

CẨM ỨNG TẠO DÒNG LAN GIẢ HẠC (*Dendrobium anosmum*) VÀ LONG TU (*Dendrobium primulinum*) ĐA BỘI BẰNG COLCHICINE

Huỳnh Hữu Đức^{*}, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Xuân Hiền, Nguyễn Thị Từ Vy, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) là một trong những loài phong lan bản địa Việt Nam, có giá trị kinh tế cao. Chúng được phân bố ở nhiều vùng khí hậu địa lý khác nhau nên có hình dạng và màu sắc hoa khác nhau. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu tạo những cá thể mang đặc tính mới, đôi khi vượt trội so với cây lưỡng bội về mặt kiểu gen và biểu hiện kiểu hình như hình thái, sinh lý, sinh hóa để cung cấp thị trường và sử dụng trong lai tạo giống. Giống giả hạc và long tu đã được xác định chính xác loài và xử lý colchicine trong điều kiện *in vitro* để tạo dòng cây đa bội. Nồng độ colchicine ở 0,1% w/v và 0,5% w/v, thời gian xử lý 1 ngày thích hợp cho việc tạo cây đa bội ở cả giống lan giả hạc và long tu. Kết quả bước đầu đã sàng lọc được 8 dòng lan đa bội tiềm năng đối với lan giả hạc, 7 dòng đối với lan long tu có đặc điểm hình thái về thân, lá, chiều dài, chiều rộng và hình dạng khác với đối chứng về kích thước. Ngoài ra, kết quả phân tích hàm lượng DNA trong nhân đối với lan giả hạc và long tu cho thấy các dòng đa bội tiềm năng có giá trị tương ứng là 2,17-3,03 pg và 2,09-2,63 pg đều cao hơn rất nhiều so với đối chứng tương ứng là 1,98 pg và 2,63 pg. Các kết quả này cho thấy các dòng lan giả hạc và long tu đa bội tiềm năng có thể tồn tại ở dạng 3n và 4n. Những dòng lan đa bội tiềm năng này sẽ được tách riêng, nhân chồi đánh giá tính ổn định đa bội và khả năng sinh trưởng trong điều kiện *ex vitro* trong tương lai.

Từ khóa: Chất điều hòa sinh trưởng, colchicine, đa bội, lan giả hạc, nhân giống *in vitro*.

MỞ ĐẦU

Chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) là loài cây ra hoa quanh năm, thích hợp cho vùng có khí hậu nhiệt đới, có giá trị kinh tế cao và rất được thị trường ưa chuộng. Hoa *Dendrobium* khá đa dạng và một số giống có mùi thơm nhẹ, có nhiều loại với nhiều màu sắc sặc sỡ như đỏ son, hồng phấn, tím, trắng hồng hay vàng nhạt. Trong đó Lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) là một trong những loài lan bản địa của Việt Nam đang được thị trường quan tâm bởi những đặc điểm hình thái, hoa của nó, đồng thời chúng có giá trị kinh tế cao. Đây là loại lan đang ngày càng phát triển và được nhiều người lựa chọn để trồng trang trí. Việc tạo ra những cá thể mang đặc tính mới về đặc điểm sinh trưởng, phát triển, đặc điểm hoa, hình thái và di truyền bằng các kỹ thuật khác nhau như lai tạo, gây đột biến bằng hóa học, sinh học, vật lý đã và đang được phát triển mạnh; trong đó, một số nghiên cứu đã sử dụng colchicine để tạo cây đa bội trên một số giống lan. Đồng thời kỹ thuật nhân giống hữu tính ở hoa Lan rất phức tạp vì phụ thuộc rất lớn vào tính tương hợp di truyền của giống bố và mẹ, tốn nhiều thời gian và công sức trong việc lai tạo, sàng lọc và đánh giá các tổ hợp lai. Do đó, việc nghiên cứu và phát triển một phương pháp lai tạo ra các giống hoa lan mới là thực sự cần thiết.

Kỹ thuật tạo cây đa bội là một trong những kỹ thuật mới đã và đang được ứng dụng trong việc lai tạo ra các giống cây trồng mới mang ưu điểm là có thể tạo ra những cá thể mang đặc tính mới, đôi khi vượt trội so với cây lưỡng bội về mặt kiểu gen và biểu hiện kiểu hình như hình thái, sinh lý, sinh hóa. Thể đa bội đề cập đến sự hiện diện của hơn hai bộ gen trên mỗi tế bào sinh dưỡng. Đa bội có bốn loại chính: autopolyploidy, allopolyploid, segmental allopolyploid và paleopolyploid. Trong tự nhiên, các sinh vật đa bội có thể tự hình thành bởi sự nhân đôi bộ nhiễm sắc thể của các tế bào soma hay do sự không phân ly các nhiễm sắc thể tương đồng làm phát sinh giao tử lưỡng bội (Ramsey và Schemske, 2002). Các thể đa bội cũng có thể được hình thành nhân tạo bằng cách xử lý các chất ức chế sự phân chia tế bào như colchicine. Sự hình thành và hiện diện của các thể đa bội trong các mô, cơ quan của một cơ thể sinh vật được ghi nhận một cách phổ biến. Kết quả phân tích di truyền tiến hóa cho thấy rằng tổ tiên của bất kỳ sinh vật nhân thực nào hiện nay đều đã trải qua quá trình đa bội hóa và tái đa bội hóa (Blanc *et al.*, 2003). Ngoài ra, đa bội hóa cũng là một trong những cơ chế tự nhiên được biết đến nhiều nhất và quan trọng nhất trong việc hình thành các loài mới (Otto và Whitton, 2000; Leitch và Leitch, 2008). Các kết quả nghiên cứu và phân tích cũng chứng minh rằng sự đa bội hóa của các loài thực vật đã làm tăng sự đa dạng biểu hiện gen từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho hình thành các kiểu hình thái - tiến hóa của sinh vật một cách hợp lý và thích ứng tốt hơn so với dạng lưỡng bội ban đầu. Một số lợi thế của các thể đa bội ghi nhận được như tăng khả năng sinh trưởng, tăng dị hợp tử, tạo ra các tổ hợp gen mới, biến thể mới lạ trong tổ hợp giữa các allele từ đó tạo ra các chức năng mới hay chức năng phụ (Anssour *et al.*, 2009). Việc tạo cây đa bội trên cây lan Hồ điệp, lan Vũ nữ, lan *Dendrobium* đã được thực hiện thành công ở một số nước như Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài

Loan, Thái Lan và góp phần tạo ra nhiều giống lan mới có giá trị cao. Grosso và đồng tác giả (2018), nghiên cứu và tạo đa bội thành công trên cây lan lai *Dendrobium phalaenopsis* × *Dendrobium loddigesii* bằng colchicine và AMP (amiprophos-methyl) với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau trên mẫu PLBs và đã tạo cây hoàn chỉnh từ các PLBs này với tỷ lệ 80% của các thể đa bội. Yenchon và Te-chato (2012), đã cảm ứng tạo đa bội từ PLBs của lan *Dendrobium formosum* bằng colchicine ở nồng độ 0,2% trong 48 giờ cho tỷ lệ tạo cây tứ bội cao nhất với các đặc điểm hình thái và sinh lý của cây tứ bội rõ ràng khác với cây lưỡng bội như lá dày, xanh đậm và kích thước thân lớn. Kích thước lỗ khí, cả chiều dài và chiều rộng của cây tứ bội lớn hơn đáng kể so với cây lưỡng bội, trong khi mật độ của chúng thấp hơn. Vichiato và đồng tác giả (2014), tạo đa bội thành công trên lan *Dendrobium nobile*. Kết quả đánh giá cây đa bội và cây lưỡng bội về các đặc điểm hình thái của hoa, lá và giả hành cho thấy sự tăng số lượng các đốt (19,9%) và các bộ phận của hoa như chiều cao, phát hoa lớn hơn (4,5%) và chiều rộng của môi (18,5%); tuy nhiên, giảm số lượng hoa trên mỗi giả hành (40,9%) và đường kính của giả hành (64,9%) và chậm ra hoa. Choopeng và đồng tác giả (2019), sử dụng colchicine với nồng độ khác nhau xử lý trong thời gian 24, 48 và 72 giờ trên lan *Dendrobium santana* × *Dendrobium friedericksianum*. Các mẫu sau khi xử lý bằng colchicine được tái sinh và xác định hàm lượng DNA bằng FCM (flow cytometry – kỹ thuật dòng chảy tế bào) cho thấy hàm lượng DNA trong nhân tăng từ 33 đến 50%. Các đặc tính sinh lý, và hình thái cho thấy kích thước lớn hơn của các tế bào bảo vệ nhưng mật độ thấp hơn so với cây ban đầu. Atichart (2013), xử lý tạo cây đa bội trên lan *Dendrobium chrysotoxum* bằng colchicine với nồng độ 0,04% trong 1 ngày hiệu quả nhất với 84% PLBs còn sống và tạo được 47% hoa lan tứ bội, được xác định hàm lượng DNA nhân bằng kỹ thuật dòng chảy tế bào. Trong khi đó, ở Việt Nam việc tạo các giống lan mới thông qua kỹ thuật đa bội hóa còn hạn chế và chỉ dừng lại ở mức độ nghiên cứu bước đầu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xử lý mẫu PLBs của lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) bằng colchicine với các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau để sàng lọc, đánh giá thể đa bội, từ đó tạo ra dòng lan đa bội có đặc điểm nổi bật để cung cấp ra thị trường và sử dụng trong lai tạo giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Cụm PLBs *in vitro* lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) có kích thước 0,5 cm (đường kính).

Phương pháp nghiên cứu

Cảm ứng tạo thể đa bội lan Giả hạc và Long tu bằng chất cảm ứng colchicine với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau.

PLBs của lan Giả hạc và Long tu được xử lý colchicine với các nồng độ 0,02; 0,1; 0,5 % w/v và cấy trên môi trường MS 1/2, bổ sung 30 g/l sucrose, 0,5 g/l peptone, 0,1 g/l inositol, 0,02 g/l glycin, 7 g/l agar, pH = 5,7 có bổ sung colchicine với các nồng độ tương ứng và nuôi cấy trong thời gian 1; 3; 7 ngày. Sau đó cấy chuyển sang môi trường trên nhưng không bổ sung colchicine. Thí nghiệm được bố trí 9 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 6 đĩa petri, mỗi đĩa 6 mẫu. Theo dõi đặc điểm sinh trưởng và phát triển của mẫu sau khi xử lý colchicine. Điều kiện nuôi cấy: cường độ ánh sáng $20 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày với độ ẩm phòng nuôi 70-80% và nhiệt độ phòng nuôi $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Biệt hóa tạo chồi từ PLB lan giả hạc và long tu sau khi xử lý cảm ứng đa bội bằng colchicine.

Mẫu PLBs của lan giả hạc và long tu sau thời gian xử lý colchicine được chuyển sang môi trường MS 1/2, bổ sung 30 g/l sucrose, 0,5 g/l peptone, 0,1 g/l inositol, 0,02 g/l glycin, 1,0 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 7 g/l agar, pH = 5,7 để cảm ứng tạo chồi. Điều kiện nuôi cấy: Sử dụng đèn LED có tỷ lệ ánh sáng 70% đỏ - 30% xanh dương ($24 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$), thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, độ ẩm phòng nuôi 70 – 80%. Thời gian nuôi cấy 18 tuần. Đánh giá đặc điểm hình thái của các chồi hình thành từ các PLBs đã được xử lý colchicine, sàng lọc các chồi có đặc điểm hình thái mới khác so với đối chứng thành từng dòng đa bội giả định và tiến hành nhân nhanh các dòng đa bội này. Mỗi chồi *in vitro* được sàng lọc và tách dòng này được ghi nhận như một dòng đa bội ban đầu. Ký hiệu DG1-x cho dòng lan Giả hạc đa bội ban đầu thứ x, DL1-y cho dòng lan Long tu đa bội ban đầu thứ y.

Sàng lọc, đánh giá các dòng đa bội giả hạc và long tu đa bội trong điều kiện *in vitro*.

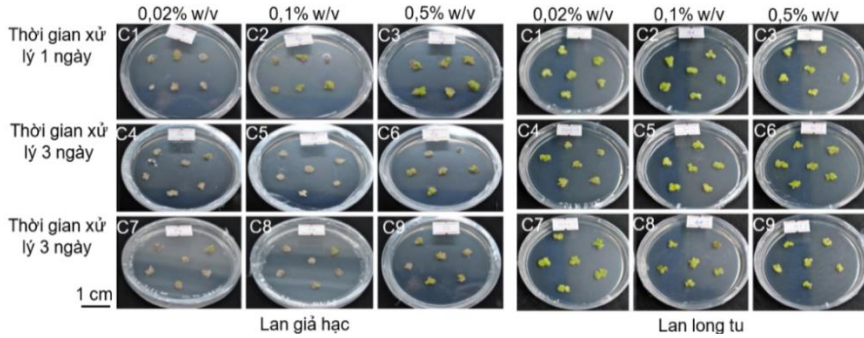
Các dòng lan giả hạc và long tu được sàng lọc từ nội dung trên được tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường MS 1/2, bổ sung 30 g/l sucrose, 0,5 g/l peptone, 0,1 g/l inositol, 0,02 g/l glycin, 0,2 mg/l BA, 1 mg/l NAA, 7 g/l agar, pH = 5,7. Điều kiện nuôi cấy: Sử dụng đèn LED trắng ($25 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$), thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, độ ẩm phòng nuôi 70 – 80%. Thời gian nuôi cấy 8 tuần. Các dòng đa bội này được phân tích và xác định hàm lượng DNA trong nhân. Mẫu lá của các dòng được sàng lọc sử dụng để xác định hàm lượng DNA trong nhân bằng kỹ thuật dòng chảy tế bào (máy Flow cytometry, FCM). Cắt mẫu lá có kích thước 0,5 cm² và đặt trên đĩa petri, bổ sung 0,25 ml PBS 1X lên mẫu lá, dùng dao lam cắt nhuyễn. Hỗn hợp dung dịch chứa mẫu lá đã cắt nhuyễn được lọc qua CellTrics 30 μm và thu dịch vào tube 5 ml, bổ sung 5 μl PI nồng độ 1mg/ml, ủ

hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp được đo trên máy FCM (Flow cytometry) (FACSAria III) với các thông số PI (tốc độ bắn): 198, FSC (forward scatter – Ánh sáng của tia laser đi qua bên ngoài của tế bào): 140 – 200, SSC (side scatter – Ánh sáng của tia laser đi qua tâm của tế bào): 225.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cảm ứng tạo thể đa bội lan giả hạc và long tu bằng colchicine với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau.

Các PLBs của lan giả hạc và long tu được xử lý đa bội bằng colchicine với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau cho kết quả như sau:



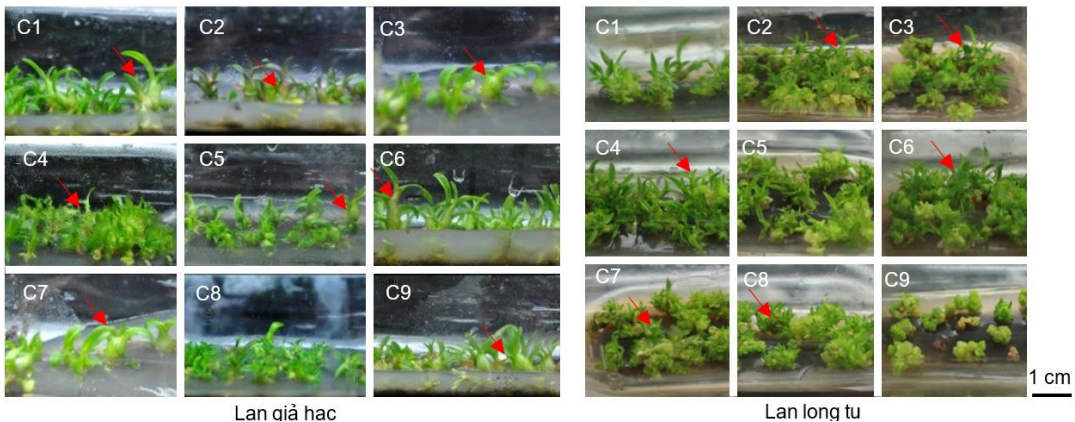
Hình 1. Ảnh hưởng của colchicine lên PLBs lan giả hạc, lan long tu với các nồng độ và thời gian xử lý

C1, C2, C3: Sau 1 ngày; C4, C5, C6: Sau 3 ngày; C7, C8, C9: Sau 7 ngày.

Đối với PLBs của lan giả hạc sau khi xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau cho thấy mẫu PLBs có sự thay đổi so với mẫu ban đầu. Mẫu được xử lý ở nồng độ 0,02; 0,1; 0,5 % w/v với thời gian 1 ngày gồm các nghiệm thức C1, C2, C3; PLBs ở nghiệm thức C1 hóa nâu và chuyển từ màu xanh gần như sang hiện tượng thủy tinh thể; ở nghiệm thức C2 mẫu PLBs chuyển từ màu xanh sang vàng; nghiệm thức C3 mẫu vẫn xanh nhưng có hiện tượng hóa nâu ở vị trí tiếp xúc với môi trường. Nghiệm thức xử lý colchicine trong thời gian 3 ngày gồm C4, C5, C6; mẫu PLBs chuyển sang màu trắng đục, một số mẫu chết và chuyển màu đen ở nghiệm thức C6. Tương tự ở nghiệm thức C7, C8, C9 xử lý trong thời gian 7 ngày, mẫu PLBs cũng chuyển sang màu trắng đục, có trạng thái thủy tinh thể, một số mẫu chết. Ngược lại, đối với mẫu PLBs của long tu được xử lý với các nồng độ colchicine và thời gian xử lý trên thì sự thay đổi về hình thái PLBs không rõ rệt giữa các nghiệm thức cũng như so với mẫu ban đầu. Tuy nhiên, ở một số nghiệm thức vẫn có một số mẫu có hiện tượng thủy tinh thể, mẫu chuyển sang màu vàng và hóa nâu. Kết quả này cho thấy có sự tương tự một số kết quả trước đây về sự ảnh hưởng của colchicine đến mẫu cấy chuyển sang màu nâu, màu trắng đục và mẫu khô chết (Yenchon và Te-chato, 2012; Vichiato *et al.*, 2014; Choopeng *et al.*, 2019).

Biệt hóa tạo chồi từ PLB lan giả hạc và long tu sau khi xử lý cảm ứng bằng chất cảm ứng đa bội colchicine.

Các mẫu PLBs sau khi xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian khác nhau sẽ được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo chồi để sàng lọc các dạng chồi có khả năng đa bội và đặc điểm hình thái khác so với đối chứng.



Hình 2. Các cụm chồi lan giả hạc, long tu hình thành từ PLBs đã được xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian khác nhau sau 18 tuần nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo chồi

C1, C2, C3: Sau 1 ngày; C4, C5, C6: Sau 3 ngày; C7, C8, C9: Sau 7 ngày.

Đối với PLBs đã được xử lý Colchicine của lan giả hạc: Sau 8 tuần nuôi cấy, nhiều mẫu PLB ở các nghiệm thức ghi nhận không có sự tăng trưởng, một số PLBs bị đen, một số có màu trắng đục và một số cụm PLB phát triển thành chồi ở các nghiệm thức C2, C3 và C7, chồi hình thành có đặc điểm hình thái khác với đối chứng là thân mập, lá dày. Ở tuần thứ 18, hầu hết các mẫu PLB ở các nghiệm thức đều sùi thành cụm PLB lớn. Các cụm chồi ở nghiệm thức C1 nhỏ có màu xanh non, cây cao 2-5 cm có lá màu xanh đậm. Các cụm chồi ở nghiệm thức C2 nhỏ, có ít cây cao 1-2 cm, vài cây có thân tím và lá viền tím. Nghiệm thức C3 chủ yếu là PLB, có ít cụm chồi, cây lùn cao 1-2 cm có thân phình to. Các cụm chồi ở nghiệm thức C4 lên nhiều, cây cao có thân ốm, một ít cây lùn có thân phình. Nghiệm thức C5 có cụm chồi nhỏ, cây lùn có thân phình to chỉ cao khoảng 1 cm và lá ngắn. Nhiều cụm chồi ở nghiệm thức C6 lên cây cao 2-3 cm có thân ốm và lá nhọn. Một số cây ở nghiệm thức C7 có thân phình to. Nghiệm thức C8 lên nhiều cụm cây và cụm chồi cao 2-4 cm. Nghiệm thức C9 có nhiều cụm chồi cao, cây lùn có thân phình to cao 1-3 cm, một vài cây có thân ốm cao 2-4 cm.

Đối với PLBs đã được xử lý Colchicine của lan long tu: Sau 4 tuần nuôi cấy nghiệm thức C1 cụm PLBs phát triển thành chồi, một vài mẫu tiết một ít phenol. Cụm PLBs ở nghiệm thức C2 chuyển sang vàng nguyên cụm. PLBs ở nghiệm thức C3 có nhiều mẫu tiết phenol, phát triển thành chồi nhỏ, màu xanh nhạt. Cụm PLBs ở nghiệm thức C4 PLB vàng xanh, bắt đầu tiết phenol. Cụm PLBs ở nghiệm thức C5 chồi hình thành, lá phát triển. Sau 6 tuần nuôi cấy, một số cụm chồi ở C1, C2, C3 có hiện tượng chết, cụm PLB ở C4 lớn dần và xanh, chồi C5 sùi cụm chồi mới, cụm chồi nhỏ xanh nhạt, lên lá dày xanh đậm; cụm PLB ở C6 vàng lớn dần, PLB xanh này cụm chồi lá. Sau 12 tuần, mẫu ở các nghiệm thức C1 và C4 đã phát triển lá chồi, phát triển thành cụm chồi và nhiều hơn so với các nghiệm thức còn lại. Các nghiệm thức C3, C5, C6 bắt đầu có hiện tượng hóa nâu ở phần mẫu tiếp xúc trực tiếp với môi trường và sau đó khô đen hết toàn bộ mẫu. Mẫu PLBs ở thí nghiệm C7 bị ức chế phát triển đang hình thành PLBs mới, màu vàng, lên thành cụm, phần mẫu tiếp xúc trực tiếp với môi trường cũng đang bị khô đen. Ở nghiệm thức C8 và C9 mẫu đang dần bị khô đen hoàn toàn và riêng ở nghiệm thức C9, từ những phần mẫu khô đen đang dần hình thành lại những PLBs xanh. Sau 18 tuần nuôi cấy, ở nghiệm thức C1 các cụm PLBs phát triển được cụm chồi lá nhỏ, cao 1 - 1,5 cm, 3 lá; nghiệm thức C2 và C3 các PLBs phát triển thành cụm chồi nhỏ; ở nghiệm thức C4 các PLBs và chồi nhỏ phát triển thành cụm chồi cao 1 - 1,5 cm; ở nghiệm thức C6 các mẫu PLBs hình thành cụm PLBs lớn, trong, các mẫu bị khô đen không có dấu hiệu tái sinh lại chồi mới như ở nghiệm thức C9.

Kết quả trên cho thấy ở tất cả các nghiệm thức xử lý với nồng độ colchicine và thời gian khác nhau đều cho thấy chồi hình thành có sự khác biệt so với đối chứng về mặt hình thái thân, hình thái lá, sinh trưởng và phát triển của chồi. Tuy nhiên, chồi có sự khác biệt so với đối chứng nhiều nhất ở nghiệm thức C2, C3, C7 đối với lan giả hạc và C1, C2, C3, C4 đối với lan long tu. Trên cả hai đối tượng đều cho thấy ở nghiệm thức C2, C3 cho khả năng tạo cây đa bội cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả này có khác biệt so với một số nghiên cứu trước đây như Yenchon và Te-chato (2012), đã cảm ứng tạo đa bội từ PLBs của lan *Dendrobium formosum* bằng colchicine ở nồng độ 0,2% trong 48 giờ cho tỷ lệ tạo cây tứ bội cao nhất với các đặc điểm hình thái và sinh lý của cây tứ bội rõ ràng khác với cây lưỡng bội như lá dày, xanh đậm và kích thước thân lớn. Kích thước lỗ khí, cả chiều dài và chiều rộng của cây tứ bội lớn hơn đáng kể so với cây lưỡng bội, trong khi mật độ của chúng thấp hơn. Atichart (2013), xử lý tạo cây đa bội trên lan *Dendrobium chrysotoxum* bằng colchicine với nồng độ 0,04% trong 1 ngày hiệu quả nhất với 84% PLBs còn sống và tạo được 47% hoa lan tứ bội, được xác định hàm lượng DNA nhân bằng FCM. Như vậy nồng độ colchicine ở 0,1% w/v, 0,5% w/v, thời gian xử lý 1 ngày thích hợp cho việc tạo cây đa bội ở cả giống lan giả hạc và long tu.

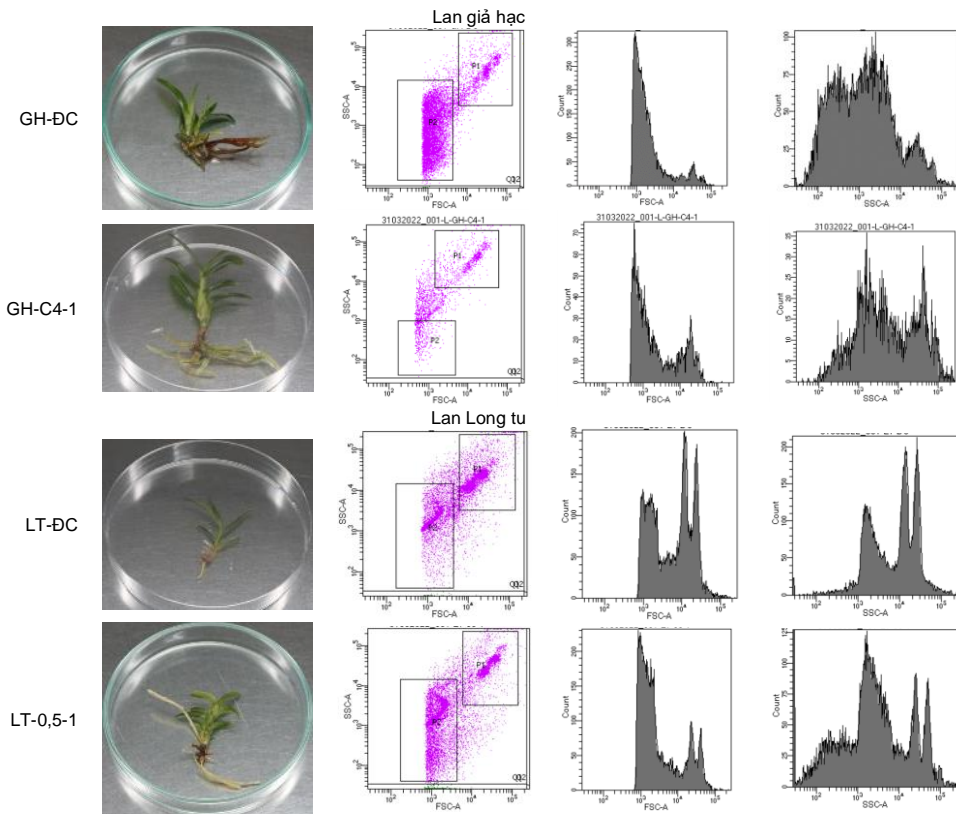
Sàng lọc, đánh giá các dòng đa bội giả hạc và long tu đa bội trong điều kiện in vitro

Chồi của lan long tu có đặc điểm hình thái khác so với đối chứng ở nội dung phát triển chồi từ PLBs đã xử lý colchicine được chọn lọc để tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường tạo cây hoàn chỉnh. Các mẫu được tiếp tục theo dõi đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển, xác định hàm lượng DNA trong nhân. Các mẫu cây lan giả hạc và long tu *in vitro* đã được phân tích và xác định hàm lượng DNA trong nhân cho thấy có hàm lượng DNA gấp đôi so với mẫu đối chứng

Bảng 1. Hàm lượng DNA trong nhân một số dòng lan giả hạc và long tu đa bội đã được sàng lọc

STT	Mẫu	Giá trị trung bình FSC-H (P2)	Hàm lượng DNA tương đối trên mỗi 1C (Megabase pasi DNA per 1C nucleus) (kp)	Hàm lượng DNA (pg)
Một số dòng lan giả hạc đa bội				
1	GH-ĐC	1,52	955,00	1,98
2	GH-C1-1	1,99	1.254,42	2,60
3	GH-C2-1	1,89	1.188,86	2,46
4	GH-C4-1	2,32	1.461,18	3,03
5	GH-C5-1	1,96	1.232,36	2,56
6	GH-C7-1	1,66	1.047,03	2,17
7	GH-C8-1	1,78	1.123,94	2,33
8	GH-C9-1	1,94	1.222,90	2,54

Một số dòng Long tu đa bội				
1	LT-ĐC	1,52	955,00	1,98
2	LT-0,1-1	1,68	1.058,38	2,19
3	LT-0,1-2	1,77	1.116,37	2,31
4	LT-0,1-3	1,60	1.009,21	2,09
5	LT-0,5-1	1,84	1.159,87	2,40
6	LT-0,5-2	2,01	1.269,55	2,63
7	LT-0,5-3	1,49	937,98	1,94



Hình 3. Một số dòng lan giả hạc và long tu đa bội

Nghiên cứu trên đã sàng lọc được nhiều dòng có đặc điểm hình thái về thân, lá, chiều dài, chiều rộng và hình dạng lá khác so với đối chứng về kích thước. Bước đầu chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng DNA trong nhân trên 8 dòng đối với lan giả hạc, 7 dòng đối với lan long tu và cây đối chứng. Đối với các dòng lan giả hạc phân tích cho thấy có giá trị DNA trên 1C (Megabase pass DNA per 1 C nucleus) và hàm lượng DNA tương ứng là 1.047,03-1.461,18 và 2,17-3,03 pg đều cao hơn rất nhiều so với đối chứng tương ứng là 955 và 1,98 pg. Đối với lan long tu cho kết quả tương ứng là 1.009,21-1.269,55 và 2,09-2,63 pg. Kết quả phân tích cho thấy peak ở các dòng đa bội có thể ở dạng 3n, 4n. Những kết quả ban đầu này cho thấy đã cảm ứng tạo được một số dòng lan giả hạc và long tu đa bội bằng colchicine. Từ kết quả này, các dòng lan giả hạc và long tu đa bội tiềm năng sẽ được tiến hành nhân chồi và đánh giá tính ổn định đa bội cũng như đánh giá khả năng sinh trưởng trong điều kiện vườn ươm (*ex vitro*).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh được khả năng cảm ứng tạo các dòng đa bội tiềm năng đối với lan giả hạc và lan long tu. Trong đó, nồng độ colchicine 0,1% w/v và 0,5% w/v; thời gian xử lý 1 ngày thích hợp cho việc cảm ứng tạo đa bội đối với mẫu PLBs của lan giả hạc và long tu. Kết quả bước đầu đã sàng lọc được 8 dòng lan giả hạc và 7 dòng lan long tu đa bội tiềm năng có thể ở dạng đa bội 3n và 4n, với hàm lượng DNA cao hơn so với các mẫu đối chứng. Kết quả này mở ra khả năng và các dòng đa bội lan giả hạc và long tu đa bội nói riêng và có thể ứng dụng trên nhiều loài lan giá trị khác nhằm mục tiêu chọn tạo giống mới.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí theo hợp đồng số 52/2021/HĐ-SNN ngày ngày 31 tháng 12 năm 2021 giữa Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn và Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh về thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp cơ sở “Nghiên cứu chọn tạo dòng lan đa bội từ một số giống lan rừng Già hạc và Long tu Việt Nam” trợ kinh phí; Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anssour S, Krügel T, Sharbel T, Saluz H, Bonaventure G, Baldwin I (2009). Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia*. *Annals of Botany*, 103: 1207-1217.
- Atichart P (2013). Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. *Thai. J. Agric. Sci.*, 46: 59-63.
- Blanc J, Thouless C, Hart J, Dublin H, Douglas-Hamilton I, Craig C, Barnes R (2003). African elephant status report 2002. *Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission*, 29.
- Choopeng S, Te-chato S, Khawnium T (2019). Effect of colchicine on survival rate and ploidy level of hybrid between *Dendrobium santana* x *D. friedericksianum* orchid. *International Journal of Agricultural Technology*, 15: 249-260.
- Grosso V, Farina A, Giorgi D, Nardi L, Diretto G, Lucretti S (2018). A high-throughput flow cytometry system for early screening of *in vitro* made polyploids in *Dendrobium* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132: 57-70.
- Leitch A, Leitch I (2008). Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*, 320: 481-483.
- Otto SP, Whitton J (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34: 401-437.
- Ramsey J, Schemske DW (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual review of ecology and systematics*, 33: 589-639.
- Vichiato MRdM, Vichiato M, Pasqual M, Rodrigues FA, Castro DMd (2014). Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl.(Orchidaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14: 154-159.
- Yenchon S, Te-chato S, 2012. Polyploidy induction of *Dendrobium formosum* by colchicine treatment *in vitro*. International Symposium on Orchids and Ornamental Plants 1025, pp. 81-88.

POLYPLOIDING INDUCTION OF *Dendrobium anosmum* AND *Dendrobium primulinum* BY COLCHICINE

Huynh Huu Duc^{*}, Nguyen Truong Giang, Nguyen Thi Xuan Hien,
Nguyen Thi Tu Vy, Nguyen Hoang Cam Tu

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Dendrobium anosmum and *Dendrobium primulinum* are the native orchid species with high economic value in Vietnam. Due to their distribution in many diverse geographical and climatic zones, they have different shapes and colors of the flowers. The purpose of the study is to create individuals with new characteristics, and some of them are superior to diploid plants in terms of genotype and phenotype expressions such as morphology, physiology, and biochemistry for supplying the market and use in breeding. *D. anosmum* and *D. primulinum* were accurately identified and treated with colchicine under *in vitro* conditions to create polyploid lines. The colchicine concentrations treating at 0.1% w/v and 0.5% w/v for one day are suitable for creating the polyploid orchid lines respectively. The results showed 8 potential polyploidy lines of *D. anosmum* and 7 lines of *D. primulinum*. These candidate polyploids showed differences in morphological characteristics such as stem, leaves, length, width, and shape were different from the control's size. In addition, the DNA content values for the polyploid lines indicated that the potential polyploid lines had values at 2.17-3.03 pg and 2.09-2.63 pg, respectively, much higher than the corresponding control (1.98 pg and 2.63 pg). These results showed that these lines can exist in 3n and 4n forms. These above polyploid lines will be isolated and propagated to evaluate polyploid stability and growth ability under *ex vitro* conditions in the future.

Keywords: Colchicine, *Dendrobium anosmum*, *Dendrobium primulinum*, plants growth regulators, polyploidy.

^{*} Author for correspondence: Tel: +84-967137046; Email: hhduc.snn@tphcm.gov.vn