

ĐỊNH DANH PHÂN TỬ VÀ NHÂN GIỐNG *in vitro* LAN KIẾM TIÊN VŨ (*Cymbidium finlaysonianum*)

Nguyễn Trường Giang^{1,2}, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú¹, Nguyễn Thị Từ Vy¹,
Nguyễn Thị Xuân Hiền³, Huỳnh Văn Biết³, Huỳnh Hữu Đức^{1*}

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh Hồ Chí Minh

²Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Lan kiếm Tiên vũ (*Cymbidium finlaysonianum*) là một trong những giống lan có tiềm năng thương mại hóa cao, nhiều giống hoang dại được sưu tập, khai thác từ rừng Việt Nam. Nhằm mục tiêu phát triển nguồn giống lan kiếm Tiên vũ với cây giống có nguồn gốc rõ ràng, trong nghiên cứu này chúng tôi đã mô tả đặc điểm hình thái của giống và xác định giống bằng di truyền phân tử, đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tái sinh chồi và tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu sử dụng để nhân giống *in vitro* đã được xác định về đặc điểm hình thái và hoa, về đặc điểm di truyền có sự tương đồng 99,61% so với *C. finlaysonianum* NC_079579.1 khi so sánh vùng gen *matK*. Môi trường Murashige and Skoog (MS) bổ sung 2 mg/L 6-Benzylaminopurine (BA) thích hợp cho quá trình tái sinh chồi từ cụm Protocorm like bodies (PLBs) với số chồi trung bình là 2,16 chồi/mẫu, khối lượng tươi 0,71 g/mẫu, khối lượng khô 0,05 g/mẫu. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) thích hợp cho quá trình tạo cây hoàn chỉnh với số rễ trung bình là 2,67 rễ/cây, số lá trung bình 4,84 lá/cây, chiều cao cây trung bình là 6,29 cm/cây, trọng lượng tươi và trọng lượng khô trung bình tương ứng là 1,14 g/mẫu và 0,39 g/mẫu. Kết quả trên cho thấy việc định danh và chứng thực bằng chỉ thị phân tử DNA barcode (acid deoxyribonucleic) kết hợp với nhân giống *in vitro* sẽ đảm bảo việc cung cấp cây giống có nguồn gốc rõ ràng, và chất lượng giống đồng nhất, nhằm góp phần nâng cao giá trị giống cung cấp ra thị trường.

Từ khóa: Chất điều hòa sinh trưởng, DNA barcode, *matK*, PLBs, lan kiếm Tiên vũ.

MỞ ĐẦU

Cymbidium là một chi phân bố rộng trải dài từ Tây Bắc dãy núi Himalayas đi qua Arunachal Pradesh, Bhutan, China, Japan, Malaysia và kéo dài đến phía Bắc nước Úc. Chúng có khoảng 50 loài và rất nhiều giống lai thường được phân bố ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, khu vực Châu Á và phía bắc nước Úc, trong đó Việt Nam hiện có khoảng 20 loài (Nayak *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2013). *Cymbidium* có sự thích nghi đa dạng với nhiều vùng khí hậu khác nhau. Một số loài thích nghi với khí hậu cận ôn đới như *C. hookerianum* Rchb.f. hay cận nhiệt đới như *Mantisia spathulata*, *C. cyperifolium* Wall ex Lindl., *C. lancifolium* Hook., *C. longifolium* D. Don... và nhiệt đới như *C. bicolor* Lindl., *C. aloifolium* (L.) Sw... Lan kiếm Tiên vũ (*C. finlaysonianum*) có đặc điểm hoa, màu sắc hoa rất đa dạng; chúng có nhiều đặc điểm khác nhau trong cùng một loài. Hiện nay, các mẫu giống lan kiếm Tiên vũ có mặt trên thị trường đa số là các mẫu giống lai và chưa được đánh giá nguồn gen, cũng như xác định nguồn gốc giống. Đồng thời, đặc điểm hình thái của một số giống lan kiếm hai màu, lan kiếm treo, lan kiếm lô hội có sự tương tự với lan kiếm Tiên vũ nên rất khó phân biệt khi chưa có hoa. Do đó, việc cung cấp cây giống có đặc điểm và nguồn gốc rõ ràng đang được quan tâm.

DNA barcode là phương pháp phổ biến để xác định loài đáng tin cậy và đang được ứng dụng rộng rãi trên thế giới nhằm phục vụ công tác phân loại, đánh giá đa dạng sinh học và bảo tồn nguồn gen. Một số vùng gen khác nhau như *rbcl*, *psaB*, *atpB* và *matK* đã được sử dụng trong các nghiên cứu, phân tích về mối quan hệ di truyền, xây dựng phát sinh loài, xác định loài ở nhiều loài khác nhau trong họ Lan. Vùng gen *rbcl*, *matK* và một số vùng DNA barcode khác như *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* vùng ITS của trong nhân đã được sử dụng để xác định loài trong chi *Dendrobium*, đồng thời đánh giá mối quan hệ di truyền của nhóm *D. fimbriatum*, *D. moniliforme*, *D. nobile*, *Dendrobium pulchellum* và *D. tosaense* dựa trên cây phát sinh chủng loài của để ứng dụng trong y học, nghiên cứu di truyền (Asahina *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012).

Mặt khác, trong thực tế sự phát triển về số lượng lan bằng con đường sinh sản, sinh dưỡng rất chậm, không những thế nhiều loài lan đang mất dần do tốc độ khai thác cao; vì vậy, phương pháp nhân giống *in vitro* là công cụ hiệu quả, cho phép nhân nhanh, tạo ra số lượng lớn cây giống đồng nhất về mặt di truyền. Phương pháp nhân giống *in vitro* đã và đang được áp dụng thành công trên nhiều loại cây trồng khác nhau và có tầm ảnh hưởng lớn đến cả nông nghiệp và công nghiệp, thông qua việc cung cấp các cây trồng cần thiết để đáp ứng nhu

cầu ngày càng tăng của thế giới. Trong nhân giống *in vitro*, từ một mẫu cấy ban đầu, qua quá trình tái sinh chồi và biệt hóa mô, cơ quan có thể tạo ra một số lượng lớn các cây hoàn chỉnh, đồng nhất về chất lượng trong thời gian ngắn và đảm bảo nguồn gốc cây giống rõ ràng (Restanto *et al.*, 2016). Hiện nay, một số nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình nhân giống *in vitro* trên chi *Cymbidium* đã thu được những hiệu quả nhất định. Hossain và đồng tác giả (2009), sử dụng môi trường bổ sung 0,5 mg/L IAA (3-Indole acetic acid) thích hợp cho việc tạo cây hoàn chỉnh. Hamada và đồng tác giả (2010), đã bổ sung 1 mg/L NAA (1-Naphthaleneacetic acid) và 2 mg/L BA (6-Benzylaminopurine) trong môi trường nuôi cấy và dưới điều kiện ánh sáng đỏ làm tăng khả năng tạo và nhân nhanh PLBs trên *Cymbidium finlaysonianum* và *Cymbidium insigne*. Tao và đồng tác giả (2011), cho thấy môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/L NAA thích hợp cho quá trình nhân nhanh PLBs. Park và đồng tác giả (2018), cho thấy môi trường MS bổ sung 20 µM 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) thích hợp cho quá trình tạo cây hoàn chỉnh và môi trường bổ sung 2,4-D 20 µM và 2 µM TDZ (Thidiazuron) cho khả năng chồi cao nhất với 21,8 chồi/mẫu trên *Cymbidium goeringii*. Một số nghiên cứu khác đã đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng, môi trường nuôi cấy để kích thích hạt nảy mầm trong điều kiện *in vitro* và tạo cây hoàn chỉnh. Tuy nhiên, các nghiên cứu này đều sử dụng nguồn mẫu là quả lan để nhân giống *in vitro* nên không thể xác định được màu sắc của hoa do có sự phân ly tính trạng và phải mất thời gian chọn lọc ở điều kiện *ex vitro* để xác định đặc điểm hoa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nguồn mẫu được thu thập đã được xác định đặc điểm hình thái, đặc điểm và màu sắc hoa, ứng chỉ thị phân tử DNA barcode để xác định loài nhằm xác định loài về mặt di truyền. Dựa trên đặc điểm hình thái và di truyền xác định chính xác nguồn mẫu sử dụng để nhân giống *in vitro*. Chồi đỉnh được sử dụng tạo nguồn mẫu *in vitro* để đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tái sinh chồi và tạo cây hoàn chỉnh trên lan kiếm Tiên vũ nhằm nâng cao hiệu quả nhân giống *in vitro* và cung cấp cây giống *in vitro* có nguồn gốc rõ ràng, phục vụ công tác bảo tồn nguồn gen và lai tạo giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Lan kiếm Tiên vũ (*C. finlaysonianum*) có nguồn gốc từ Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. Hồ Chí Minh, được sử dụng để tạo nguồn mẫu *in vitro* Cụm PLBs (Protocorm like bodies), chồi *in vitro* có kích thước đồng nhất, có 2-3 lá được sử dụng trong nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định giống dựa trên đặc điểm hình thái và chỉ thị phân tử DNA barcode

Mẫu lá lan kiếm Tiên vũ được sử dụng để tách chiết DNA tổng số bằng Kit GeneJET Plant genomic DNA Purification (ThermoFisher Scientific-Hoa Kỳ). Độ tinh sạch và nồng độ của các dịch chiết DNA được kiểm tra bằng phương pháp điện di gel agarose 0,8 % và trên máy Nano drop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific-Hoa Kỳ).

Khuếch đại vùng *matK* với cặp mồi *matK472-F*: 5'-CCCRTYCATCTGGAAATCTTGTTTC-3' và *matK1248-R*: 5'-GCTRTRATAATGAGAAAGATTCTGC-3' (Asahina *et al.*, 2010). Thành phần cho 1 phản ứng PCR 20 µL chứa 10 µL Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific-Hoa Kỳ); 0,4 µL primer xuôi (20 µM); 0,4 µL primer ngược (20 µM) (tổng hợp tại Integrated DNA technologies (IDT)); 8,2 µL nước cất 2 lần khử trùng; 1 µL DNA khuôn mẫu. Chu kỳ PCR tiến triển tính 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ (biến tính ở 95°C trong 30 giây; bắt cặp ở 52°C và 54°C trong 30 giây; kéo dài ở 72°C trong 40 giây); chu kỳ hoàn thành 72°C trong 10 phút. Kết quả PCR (Polymerase Chain Reaction) được phân tích đánh giá trên gel agarose 1,2%; hiệu điện thế 100 V; thời gian 30–40 phút; nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It@2315 imager UVP-Mỹ). Sản phẩm PCR vùng gen *matK* được giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại công ty 1st Base (Malaysia). Các trình tự DNA được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC ver 7.1 và kiểm tra các sai lệch. Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu Genbank bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên quá trình tái sinh chồi *in vitro*

Dựa trên các nghiên cứu tương tự của nhóm nghiên cứu chúng tôi trên các đối tượng lan khác, trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA và NAA lên quá trình tái sinh chồi trên lan kiếm Tiên vũ. Cụm PLBs có kích thước 0,5 – 1 cm (4-5 PLBs/mẫu) được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tái sinh chồi. Cụm PLBs được cấy trên môi trường MS 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, (0,5 – 2) mg/L BA và (0 – 0,2) mg/L NAA, môi trường được điều chỉnh ở pH = 5,5. Thí nghiệm được bố trí 13 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 5 chai, mỗi chai 5 mẫu.

Điều kiện nuôi cấy: Sử dụng đèn LED có tỷ lệ ánh sáng 70% đỏ - 30% xanh dương (24 ± 2 µmol/m²s), thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 3°C, độ ẩm phòng nuôi 70 – 80%

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi (số chồi TB/mẫu), khối lượng tươi, khối lượng khô, hình thái chồi

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên quá trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Dựa trên các nghiên cứu tương tự của nhóm nghiên cứu chúng tôi trên các đối tượng lan khác, trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA và NAA lên quá trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh trên lan kiếm Tiên vũ. Chồi đơn *in vitro* có từ 2-3 lá được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh. Chồi *in vitro* được cấy trên môi trường MS 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, (0,5 – 2) mg/L NAA và (0 – 0,2) mg/L BA, môi trường được điều chỉnh ở pH = 5,5. Thí nghiệm được bố trí 9 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 5 chai, mỗi chai 5 mẫu.

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 $25 \pm 3^\circ\text{C}$, độ ẩm phòng nuôi 70 – 80%

Chỉ tiêu theo dõi: Số rễ (số rễTB/mẫu), khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều cao (cm), số lá/mẫu (lá).

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và Minitab 18. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được đánh giá bằng trắc nghiệm phân hạng LSD và Duncan với mức độ tin cậy $P \leq 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định giống dựa trên đặc điểm hình thái và chỉ thị phân tử DNA barcode

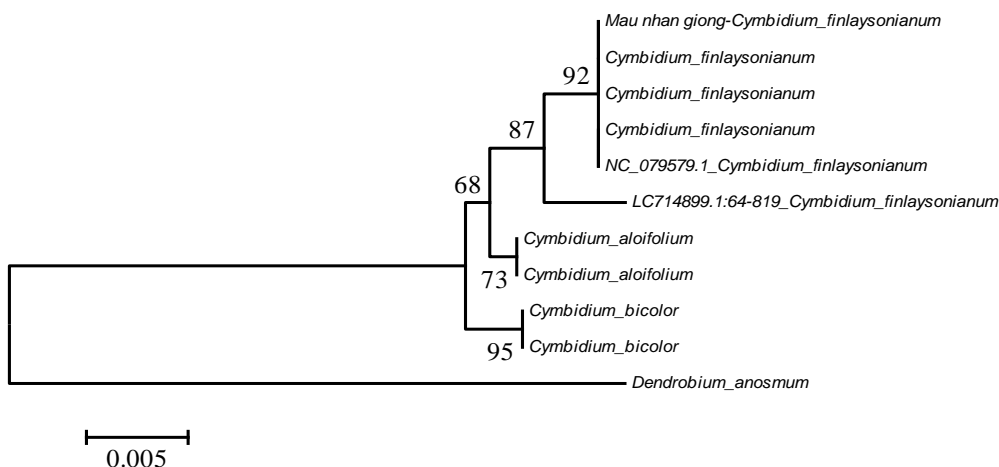
Mẫu giống lan kiếm Tiên vũ sử dụng để tiến hành nhân giống đã được xác định đặc điểm hình thái với kích thước giả hành 48 cm², số lượng lá lúc ra hoa 6 lá/gốc, chiều dài lá 80 cm, chiều rộng lá 4,9 cm, chiều dài phát hoa 80 cm, số lượng hoa/phát hoa 36 hoa/phát hoa, chiều dài hoa 3,8 cm, chiều rộng 1,3 cm, kích thước lưng đài hoa 1x3 cm, kích thước đài bên 1x3 cm, kích thước cánh hoa 1,1x2,1 cm, chiều dài và chiều rộng cánh môi tương ứng 2,5 cm và 0,9 cm có dạng hình cầu, đài hoa và cánh hoa có màu Moderate Yellow (YG161A), cánh môi có màu Brilliant Yellow (Y7A) và White (WNN155C) (theo RHS Colour Chart); di truyền phân tử.



Hình 1. Cây và hoa của mẫu giống lan kiếm Tiên vũ sử dụng để tiến hành nhân giống

Bảng 1. So sánh mức độ tương đồng và mức độ bao phủ của trình tự DNA vùng gen *matK*, ITS2 của mẫu lan kiếm Tiên vũ so với trình tự DNA có sẵn trên Genbank

Mẫu	Vùng gen	Accession	Tên khoa học	Mức độ tương đồng (%)	Mức độ bao phủ (%)
Mẫu nhân giống- <i>Cymbidium finlaysonianum</i>	<i>matK</i>	NC_079579.1	<i>Cymbidium finlaysonianum</i>	99,61	100
		LC714899.1	<i>Cymbidium finlaysonianum</i>	98,64	100



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự DNA vùng gen *matK* của mẫu nhân giống, trình tự một số loài đã được xác định của nhóm nghiên cứu và trình tự tham chiếu trên Genbank

DNA tổng số sau khi tách chiết được định lượng và kiểm tra độ tinh sạch, kết quả thu được tỉ lệ OD260/OD280 là 1,94; nồng độ DNA tổng số là 186,71 ng/μL cho thấy DNA tổng số thu được là tinh sạch đảm bảo cho các bước tiếp theo. Kết quả khuếch đại vùng gen *matK* có kích thước 800 bp. Vùng gen *matK* được giải trình tự bằng phương pháp Sanger, hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC ver 7.1, kiểm tra các sai lệch cho kích thước liên ứng là 764 bp. So sánh trình tự DNA vùng gen *matK* trên ngân hàng Genbank cho thấy có mức độ tương đồng với NC_079579.1-*C. finlaysonianum* là 99,61%. Ngoài ra, kết quả phân tích cây phát sinh loài (Hình 2) cũng cho thấy có sự tương đồng cao và sự phân nhóm chung giữa trình tự DNA của mẫu giống nghiên cứu và trình tự của các mẫu tham chiếu thuộc loài *C. finlaysonianum* trên Genebank đối với vùng gen *matK*. Như vậy, dựa trên kết quả so sánh trình tự gen và trình tự tham chiếu bằng công cụ Blast và kết quả xây dựng cây phát sinh loài đều cho kết quả tương đồng nhau chứng minh mẫu sử dụng nghiên cứu thuộc loài *C. finlaysonianum*. Bên cạnh đó, kết quả mô tả các đặc điểm hình thái (Hình 1) cũng hỗ trợ khẳng định này.

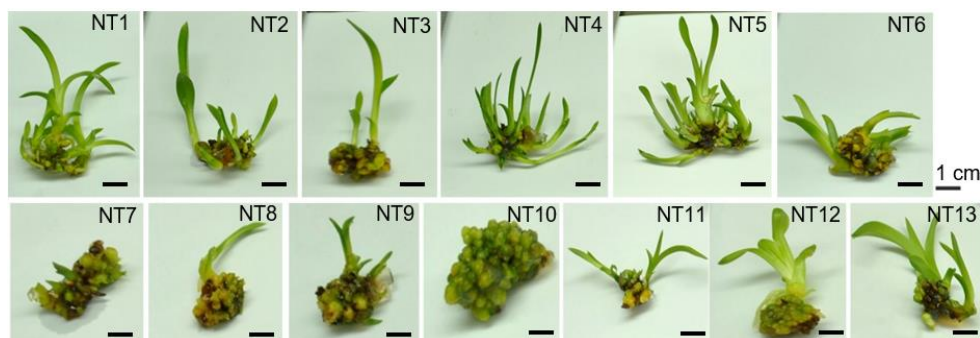
Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên quá trình tái sinh chồi *in vitro*

Chất điều hòa sinh trưởng ở thực vật là thành phần quan trọng nhất trong môi trường nuôi cấy. Có 2 nhóm chất điều hòa sinh trưởng thường được sử dụng trong nhân giống *in vitro* là auxin và cytokinin. NAA là một loại auxin thường được dùng trong nuôi cấy *in vitro*, có tác dụng kích thích sự phân bào và sinh trưởng của mô sẹo hay PLBs. BA là một loại cytokinin được dùng phổ biến trong việc kích thích phân hóa chồi ở nhiều loài thực vật (Schaller *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, BA và NAA được kết hợp sử dụng ở các nồng độ khác nhau để khảo sát khả năng tái sinh chồi từ PLBs lan kiếm Tiên vũ. Kết quả sau 12 tuần nuôi cấy như sau:

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tái sinh chồi *in vitro* của cây lan kiếm Tiên vũ

Nghiệm thức	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Số chồi trung bình (chồi/mẫu)	Khối lượng tươi (g/mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)
NT1	0	0	2,31 ^a	0,86 ^{abc}	0,08 ^{abc}
NT2	0,5	0	1,31 ^{abc}	0,36 ^c	0,04 ^c
NT3	1		1,90 ^{abc}	0,36 ^c	0,03 ^c
NT4	1,5		1,96 ^{abc}	0,62 ^{bc}	0,06 ^{abc}
NT5	2		2,16 ^{ab}	0,71 ^{abc}	0,05 ^{abc}
NT6	0,5		0,1	1,08 ^{abc}	0,49 ^c
NT7	1	0,31 ^{bc}		0,40 ^c	0,05 ^{abc}
NT8	1,5	0,73 ^{abc}		0,41 ^c	0,04 ^c
NT9	2	1,22 ^{abc}		1,47 ^{ab}	0,12 ^{ab}
NT10	0,5	0,2	0,13 ^c	1,55 ^a	0,13 ^a
NT11	1		0,36 ^{bc}	0,50 ^c	0,04 ^{bc}
NT12	1,5		1,22 ^{abc}	1,37 ^{ab}	0,11 ^{abc}
NT13	2		0,84 ^{abc}	1,01 ^{abc}	0,08 ^{abc}
CV %			5,95	5,09	5,10

Chú thích: Những giá trị trong cùng một cột với những mẫu tự a, b, c, d theo sau thì khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ở mức độ 0,05.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên quá trình tái sinh chồi *in vitro* của cây lan Kiếm lá cứng (*Cymbidium* Spp.) sau 12 tuần nuôi cấy

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tái sinh chồi từ PLBs cho thấy ở các nghiệm thức bổ sung BA và NAA ở các nồng độ khác nhau có sự khác biệt thống kê về số chồi hình thành, khối lượng tươi,

khối lượng khô. Trong đó, nghiệm thức bổ sung 2 mg/L BA cho số hình thành cao nhất là 2,16 chồi/mẫu so với các nghiệm thức còn lại. Chồi hình thành từ PLBs sinh trưởng và phát triển đồng đều. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi kết hợp BA và NAA làm giảm khả năng hình thành chồi từ PLBs, cụm PLBs tăng sinh, một số mẫu bắt đầu vàng và chết. Khi kết hợp với 0,2 mg/L BA hoặc 0,1 mg/L NAA số chồi giảm xuống rõ rệt. Khi tăng nồng độ BA lên, số chồi mới dần được cải thiện, tuy nhiên vẫn thấp hơn so với các nghiệm thức chỉ bổ sung BA, có thể giải thích sự có mặt của NAA cũng đã ức chế khả năng tái sinh chồi của cây lan Kiếm Tiên vũ *in vitro*. Nghiên cứu của Park và đồng tác giả (2018) cho thấy môi trường MS bổ sung 20 μ M 2,4D thích hợp cho quá trình tạo cây hoàn chỉnh và môi trường bổ sung 20 μ M 2,4D và 2 μ M TDZ cho khả năng tạo chồi cao nhất với 21,8 chồi/mẫu trên *C. goeringii*. Nguyễn Văn Tiến và đồng tác giả (2020), khi nhân giống *in vitro* lan Kiếm Thanh Ngọc (*C. sinense* var. *alba*) trên môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BAP cho khả năng nhân chồi là tốt nhất với hệ số nhân đạt 5,03 chồi/mẫu, chất lượng chồi tốt xanh đậm và mập. Qua đó, cho thấy cytokinine đóng vai trò chính trong sự hình thành chồi lan kiếm Tiên vũ *in vitro*. Kết quả này cho thấy môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA đơn lẻ, không cần bổ sung auxin NAA, thích hợp nhất cho quá trình tái sinh chồi *in vitro* của cây lan kiếm Tiên vũ.

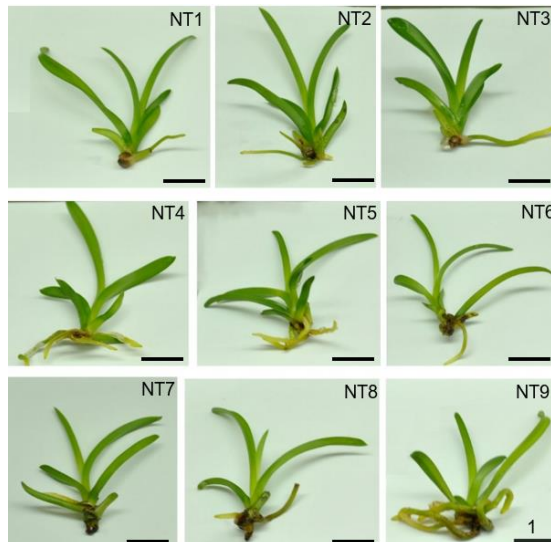
Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Trong quy trình nhân giống *in vitro* giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh là một trong những bước ảnh hưởng đến kết quả ở giai đoạn ra cây ở điều kiện vườn ươm. Trong đó nồng độ và tỉ lệ của chất điều hòa sinh trưởng thực vật auxin có/không có sự kết hợp với cytokinin là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh trong điều kiện *in vitro*. Trong thí nghiệm này, vai trò của auxin NAA ở các nồng độ khác nhau sử dụng độc lập hay kết hợp với 0,2 mg/L BA được đánh giá trong quá trình tạo cây hoàn chỉnh lan kiếm Tiên vũ sau 8 tuần nuôi cấy:

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA, NAA lên quá trình tạo cây *in vitro* của cây lan Kiếm Tiên vũ

Nghiệm thức	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Số rễ trung bình (rễ/cây)	Số lá trung bình (lá/cây)	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng tươi (g/cây)	Khối lượng khô (g/cây)
NT1	0,0	0,0	1,58 ^{ab}	5,31	7,36 ^a	0,90	0,35
NT2	0,5	0,0	2,13 ^{ab}	4,95	6,34 ^{ab}	0,76	0,28
NT3	1,0		1,20 ^b	4,53	5,64 ^b	0,58	0,22
NT4	1,5		2,67 ^a	4,84	6,29 ^{ab}	1,14	0,39
NT5	2,0		2,18 ^{ab}	4,69	5,79 ^b	0,95	0,34
NT6	0,5		0,2	1,07 ^b	5,53	6,14 ^{ab}	0,71
NT7	1,0	1,02 ^b		4,64	6,36 ^{ab}	0,80	0,26
NT8	1,5	1,67 ^{ab}		4,76	6,84 ^{ab}	0,97	0,32
NT9	2,0	2,56 ^a		5,18	5,88 ^b	1,06	0,39
CV %			28,99	13,20	8,61	26,32	29,94

Chú thích: Những giá trị trong cùng một cột với những mẫu tự a, b, c, d theo sau thì khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ở mức độ 0,05.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên quá trình tạo cây *in vitro* của cây lan kiếm Tiên vũ sau 8 tuần nuôi cấy

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng NAA và BA lên quá trình tạo cây lan kiếm Tiên vũ *in vitro* hoàn chỉnh cho thấy nghiệm thức bổ sung NAA ở nồng độ 1,5 mg/L và 2 mg/L cho kết quả cũng như sự sinh trưởng và phát triển tốt nhất so với các nghiệm thức còn lại. Ở nghiệm thức chỉ bổ sung NAA khi tăng nồng độ lên 2 mg/L thì số lượng rễ, số lượng lá, chiều cao cây lại giảm. Tuy nhiên, khi kết hợp giữa NAA và BA thì việc tăng nồng độ NAA lại làm tăng khả năng tạo rễ, nhưng chất lượng cây lại giảm. Nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L NAA thích hợp cho việc tạo cây lan kiếm hoàn chỉnh với số rễ trung bình là 2,67 rễ/cây, số lá trung bình 4,84 lá/cây, chiều cao cây trung bình là 6,29 cm/cây, khối lượng tươi và khối lượng khô trung bình tương ứng là 1,14 g/mẫu và 0,39 g/mẫu, cây sinh trưởng và phát triển tốt. Dương Tấn Nhật và đồng tác giả (2004) cho thấy môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L NAA thích hợp cho việc tạo rễ *in vitro* cây lan kiếm *Cymbidium*. Hossain và đồng tác giả (2009), cho thấy môi trường bổ sung 0,5 mg/L IAA thích hợp cho việc tạo cây hoàn chỉnh. Park và đồng tác giả (2018), cho thấy môi trường MS bổ sung 20 µM 2,4D thích hợp cho quá trình tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả trên cho thấy có sự khác biệt so với một số nghiên cứu trước đây, tuy nhiên đối với mỗi mẫu giống có đặc điểm di truyền khác nhau, nên việc ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh khác nhau. Điều này cho thấy, môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA đơn lẻ, không cần bổ sung BA, thích hợp cho việc tạo cây lan kiếm Tiên vũ *in vitro* hoàn chỉnh.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* lan cho giống lan kiếm Tiên vũ có chứng thực, định danh di truyền bằng chỉ thị phân tử DNA barcode. Trong đó, mẫu giống sử dụng để nhân giống *in vitro* được mô tả hình thái và chứng thực di truyền phân tử bằng trình tự DNA vùng gen *matK*. Đối với giai đoạn tạo chồi, môi trường MS bổ sung BA 2 mg/L thích hợp cho việc tái sinh chồi lan kiếm từ cụm PLBs với số chồi trung bình là 2,16 chồi/mẫu. Đối với giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh, môi trường MS bổ sung NAA 1,5 mg/L thích hợp cho quá trình tạo cây lan kiếm hoàn chỉnh với số rễ trung bình là 2,67 rễ/cây, số lá trung bình 4,84 lá/cây, chiều cao cây trung bình là 6,29 cm/cây. Kết quả trên cho thấy việc định danh và chứng thực bằng chỉ thị phân tử DNA barcode kết hợp với nhân giống *in vitro* sẽ đảm bảo việc cung cấp cây giống có nguồn gốc rõ ràng và chất lượng giống đồng nhất nhằm góp phần nâng cao giá trị giống cung cấp ra thị trường.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Tp Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí theo hợp đồng số 07/2023/HĐ-QKCN ngày 09 tháng 03 năm 2023 giữa Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Tp HCM và Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp Hồ Chí Minh về việc thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ "Nghiên cứu bảo tồn và đánh giá nguồn gen lan kiếm lá cứng (*Cymbidium* spp.) Việt Nam", 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

- Asahina H, Shinozaki J, Masuda K, Morimitsu Y, Satake M (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences. *J Natl Med*, 64: 133-138.
- Hossain MM, Sharma M, Pathak P (2009). Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.–a medicinally important orchid. *Eng Life Sci*, 9: 444-453.
- Nayak NR, Tanaka M, Teixeira da Silva J (2006). Biotechnology of *Cymbidium*-an overview of recent progress and future opportunities. *Floriculture, Ornamental and plant biotechnology: Advances and topical issues*, 4: 558-562.
- Park HY, Kang KW, Kim DH, Sivanesan I (2018). *In vitro* propagation of *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. through direct adventitious shoot regeneration. *Physiol Mol Biol Plants*, 24: 307-313.
- Restanto DP, Santoso B, Kriswanto B, Supardjono S (2016). The application of chitosan for protocorm like bodies (PLB) induction of orchid (*Dendrobium* sp) *in vitro*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9: 462-468.
- Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, 27: 44-63.
- Singh HK, Parveen I, Raghuvanshi S, Babbar SB (2012). The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC res notes*, 5: 42.
- Tao J, Yu L, Kong F, Zhao D (2011). Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe. *Afri J Biotechnol*, 10: 15639-15646.
- Yang J-B, Tang M, Li H-T, Zhang Z-R, Li D-Z (2013). Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses. *BMC evol biology*, 13: 84.

MOLECULAR IDENTIFICATION AND *In vitro* PROPAGATION OF *Cymbidium finlaysonianum*

Nguyen Truong Giang^{1,2}, Nguyen Hoang Cam Tu¹, Nguyen Thi Tu Vy¹,
Nguyen Thi Xuan Hien¹, Huynh Van Biet³, Huynh Huu Duc^{1*}

¹Biotechnology Center Of Ho Chi Minh City

²Faculty of Biological Sciences, Nong Lam university – Ho Chi Minh City

³Research institute for biotechnology and environment, Nong Lam university – Ho Chi Minh City

SUMMARY

Cymbidium finlaysonianum is one of the orchids with high commercial potential, so many wild varieties are collected and exploited from Vietnamese forests. In this study, to develop and commercialize a large number of a *C. finlaysonianum* variety, we characterized this variety both morphological and molecular genetic properties and finding suitable factors for rapid shoot regeneration/bud multiplication as well as complete plant formation. The results showed that the variety used for *in vitro* propagation had been identified with morphological and flower characteristics, the genetic characteristics had a similarity with NC_079579.1-*C. finlaysonianum* of 99.61% when compared *matK* region to Genbank. For rapid shoot regeneration/bud multiplication, MS medium supplemented with 2 mg/L BA was suitable for culturing PLB clusters with an average number of shoots (2.16 shoots/sample), fresh weight (0.71 g/sample), weight dry (0.05 g/sample) values. For root formation, MS medium supplemented with 1.5 mg/L NAA was suitable for creating complete plants with 2.67 roots/plant, 4.84 leaves/plant, fresh weight 1.14 g/sample, and dry weight 0.39 g/sample). These above results show that the identification and authentication using DNA barcode markers combined with *in vitro* propagation will ensure the supply of the plantlets with clear origin and consistent seed quality. This contributes to improving the quality of the plantlets with high-value seeds for the market.

Keywords: *Cymbidium finlaysonianum*, DNA barcode, *matK*, plants growth regulators, PLBs.

* Author for correspondence: Tel: +84 967 137 046; Email: hhduc.snn@tphcm.gov.vn