độ 50 ppm trong thời gian 10 giờ.  |
| 12        | <b>M1</b>           | Mẫu lan Giả hạc tím Huế không xử lý hoá chất (đối chứng).          |
| 13        | <b>M2</b>           | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong thời gian 6 giờ.     |
| 14        | <b>M3</b>           | Mô sẹo xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 2 giờ.       |
| 15        | <b>M4</b>           | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 4 giờ.     |
| 16        | <b>M5</b>           | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 8 giờ.     |
| 17        | <b>M6</b>           | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 8 giờ.     |
| 18        | <b>M7</b>           | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 400 ppm, trong thời gian 2 giờ.    |
| 19        | <b>M8</b>           | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 6 giờ.     |
| 20        | <b>M9</b>           | Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong thời gian 4 giờ.             |
| 21        | <b>M10</b>          | Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong thời gian 6 giờ.            |
| 22        | <b>M11</b>          | Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 100 ppm, trong thời gian 8 giờ.           |
| 23        | <b>M12</b>          | Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ.           |
| 24        | <b>M13</b>          | Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 200 ppm, trong thời gian 4 giờ.           |
| 25        | <b>M14</b>          | Mô sẹo xử lý DMS với nồng độ 400 ppm, trong thời gian 2 giờ.       |
| 26        | <b>M15</b>          | Mô sẹo xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 4 giờ.       |
| 27        | <b>M16</b>          | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 50 ppm trong thời gian 10 giờ.     |
| 28        | <b>M17</b>          | Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ.    |
| 29        | <b>H1</b>           | Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến                     |
| 30        | <b>H2</b>           | Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến                     |
| 31        | <b>H3</b>           | Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến                     |
| 32        | <b>H4</b>           | Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến                     |
| 33        | <b>H5</b>           | Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến                     |
| 34        | <b>H6</b>           | Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến                     |

## PHỤ LỤC 17: BẢNG HỆ SỐ TƯƠNG ĐỒNG

**Bảng hệ số tương đồng của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế thí nghiệm**

| Mẫu  | M1    | HX2   | M2    | HX1   | M6    | HX3   | M15   | M4    | M7    | M10   | M11   | M13   | M14   | M12   | M16   | HX11  | H2    | H5    | H1    | HX10  | HX4   | HX7   | HX9   | HX5   | M5    | HX8   | H3    | H4    | H9    | M9    | HX6   | M8    | M5    | M17   |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| M1   | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX2  | 0,855 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M2   | 0,870 | 0,870 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX1  | 0,812 | 0,899 | 0,768 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M6   | 0,826 | 0,826 | 0,811 | 0,841 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX3  | 0,826 | 0,913 | 0,841 | 0,870 | 0,855 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M15  | 0,768 | 0,768 | 0,783 | 0,725 | 0,768 | 0,739 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M4   | 0,812 | 0,870 | 0,855 | 0,797 | 0,928 | 0,870 | 0,812 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M7   | 0,687 | 0,696 | 0,652 | 0,739 | 0,725 | 0,638 | 0,725 | 0,681 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M10  | 0,725 | 0,812 | 0,710 | 0,768 | 0,696 | 0,725 | 0,667 | 0,681 | 0,826 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M11  | 0,739 | 0,797 | 0,754 | 0,783 | 0,768 | 0,768 | 0,739 | 0,725 | 0,870 | 0,899 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M13  | 0,754 | 0,754 | 0,739 | 0,768 | 0,754 | 0,725 | 0,725 | 0,710 | 0,884 | 0,884 | 0,928 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M14  | 0,855 | 0,855 | 0,841 | 0,812 | 0,826 | 0,826 | 0,797 | 0,841 | 0,725 | 0,754 | 0,768 | 0,754 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M12  | 0,783 | 0,812 | 0,768 | 0,768 | 0,783 | 0,783 | 0,754 | 0,768 | 0,826 | 0,913 | 0,957 | 0,913 | 0,783 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M16  | 0,812 | 0,841 | 0,826 | 0,768 | 0,812 | 0,812 | 0,870 | 0,884 | 0,768 | 0,739 | 0,783 | 0,768 | 0,841 | 0,826 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX11 | 0,841 | 0,841 | 0,826 | 0,797 | 0,783 | 0,812 | 0,870 | 0,826 | 0,681 | 0,710 | 0,754 | 0,739 | 0,812 | 0,797 | 0,884 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H2   | 0,913 | 0,913 | 0,899 | 0,812 | 0,855 | 0,884 | 0,797 | 0,870 | 0,696 | 0,754 | 0,797 | 0,783 | 0,826 | 0,841 | 0,899 | 0,870 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H5   | 0,957 | 0,870 | 0,884 | 0,826 | 0,841 | 0,870 | 0,754 | 0,826 | 0,681 | 0,739 | 0,754 | 0,768 | 0,841 | 0,797 | 0,826 | 0,797 | 0,928 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H1   | 0,913 | 0,884 | 0,841 | 0,841 | 0,797 | 0,855 | 0,768 | 0,812 | 0,696 | 0,754 | 0,768 | 0,783 | 0,826 | 0,812 | 0,841 | 0,812 | 0,913 | 0,957 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX10 | 0,855 | 0,855 | 0,812 | 0,812 | 0,768 | 0,797 | 0,855 | 0,812 | 0,725 | 0,725 | 0,797 | 0,754 | 0,826 | 0,783 | 0,812 | 0,841 | 0,855 | 0,841 | 0,855 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX4  | 0,899 | 0,928 | 0,855 | 0,855 | 0,841 | 0,870 | 0,783 | 0,855 | 0,739 | 0,797 | 0,841 | 0,797 | 0,841 | 0,855 | 0,884 | 0,855 | 0,957 | 0,913 | 0,928 | 0,899 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX7  | 0,884 | 0,884 | 0,841 | 0,870 | 0,913 | 0,884 | 0,797 | 0,841 | 0,725 | 0,754 | 0,826 | 0,812 | 0,826 | 0,841 | 0,841 | 0,870 | 0,942 | 0,899 | 0,884 | 0,855 | 0,928 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX9  | 0,913 | 0,855 | 0,841 | 0,870 | 0,884 | 0,855 | 0,797 | 0,812 | 0,725 | 0,754 | 0,826 | 0,812 | 0,797 | 0,841 | 0,841 | 0,841 | 0,942 | 0,928 | 0,913 | 0,855 | 0,928 | 0,971 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX5  | 0,913 | 0,884 | 0,812 | 0,870 | 0,826 | 0,826 | 0,826 | 0,812 | 0,725 | 0,783 | 0,826 | 0,783 | 0,826 | 0,841 | 0,841 | 0,870 | 0,913 | 0,899 | 0,913 | 0,913 | 0,957 | 0,913 | 0,942 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| M5   | 0,841 | 0,870 | 0,797 | 0,855 | 0,812 | 0,841 | 0,754 | 0,797 | 0,710 | 0,710 | 0,783 | 0,739 | 0,812 | 0,768 | 0,826 | 0,884 | 0,870 | 0,826 | 0,870 | 0,841 | 0,913 | 0,899 | 0,870 | 0,870 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HX8  | 0,870 | 0,870 | 0,826 | 0,855 | 0,899 | 0,870 | 0,783 | 0,826 | 0,710 | 0,739 | 0,812 | 0,797 | 0,812 | 0,826 | 0,826 | 0,855 | 0,928 | 0,884 | 0,899 | 0,841 | 0,913 | 0,986 | 0,957 | 0,899 | 0,913 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H3   | 0,884 | 0,913 | 0,870 | 0,812 | 0,855 | 0,884 | 0,826 | 0,870 | 0,696 | 0,725 | 0,768 | 0,754 | 0,826 | 0,812 | 0,870 | 0,870 | 0,971 | 0,899 | 0,884 | 0,884 | 0,928 | 0,942 | 0,913 | 0,884 | 0,870 | 0,928 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |
| H4   | 0,913 | 0,884 | 0,870 | 0,812 | 0,855 | 0,855 | 0,768 | 0,841 | 0,667 | 0,725 | 0,768 | 0,754 | 0,826 | 0,812 | 0,841 | 0,870 | 0,942 | 0,899 | 0,884 | 0,855 | 0,928 | 0,942 | 0,913 | 0,884 | 0,899 | 0,928 | 0,942 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |
| H9   | 0,913 | 0,884 | 0,841 | 0,841 | 0,855 | 0,855 | 0,768 | 0,841 | 0,667 | 0,725 | 0,739 | 0,754 | 0,826 | 0,783 | 0,812 | 0,812 | 0,913 | 0,957 | 0,942 | 0,855 | 0,899 | 0,913 | 0,913 | 0,884 | 0,841 | 0,899 | 0,913 | 0,913 | 1,000 |       |       |       |       |       |
| M9   | 0,696 | 0,725 | 0,710 | 0,681 | 0,725 | 0,725 | 0,870 | 0,768 | 0,681 | 0,652 | 0,696 | 0,681 | 0,725 | 0,739 | 0,826 | 0,797 | 0,754 | 0,681 | 0,696 | 0,782 | 0,739 | 0,754 | 0,725 | 0,754 | 0,681 | 0,739 | 0,783 | 0,754 | 0,696 | 1,000 |       |       |       |       |
| HX6  | 0,841 | 0,870 | 0,826 | 0,797 | 0,812 | 0,841 | 0,812 | 0,826 | 0,739 | 0,768 | 0,783 | 0,768 | 0,783 | 0,826 | 0,855 | 0,855 | 0,928 | 0,855 | 0,870 | 0,841 | 0,913 | 0,899 | 0,899 | 0,899 | 0,826 | 0,884 | 0,928 | 0,870 | 0,841 | 0,768 | 1,000 |       |       |       |
| M8   | 0,899 | 0,783 | 0,797 | 0,797 | 0,841 | 0,812 | 0,696 | 0,768 | 0,652 | 0,681 | 0,725 | 0,739 | 0,754 | 0,739 | 0,739 | 0,768 | 0,841 | 0,913 | 0,870 | 0,754 | 0,826 | 0,870 | 0,899 | 0,841 | 0,797 | 0,855 | 0,812 | 0,841 | 0,899 | 0,623 | 0,797 | 1,000 |       |       |
| M5   | 0,663 | 0,623 | 0,580 | 0,638 | 0,681 | 0,594 | 0,710 | 0,638 | 0,696 | 0,667 | 0,739 | 0,725 | 0,652 | 0,696 | 0,667 | 0,638 | 0,652 | 0,638 | 0,681 | 0,681 | 0,696 | 0,681 | 0,710 | 0,739 | 0,696 | 0,696 | 0,623 | 0,652 | 0,652 | 0,638 | 0,638 | 0,696 | 1,000 |       |
| M17  | 0,661 | 0,623 | 0,609 | 0,696 | 0,710 | 0,652 | 0,623 | 0,638 | 0,725 | 0,638 | 0,652 | 0,667 | 0,623 | 0,638 | 0,638 | 0,609 | 0,623 | 0,696 | 0,652 | 0,594 | 0,638 | 0,681 | 0,681 | 0,652 | 0,638 | 0,667 | 0,623 | 0,681 | 0,681 | 0,638 | 0,609 | 0,696 | 0,652 | 1,000 |

## PHỤ LỤC 18: XÂY DỰNG QUY TRÌNH

### Quy trình 1: Quy trình tái sinh của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến

**Bước 1:** Chuẩn bị, lựa chọn cây lan con hoặc chồi *in-vitro* của những dòng lan đột biến đủ tiêu chuẩn ( khoẻ mạnh, xanh tốt, cao 3-4 cm, có 4-5 lá), cắt bỏ lá, rễ sau đó cắt thân chồi thành những đoạn ngắn 1,5-2cm. Mỗi đoạn thân phải chứa ít nhất 1 chồi ngủ.

Phòng nuôi có nhiệt độ được cài đặt  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm phải được phân bố đều trong toàn phòng nuôi, độ ẩm được điều chỉnh từ 50-60%. Sử dụng bóng đèn huỳnh quang chiếu sáng với mật độ thông lượng photon quang hợp trong khoảng  $13,5 - 27 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ , thời gian chiếu sáng được điều chỉnh 8 giờ/ ngày.

### **Bước 2:** Tái sinh chồi hoặc mô sẹo từ đoạn thân

Những đoạn thân ngắn được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA, pH 5,8.

### **Bước 3:** Tái sinh chồi từ mô sẹo

Mô sẹo khoẻ mạnh không nhiễm nấm bệnh được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA, pH 5,8 nhằm kích thích mô sẹo tạo chồi.

### **Bước 4:** Nhân chồi

Những chồi tái sinh khoẻ mạnh, cao 2-3 cm và có 2-3 lá không nhiễm nấm bệnh được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA, pH 5,8 để kích thích chồi nhân nhanh.

### **Bước 5:** Ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh

Những chồi khoẻ mạnh, cao 3-4 cm và có 4-5 lá không nhiễm nấm bệnh được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 0,7 mg/L NAA, pH 5,8 để nuôi cây ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh.

## **Quy trình 2: Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế**

**Bước 1: Lấy mẫu.** Mẫu lan Giả hạc tím Huế được thu thập, nuôi dưỡng. Thu thập quả đã chín sinh lý và đoạn thân có chồi ngủ, mẫu thu thập cần khoẻ mạnh, sạch bệnh.

**Bước 2: Khử trùng mẫu.** Những đoạn thân hoặc quả thu về được vệ sinh loại bỏ các phần không cần thiết, rửa dưới vòi nước chảy và lắc nhẹ trong xà phòng pha loãng trong 5 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất khử trùng và chuyển vào tủ cấy vô trùng.

Đối với mẫu là quả lan sẽ được nhúng ngập toàn bộ quả trong cồn ethanol 96° và lắc nhẹ trong vòng 30 giây, sau đó quả được lấy ra và đốt qua bằng ngọn lửa đèn cồn. Tiếp theo là cắt đôi quả lấy hạt gieo lên môi trường dinh dưỡng MS. Đối với mẫu là đoạn thân sẽ được khử trùng bằng cách lắc 10 phút trong NaClO 2% và 10 phút HgCl<sub>2</sub> 0,1% sau đó mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng và cấy vào môi trường dinh dưỡng MS.

**Bước 3: Tái sinh mô sẹo hoặc protocorm tạo vật liệu khởi đầu.** Mẫu sạch, không bị nhiễm nấm khuẩn, còn sống được cấy chuyển sang môi trường tái sinh chồi/mô sẹo/protocorm.

Nếu mẫu là hạt lan được cấy vào 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 và pH 5,8 + 0,75 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA để kích thích hạt phát triển thành protocorm.

Nếu mẫu là đoạn thân được cấy vào 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 và pH 5,8 + 1,5 mg/L DTZ + 0,5 mg/L NAA nhằm kích thích đoạn thân tạo mô sẹo.

**Bước 4: Tái sinh chồi.** Chồi có thể được tái sinh từ đoạn thân chứa chồi ngủ, hoặc từ mô sẹo hoặc từ protocorm bằng cách nuôi cấy vào môi trường dinh dưỡng có bổ sung hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng phù hợp, cụ thể là:

Tái sinh chồi từ đoạn thân môi trường dinh dưỡng được sử dụng là 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 và pH 5,8 + 1,5 mg/L BA.

Tái sinh chồi từ mô sẹo/protocorm môi trường dinh dưỡng được sử dụng là 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 và pH 5,8 + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA.

**Bước 5: Nhân chồi.** Chồi tạo ra từ quá trình tái sinh chồi được lựa chọn những chồi to khỏe, xanh tốt, không nhiễm nấm khuẩn cấy vào môi trường dinh dưỡng 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 và pH 5,8 + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA để kích thích chồi nhân nhanh.

**Bước 6: Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.** Chọn chồi xanh tốt, khỏe mạnh, không nhiễm nấm khuẩn, cao 4-5 cm, có 3-4 lá cấy vào môi trường dinh dưỡng 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 và pH 5,8 + 0,7 mg/L NAA nhằm kích thích ra rễ của chồi.

**Bước 7: Ra cây ngoài vườn ươm.** Những bì cây lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* phát triển đạt chuẩn có đầy đủ rễ lá, xanh tốt, khỏe mạnh ko bị nhiễm nấm khuẩn được đưa xuống vườn ươm chăm sóc từ 2-3 tuần sau đó ra cây trồng trên hỗn hợp giá thể sơ dừa và trấu hun tỉ lệ 1:1, điều kiện vườn ươm được kiểm soát ánh sáng che 50%, nhiệt độ 25-35°C. Cây được chăm sóc tưới nước 2 lần/ngày, phun chế phẩm với liều lượng 10ml/L nước, phun 2 lần/tuần đồng thời có bổ sung thêm phân chậm tan có thành phần N:P:K:Mg tương đương 6:40:6:15 với liều lượng 1 g/cây/tháng.

## **PHỤ LỤC 19: CÁC BƯỚC XÁC ĐỊNH MẬT ĐỘ VI KHUẨN (CFU/mL)**

### **Bước 1: Pha loãng mẫu vi khuẩn**

Mẫu ban đầu thường có mật độ vi khuẩn rất cao, nên cần pha loãng theo cấp số nhân (10 lần mỗi cấp).

Ví dụ: lấy 1 mL mẫu cho vào 9 mL nước muối sinh lý hoặc môi trường lỏng → pha loãng  $10^{-1}$ ; tiếp tục lấy 1 mL từ đó cho vào 9 mL mới →  $10^{-2}$ , v.v.

### **Bước 2: Cấy mẫu lên đĩa thạch**

Dùng pipet lấy một lượng nhỏ (0.1 mL) từ mỗi độ pha loãng và cấy lên đĩa thạch Petri.

Trải đều mẫu trên bề mặt thạch để khuẩn lạc phát triển riêng biệt.

### **Bước 3: Ủ đĩa thạch**

Đặt đĩa vào tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp ( $37^{\circ}\text{C}$ ) trong 24–48 giờ để vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc.

### **Bước 4: Đếm số khuẩn lạc**

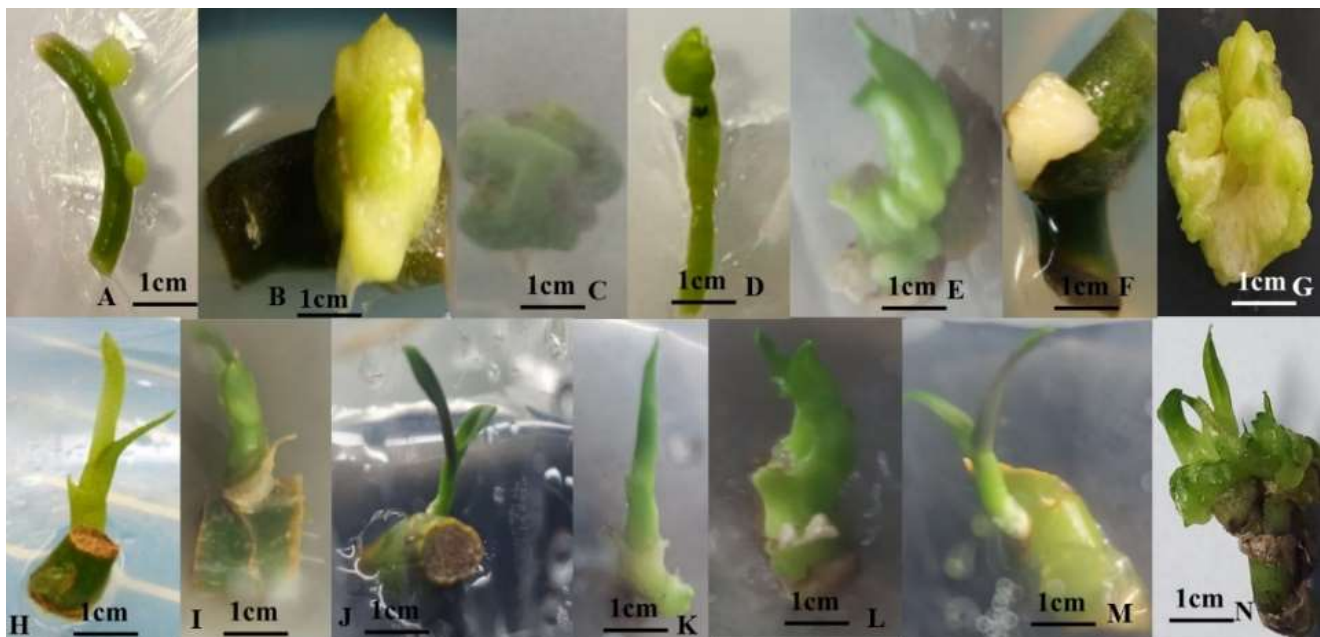
Sau thời gian ủ, đếm số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa. Mỗi khuẩn lạc được xem là một CFU.

### **Bước 5: Tính toán mật độ vi khuẩn**

Áp dụng công thức:

$$CFU/mL = \frac{\text{số khuẩn lạc đếm được}}{\text{Thể tích cấy (ml)} \times \text{hệ số pha loãng}}$$

**PHỤ LỤC 20: MỘT SỐ HÌNH ẢNH ĐƯỢC CHỤP LẠI TRONG THỜI GIAN  
NGHIÊN CỨU**



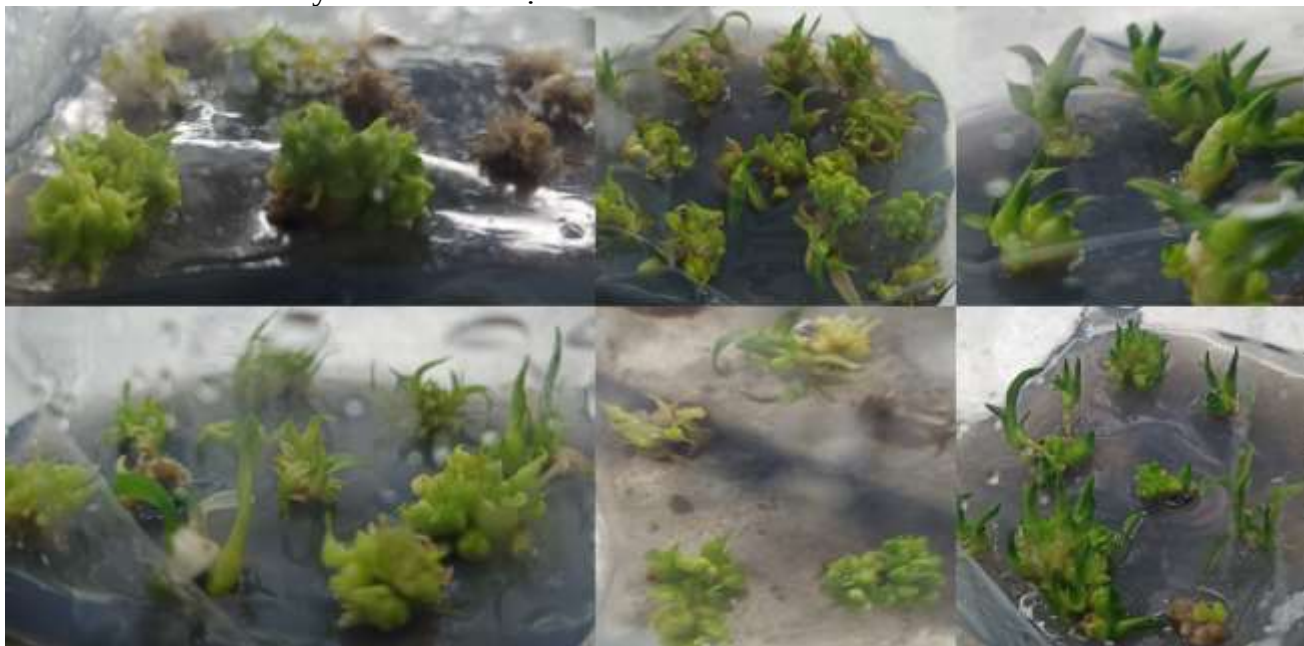
**Hình P20-3.1:** Khả năng tái sinh chồi/mô sẹo của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.  
(A, H: Mẫu đối chứng; B, I: Mẫu HX3; C, J: Mẫu HX10; D, K: Mẫu M5; E, L: Mẫu M13; F, M: Mẫu M14; G, N: Mẫu M17)



**Hình P20-3.2:** Cây lan Giả hạc tím Huế đầu dòng.



**Hình P20-3.3:** Ra cây lần con Giả hạc tím Huế *in-vitro* ở vườn ươm



**Hình P20-3.4:** Giai đoạn tái sinh chồi của môi sẹo sau khi xử lý hoá chất đột biến



**Hình P20-3.5:** Phòng nuôi cây thí nghiệm

## TÀI LIỆU THAM KHẢO PHẦN PHỤ LỤC

- [1] H. V. .Cường, M. T. H. Anh, T. Q. Tân, and C. H. Mậu, ‘phân tích vùng gene lục lạp, rbcL, phân lập từ cây lan tai cáo (*Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight)’, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, vol. 228, no. 01, pp. 474–481, 2023.
- [2] L. T. N. .Điệp, N. T. Diễm, N. N. Hoa, T. H. Dũng, and V. T. H. Trang, ‘Đánh giá đa dạng di truyền của một số loài Lan *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam’, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường ĐH Nguyễn Tất Thành*, vol. 3, no. 3, pp. 1–12, 2020, doi: <https://doi.org/10.55401/jst.v3i3.113>.
- [3] N. V. .Giang, P. P. Thu, C. Đ. Hà, and N. T. T. Mai, ‘Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên’, *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, vol. 60, no. 5, 2018, [Online]. Available: [https://b.vjst.vn/index.php/ban\\_b/article/view/480](https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/480)
- [4] P. T. N. .Lan, L. T. T. Xuân, and N. T. B. Châu, ‘Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố pleiku, tỉnh Gia lai’, *tạp chí khoa học và công nghệ, Trường đại học khoa học Huế, ĐH Huế*, vol. 17, no. 2, pp. 169–179, 2020.
- [5] N. T. .Minh and Đ. M. Thu, ‘Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất mặn huyện giao thủy, tỉnh Nam Định’, *Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, pp. 1022–1032, 2017, doi: <http://www1.vnua.edu.vn/tapchi/upload/8-2017/4.pdf>.
- [6] J. M. Bric, R. M. Bostock, and S. E. Silverstone, ‘Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane’, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 535–538, 1991, [Online]. Available: doi: <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991%0A>
- [7] A. Kumar, R. Singh, A. Yadav, D. D. Giri, P. K. Singh, and K. D. Pandey, ‘Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L.’, *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, p. 60, Jun. 2016, doi: [10.1007/s13205-016-0393-y](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0393-y).
- [8] J. D. Nugroho, A. Y. S. Arobaya, and E. A. Tanur, ‘Propagation of *Dendrobium antennatum* Lindl via seed culture in vitro using simple medium: fertilizer and complex organic based medium’, *Hayati J. Biosci.*, vol. 26, no. 3, pp. 133–138, 2019, doi: <https://doi.org/10.4308/hjb.26.3.133>.
- [9] D. T. K. Pham, B. Van Huynh, and T. Mai, ‘Genetic relationship analysis of *Dendrobium anosmum* Lindl. var. *semialba* based on the chloroplast matK and rbcL genes’, *J. Agric. Dev.*, vol. 20, no. 3, pp. 41–49, 2021, doi: [10.52997/jad.6.03.2021](https://doi.org/10.52997/jad.6.03.2021).
- [10] R. J. Porra, ‘The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b’, *Photosynth. Res.*, vol. 73, pp. 149–156, 2002.
- [11] T. Takamiya *et al.*, ‘Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse groups, *Dendrobium* section *Dendrobium* and allies’, *AoB Plants*, vol. 6, p. plu045, 2014, doi: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu045>.