

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN HỮU THỌ

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO, CÔNG
TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

**Tên luận án: Nghiên cứu tạo một số dòng lan giả
hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) đột
biến bằng phương pháp thực nghiệm.**

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Huế, 2026

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 sulfide (DMS) đến tạo biến dị lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.)**. Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, 467-473.
5. **Nguyễn Hữu Thọ**, Trương Thị Bích Phượng, Hồ Thị Xuân Túy, Phạm Thành, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024). **Nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng**. Tạp chí Đại học Huế, Tập 133, số 1C.
6. **Tho Nguyen Huu**, An Nguyen Hoang, Tuy Ho Thi Xuan, Cuc Nguyen Thi Kim, Phuong Truong Thi Bich (2026). **Establishment of callus-derived polyploid lines for the Purple Gia Hac orchid (*Dendrobium anosmum* Lindl.) via colchicine treatments**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 165(2), 36. <https://doi.org/10.1007/s11240-026-03456-5>



CONSERVATION OF *DENDROBIUM ANOSMUM* LINDL. 'TIM HUE' BY *IN VITRO* PROPAGATION

Nguyen Huu Tho^{1,4}, Nguyen Thi Oanh¹, Truong Thi Bich Phuong², Pham Thanh³,
Hoang Khanh Linh³, and Nguyen Thi Kim Cuc^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam,
*E-mail: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn

²Hue University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue City, Thua Thien Hue, Vietnam

³Hue University of Education, Hue University, 34 Le Loi, Hue City, Thua Thien Hue, Vietnam

⁴College Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam, KV8, Bui Thi Xuan Ward,
Quy Nhon city, Binh Dinh, Vietnam

Abstract

Dendrobium anosmum 'Tim Hue' is a local orchid from the Thua Thien Hue wild forest with typical color and fragrance, needing conservation measures. This study focuses on *in vitro* propagation of 'Tim Hue'. Nodal segments used as initial explants were disinfected in 2% NaClO and 0.1% HgCl₂ for 10 min, resulting in 66.7% aseptic explants. Axillary shoot induction was best (88.9%) in Murashige and Skoog (MS) medium containing 1.5 mg l⁻¹ BAP and shoot multiplication was optimal in the same medium supplemented with 1.5 mg l⁻¹ BAP and 0.5 mg l⁻¹ IAA, with an estimated average of 6.0 shoots with 3.0 cm in length and 4.7 leaves after eight weeks of culture. Also, MS medium supplemented with 1 g l⁻¹ activated charcoal, and 0.7 mg l⁻¹ NAA or 0.5 mg l⁻¹ IAA was found the most efficient medium for the rooting of shoots. 'Tim Hue' plantlets were well acclimatized to the nursery conditions with a survival rate of 97.8% on coconut coir and rice husk coal (1 : 1, w : w) or 95.6% on fern board with sphagnum moss.

Key words: conservation, *Dendrobium anosmum* Lindl. 'Tim Hue', *in vitro* propagation

INTRODUCTION

The overall decline in biodiversity has dramatically increased in recent years, therefore, it is imperative to implement conservation strategies to conserve and propagate plant genetic resources from each geographical area (Deplazes-Zemp 2018). Previously, valuable clonal plants, that have unique characteristics were conserved by traditional vegetative propagation instead of sexual reproduction (Rajasekharan and Sahijram 2015), however these techniques are difficult to mass production of seedlings (Högberg 2003). To overcome the disadvantage of the traditional method, *in vitro* tissue culture has been applied to generate mass plantlets from a few initial explants (Hussain et al. 2012). Commonly, apical meristem or axillary buds, which retain good developmental capacity, were preferred as initial materials to differentiate tissues in *in vitro* propagation (Rajasekharan and Sahijram 2015). So far different crops, flowers, and fruits were successfully micropropagation using artificial media with suitable growth hormone regulators (Hasnain et al. 2022).

Among floral varieties, orchids are famous ornamentals with a global marketing industry, but they are recently at risk of extinction in nature (Zhao et al. 2021). Previously, growing orchids in the wild mainly depended on vegetable regeneration because their seeds lack endosperm and have a very low germination rate (Zhao et al. 2021). To overcome that fact, the micropropagation technique has been successfully applied to generate orchid plantlets from seeds and somatic tissues (Chugh et al. 2009) that are important to the market and maintain the orchid gene pool (Reddy et al. 2020). So far, many orchid species have been successfully cultured by seed germination in aseptic conditions as *Laelia anceps* Lindl. (Ramírez-Mosqueda et al. 2019), *Epidendrum nocturnum* (De Stefano et al. 2022), *Vanda pumila* Hook. f. (Maharjan et al. 2019), *Dendrobium secundum* (Ramasoot et al. 2022), *Dendrobium anosmum* Lindl. (Nguyen et al. 2022b), however, it is valuable to note that the *in vitro* propagation of orchid seeds may generate heterozygous plantlets with chimeric traits. Therefore, some group, recently, tried to

use somatic tissues as initial material to micropropagation of valuable orchid, such as *Dendrobium palpebrae* Lindl. (Bhowmik and Rahman 2020), *D. trankimianum* T. Yukawa (Bing et al. 2018), *Phalaenopsis amabilis* cv. Detroit (Balilashaki et al. 2021).

Vietnam has various native orchids with unique ornamental characteristics, and some of them were propagation and conservation by somatic *in vitro* culture (Bing et al. 2018, Nguyen et al. 2018, Vu et al. 2019). However, it needs to pay more attention to saving natural orchids. *Dendrobium anosmum* 'Tim Hue', originated from Thua Thien Hue wild forest, is an attractive orchid species with violet flowers and a sweet, gentle fragrance. Unfortunately, this orchid is subject to indiscriminate exploitation and is at risk of extinction from wild habitats. Moreover, the ability to propagate 'Tim Hue' in the wild is rare due to the low frequency of seed germination and the infrequent bud development from stocks. Therefore the aim of our study was to study the effect of different plant growth regulators and their concentrations for *in vitro* propagation by axillary shoots and acclimatization of the produced plantlets.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and surface disinfection of the explants

D. anosmum 'Tim Hue' from the wild forest in Thua Thien Hue province, Vietnam was collected and grown in the net house (Institute of Biotechnology, Hue University).

Healthy, disease-free nodal segments about 15-20 cm long of *D. anosmum* 'Tim Hue' were collected in June/July 2021. They were washed under running water, and gently shaken with a diluted commercial soap for 5 min, then rinsed several times with tap water to completely remove the residue of soap. The isolated nodal segments 6-7 cm in length, were placed in a 500 ml Erlenmeyer flask and washed again every 2 min by shaking them in distilled water 2-3 times. Disinfection was carried out using 2% NaClO for 10 min (David et al. 2022), 3% H₂O₂ for 10-20 min (De Stefano et al. 2022), and 0.1% HgCl₂ for 5-10 min (Bing et al. 2018) and a different combination of 2% NaClO, 3% H₂O₂, and 0.1% HgCl₂ (Table 1). Finally, the explants were rinsed with sterile distilled water 3-4 times before embedding in modified plant growth regulators (PGRs)-free MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 100 ml l⁻¹ coconut water; 7 g l⁻¹ agar, 30 g l⁻¹ sucrose, and 60 g l⁻¹ potatoes paste). The nutrient medium was adjusted to pH 5.8 before being autoclaved and then poured into a square-bottomed polypropylene (PP) bag with approximately 70 ml of medium/bag (Nguyen et al. 2022c) and the *in vitro* culture conditions were set at 25 ± 2°C, and photosynthetic photon flux density (PPDF) was between 13.5-27 μmol s⁻¹m⁻² for 8 h/day if not further note.

To evaluate the effect of different factors on disinfection, the percentage of infected explants was counted after a week.

Axillary shoot induction

The disinfected nodal segments were transferred to modified MS medium, and supplemented with 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg l⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) for axillary shoot induction. Three replications, each containing 10 explants were used per treatment. The percentage of regenerated shoots from buds, the number and the average length of shoots were monitored after eight weeks.

Multiplication of shoots

The isolated axillary shoots were cultured in modified MS medium containing mixed treatments of different concentrations (0.0, 0.1, 0.3, 0.5, and 0.7 mg l⁻¹) of indole-3-acetic acid (IAA) and BAP. The shoot proliferation coefficient, average shoot length, number of leaves, and shoot morphology were monitored after 8 weeks of culture.

Shoot proliferation coefficient (H) was calculated as:

$$H = \frac{\text{number of shoots after 8 weeks}}{\text{initial number of nodal segments}}$$

Rooting of adventitious shoots

Adventitious shoots (3-4 leaves and 3-4 cm in length) were excised and cultured to modified MS medium supplemented with α-naphthaleneacetic acid (NAA) (0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, and 1.0 mg l⁻¹) or IAA (0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, and 1.0 mg l⁻¹) and 1 g l⁻¹ activated charcoal (Nguyen et al. 2022b). The rooting ability is determined by the percentage of rooted shoots, the average length, and number of roots after eight weeks.

Each treatment had six replications, and five shoots were used in each replication.

Acclimatization of the plantlets

The plantlets with 4-5 cm in length, 5-6 roots, and 5-6 true leaves were acclimated in a net house covered with a plastic roof and sun mesh shade to maintain PPDF between 18.5-37 μmol s⁻¹m⁻², earthen floor with tarps, and equipped with an irrigation system to produce mist which helps to maintain the temperature in the range 25-32°C. All plants in aseptic culture bags were hung on cloth ropes in the net house for two weeks before taking out and planting in different substrates (Teixeira da Silva et al. 2017). After acclimatization of plantlets in the aseptic condition in the net house for two weeks, the agar-containing medium was removed from the roots by washing in tap water, and the plantlets were planted in mixed coconut coir and rice husk charcoal (1 : 1, w : w; CT1) (Nguyen et al. 2021); coconut coir and sphagnum moss (1 : 1, w : w; CT2); coconut

coir and pine bark (1 : 1, w : w; CT3); sphagnum moss (CT4); Coconut coir (CT5); fern board (20 × 15 cm) with sphagnum moss (Kang et al. 2020) (CT6) or Star apple wood board (20 × 15 cm) with sphagnum moss (Pradhan et al. 2014) (CT7). After 12 weeks, the survival rate, stem length and diameter, number of leaves, leaf size, shape, and color of plantlets were monitored. Three replications, each containing 10 plantlets were used per treatment. Stem length was measured from the base to the tallest leaf using a straight ruler (Nguyen et al. 2022c).

Statistical analysis

The data were analyzed by Microsoft Excel 2019 and IBM SPSS Statistics 26 software. The LSD standard (for a reliability of 95%), and ANOVA (Duncan's test) for each treatment were calculated to evaluate the significance of differences.

RESULTS AND DISCUSSION

Disinfection of nodal segments

The combination of 2% NaClO and 0.1% HgCl₂ for 10 min (CT6), was the best for decontaminant of initial explants, of which the disinfection rate reached 66.7%, while 11.1% and 22.2% were infected or dead, respectively. The treatments with 2% NaClO alone (CT1) or mixed with 3% H₂O₂ at 10 min (CT2), 15 min (CT3), and 20 min (CT4) showed a high ratio of infected and dead explants, of which CT1 and CT2 had no clean and viable explants, CT3, and CT4 gradually increased clean sample rate with 11.1 and 33.3%, respectively; whereas the infection rate reduced from 100% (CT1) to 88.9% (CT2), 66.7% (CT3) and 44.4% (CT4) and death rate increased from 0 (CT1), to 11.1% (CT2), 22.2% (CT3 and CT4). Notably, 2% NaClO mixed with 0.1% HgCl₂ at 15 min (CT7) had the lowest infected rate (4.6%) but the highest death rate (64.1%) whereas 2% NaClO mixed with 0.1% HgCl₂ at 5 min (CT5) had lower death rate (11.1%) but high infection rate (66.7%) (Table 1). This result suggested

that the 2% NaClO and 0.1% HgCl₂ combination was better for disinfection than 2% NaClO and 3% H₂O₂, but the long-term exposure to HgCl₂ could be toxicity or induced tissue degeneration leading to an increased number of dead explants (Table 1). Our results were consistent with the observation of Hashim et al. (2021) who performed the similar experiment in *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau.

Previously, many researchers focused on the *in vitro* propagation of *Dendrobium* but few reports use somatic tissues to produce plantlets (Teixeira Da Silva et al. 2016, Deb and Jakha 2020, Nguyen and Nguyen 2021 Nguyen et al. 2022b,c). Among the reports, NaOCl, EtOH, and HgCl₂ are the main disinfection reagents (Asghar et al. 2011, Dohling et al. 2012, Priya Kumari et al. 2013, Winarto et al. 2013, Ju et al. 2016). Dohling et al. (2012), reported that *D. longicornu* Lindl. was successfully disinfected in 10% NaClO for 10 min and 0.1% HgCl₂ for 2 min and a survival rate of explants was nearly 90%. Similarly, the study from the Winarto et al. (2013) showed that 1% Tween 20 and 0.05% HgCl₂ were sufficient to remove infections from *D. zahra* FR62 with up to 87% of explants surviving. Recently, Ju et al. (2016) reported that *D. candidum* Wall ex Lindl. had a survival rate reaching 97% after treatment with 70% EtOH and 0.1% HgCl₂. Compared to the reports of Dohling et al. (2012), Winarto et al. (2013), and Ju et al. (2016), our result had a lower aseptic survival rate. However, this phenomenon may due to 'Tim Hue' was collected from a wild forest and being contaminated seriously with microorganisms, particularly fungi which are tough to treat, and the explants are more sensitive to HgCl₂ than other *Dendrobium* species (Xing et al. 2011, Wang et al. 2022).

Regeneration of axillary shoots

On the plant growth regulators (PGRs)-free medium, the axillary shoot induction rate, number of shoots, and shoot length were the lowest, reaching 12.7%, 0.7 shoots with 0.6 cm, respectively (CT1). The shoot regeneration rate gradually increased according to

Table 1. Effect of disinfectant and disinfection time on the survival rate of *D. anosmum* 'Tim Hue'.

Treatment	Disinfection time (min)			Aseptic explants (%)	Infected explants (%)	Dead explants (%)
	2% NaClO	3% H ₂ O ₂	0.1% HgCl ₂			
CT1	10	-	-	0.0 ± 0.1 e	100.0 ± 0.1 f	0.0 ± 0.0 a
CT2	10	10	-	0.0 ± 0.0 e	88.9 ± 2.6 e	11.1 ± 2.6 b
CT3	10	15	-	11.1 ± 2.0 d	66.7 ± 2.0 d	22.2 ± 1.0 c
CT4	10	20	-	33.3 ± 2.0 b	44.4 ± 2.2 c	22.2 ± 0.6 c
CT5	10	-	5	22.2 ± 2.6 c	66.7 ± 2.4 d	11.1 ± 0.6 b
CT6	10	-	10	66.7 ± 1.5 a	11.1 ± 1.1 b	22.2 ± 0.9 c
CT7	10	-	15	31.3 ± 1.9 b	4.7 ± 0.9 a	64.1 ± 1.6 d

Means ± standard errors; within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

Table 2. Effect of BAP on axillary shoot regeneration from nodal explants after 8 weeks in culture.

Treatment	BAP (mg l ⁻¹)	Shoot regeneration (%)	Number of shoots	Shoot length (cm)
CT1	0.0	12.7 ± 1.1 e	0.7 ± 0.1 e	0.6 ± 0.1 c
CT2	0.5	33.3 ± 1.4 d	1.0 ± 0.1 d	0.8 ± 0.1 bc
CT3	1.0	44.4 ± 1.3 c	1.3 ± 0.1 c	1.0 ± 0.1 b
CT4	1.5	88.9 ± 2.1 a	2.3 ± 0.1 a	1.6 ± 0.2 a
CT5	2.0	55.6 ± 1.8 b	1.7 ± 0.1 b	1.1 ± 0.1 b

Means ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

the concentration of 0.5 mg l⁻¹ BAP (CT2), and 1 mg l⁻¹ (CT3) with values of 33.3%, and 44.4% respectively, and the concentration of 1.5 mg l⁻¹ BAP was the best for induction of axillary shoots, which reached 88.9% with an average of 2.3 shoots and 1.6 cm in length (CT4) (Table 2, Fig. 1). However, the shoot formation rate decreased to 55.6% with an average of 1.7 shoots and 1.1 cm in length at 2.0 mg l⁻¹ BAP (CT5), which suggested that overdose inhibit shoot production (Table 2, Fig. 1).

BAP concentration for shoot induction in our study was much lower than that reported by Asghar et al. (2011), who showed that 2 mg l⁻¹ BAP was the best concentration for shoot regeneration of *D. nobile* 'Emma White'. Moreover, our results were also different from the study of Pradhan et al. (2013) and Chen et al. (2014), who reported that MS basal medium supplemented with 2.0 mg l⁻¹ BAP and 0.5 mg l⁻¹ NAA; and 2.0 mg l⁻¹ BAP and 0.1 mg l⁻¹ NAA was optimal for the shoot regeneration of *D. densiflorum* Lindl. and *D. officinale* 'Kimura et Migo', respectively. In the optimal conditions, the average shoot number and length of *D. densiflorum* reached 4 and 2.9 cm, respec-

tively (Pradhan et al. 2013), which was almost double the results in our experiment. The results suggest that different types of PGRs and *Dendrobium* species are important in axillary shoot formation. Furthermore, in the study by Nguyen et al. (2021), it was determined that a modified MS medium supplemented with 1 mg l⁻¹ BAP was good for the shoot regeneration of protocorm-like bodies from *D. anosmum* originating from Lam Dong province. Similarly, the publication of Nguyen et al. (2022b) showed that protocorm-like bodies of *D. thyrsiflorum* Rchb. f. ex André well formed shoots in modified MS medium plus 0.4 mg l⁻¹ BAP. Hence, it is suggested that BAP is suitable for shoot regeneration of *Dendrobium*, but the optimal concentration depends on orchid species.

Multiplication of axillary shoot

It was found that 1.5 mg l⁻¹ BAP could be sufficient to induce shoot proliferation (2.3 shoots) and development (1.7 cm in length, 0.3 cm shoot diameter, and with 2 leaves) (Table 3). The presence of 1.5 mg l⁻¹ BAP and IAA in the media gradually induce a higher number of shoots according to IAA concentration and

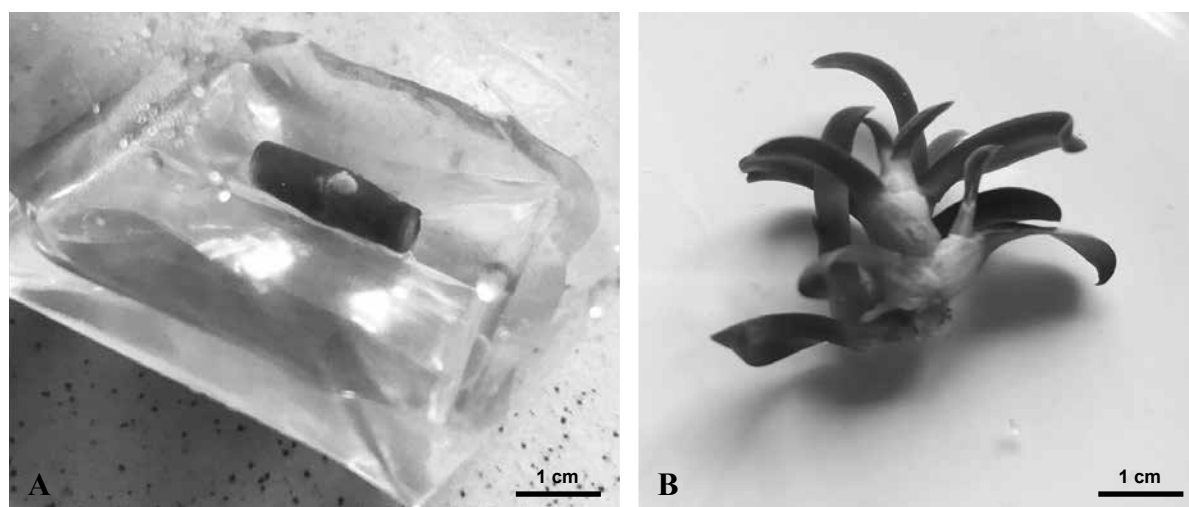


Fig. 1. In vitro shoot regeneration from nodal segments of *D. anosmum* 'Tim Hue'. A) In vitro shoot regeneration from nodal segments of *D. anosmum* 'Tim Hue' after 2 weeks, B) In vitro shoot regeneration from nodal segments of *D. anosmum* 'Tim Hue' after 8 weeks.

Table 3. Effects of BAP and IAA on axillary shoots formation of *D. anosmum* ‘Tim Hue’.

Treatment	BAP (mg l ⁻¹)	IAA (mg l ⁻¹)	Numbers of shoots	Shoot length (cm)	Shoot diameter (cm)	Number of leaves	Shoot color
Control	0.0	0.0	1.1 ± 0.1 e	1.2 ± 0.1 d	0.2 ± 0.0 c	2.0 ± 0.2 c	yellowish green
CT1	1.5	0.0	2.3 ± 0.3 d	1.7 ± 0.1 c	0.3 ± 0.0 c	2.0 ± 0.2 c	light green
CT2	1.5	0.1	3.3 ± 0.3 c	2.1 ± 0.1 b	0.4 ± 0.0 b	3.7 ± 0.2 b	light green
CT3	1.5	0.3	4.3 ± 0.3 b	2.4 ± 0.1 b	0.4 ± 0.0 b	4.3 ± 0.3 a	dark green
CT4	1.5	0.5	6.0 ± 0.3 a	3.0 ± 0.1 a	0.5 ± 0.0 a	4.7 ± 0.2 a	dark green
CT5	1.5	0.7	3.7 ± 0.3 bc	2.1 ± 0.1 b	0.4 ± 0.0 b	3.7 ± 0.2 b	light green

Means ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan’s multiple range test at $p \leq 0.05$.

the best results were observed when the concentration of IAA reaches 0.5 mg l⁻¹. The maximum number of leaves (4.7), the longest shoots (3.0 cm), the best shoot diameter (0.5 cm), and the highest number of shoots (6) were obtained at the combination of 1.5 mg l⁻¹ BAP and 0.5 mg l⁻¹ IAA (CT4, Fig. 2), but lower concentrations of IAA resulted in decreasing of shoot numbers, shoot length, shoot diameter, and number of leaves (CT2 and CT3), respectively. Notably, in combination with 1.5 mg l⁻¹ BAP and 0.7 mg l⁻¹ IAA (CT5), the proliferation and development of shoots were comparable with CT3 (Table 3).

Auxin and cytokinin are the main growth regulators in plant development, and determining their particular ratios in different stages of plantlet development is important. Some previous reports indicated that a higher ratio of cytokinin compared to auxin promotes the induction and multiplication of shoots (Su et al. 2011). In terms of *in vitro* proliferation of *Dendrobium* species, some papers reported that the addition of BAP

was sufficient for the multiplication of shoots (Dang et al. 2018, Pham et al. 2018, Le et al. 2020) although different varieties have different optimal concentrations of the PGRs. Our results showed that BAP alone could induce the shoots proliferation, however, the multiplication rate was lower than those mixed with IAA. Of the different combination of PGRs also used in multiplication of shoot, Nguyen et al. (2022b) indicated that mixture of BAP and KIN was suitable for rapid multiplication of *D. thysiflorum*, while Maharjan et al. (2020) suggested that KIN and GA₃ combination was effectively stimulated *D. chryseum* Rolfe shoots multiplication. Moreover, the combination of KIN and NAA was the best to induce rapid multiplication of *D. heterocarpum* Wall. ex. Lindl. shoots (Longchar and Deb 2022). Hence, our results and published papers indicated that PGRs are crucial to the multiplication of orchid shoots. However, PGRs and their mixture should be carefully selected in order to obtain the best results.

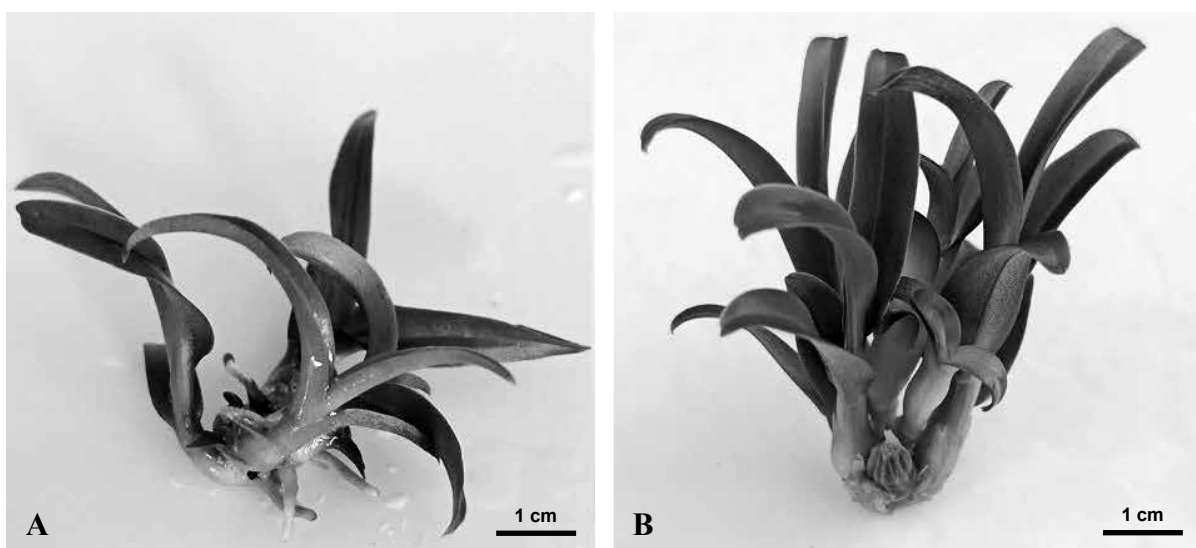


Fig. 2. Multiplication of shoots after 8 weeks of culture. A) PGRs-free medium, B) Culture medium supplemented with 1.5 mg l⁻¹ BAP and 0.5 mg l⁻¹ IAA.

Table 4. Effect of IAA and NAA on the rooting ability of *D. anosmum* 'Tim Hue' shoots.

Treatment	Auxin (mg l ⁻¹)		Rooting rate (%)	Number of roots	Root length (cm)
	IAA	NAA			
CT1	0.00	0.00	100.0 ± 0.0	1.6 ± 0.2 e	1.2 ± 0.1 f
CT2	0.10	0.00		2.7 ± 0.3 d	1.5 ± 0.3 ef
CT3	0.30	0.00		3.2 ± 0.4 cd	1.8 ± 0.3 de
CT4	0.50	0.00		4.3 ± 0.3 ab	3.2 ± 0.2 b
CT5	0.70	0.00		3.7 ± 0.4 bc	2.6 ± 0.1 c
CT6	1.00	0.00		3.3 ± 0.4 cd	1.9 ± 0.2 de
CT7	0.00	0.10		2.5 ± 0.3 d	1.7 ± 0.2 de
CT8	0.00	0.30		2.9 ± 0.2 cd	2.4 ± 0.2 c
CT9	0.00	0.50		3.3 ± 0.2 cd	3.4 ± 0.2 b
CT10	0.00	0.70		4.6 ± 0.4 a	4.0 ± 0.2 a
CT11	0.00	1.00		3.1 ± 0.3 cd	2.2 ± 0.1 cd

Means ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

Rooting of axillary shoots

In fact, 100% of shoots had roots after 8 weeks of culture (Table 4). The roots were generated in PGRs-free medium, supplemented with 1 mg l⁻¹ charcoal (CT1), but only 1.6 roots were observed, and the length reached 1.2 cm (Table 4, Fig. 3). Both IAA and NAA could induce rooting, and the best results were observed in medium with 0.5 mg l⁻¹ IAA (CT4) or 0.7 mg l⁻¹ NAA (CT10), in which 4.3 and 4.6 roots were formed, respectively (Fig. 3). In the presence of 0.1 mg l⁻¹ (CT2), 0.3 mg l⁻¹ (CT3) IAA or 0.1 mg l⁻¹ (CT7), 0.3 mg l⁻¹ (CT8), 0.5 mg l⁻¹ (CT9) NAA the root numbers and shoot length gradually increased following auxin concentration. However, the higher concentration of

IAA (0.7 mg l⁻¹) or NAA (1 mg l⁻¹) reduced root number and root length compared to those of 0.5 mg l⁻¹ IAA and 0.7 mg l⁻¹ NAA (Table 4). Thus, our study demonstrated that IAA and NAA are crucial to generate *D. anosmum* 'Tim Hue' root.

There have been studies on the effect of NAA (Bing et al. 2018, Dang et al. 2018, Le et al. 2020, Tian et al. 2022) or IAA (Bijaya Pant and Thapa 2012, Pham et al. 2018) for rooting of *Dendrobium* shoots. Bijaya Pant and Thapa (2012) screened different concentrations of IAA, IBA, and NAA for rooting of *D. primulinum* Lindl. shoots and found that 0.5 mg l⁻¹ IAA in MS medium was the best. On the other hand, Pham et al. (2018) suggested that the hybrid *D. caesar* (*D. striaenopsis* M. A. Clem.

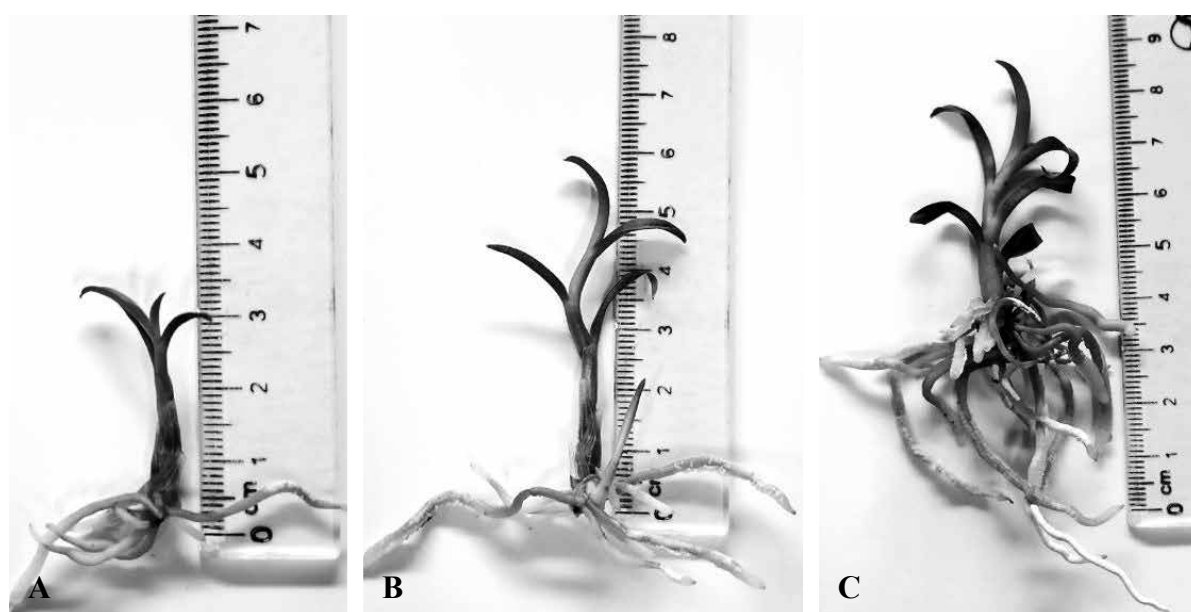


Fig. 3. Effect of auxins on rooting of *D. anosmum* 'Tim Hue' shoots. A) Control, B) Using 0.5 mg l⁻¹ IAA, C) Using 0.7 mg l⁻¹ NAA.

Table 5. Effect of media on the growth of *in vitro* plantlets of *D. anosum* ‘Tim Hue’ in the nursery.

Treatment	Surviving plantlets (%)	Length (cm)	Diameter (cm)	Number of leaves	Width of leaves (cm)	Length of leaves (cm)	New leaves
Initial plantlet	-	5.2 ± 0.5 d	0.3 ± 0.0 d	5.5 ± 0.4 c	0.6 ± 0.1 e	3.2 ± 0.2 e	0.0 ± 0.0 c
CT1	97.8 ± 0.4 a	9.9 ± 0.3 a	0.9 ± 0.0 a	11.3 ± 0.4 a	1.5 ± 0.0 a	5.0 ± 0.2 a	5.8 ± 0.2 a
CT2	90.7 ± 1.7 b	7.5 ± 0.6 c	0.6 ± 0.0 c	9.5 ± 0.2 b	1.3 ± 0.1 cd	3.8 ± 0.2 d	4.1 ± 0.2 b
CT3	87.7 ± 1.3 bc	7.7 ± 0.8 c	0.7 ± 0.0 b	9.5 ± 0.4 b	1.4 ± 0.1 ab	4.3 ± 0.2 c	4.0 ± 0.3 b
CT4	80.7 ± 1.8 d	7.8 ± 0.5 c	0.7 ± 0.0 b	9.1 ± 0.2 b	1.2 ± 0.0 d	4.1 ± 0.1 cd	3.6 ± 0.2 b
CT5	85.9 ± 1.5 c	7.6 ± 0.2 c	0.7 ± 0.0 b	9.3 ± 0.2 b	1.2 ± 0.0 d	4.2 ± 0.1 cd	3.8 ± 0.2 b
CT6	95.6 ± 0.5 a	9.3 ± 0.4 ab	0.8 ± 0.0 a	10.7 ± 0.3 a	1.4 ± 0.0 ab	4.7 ± 0.1 ab	5.3 ± 0.2 a
CT7	88.9 ± 1.2 bc	8.3 ± 0.3 bc	0.5 ± 0.0 d	9.1 ± 0.3 b	1.3 ± 0.0 cd	4.4 ± 0.1 bc	3.7 ± 0.2 b

Means ± standard errors; within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan’s multiple range test at $p \leq 0.05$.

Legend: CT1: Coconut coir : Rice husk coal (1 : 1, ratio, w : w); CT2: Coconut coir : sphagnum moss (1 : 1, ratio, w : w); CT3: Coconut coir : pine bark (1 : 1, ratio, w : w); CT4: Sphagnum moss (100%); CT5: Coconut coir (100%); CT6: Mounted on the fern board (20 × 15 cm) with sphagnum moss.; CT7: Mounted on Star apple wood (20 × 15 cm) with sphagnum moss.

et *D. L. Jones* × *D. stratiotes* Rehb. f.) plantlets could strongly root in Knudson (1946) medium supplemented with 0.5 mg l⁻¹ active charcoal and 1 mg l⁻¹ IAA. The rooting rate of ‘Tim Hue’ shoots in modified MS medium plus active charcoal was 100% in CT1 (Table 4), which is similar to those reports by other research-

ers who suggested that rooting of *D. anosum* and *D. thyrsoiflorum* also occurred in the PGR-free medium (Nguyen et al. 2022b,c). Hence, the result suggested that ‘Tim Hue’ shoots could root in PGRs-free media, serving as a critical points in production of seedlings with reducing cost.



Fig. 4. Effect of the substrate on acclimatization of the *in vitro* produced plantlets of *D. anosum* ‘Tim Hue’.

Acclimatization of plantlets

The artificial substrate for transplanting has a great influence on the survival ability and growth process of *in vitro*-produced plantlets. The best survival rate (%), plant length (cm), plant diameter (cm), number of leaves, leaves width and length (cm), and new leaves were obtained in CT1 (coconut coir and rice husk coal, 1 : 1, w : w and CT6 (fern board). The results were 97.8%, 9.9 cm, 0.9 cm, 11.3 leaves, 1.5 cm, 5.0 cm, 5.8 leaves (CT1), and 95.6%, 9.3 cm, 0.8 cm, 10.7 leaves, 1.4 cm, 4.7 cm, 5.3 leaves (CT6), respectively (Table 5, Fig. 4). In other treatments (CT2, CT3, CT4, CT5, CT7), these parameters were lower than treatment CT1, CT6 but the survival rate was over 80%.

The survival rate of 'Tim Hue' in this study ranged from 80 to 97.83%, which was consistent with the study of Nguyen et al. (2022c), who reported 94.8% of *D. thyrsiflorum* on sphagnum moss-covered fern substrates. In contrast, Nguyen (2021) reported that *D. anosmum* seedlings had a low survival rate (40-86.67%) on the single type or mixture of sphagnum moss, coconut coir, and charcoal (Nguyen 2021). The reason could be due to the differences in weather, care regimes, humidity, and moisture content of substrates (Mežaka et al. 2023)

The highest survival rate of *D. anosmum* 'Tim Hue' in the mixture of coconut fiber and rice husk charcoal (1 : 1) was 97.8% after 12 weeks, which was quite similar to the results published by Le et al. (2022), who found 93.5% survival of *D. anosmum* 'Quang Tri' at the same substrate. Moreover, 'Tim Hue' and *D. thyrsiflorum* Rchb.f. ex Andre grew well the fern board with sphagnum moss with survival rate 95.6% and 94.8, respectively. Our study suggested that 'Tim Hue' grew well in a mixture of 2 substrates, however the mixture of more substrates was also good for the growth of *in vitro* seedlings since Tikendra et al. (2018) showed that *D. thyrsiflorum* reached 91% survival in a mixture of brick, charcoal, and coconut coir (1 : 1 : 1). Thus, substrates or their mixture could differ but they should help to maintain ventilation and moisture, which are necessary to successfully train plant *in vitro* seedlings (Min and Oh 2020).

Acknowledgement: The authors appreciate Dr. Derek Wilkinson from Biocev, Charles University in Prague for the English editing of the manuscript.

REFERENCES

- ASGHAR S., AHMAD T., HAFIZ I. A., YASEEN M. (2011). *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. African Journal of Biotechnology, 10: 3097-3103.
- BALILASHAKI K., ZAKIZADEH H., OLFAFI J.-A. (2021). The study of large scale *Phalaenopsis amabilis* cv. Detroit plantlets production through *in vitro* culture of the vegetative organs. Iranian Journal of Horticultural Science, 52: 689-699.
- BHOWMIK T. K., RAHMAN M. M. (2020). Micropropagation of commercially important orchid *Dendrobium palpebrae* Lindl. through *in vitro* developed pseudobulb culture. Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics, 3: 225-232.
- BIJAYA PANT, THAPA D. (2012). *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. African Journal of Biotechnology, 11: 9970-9974.
- BING H. N., DANG T. T., TRAN V. T., QUACH VAN H., VU C. K., NONG V. D. (2018). *In vitro* propagation of the new orchid *Dendrobium trankimianum* T. Yukawa. Vietnam Journal of Biotechnology, 16: 649-657.
- CHEN B., TRUEMAN S. J., LI J., LI Q., FAN H., ZHANG J. (2014). Micropropagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium officinale*. Life Science Journal, 11: 526-530.
- CHUGH S., GUHA S., RAO I. U. (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae, 122: 507-520.
- DANG T. T., H'YON N. B., NGUYEN T. T. H., DINH V. K., NONG V. D., TRAN T. V., QUACH V. H., VU K. C. (2018). Micropropagation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl. Journal of Biotechnology, 16: 127-135.
- DAVID D., RUSDI N. A., MOHD MOKHTAR R. A., MOHD FAIK A. A., GANSAU J. A. (2022). Establishment of *in vitro* regeneration protocol for Sabah's Jewel orchid, *Macodes limii* J. J. Wood et Lamb. Horticulturae, 8: 155-165.
- DEPLAZES-ZEMP A. (2018). 'Genetic resources' an analysis of a multifaceted concept. Biological Conservation, 222 (December 2017): 86-94.
- DE STEFANO D., COSTA B. N. S., DOWNING J., FALLAHI E., KHODDAMZADEH A. A. (2022). *In-vitro* micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements. American Journal of Plant Sciences, 13: 380-393.
- DEB C. R., JAKHA H. Y. (2020). Factors affecting asymbiotic immature seed culture and *in vitro* propagation of *Paphiopedilum insigne* (Wall. ex Lindl.) Pfitzer - a horticultural important vulnerable orchid. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, 21: 129-141.
- DOHLING S., KUMARIA S., TANDON P. (2012). Multiple shoot induction from axillary bud cultures of the medicinal orchid, *Dendrobium longicornu*. AoB Plants, 2012, pls032.
- HASHIM S. N., GHAZALI S. Z., SIDIK N. J., CHIA-CHAY T., SALEH A. (2021). Surface sterilization method for reducing contamination of *Clinacanthus nutans* nodal explants intended for *in-vitro* culture. In: Guéhot S., Houlbert I. (Eds). E3S Web of Conferences, 306: 1-8.

- HASNAIN A., NAQVI S. A. H., AYESHA S. I., KHALID F., ELLAHI M., IQBAL S., HASSAN M. Z., ABBAS A., ADAMSKI R., MARKOWSKA D. (2022). Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1-21.
- HÖGBERG K.-A. (2003). Possibilities and limitations of vegetative propagation in breeding and mass propagation of Norway spruce. *In: Högborg K.-A. (Ed.). Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Silvestria*, 249: 1-41.
- HUSSAIN A., QARSHI I. A., NAZIR H., ULLAH I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. *In: Leva A., Rinaldi L. M. R. (Eds). Recent Advances in Plant In Vitro Culture. IntechOpen*: 1-28.
- JU S. M., ZHU W. L., WANG W. L., GAO Y., MA T. (2016). Direct regeneration of seedling from stem fragments of *Dendrobium candidum*. *Journal of Gansu Agricultural University*, 51: 45-48 (in Chinese with English abstract).
- KANG H., KANG K. W., KIM D. H., SIVANESAN I. (2020). *In vitro* propagation of *Gastrochilus matsuran* (Makino) Schltr., an endangered epiphytic orchid. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9: 524-534.
- KNUDSON L. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217.
- LE L. T., NGUYEN Q. T. T., LAM T. N. T., NGUYEN T. D., NGUYEN P. H., TRUONG P. B. T. (2020). A research on *in vitro* propagation of *Dendrobium adastra*. *In: Hai T. T. H., Huy N. D., Binh L. T., Minh N. N., Xo D. H., Phuong T. T. B., Dung T. Q., Thuy D. T. B., Binh T. D. (Eds). National Biotechnology Conference. Hue University Publishing House*: 897-902.
- LE V. T., TRUONG N. L. T., NGUYEN T. B. T., NGUYEN D. T., NGUYEN O. T., NGUYEN C. K. T. (2022). *In vitro* propagation of *Dendrobium anosmum* mutation. *Hue University Journal of Natural Sciences*, 131: 5-15.
- LONGCHAR T. B., DEB C. R. (2022). 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 Journal of Botany*, 149: 67-78.
- MAHARJAN S., PRADHAN S., THAPA B. B., PANT B. (2019). *In vitro* propagation of endangered orchid, *Vanda pumila* Hook. f. through protocorms culture. *American Journal of Plant Sciences*, 10: 1220-1233.
- MAHARJAN S., THAKURI L. S., THAPA B. B., PRADHAN S., PANT K. K., JOSHI G. P., PANT B. (2020). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Dendrobium chryseum* Rolfe from protocorms culture. *Nepal Journal of Science and Technology*, 19: 39-47.
- MEŽAKA I., KĻAVIŅA D., KAĻĀNE L., KRONBERGA A. (2023). Large-scale *in vitro* propagation and *ex vitro* adaptation of the endangered medicinal plant *Eryngium maritimum* L. *Horticulturae*, 9: 271-292.
- MIN S. Y., OH W. (2020). Effects of nutrient solution application methods and rhizospheric ventilation on vegetative growth of young moth orchids without a potting medium in a closed-type plant factory. *Journal of People, Plants, and Environment*, 23: 545-554.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- NGUYEN T. T., NGUYEN T. D., DAO X. T., CHU T. D., NGO X. B. (2018). *In vitro* propagation of a Vietnam Endemic lady's slipper orchid (*Paphiopedilum vietnamense* O. Gruss & Perner). *Journal of Horticulture and Plant Research*, 1: 1-8.
- NGUYEN D. M. T. (2021). The process of micropropagation *Dendrobium anosmum*. *AGU International Journal of Sciences*, 27: 73-82.
- NGUYEN D. T., NGUYEN O. T., HO T. T., NGUYEN T. H., NGUYEN C. K. T. (2021). Cultivation of *Dendrobium anosmum* Di Linh from *in vitro* seedlings. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 130: 107-115.
- NGUYEN D. T., NGUYEN O. T., HO T. T., NGUYEN T. H., LA H. T. T., NGUYEN C. K. T. (2022a). Effects of hormone and fertilizers on early flower induction of *Dendrobium anosmum* hybrid seedlings under *ex vitro* condition. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10: 1168-1179.
- NGUYEN H. T., DINH S. T., NINH T. T., NONG H. T., DANG T. T. T., KHUAT Q. V., DANG A. T. P., LY M. T., KIRAKOSYAN R. N., KALASHNIKOVA E. A. (2022b). *In vitro* propagation of the *Dendrobium anosmum* Lindl. collected in Vietnam. *Agronomy*, 12: 324-338.
- NGUYEN O. T., NGUYEN D. T., NGUYEN T. H., NGUYEN C. K. T. (2022c). Optimal condition for propagation and growing of *Dendrobium thyrsoiflorum*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10: 524-532.
- NGUYEN Y. H. T., NGUYEN H. T. (2021). Study on *in vitro* propagation of *dendrobium asomum* Lindl. distribute in thai nguyen province. *TNU Journal of Science and Technology*, 226: 39-46.
- PHAM Q. M., DUONG K. C., QUACH P. N. D., HOANG M. T. T. (2018). Micropropagation and nursery at garden of *Dendrobium caesar*. *VNUHCM Journal of Natural Sciences*, 23: 14-22.
- PRADHAN S., PAUDEL Y. P., PANT B. (2013). Efficient regeneration of plants from shoot tip explants of *Dendrobium densiflorum* Lindl., a medicinal orchid. *African Journal of Biotechnology*, 12: 1378-1383.
- PRADHAN S., TIRUWA B., SUBEDEE B. R., PANT B. (2014). *In vitro* germination and propagation of a

- threatened medicinal orchid, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. through artificial seed. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4: 971-976.
- PRIYA KUMARI I., SABINA GEORGE T., RAJMOHAN K. (2013). Influence of plant growth regulators on *in vitro* clonal propagation of *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'. *Journal of Bio Innovation*, 2: 51-58.
- RAJASEKHARAN P. E., SAHIJRAM L. (2015). *In vitro* conservation of plant germplasm. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. V. (Eds). *Plant Biology and Biotechnology, Volume II, Plant Genomics and Biotechnology*. Springer India: 417-443.
- RAMASOOT S., WEERAPONG M., KEAWSAAD Y., RITCHUAY S., ROTDUANG P. (2022). Enhance efficiency propagation and conservation of Toothbrush Orchid *in vitro*. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 9: 15-23.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA M. A., CRUZ-CRUZ C. A., ATLAHUA-TEMOXTE J., BELLO-BELLO J. J. (2019). *In vitro* conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. *South African Journal of Botany*, 121: 219-223.
- REDDY J., SHAJU A., JOSE A., BETTY A., YARMICHON, H. (2020). Plant growth regulators used for *in vitro* micropropagation of orchids: a research review. *International Journal of Biological Research*, 8: 37-42.
- SU Y.-H., LIU Y.-B., ZHANG X.-S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4: 616-625.
- TEIXEIRA DA SILVA J. A., WINARTO B., DOBRÁNSZKI J., CARDOSO J. C., ZENG S. (2016). Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium in vitro* culture. *Folia Horticulturae*, 28: 57-75.
- TEIXEIRA DA SILVA J. A., HOSSAIN M. M., SHARMA M., DOBRÁNSZKI J., CARDOSO J. C., ZENG S. (2017). Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3: 110-124.
- TIAN J., JIANG W., SI J., HAN Z., LI C., CHEN D. (2022). Developmental characteristics and auxin response of epiphytic root in *Dendrobium catenatum*. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1-15.
- TIKENDRA L., AMOM T., NONGDAM P. (2018). Effect of phytohormones on rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb. f.: an endangered medicinal orchid. *Pharmacognosy Magazine*, 14: 495-500.
- VU L. Q., LE C. K., HOANG T. T., VU H. T., TRAN H., DUONG N. T. (2019). Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species. *Scientia Horticulturae*, 256: 1-6.
- WANG S. S., LIU J. M., SUN J., HUANG Y. T., JIN N., LI M. M., LIANG Y. T., FAN B., WANG F. Z. (2022). Analysis of endophytic bacterial diversity from different *Dendrobium* stems and discovery of an endophyte produced *Dendrobine*-type sesquiterpenoid alkaloids. *Frontiers in Microbiology*, 12: 1-15.
- WINARTO B., RACHMAWATI F., SANTI A., TEIXEIRA DA SILVA J. A. (2013). Mass propagation of *Dendrobium* 'Zahra FR 62', a new hybrid used for cut flowers, using bioreactor culture. *Scientia Horticulturae*, 161: 170-180.
- XING Y.-M., CHEN J., CUI J.-L., CHEN X.-M., GUO S.-X. (2011). Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietnam. *Current Microbiology*, 62: 1218-1224.
- ZHAO D.-K., SELOSSE M.-A., WU L., LUO Y., SHAO S.-C., RUAN Y.-L. (2021). Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi derived from protocorms or seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 12: 1-11.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC THỦ DẦU MỘT
NHIỀU TÁC GIẢ

KỶ YẾU HỘI THẢO

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, NĂM 2023

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ
Huế, 2024

Biên mục trên xuất bản phẩm của Thư viện Quốc gia Việt Nam

Kỷ yếu hội thảo 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 năm 2023 / Trần Trung Hiếu, Lê Don Nhân, Trần Thị Thu Hằng. - Huế : Đại học Huế, 2024. - 243tr. : hình vẽ, ảnh ; 27 cm

ĐTTS ghi: Đại học Thủ Dầu Một

ISBN: 978-604-489-317-4

1. Dược liệu 2. Họ Lan 3. Họ Gừng 4. Họ Trà 5. Đa dạng sinh học 6. Việt Nam
7. Kỷ yếu hội thảo

615.32109597 – dc23

DUMP0929p

Mã số sách: NC/568-2024

MỤC LỤC

Trang

- THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT N-HEXANE TỪ THÂN RỄ TAM THẮT GỪNG (*Stahlianthus thorelii* Gagnep.)** 1
Trần Trung Hiếu, Lê Doãn Nhân, Trần Thị Thu Hằng, Vi Thị Thuận, Nguyễn Thị Giang An, Nguyễn Hoàng Tuấn, Nguyễn Đăng Khoa, Nguyễn Xuân Hà, Lê Đức Giang
- TỔNG QUAN VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ CỦA CÁC LOÀI *DISTICHOCHLAMYS* M. F. NEWMAN: LOÀI THỰC VẬT ĐẶC HỮU Ở VIỆT NAM** 11
Trần Văn Chên, Cao Lý Tấn Thông, Nguyễn Thành Triết
- NGHIÊN CỨU BẢO TỒN LOÀI HỒNG LAN (*CYMBIDIUM INSIGNE* ROLFE) QUÝ HIẾM TRONG SINH CẢNH RỪNG HỖN GIAO THÔNG ĐÀ LẠT (*PINUS DALATENSIS* FERRÉ) DỰA VÀO CỘNG ĐỒNG Ở HUYỆN KON PLÔNG, TỈNH KON TUM, VIỆT NAM** 42
Nguyễn Thị Thiên Hương, Nguyễn Quốc Dụng, A Siu
- ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT, MÃ VẠCH DNA VÀ SƠ BỘ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY HẢI ĐƯỜNG (*CAMELLIA AMPLEXICAULIS*), HỌ TRÀ (THEACEAE)** 56
Dương Nguyên Xuân Lâm, Nguyễn Đỗ Lâm Điền
- ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN NHÂN GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM (*DENDROBIUM ANOSMUM* LINDL.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY IN-VITRO** 68
Nguyễn Hữu Thọ, Nguyễn Thị Oanh, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc
- TỔNG HỢP MỘT SỐ DƯỢC LIỆU THUỘC HỌ LAN (ORCHIDACEAE) SỬ DỤNG ĐIỀU TRỊ ĐÁI THÁO ĐƯỜNG Ở VIỆT NAM: CÔNG DỤNG THEO Y HỌC CỔ TRUYỀN VÀ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ HIỆN ĐẠI** 88
Trần Văn Chên, Dương Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thành Triết, Võ Trọng Tuấn
- THÀNH PHẦN LOÀI CỦA SECTION *DALATIA* (*CAMELLIA*, THEACEAE) Ở VIỆT NAM** 107
Quách Văn Hợi, Nông Văn Duy, Vũ Kim Công, Trần Thái Vinh, Đặng Thị Thắm, Lương Văn Dũng
- ĐA DẠNG HỆ THỰC VẬT CÓ MẠCH TRONG HỆ THỐNG HANG SƠN ĐỒNG, VƯỜN QUỐC GIA PHONG NHA - KẾ BÀNG, TỈNH QUẢNG BÌNH** 115
Bùi Văn Hương, Vũ Văn Liên, Đỗ Văn Trường, Vũ Anh Tài, Vũ Thị Thu Hiền

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN NHÂN GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM (*DENDROBIUM ANOSMUM* LINDL.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY IN-VITRO

Nguyễn Hữu Thọ^{1,3}, Nguyễn Thị Oanh¹, Trương Thị
Bích Phượng², Nguyễn Thị Kim Cúc^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Thừa Thiên Huế

²Trường Đại học khoa học, Đại học Huế, Thừa Thiên Huế

³ Trường Cao đẳng Cơ điện, Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ, Bình Định

Email: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn

TÓM TẮT

Lan Giả hạc tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) phân bố ở vùng tỉnh Thừa Thiên Huế, với đặc điểm hoa to đẹp, mang sắc tím đặc trưng và có mùi hương dịu nhẹ đã làm cho dòng lan này được ưa chuộng trong những năm gần đây. Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh protocorm từ hạt, tái sinh, phát triển chồi, và tạo cây hoàn chỉnh trong nuôi cấy lan *Dendrobium anosmum* Lindl. bằng phương pháp nhân giống in vitro đã được chúng tôi khảo sát. Quy trình khử trùng quả lan đạt hiệu quả cao với tỷ lệ nhiễm chỉ 4,89 %, tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 93,46 % sau trung bình 23,27 ngày nuôi cấy, tỷ lệ hình thành protocorm là 88,75% và tỷ lệ hạt chết chiếm 4,43%. Môi trường thích hợp cho tái sinh chồi là MS có bổ sung thêm 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 96,00 % sau 45 ngày cấy chuyển. Hệ số nhân chồi tốt nhất đạt 6,36 lần trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung 1,5mg/l BA + 0,5 mg/l IAA sau 6 tuần nuôi cấy. Chồi in-vitro tạo rễ tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,7 mg/l NAA, số rễ đạt được 5,72 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 4,06 cm/rễ, rễ có đặc điểm to và khoẻ sau 8 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: *Dendrobium*, in-vitro, kích thích sinh trưởng thực vật.

1. Đặt vấn đề

Với vẻ đẹp hấp dẫn và cấu trúc hình thái nổi bật, hoa lan được ưa chuộng trên khắp thế giới. Orchidaceae là họ thực vật có hoa với số lượng loài lớn nhất (Khasim et al., 2020). Trên thế giới có khoảng 763 chi và 28.000 loài lan đã được ghi nhận (Christenhusz & Byng, 2016). Họ Orchidaceae có sự đa dạng về đặc điểm sinh dưỡng

và hình thái hoa, nó được quan tâm nhiều do sự phân bố địa lý rộng rãi, giá trị cao của các giống lan rừng và lan thương mại (Catzal-Ix & Noguera-Savelli, 2014). Trong số đó, *Dendrobium* là chi lớn thứ hai của họ Orchidaceae có khoảng 1800 loài (De & Singh, 2015). *Dendrobium* được phân bố rộng khắp Châu Á và Nam Thái Bình Dương, vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, từ các vùng thấp và ẩm ở Bắc Úc, Đông Nam Á và dãy núi Himalaya (Ketsa & Warrington, 2023). Ở Việt Nam, chi *Dendrobium* có 107 loài và 1 thứ được phân bố rộng khắp từ Bắc đến Nam (Huyền, 2007), nhiều loài trong chi này được thuần dưỡng và phát triển rất tốt ở điều kiện nuôi trồng.

Lan Giả hạc tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) với những đặc trưng như khuôn hoa đẹp, nhiều biến thể màu sắc, lá uốn cong, thân thông tạo nên cảm giác mềm mại, đặc biệt là mùi hương dịu nhẹ (Hartati et al., 2022) tạo được sức hút đặc biệt trong lĩnh vực sưu tầm hoa cũng như nghiên cứu chuyên môn trong những năm qua. đã làm cho loài lan này trở nên được ưa chuộng trong thời gian gần đây. Do nhu cầu về giống lan này tăng cao dẫn đến tình trạng khai thác nguồn lan rừng diễn ra ồ ạt, hơn nữa, môi trường sinh trưởng của lan này cũng bị thu hẹp do các hoạt động của con người, thiên tai và biến đổi khí hậu. Mặt khác, khả năng nhân giống trong tự nhiên của giống lan này có nhiều hạn chế bởi hạt lan rất khó nảy mầm trong điều kiện tự nhiên (Trần Hợp, 1998). Do vậy, nguồn lan Giả hạc tím trong tự nhiên dần trở nên khan hiếm.

Hiện nay, sự phát triển của công nghệ sinh học, phương pháp nhân giống *in-vitro* được đánh giá là tối ưu để nhân nhanh phục vụ nhu cầu thương mại cũng như bảo tồn nhiều loài lan quý hiếm và có giá trị cao về kinh tế, dược liệu và thẩm mỹ. Cho đến nay trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu vi nhân giống chi *Dendrobium*, như nhân giống các loài *D. chryseum* Rolfe (Maharjan và cộng sự, 2020), *D. antennatum* Lindl (Nugroho và cộng sự, 2019), *D. heterocarpum* Wall. ex. Lindl. (Longchar & Deb, 2022). Ở Việt Nam, nhân giống *Dendrobium* đã được tiến hành thành công trên một số loài như: *D. officinale* Kimura et Migo (T. S. Nguyen và cộng sự, 2014); *D. anosmum* Lindl. (V. T. Le và cộng sự, 2022; D. T. Nguyen và cộng sự, 2021; Y. H. T. Nguyen & Nguyen, 2021), *D. heterocarpum* Lindl (Dang và cộng sự, 2018), các nghiên cứu nhân giống vẫn còn hạn chế trong quy mô phòng thí nghiệm, còn ít nơi đưa ra cây giống phục vụ thương mại và bảo tồn. Trong nghiên cứu này, nhân giống *in vitro* lan Giả hạc tím bằng cách sử dụng hạt lan nuôi cấy trong môi trường thích hợp để tạo vật liệu khởi đầu cho quy trình nhân giống. Cây con sau đó được chuyển sang môi trường bổ sung chất kích thích tăng trưởng ở các nồng độ khác nhau phù hợp với từng giai đoạn phát triển. Chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng trong nghiên cứu là auxin và cytokine. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của một số yếu tố dinh dưỡng, ánh sáng và chất kích thích sinh

trưởng lên quá trình nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl.) được phân bố tại Thừa Thiên Huế.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Vật liệu nuôi cấy khởi đầu là hạt lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl.) phân bố tại Thừa Thiên Huế. Quả lan đã chín sinh lý (6-7 tháng) được thu hái, lựa chọn quả to chắc, còn xanh chưa mở, không bị bệnh, vỏ quả lành lặn. Quả được thu hái tại vườn lan Viện công nghệ sinh học, Đại học Huế.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện *in vitro*: Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có độ ẩm 50 - 60%, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sử dụng bóng đèn huỳnh quang với cường độ chiếu sáng từ 2.500 - 3.000 lux.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường sử dụng trong nghiên cứu này là $\frac{1}{2}$ MS, MS (Murashige & Skoog, 1962), Môi trường VW (Vacin & Went, 1949), Môi trường Hyp (Kano, 1965) và Môi trường Knusond C (Knudson, 1946) có thành phần các chất dinh dưỡng thay đổi nhằm tìm ra môi trường thích hợp cho quá trình sinh trưởng chồi lan Giả hạc tím trong nuôi cấy *in-vitro*.

Nuôi cấy khởi đầu

Quả lan sau khi chín sinh lý sẽ được mang về phòng thí nghiệm và làm sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy với xà phòng. Sau đó quả lan được đưa vào tủ cấy vô trùng, rửa quả qua 1 lần nữa bằng nước cất được hấp vô trùng trong vòng 1 phút. Tiếp theo, quả được khử trùng bằng cách nhúng ngập toàn bộ quả vào trong cồn ethanol 96° và lắc nhẹ trong vòng 30 giây. Quả được lấy ra và đốt qua với đèn cồn trước khi quả được cắt đôi để lấy hạt (Hà & Hà, 2020). Hạt lan được gieo vào môi trường MS. Bố trí thí nghiệm với thời gian chiếu sáng khác nhau (0h hoặc 4h hoặc 8h) 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 túi môi trường, và lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu đánh giá là thời gian hạt nảy mầm (ngày), tỷ lệ hạt nảy mầm (%), tỷ lệ hình thành protocorm (%), tỷ lệ hạt chết (%), tỷ lệ nhiễm (%).

Hạt lan được cấy trên các môi trường $\frac{1}{2}$ MS, MS, VW, Hyp, KC và có bổ sung chất kích thích sinh trưởng 1-naphthylacetic Acid (NAA), 6-Benzylaminopurine (BA) ở những nồng độ khác nhau từ 0-1 mg/l để xác định môi trường và nồng độ kích thích sinh trưởng phù hợp để hạt lan nảy mầm và hình thành protocorm.

Tái sinh chồi

Các protocorm hình thành được cấy vào môi trường dinh dưỡng tối ưu ở thí nghiệm nuôi cấy khởi đầu. Môi trường dinh dưỡng được bổ sung BA và NAA với những nồng độ khác nhau (0-2 mg/l). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần có 10 túi môi trường, mỗi túi được cấy 5 mẫu protocorm. Chỉ tiêu được theo dõi sau 8 tuần nuôi cấy là tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi, chiều dài của chồi.

Nhân nhanh chồi

Các chồi hoặc cụm chồi (2–3 chồi) phát sinh từ protocorm được cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng BA (1,5mg/l) và β -indol-acetic acid (IAA) nồng độ 0-0,7 mg/l để quan sát khả năng nhân nhanh chồi *in-vitro*. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần có 10 túi môi trường, mỗi túi được cấy 5 mẫu chồi. Thu số liệu đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy là hệ số nhân chồi, chiều cao chồi (cm), số lá của chồi, đặc điểm chồi.

$$\text{Hệ số nhân chồi (lần)} = \frac{\text{số chồi sau 6 tuần nuôi cấy}}{\text{số chồi ban đầu}} \quad (\text{Hà \& Hà, 2020})$$

Tạo rễ

Các chồi thu được từ thí nghiệm nhân nhanh chồi đạt tiêu chuẩn (cao 2-3 cm, có 3-4 lá, xanh tốt, không nhiễm bệnh) được tách ra và cấy chuyển sang môi trường ra rễ. Môi trường dinh dưỡng được bổ sung thêm chất kích thích sinh trưởng IAA và NAA với các nồng độ khác nhau (0-1 mg/l) để thăm dò khả năng ra rễ của chồi lan. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần có 10 túi môi trường, mỗi túi được cấy 5 chồi. Các số liệu được thu lại sau 8 tuần nuôi cấy là tỷ lệ ra rễ (%), số rễ trung bình/ chồi, chiều dài rễ trung bình/ chồi, đặc điểm của rễ.

Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 và IBM SPSS Statistic 26. Tiêu chuẩn LSD (cho độ tin cậy 95%) và phân tích ANOVA (Duncan's test) cho từng công thức để đánh giá sự khác biệt.

3. Kết quả và bàn luận

3.1 Nuôi cấy khởi đầu

3.1.1 Ảnh hưởng của quy trình khử trùng và thời gian chiếu sáng đến khả năng nảy mầm của hạt lan

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của quy trình khử trùng và thời gian chiếu sáng đến khả năng nảy mầm của hạt lan Giả hạc tím sau 12 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: Kết quả khử trùng và thời gian chiếu sáng ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc tím

CT	Thời gian chiếu	Thời gian nảy mầm	Tỷ lệ nảy mầm của hạt	Tỷ lệ hình thành	Tỷ lệ hạt chết (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)
----	-----------------	-------------------	-----------------------	------------------	--------------------	-----------------

	sáng (giờ)	của hạt (ngày)	(%)	protocorm (%)		
1	0	69,53±0,95 c	20,93±0,95 c	20,00±0,79 c	76,00±0,56 c	4,89±1,21 a
2	4	57,07±0,45 b	46,13±0,40 b	41,96±0,38 b	44,40±0,90 b	4,44±1,06 a
3	8	41,33±0,96 a	64,76±0,96 a	60,89±0,91 a	20,36±0,96 a	4,00±1,09 a

(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))

Kết quả bảng 1 cho thấy quy trình khử trùng quả lan đã thực hiện có kết quả rất tốt khi tỉ lệ nhiễm cao nhất chỉ ở mức 4,89 %, giữa các công thức thí nghiệm kết quả không có sự khác biệt về mặt thống kê. Kết quả này có thể một phần do hạt lan được bao bọc bởi lớp vỏ quả dày, cách ly tốt với môi trường bên ngoài nên hạn chế việc bị nhiễm. Kết quả cho thấy quy trình khử trùng bằng ethanol 96 đạt hiệu quả khá tương đồng với nghiên cứu nhân giống lan *Dendrobium* bằng cách gieo hạt *in-vitro* của Nguyễn Quỳnh Trang và cộng sự (2013) khi khử trùng quả lan Giả hạc bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 9 phút với tỷ lệ nhiễm 4,75%, tuy nhiên tỷ lệ tái sinh chỉ đạt 23,81 % thấp hơn rất nhiều so với nghiên cứu của chúng tôi (64,76%) (Trang và cộng sự, 2013). Cùng chất khử trùng $HgCl_2$ 0,1% được xử lý trong các khoảng thời gian từ 5 đến 15 phút trên đối tượng quả lan Hoàng thảo vôi (*D. cretaceum* Lindley) có tỷ lệ mẫu sạch đều trên 80% ở tất cả các nghiệm thức (Việt, 2017). Trong nghiên cứu của Đặng Thị Thu Hà và Phạm Thu Hà (2020) về nhân giống lan Phi điệp tím (*D. anosmum* Lindl) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in-vitro* thực hiện khử trùng quả lan bằng phương pháp nhúng vào cồn 96° và đốt trên ngọn lửa đèn cồn ghi nhận tỷ lệ mẫu sạch từ 61,76 – 100% (Hà & Hà, 2020). Như vậy, sử dụng quy trình khử trùng quả lan bằng cách nhúng vào cồn 96° và đốt trên ngọn lửa đèn cồn trong 30 giây vừa đơn giản, an toàn cho người thực hiện, không gây ảnh hưởng đến môi trường khi xả thải đồng thời cho tỷ lệ mẫu sạch và hạt nảy mầm tốt.

Nghiên cứu đồng thời cho thấy thời gian chiếu sáng ảnh hưởng nhiều đến khả năng nảy mầm hình thành protocorm của hạt lan. Cụ thể với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày cho kết quả tốt, với thời gian nảy mầm 41,33 ngày, tỷ lệ nảy mầm và hình thành protocorm lần lượt đạt 64,76 % và 60,89 %, tỷ lệ hạt chết thấp nhất là 20,36 %. Trong khi đó thí nghiệm không chiếu sáng (CT1) và chiếu sáng 4 giờ/ngày (CT2) ghi nhận hiệu quả thấp hơn đáng kể, thứ tự kết quả thời gian nảy mầm, tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ hình thành protocorm và tỷ lệ hạt chết là 96,53 ngày; 20,93 %; 20,00 %; 76,00 % (CT1) và 57,07 ngày; 46,13 %; 41,96 %; 44,40 % (CT2) (Bảng 1). Những công bố tương tự về ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến khả năng nảy mầm của hạt lan như nghiên cứu của Lê Thiên Vinh và cộng sự (2022) về nhân giống lan Giả hạc (*D. anosmum*) đột biến bằng phương pháp nuôi cấy mô *in-vitro* thực hiện khảo sát với điều kiện chiếu sáng 8 giờ/ngày có tỷ lệ hạt nảy mầm đều trên 70% (V. T. Le và cộng sự, 2022). Trong nghiên cứu của

Sorgato và cộng sự (2020) về ảnh hưởng của ánh sáng, agar, than hoạt tính và môi trường nuôi cấy đến sự nảy mầm và phát triển ban đầu của cây *Dendrobium* đã cho thấy có mối quan hệ giữa điều kiện ánh sáng và khả năng nảy mầm của hạt, với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày cho tỷ lệ nảy mầm đạt 50,6 % đối với *D. nobile* và 82,7 % đối với *D. phalaenopsis* cao hơn rất nhiều so với không chiếu sáng là 35,5% (*D. nobile*) và 77,8% (*D. phalaenopsis*). Trong nghiên cứu của Parthibhan và cộng sự (2012) thời gian chiếu sáng từ 8-24 giờ/ ngày luôn cho tỷ lệ nảy mầm hạt lan *D. aqueum* Lindley là trên 80% trong khi đối chứng không chiếu sáng thì tỷ lệ nảy mầm của hạt chỉ đạt 70,74%. Như vậy, có thể thấy tùy vào mỗi loại lan mà sự ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến khả năng nảy mầm của hạt cũng khác nhau, lan Giả hạc tím cảm ứng tốt với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày.

3.1.2 Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan ở điều kiện thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím

CT	Thời gian nảy mầm của hạt (ngày)	Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%)	Tỷ lệ hình thành protocorm (%)	Tỷ lệ hạt chết (%)
1	41,33±0,96 a	64,76±0,96 a	60,89±0,91 a	20,36±0,96 a
2	54,00±0,70 b	50,42±1,19 b	44,73±1,62 b	45,63±1,61 b
3	57,53±0,48 c	47,44±1,11 b	36,87±1,44 c	42,07±1,49 b
4	42,87±0,65 a	63,08±1,68 a	59,62±1,79 a	22,71±0,67 a
5	63,93±0,49 d	40,27±1,08 c	29,29±1,13 d	52,65±1,88 c

(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). - CT1: Môi trường MS + 7 g/l agar + 0,7 g/l than hoạt tính + 30 g/l saccharose, pH 5,8; - CT2: Môi trường 1/2 MS + 7 g/l agar + 0,7 g/l than hoạt tính, + 30 g/l saccharose, pH 5,8; - CT3: Môi trường VW + 2 g peptone + 7 g/l agar + 0,7 g/l than hoạt tính + 30g/l saccharose, pH 5,5; - 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; - CT5: Môi trường KC + 7 g/l agar + 0,5 g/l than hoạt tính + 30 g/l saccharose, pH 5,5.

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 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 %. 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 này. Nghiên cứu của Lê Thị Luận và cộng sự (2020) về nhân giống *in-vitro* cây lan Giả hạc Hawaii (*D. adastr*) 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 (L. T. Le và cộng sự, 2020). Môi trường MS cũng phù hợp với cây lan *D. antennatum* Lindl. cho tỷ lệ nảy mầm đạt 100% trong 37,8 ngày (Nugroho và cộng sự, 2019), trên lan *D. aqueum* Lindley tỷ lệ nảy mầm của hạt là từ 80,78% – 97,75% trong 46 ngày (Parthibhan và cộng sự, 2012). Môi trường Hyp lại 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 (Della Rahayu, 2016). 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 giống protocorm (plbs) có hiệu quả giống môi trường MS (Thepsithar và cộng sự, 2009).

3.1.3 Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của kích thích 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, hình 1.

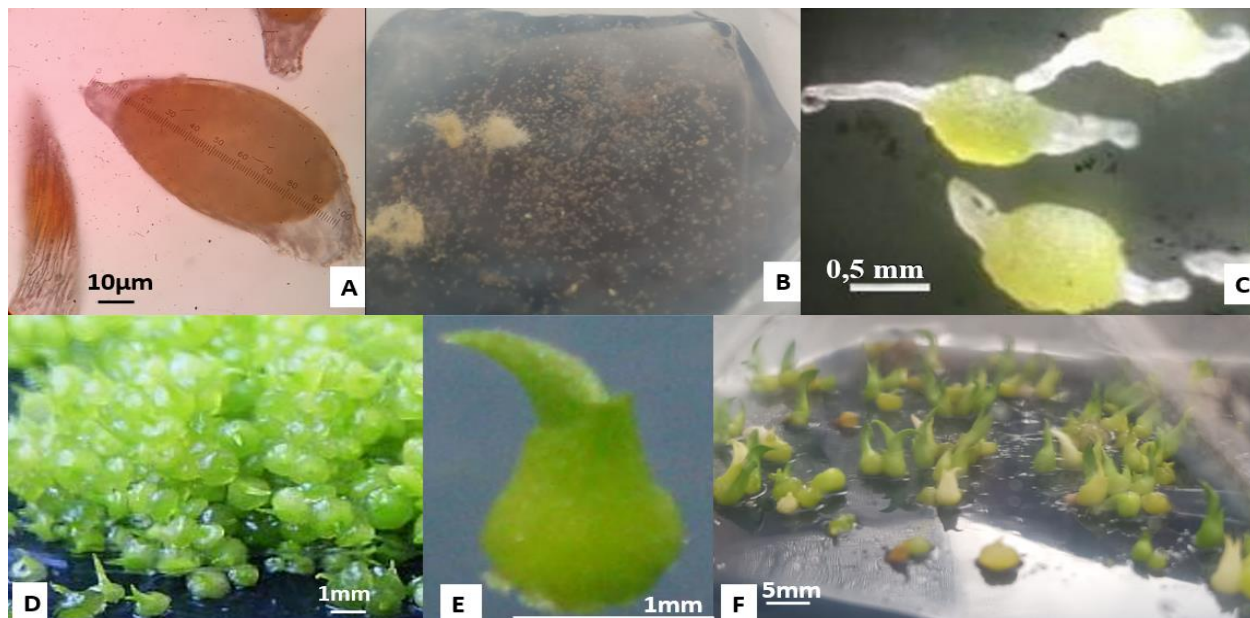
Bảng 3: Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím

CT	Kích thích 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				
1	0	0	41,33±0,96 g	64,76±0,96 h	60,89±0,91 g	20,36±0,96 e
2	0	0,25	36,60±0,49 ef	73,53±0,51 g	70,81±0,87 f	19,33±0,74 e
3	0,25	0,25	37,47±0,70 f	75,39±0,77 f	72,91±0,45 ef	18,60±0,77 e
4	0,5	0,25	35,33±0,62 de	81,63±0,63 d	76,20±0,40 d	14,68±0,67 cd
5	0,75	0,25	28,27±0,92 b	87,64±0,64 b	82,04±0,61 b	10,49±0,54 b
6	1	0,25	31,33±0,69 c	81,40±0,69 d	77,41±0,44 cd	13,13±0,52 c
7	0	0,5	34,13±0,52 d	75,84±0,57 f	71,26±0,84	18,83±0,70 e
8	0,25	0,5	33,67±0,80 d	78,76±0,81 e	73,35±0,53 e	13,79±0,36 c

9	0,5	0,5	33,93±0,63 d	77,09±0,55 ef	73,20±0,54 e	15,80±0,83 d
10	0,75	0,5	23,27±0,27 a	93,46±0,47 a	88,75±0,55 a	4,43±0,37 a
11	1	0,5	29,53±0,93 bc	84,68±0,49 c	78,66±0,56 c	13,61±0,43 c

(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))

Nghiên cứu đã phối hợp hai loại kích thích sinh trưởng thuộc 2 nhóm auxin (BA) và cytokinin (NAA) với những nồng độ khác nhau để thăm dò sự ảnh hưởng của nó đến khả năng nảy mầm của hạt lan. Khi không sử dụng bất kỳ chất kích thích sinh trưởng nào thì kết quả thu được không khả quan với 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 3). Kết quả này được cải thiện hơn 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 thì 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 nồng độ BA lên 0,5 mg/l thì kết quả có sự thay đổi, đạt tốt nhất ở 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). Tương tự CT6 khi tăng nồng độ NAA lên 1 mg/l hiệu quả giảm đi đáng kể (29,53 ngày; 84,68%; 78,66 %; và 13,61%) (CT11, bảng 3), 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 của hạt lan Giả hạc tím. 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% (D. M. T. Nguyen, 2021), có trường hợp đạt 100% (Y. H. T. Nguyen & Nguyen, 2021).



Hình 1: Các giai đoạn phát triển của hạt lan Giả hạc tím 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 10 ngày; C. Hạt lan gieo được 15 ngày; D, E. Hạt lan gieo được 25 ngày; f. Hạt lan gieo được 35 ngày.

3.2 Tái sinh chồi

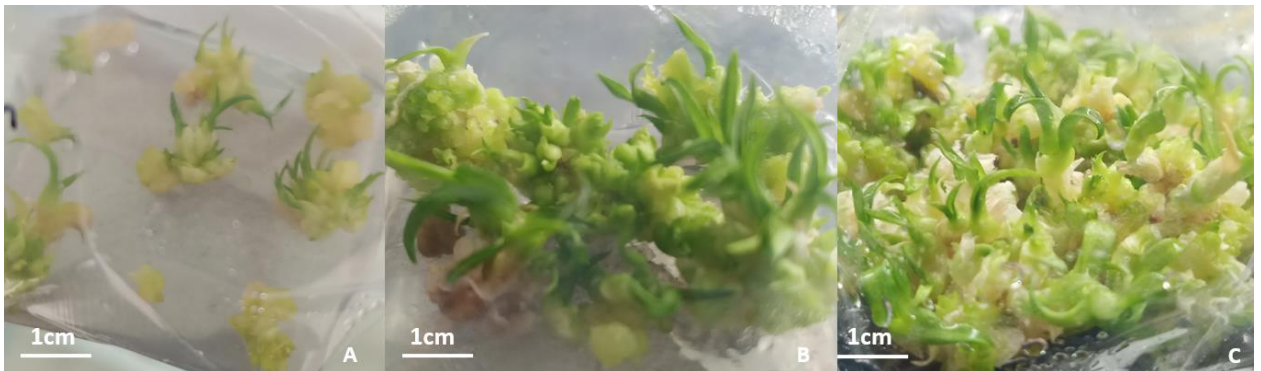
Những khối/cụm protocorm thu được từ thí nghiệm nuôi cấy khối đầu được lựa chọn cấy sang môi trường tái sinh chồi. Môi trường dinh dưỡng được sử dụng là MS có bổ sung chất kích thích sinh trưởng BA và NAA. Kết quả tái sinh chồi từ protocorm của lan Giả hạc tím thu được sau 8 tuần nuôi cấy thể hiện qua bảng 4.

Bảng 4: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng tới khả năng tái sinh chồi từ protocorm

CT	Kích thích sinh trưởng (mg/l)		Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Dài chồi (cm)
	BA	NAA			
1	0	0	65,33±2,26 g	1,03±0,11f g	0,55±0,03 g
2	0	0.5	74,00±1,94 ef	1,22±0,05 efg	0,75±0,04 f
3	0.5	0.5	79,33±1,94 de	1,52±0,06 d	1,26±0,03 c
4	1	0.5	85,33±1,70 bc	1,78±0,03 c	1,57±0,05 b
5	1.5	0.5	96,00±1,25 a	2,76±0,04 a	1,83±0,03 a
6	2	0.5	88,00±2,71 b	1,54±0,03 d	1,45±0,00 b
7	0	1	72,00±1,70 f	1,01±0,06 g	0,82±0,02 ef
8	0.5	1	76,00±1,25 ef	1,31±0,10 e	1,10±0,06 d
9	1	1	82,00±1,70 cd	1,59±0,05 cd	1,26±0,09 c
10	1.5	1	90,67±2,21 ab	2,03±0,11 b	1,58±0,04 b
11	2	1	73,33±1,83 f	1,23±0,05 ef	0,90±0,05 e

(Trung bình \pm 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)

Tái sinh chồi là một khâu quan trọng trong quy trình nhân giống *in-vitro*, điều này cũng quyết định sự thành công của nhân giống. Kết quả bảng 4 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 dài 0,55 cm/ chồi (bảng 4). Kết quả này tốt hơn khi môi trường bổ sung thêm BA và NAA, cụ thể kết quả tốt nhất được ghi nhận ở CT5 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 dài 1,83 cm/ chồi (bảng 4). Khi bổ sung kích thích sinh trưởng thấp hơn hoặc cao hơn ngưỡng ở CT5 đều cho kết quả không tốt bằng CT5, điều này có thể do tỷ lệ auxin và cytokinin không phù hợp dẫn đến những ức chế trong quá trình tái sinh chồi. Kết quả nghiên cứu của Y. H. T. Nguyen & Nguyen, (2021) trên lan Giả hạc *D.anosmum* cũng 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. Một nghiên cứu đáng chú ý khác khi nhân giống lan Giả hạc *D.anosmum* ở Hoà Bình của H. T. Nguyen và cộng sự (2022) đã cho kết quả tỷ lệ tái sinh chồi từ protocorm đạt 100% dù môi trường có hay không có kích thích sinh trưởng nhưng 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). 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 2: Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của lan Giả hạc tím. A. Môi trường không bổ sung chất kích thích 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.

3.3 Nhân nhanh chồi

Những chồi hoặc cụm chồi đạt chất lượng (cao 0,7-1cm, có 1-2 lá, xanh tốt, không nhiễm bệnh) được lựa chọn và cấy vào môi trường nhân nhanh. Môi trường được sử dụng

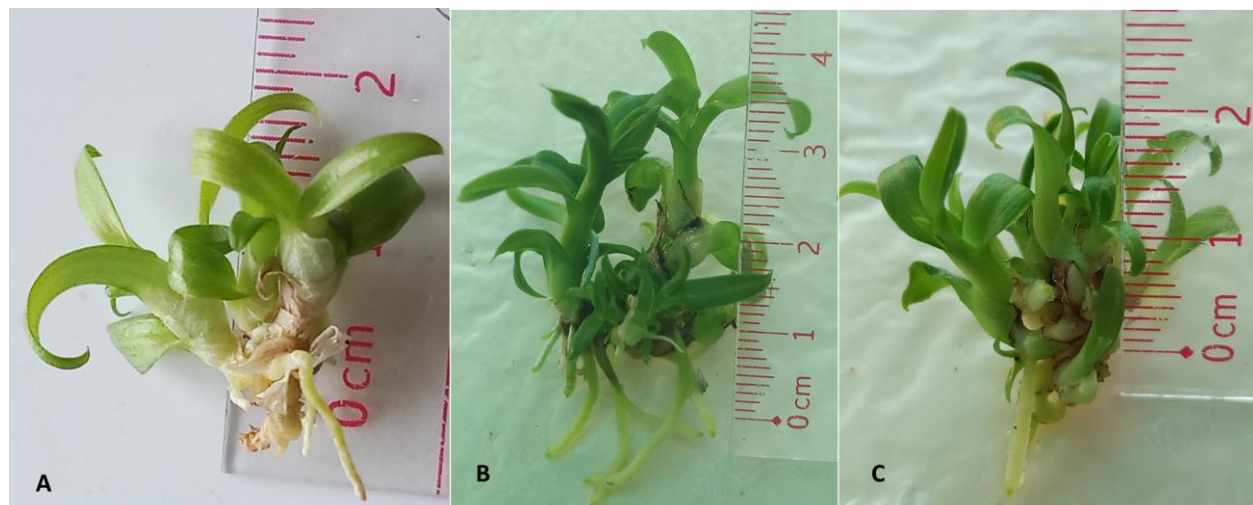
là MS có bổ sung thêm kích thích sinh trưởng 1,5 mg/l BA và IAA có nồng độ 0-0,7 mg/l. Kết quả nhân nhanh chồi sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi lan Giả hạc tím

Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ IAA (mg/L)	Hệ số nhân	Chiều cao /chồi (cm)	Đường kính chồi (cm)	Số lá/chồi	Đặc điểm chồi
0	0	1,25 ± 0,06 f	1,42 ± 0,06 e	0,22±0,01 e	2,26 ± 0,07 c	Chồi nhỏ yếu, màu xanh hơi vàng
1,5	0	2,18 ± 0,04 e	1,77 ± 0,06 d	0,31±0,01 d	2,39 ± 0,08 c	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt.
1,5	0,1	3,46 ± 0,06 d	2,42 ± 0,05 c	0,37±0,01 c	3,70 ± 0,05 d	Chồi trung bình, màu xanh nhạt.
1,5	0,3	4,52 ± 0,09 b	2,56 ± 0,03 b	0,44±0,01 b	4,55 ± 0,04 b	Chồi mập, cao, màu xanh đậm.
1,5	0,5	6,36 ± 0,05 a	3,72 ± 0,03 a	0,56±0,01 a	5,14 ± 0,04 a	Chồi mập, cao, màu xanh đậm.
1,5	0,7	4,29 ± 0,06 c	2,38 ± 0,04 c	0,36±0,01 c	4,24 ± 0,02 c	Chồi trung bình, màu xanh nhạt.

(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))

Kết quả bảng 5 cho thấy nhân nhanh chồi đạt hiệu quả tối ưu khi sử dụng môi trường dinh dưỡng có bổ sung thêm 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IAA với hệ số nhân chồi đạt 6,36, chiều cao chồi 3,72 cm/chồi, số lá 5,14 lá/chồi, kết quả này cao hơn rất nhiều so với đối chứng khi sử dụng môi trường không bổ sung kích thích sinh trưởng (1,25; 1,42 cm; 2,26 lá) (bảng 5). Trong khi các công thức thí nghiệm khác khi bổ sung nồng độ IAA cao hoặc thấp hơn 0,5 mg/l đều cho kết quả thấp hơn. Đã có nhiều nghiên cứu về nhân giống lan ở giai đoạn nhân nhanh chồi bổ sung vào môi trường các chất kích thích sinh trưởng nhằm tăng hiệu quả của việc nhân nhanh. Trong nghiên cứu của Vũ Thị Phan và cộng sự (2019) về nhân giống lan *D. nestor*, tác giả đã phối hợp 3 chất kích thích sinh trưởng vào môi trường với nồng độ khác nhau để đánh giá mức độ hiệu quả của chúng, kết quả tốt nhất cho nhân chồi ghi nhận tại nồng độ 0,4 mg/l BA+ 0,2 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA với hệ số nhân chồi 6,33 (Phan và cộng sự, 2019). Trên lan Giả hạc Hawaii (*D. adastra*) khi bổ sung 1 mg/l BA hoặc 1,5 mg/l Kinetin đơn lẻ đã cho hiệu quả nhân chồi tốt, cụ thể hệ số nhân chồi đạt được là 4,22 và 3,71, chồi xanh tốt (L. T. Le và cộng sự, 2020). Một nghiên cứu khác trên lan *D. anosmum*, khi môi trường bổ sung 0,3 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA +0,2 mg/l kinetin cho kết quả nhân chồi hiệu quả với hệ số nhân chồi đạt 9,44 (Hà & Hà, 2020). Có thể thấy lan *D. anosmum* có khả năng nhân chồi rất cao dù sử dụng chất kích thích sinh trưởng riêng lẻ hay kết hợp.



Hình 3: Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi lan Giả hạc tím. A. Chồi lan cấy ở môi trường không bổ sung kích thích sinh trưởng; B. Chồi lan cấy ở môi trường bổ sung 1,5 mg/l BA + 0,3 mg/l IAA; C. Chồi lan cấy ở môi trường bổ sung 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IAA.

3.4 Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Đây là giai đoạn cuối cùng của nhân giống *in-vitro* trước khi đưa cây đi thích nghi ở điều kiện vườn ươm. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím

TN	Chất điều hoà sinh trưởng (mg/l)		Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài rễ TB/chồi (cm)	Đặc điểm hình thái rễ, chồi
	IAA	NAA				
TN1	0	0	100	1,88±0,10 f	1,44±0,14 g	+
TN2	0,1	0	100	2,97±0,11 e	1,57±0,13 g	+
TN3	0,3	0	100	3,97±0,12 cd	2,04±0,12 f	++
TN4	0,5	0	100	5,03±0,10 b	4,12±0,09 a	+++
TN5	0,7	0	100	4,31±0,12 c	3,51±0,06 bc	+++
TN6	1	0	100	4,04±0,15 c	3,16±0,11 d	+++
TN7	0	0,1	100	3,18±0,09 e	2,24±0,10 f	++
TN8	0	0,3	100	3,65±0,09 d	2,84±0,13 e	++
TN9	0	0,5	100	4,24±0,10 c	3,25±0,10 cd	+++
TN10	0	0,7	100	5,72±0,12 a	4,06±0,09 a	+++
TN11	0	1	100	4,95±0,20 b	3,68±0,14 b	+++

(+): Rễ ngắn, ít rễ, yếu mảnh, 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 trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Duncan's test)

Kết quả bảng 6 cho thấy khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím rất mạnh, tỷ lệ ra rễ đạt 100% ở tất cả các công thức thí nghiệm. Ở thí nghiệm đối chứng không sử dụng kích thích sinh trưởng có hiệu quả không cao dù tỷ lệ ra rễ vẫn đạt 100% nhưng số rễ là 1,88 rễ/ chồi, chiều dài rễ đạt 1,44 cm/chồi, rễ mảnh và yếu. Khi môi trường có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng cho kết quả cải thiện rõ rệt, tiêu biểu là ở NT4 (tốt nhất khi bổ sung IAA) và NT10 (tốt nhất khi bổ sung NAA). Với nồng độ 0,5 mg/l IAA (NT4) cho kết quả số rễ là 5,03 rễ/chồi, chiều dài rễ 4,12 cm/rễ, rễ to, khoẻ. Từ kết quả thí nghiệm nhận thấy chất kích thích sinh trưởng NAA là phù hợp hơn với chồi lan Giả hạc tím dùng cho mục đích ra rễ, cụ thể khi bổ sung 0,7mg/l NAA vào môi trường dinh dưỡng thì số rễ đạt được 5,72 rễ/chồi, dài rễ đạt 4,06 cm/rễ, rễ to, khoẻ. Những nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi ở một số loài lan thuộc chi *Dendrobium* như trên lan *D. lituiflorum* và *D. aduncum* được Barua và cộng sự, (2022) thực hiện, tác giả đã sử dụng NAA và IBA để kích thích ra rễ và cho kết quả rất tốt, chồi đều đạt từ 3-8 rễ/chồi, dài 1-5 cm/rễ. Trong nghiên cứu của Hà & Hà, (2020) trên lan *D.anosmum* đã báo cáo tỷ lệ ra rễ của chồi lan là đạt 100% ở các thí nghiệm, và có số rễ, chiều dài rễ đạt tốt nhất khi môi trường bổ sung 0,5mg/l NAA kết quả đạt 7,46 rễ/chồi, 3,73 cm/rễ. Nhìn chung, khả năng ra rễ của lan *D.anosmum* là rất cao dù môi trường có hay không có bổ sung chất kích thích sinh trưởng.



Hình 4: Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím. A. Môi trường không bổ sung kích thích sinh trưởng; B. Môi trường bổ sung 0,5 mg/l IAA; C. môi trường bổ sung 0,7 mg/l NAA

4. Kết luận

Với quy trình khử trùng quả lan bằng cách nhúng toàn bộ quả vào trong cồn 96⁰ và lắc nhẹ trong vòng 30 giây sau đó đốt qua ngọn lửa đèn cồn đã đem lại hiệu quả cao với tỷ lệ nhiễm đạt cao nhất chỉ chiếm 4,89 %, đây có thể xem là phương pháp khử trùng quả lan tối ưu đối với lan Giả hạc tím và có thể áp dụng cho một số loài lan khác. Hạt lan Giả hạc tím nảy mầm tốt ở điều kiện chiếu sáng 8 giờ/ngày khi được gieo trên môi trường MS và có bổ sung 0,75 mg/l NAA+ 0,5 mg/l BA đem lại hiệu quả là hạt nảy mầm trong 23,27 ngày, tỷ lệ nảy mầm 93,46 %, tỷ lệ hình thành protocorm là 88,75% và tỷ lệ hạt chết 4,43%.

Môi trường thích hợp cho quá trình tái sinh chồi lan Giả hạc tím là MS có bổ sung thêm 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 dài 1,83 cm/ chồi và chồi có chất lượng tốt.

Môi trường có bổ sung 1,5mg/l BA + 0,5 mg/l IAA là phù hợp nhất để nhân nhanh chồi lan Giả hạc tím, với hiệu quả nhân nhanh có hệ số nhân chồi đạt 6,36 lần, chiều cao chồi 3,72 cm/chồi, số lá 5,14 lá/chồi.

Khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím rất mạnh luôn đạt được tỷ lệ ra rễ 100%, tuy nhiên số lượng và chiều dài rễ đạt tốt nhất ở môi trường có bổ sung 0,7mg/l NAA thì số rễ đạt được 5,72 rễ/chồi, dài rễ đạt 4,06 cm/rễ, rễ to, khoẻ.

Tài trợ

Tất cả thí nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Kinh phí được phòng thí nghiệm hỗ trợ và từ nguồn học bổng VinIF. “Nguyễn Hữu Thọ được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.TS.121 ”.

Tài liệu tham khảo

- 1.Barua, K. N., Singha, B. L., Bora, B., & Bordoloi, S. (2022). In vitro seed propagation of endangered *Dendrobium* - *D. lituiflorum* Lindl. and *D. aduncum* Lindl. International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive, 3, 108–115.
- 2.Catzal-ix, W., & Noguera-Savelli, E. (2014). *Orchidaceae: The Largest Family Of Flowering Plants*. <http://www.eoearth.org/view/article/53725e080cf2aafa2ccd8e15/>
- 3.Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217.
- 4.Dang, T. T., H’Yon, N. B., Nguyen, T. T. H., Dinh, V. K., Nong, V. D., Tran, T. V, Quach, V. H., & Vu, K. C. (2018). Micropropagation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl. *Journal of Biotechnology*, 16(1), 127–135.
- 5.De, L. C., & Singh, D. R. (2015). Biodiversity, conservation and bio-piracy in orchids-an overview. *J Glob Biosci*, 4(4), 2030–2043.

6. Della Rahayu, E. M. (2016). Handling and propagation of *Dendrobium* ‘Iriana Jokowi’ in Bogor Botanic Gardens, Indonesia. *Nusantara Bioscience*, 8(2), 258–263.
7. Hà, Đ. T. T., & Hà, P. T. (2020). Nghiên cứu nhân giống lan phi điệp tím (*D. anosmum* Lindl) bằng kỹ thuật nuôi cấy in-vitro. *Khoa Học Công Nghệ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*, 2(7), 101–120.
8. Hartati, S., Samanhudi, & Cahyono, O. (2022). Morphological characterization of five species of *Dendrobium* native to Indonesia for parent selection. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(5), 2648–2654.
9. Huyền, D. Đ. (2007). Tập 9 : Họ Lan - Orchidaceae Juss. Chi hoàng thảo - *Dendrobium* Sw. In D. Đ. Huyền (Ed.), *Thực vật chí Việt Nam (Flora of VietNam)* (pp. 1–219). Khoa học và kỹ thuật.
10. Kano, K. (1965). Studies on the media for orchid seed germination. *Memoirs Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 20, 1–68.
11. Ketsa, S., & Warrington, I. J. (2023). The *dendrobium* orchid: Botany, horticulture, and utilization. *Crop Science*, 63(4), 1829–1888.
12. Khasim, S. M., Hegde, S. N., González-Arno, M. T., & Thammasiri, K. (2020). *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges* (S. M. Khasim, S. N. Hegde, M. T. González-Arno, & K. Thammasiri (eds.)). Springer Singapore. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1>
13. Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15, 214–217.
14. Le, L. T., Nguyen, Q. T. T., Lam, T. N. T., Nguyen, T. D., Nguyen, P. H., & Truong, P. B. T. (2020). A research on in vitro propagation of *Dendrobium adastra*. In 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, & T. D. Binh (Eds.), *National Biotechnology Conference*. (pp. 897–902). Hue University Publishing house. <http://huib.hueuni.edu.vn/wp-content/uploads/2020/12/897-902.pdf>
15. Le, V. T., Truong, T. L. N., Nguyen, T. B. T., Diem, N. T., Nguyễn, T. O., & Nguyen, T. K. C. (2022). Nhân giống lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) đột biến bằng phương pháp nuôi cấy in vitro. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 131(1A), 5–15.
16. Longchar, T. B., & Deb, C. R. (2022). 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 Journal of Botany*, 149, 67–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.058>
17. Maharjan, S., Thakuri, L. Sen, Thapa, B. B., Pradhan, S., Pant, K. K., Joshi, G. P., & Pant, B. (2020). In vitro propagation of the endangered orchid *Dendrobium chryseum* Rolfe from protocorms culture. *Nepal Journal of Science and Technology*, 19(1), 39–47.
18. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
19. Nguyen, D. M. T. (2021). The process of micropropagation *Dendrobium anosmum*. *AGU International Journal of Sciences.*, Vol. 27 (1) 73 – 82.

20. Nguyen, D. T., Nguyen, O. T., Ho, T. T., Nguyen, T. H., & Nguyen, C. K. T. (2021). Cultivation of *Dendrobium anosmum* Di Linh from in vitro seedlings. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 130(1A), 107–115. <https://doi.org/10.26459/hueunijns.v130i1A.5907>
21. Nguyen, H. T., Dinh, S. T., Ninh, T. T., Nong, H. T., Dang, T. T. T., Khuat, Q. V., Dang, A. T. P., Ly, M. T., Kirakosyan, R. N., & Kalashnikova, E. A. (2022). In vitro propagation of the *Dendrobium anosmum* Lindl. collected in Vietnam. *Agronomy*, 12(2), 324–338. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020324>
22. Nguyen, T. S., Tu, B. T., Dang, T. N., Nguyen, T. L. A., Hoang, T. N., & Nguyen, Q. T. (2014). In vitro propagation of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Journal of Science and Development*, 12, 1274–1282.
23. Nguyen, Y. H. T., & Nguyen, H. T. (2021). Study on in vitro propagation of *dendrobium asomum* lindl. distribute in thai nguyen province. *TNU Journal of Science and Technology*, 226(10), 39–46. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4286>
24. Nugroho, J. D., Arobaya, A. Y. S., & Tanur, E. A. (2019). Propagation of *Dendrobium antennatum* Lindl via seed culture in vitro using simple medium: fertilizer and complex organic based medium. *Hayati Journal of Biosciences*, 26(3), 133–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.4308/hjb.26.3.133>
25. Parthibhan, S., Benjamin, J. H. F., Muthukumar, M., Sherif, N. A., Kumar, T. S., & Rao, M. V. (2012). Influence of nutritional media and photoperiods on in vitro asymbiotic seed germination and seedling development of *Dendrobium aqueum* Lindley. *African Journal of Plant Science*, 6(14), 383–393.
26. Phan, V. T. N., Hải, K. T., & Thơ, N. T. (2019). Nghiên cứu nhân giống in vitro lan trầm tím (*Dendrobium nestor*). *Công Nghệ Sinh Học và Giống Cây Trồng*, 1, 38–44.
27. Sorgato, J. C., Soares, J. S., Damiani, C. R., & Ribeiro, L. M. (2020). Effects of light, agar, activated charcoal, and culture medium on the germination and early development of *Dendrobium* seedlings. *Australian Journal of Crop Science*, 14(4), 557–564.
28. Thepsithar, C., Thongpukdee, A., & Kukieatdetsakul, K. (2009). Enhancement of organic supplements and local fertilisers in culture medium on growth and development of Phalaenopsis ‘Silky Moon’ protocorm. *African Journal of Biotechnology*, 8(18), 4433–4440.
29. Trần Hợp. (1998). Phong lan Việt Nam (T. Hợp (ed.)). Nhà xuất bản Nông nghiệp.
30. Trang, N. Q., Huệ, V. T., Ninh, K. T. H., & Thơ, N. T. (2013). Nhân giống in-vitro lan phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*). *Công Nghệ Sinh Học và Giống Cây Trồng*, 3(1), 16–22.
31. Vacin, E. F., & Went, F. W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 110(4), 605–613.
32. Việt, N. V. (2017). 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*, 6(79), 55–61.

**EFFECT OF SEVERAL FACTORS ON THE PROPAGATION OF
DENDROBIUM ANOSMUM ORCHID BY *IN-VITRO* CULTURE METHOD**
Nguyen Huu Tho^{1,3}, Nguyen Thi Oanh¹, Truong Thi Bich Phuong², Nguyen Thi Kim Cuc^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Hue University.

*E-mail: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn

²Hue University of Sciences, Hue University.

³College Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam.

Abstract: *Dendrobium anosmum* Lindl. distributed in Thua Thien Hue province, with beautiful large flowers, a characteristic purple color, and a gentle scent that has made this orchid line popular in recent years. In this study, factors affecting protocorm generation from seeds, regeneration, rapid multiplication of shoot, and complete plant formation in *Dendrobium anosmum* Lindl orchid culture in-vitro was investigated by us. The orchid fruit sterilization process brings high disinfection efficiency with an infection rate of only 4.89%, seed germination rate reaches 93.46% after an average of 23.27 days of culture, protocorm formation rate is 88.75% and a dead seed rate is 4.43%. The suitable environment for shoot regeneration is MS supplemented with 1.5 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA with a shoot regeneration rate of 96.00% after 45 days of subculture. The best shoot multiplication coefficient reached 6.36 times on nutrient medium supplemented with 1.5 mg/l BA + 0.5 mg/l IAA after 6 weeks of culture. . In-vitro shoots formed the best roots on MS medium supplemented with 0.7 mg/l NAA, the number of roots and root length reached 5.72 roots/shoot and 4.06 cm/root, respectively, together with big and strong roots after 8 days weeks of culture

Keywords: *Dendrobium*, *in-vitro*, *Stimulates plant growth*

BÁO CÁO KHOA HỌC
VỀ NGHIÊN CỨU VÀ GIẢNG DẠY SINH HỌC
Ở VIỆT NAM

HỘI NGHỊ KHOA HỌC QUỐC GIA LẦN THỨ 6
THÀNH PHỐ HUẾ, 06/7/2024
PROCEEDING OF THE 6TH NATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE
ON BIOLOGICAL RESEARCH AND TEACHING IN VIETNAM
HUE CITY, JULY 6, 2024

ĐƠN VỊ PHỐI HỢP TỔ CHỨC

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM, ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC QUY NHƠN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM HÀ NỘI 2
TRƯỜNG ĐẠI HỌC QUỐC TẾ, ĐHQG TP.HCM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM, ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM TP. HCM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN, ĐHQG HÀ NỘI
TRƯỜNG QUỐC TẾ - ĐHQG HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC, ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH
HỘI CÁC NGÀNH SINH HỌC VIỆT NAM



**BÁO CÁO
KHOA HỌC**
VỀ NGHIÊN CỨU
VÀ GIẢNG DẠY
SINH HỌC
Ở VIỆT NAM

HỘI NGHỊ KHOA HỌC
QUỐC GIA LẦN THỨ 6
THÀNH PHỐ HUẾ, 06/7/2024

PROCEEDING OF THE 6TH NATIONAL
SCIENTIFIC CONFERENCE
ON BIOLOGICAL RESEARCH AND
TEACHING IN VIETNAM
HUE CITY,
JULY 6, 2024



NHÀ XUẤT BẢN
KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ



TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM - ĐẠI HỌC HUẾ

**BÁO CÁO
KHOA HỌC**
VỀ NGHIÊN CỨU
VÀ GIẢNG DẠY
SINH HỌC
Ở VIỆT NAM **6**

HỘI NGHỊ KHOA HỌC QUỐC GIA LẦN THỨ 6
THÀNH PHỐ HUẾ, 06/7/2024

PROCEEDING OF THE 6TH NATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE
ON BIOLOGICAL RESEARCH AND TEACHING IN VIETNAM
HUE CITY, JULY 6, 2024



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ

ISBN: 978-604-357-275-9



SÁCH KHÔNG BÁN

TT	Tên bài	Trang
93	BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN DUNG HỢP S1D-LL-37 Ở TẾ BÀO MÔ SẸO LÚA CHUYỂN GEN Nguyễn Xuân Huy, Moon-Sik Yang	898
94	<i>Dendrobium anosmum</i> LINDL. ‘TIM HUE’ AND THE METHOD OF VEGETATIVE PROPAGATION FROM THE AXILLARY NODE SHOOTS OF THE STEM (KEIKIS) Nguyen Huu Tho, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, and Nguyen Thi Kim Cuc	908
95	ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CYTOKININ CPPU KT-30 VÀ PHÂN HỮU CƠ ĐẦU TRÊU ORGANIC NUTRI GREEN ĐẾN SINH TRƯỞNG, NĂNG SUẤT VÀ CHẤT LƯỢNG HẠT CÚC GAI (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.) TRỒNG TẠI TỈNH PHÚ THỌ Hoàng Thị Lệ Thu, Nguyễn Thị Việt Thùy, Phạm Thanh Loan	916
96	ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN TẬP ĐOÀN LAN HOÀNG THẢO (<i>Dendrobium</i>) BẢN ĐỊA Ở PHÍA NAM VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ DNA (RAPD-PCR) Trịnh Thị Hương, Lê Đình Chấn	924
97	ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ NĂNG SUẤT CỦA MỘT SỐ GIỐNG DƯA CHUỘT ĐƠN TÍNH CÁI TRỒNG TRONG NHÀ LƯỚI TẠI THÀNH PHỐ QUY NHƠN, TỈNH BÌNH ĐỊNH Bùi Hồng Hải, Nguyễn Thị Y Thanh	933
98	ĐÁNH GIÁ SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN, NĂNG SUẤT VÀ CHẤT LƯỢNG QUẢ CỦA MỘT SỐ GIỐNG NHẪN (<i>Dimocarpus longan</i>) TRỒNG TẠI TỈNH HƯNG YÊN Trần Thị Thanh Huyền, Trần Thị Thu Trang, Lương Hoàng Anh, Cao Phi Bằng, Chu Đức Hà	942
99	ĐỀ XUẤT KHUNG HƯỚNG DẪN QUẢN LÝ CHUNG CHO KHU DỰ TRỮ SINH QUYỂN THỂ GIỚI Ở VIỆT NAM Trương Quang Học, Hoàng Thị Thanh Nhàn, Hoàng Thị Ngọc Hà, Vũ Thục Hiền	953
100	<i>In vitro</i> PROPAGATION OF SWEET POTATO VARIETIES VC6, VC7 (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) LAM) THROUGH LATERAL BUD CULTURE Le Thi Thuy, Tran Thi Giang, Tong Thi Thu Hoai, Tran Thi Hai	962
101	INVESTIGATING CHILD LINEAR GROWTH: AN EXPLORATION OF ANTHROPOMETRIC CHARACTERISTICS AMONG 6 - 14-YEAR-OLD CHILDREN IN THAI NGUYEN CITY, VIETNAM Duong Thi Anh Dao, Nguyen Thi Trung Thu, Le Thi Tuyen, Do Thi Nhu Trang, Nguyen Thi Thuy Nga, Nguyen Thi Hong Hanh	972
102	KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ NĂNG SUẤT CỦA MỘT SỐ GIỐNG SEN (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.) TẠI TỈNH THỪA THIÊN HUẾ Nguyễn Thị Quỳnh Trang, Phạm Thành, Hoàng Thị Kim Hồng	983

***Dendrobium anosmum* Lindl. “TIM HUE’ AND THE METHOD OF VEGETATIVE PROPAGATION FROM THE AXILLARY NODE SHOOTS OF THE STEM (KEIKIS)**

Nguyen Huu Tho^{1,3}, Nguyen Thi Oanh¹, Truong Thi Bich Phuong², and Nguyen Thi Kim Cuc^{1*}

Abstract. *Dendrobium anosmum* Lindl. 'tim hue' has many outstanding features such as large stems and leaves, big-sized flowers, symmetrical flower structure, a characteristic purple color, and a gentle scent. The study found a suitable medium for propagating from keikis was sand with the highest keiki budding rate of 70.16%. Two growth stimulants BAP and TDZ were regarded as affecting the shooting ability of keiki, the best concentrations of BAP and TDZ were 200 mg/L and 250 mg/L respectively. The plant growth stimulant used to stimulate rooting was NAA, the most effective concentration was 250 mg/L.

Keywords: *Dendrobium anosmum* Lindl., morphological characteristics, microbial preparations, propagation from keiki.

1. INTRODUCTION

Dendrobium is a large genus in the Orchidaceae family including more than 1,200 species that widely distributed in South Asia, East Asia, and Southeast Asia (Givnish et al., 2015). *Dendrobium anosmum* Lindl. belongs to the genus *Dendrobium* (Ban, 2005) with attractive beauty and outstanding flower structure so that they was keep being favored.

Orchid seeds have no endosperm or a thin endosperm layer, therefore, their seeds need specific symbiotic fungi to be likely to germinate. Their natural budding ability was ultra-low (Kauth et al., 2008). Orchids propagating by conventional methods (propagating from stem cuttings, separating bushes, etc.) have the disadvantage of a low multiplication coefficient and disturbingly impact on the original plant (Martin & Madassery, 2006), however, this process is assessed as simple and easy to implement. In orchids, Keiki is often used for vegetative propagation. Keiki is referred to as a shoot that develops into a seedling from a dormant node in the stem instead of growing into a branch (De et al., 2015).

Recently, a several studies on vegetative propagation with high efficiency was published such as breeding *Dendrobium nobile* Lindl. orchids (Colombo et al., 2015; Venturieri & Pickscius, 2013), *Dendrobium johannis* Rchb.f. (Suryaningsih et al., 2018). *D. anosmum* Lindl., is a rather special orchid because the propagation via stimulating its keikes is more easily compared to other orchids. In this study, we specifically identified

¹Institute of Biotechnology, Hue University

²Hue University – University of Sciences

³College Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam

*Email: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn

the orchid species *Dendrobium anosmum* Lindl. 'tim hue', and optimized substrate as well as growth stimulants to propagate *D. anosmum* Lindl. from keikis effectively.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant materials

D. anosmum Lindl. 'tim hue' was discovered from a local origin, then transferred and grown at the orchid garden of the Institute of Biotechnology, Hue University, Thua Thien Hue province, Vietnam. The study used pseudobulb stems of 2 years old or older orchids. In August-September 2023 (after the flowering season), we cut these stems into short sections of 4-5 cm with 1-3 axillary shoots per section.

2.2. METHODS

Describe morphological characteristics

Describe the morphological characteristics of *D. anosmum* Lindl. 'tim hue' orchid according to the method of orchid morphological characterization by De (2020).

Effect of substrate on the budding ability of Keiki

Qualified pseudobulb stems (large and strong, free of pests and diseases, and alive axillary shoots) were selected after removing the dry leaf sheaths. The pseudobulb stem was cut into short sections from 4-5 cm containing 2-3 axillary shoots. Short stem sections have a layer of healing glue applied at the cut to disinfect and reduce water loss. Then they were placed in different substrates (plastic tray, mix of coconut coir and rice husk charcoal (1:1, w/w), sand (Colombo et al., 2015), moss). The substrate ensures ventilation and moisture retention (Gurung & Gurung, 2014). Each experiment was repeated 3 times with 10 stem segments for each. The period of 60 days, observing budding time, budding rate, shoot length, shoot diameter, and number of leaves.

Effect of growth stimulants on the budding ability of Keikis

Using growth stimulants 6-Benzylaminopurine (BAP) and Thidiazuron (TDZ) (Tran et al., 2021) with concentrations ranging from 100-300 mg/L, sprayed directly on stem sections twice a week. The experiment was repeated 3 times, each time using 10 stem segments. During 60 days, observing budding time, budding rate, shoot length, number of leaves, and shoot diameter.

Effect of growth stimulants on the rooting ability of shoots from Keiki

Utilizing keiki which has shoots but no roots from the shoot creation experiment for this process. The growth stimulant used was naphthylacetic acid (NAA) (Tran et al., 2021) with a concentration from 100-300 mg/L. Sprayed directly NAA on the shoots twice a week. The experiment was repeated 3 times and used 10 shoots each time. During the 60-day phase, parameters of rooting time, rooting rate, root length, number of roots, and root characteristics were recorded.

Statistical analysis

Data were analyzed using Microsoft Excel 2019 and IBM SPSS Statistic 26 software. LSD standard (for 95% confidence) and ANOVA analysis (Duncan's test) for each formula were applied to evaluate differences.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Morphological characteristics of *D. anosmum* Lindl 'tim hue' orchid

D. anosmum Lindl 'tim hue' was described in detail with its stem, root, leaf, and flower characteristics, these are morphologically identifiable characteristics of this species. The data on some characteristics are shown in Table 1, Fig 1.

Table 1. Some characteristics of *D. anosmum* Lindl 'tim hue' orchid

Characteristics	Mature tree (topped)	The tree is still growing
Height of trees (cm)	102.00 ^a ±2.78	58.53 ^b ±2.01
Diameter of tree (cm)	1.16 ^a ±0.06	0.83 ^b ±0.03
Length of the internode (cm)	3.67 ^a ±0.11	2.38 ^b ±0.07
Number of leaves	34.47 ^a ±0.69	24.67 ^b ±0.54
Leaf length (cm)	16.14 ^a ±0.58	10.38 ^b ±0.34
Maximum leaf width (cm)	3.42 ^a ±0.09	2.17 ^b ±0.09
Flower diameter (cm)	10.36±0.59	

Note: (Means ± standard errors; within a row followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.)



Fig 1. Morphology of orchid *D. anosmum* 'tim hue'. A: Orchid; B: The location of the flower growing from the stem; C1,2: Upper and lower sides of leaves; D1,2,3,4,5: flower views (front, top, bottom, side and Spread flowers on a flat surface); E: Column; F: Anther and Pollinia; G: Pollinia; H: Upper sepal; I: Two Shoulders petals; K: Two lower sepals; L: Flower lips

Flower: The flower has 5 petals including one upper sepal, two lower sepals, and two shoulder sepals (usually larger than the other wings flower), waxy petals with a pale pinkish-purple border, an oblong lance-shaped with a pointed apex, balanced flower structure, curled backward petals when blooming. There are flower lips, two flower eyes, throat lobes, a nose, and spurs. Flowers are fragrant (a bit like a lavender scent) and have a variety of colors but the most common are white purple, light pink, or dark purple. Flowers grow in clusters with 2-3 flowers at the location of nodes near the top and have many flower clusters.

Leaves: The leaves are oblong and green, the collar is a purple ring. On the surface of old leaves, the veins are clearly visible and vertical to both sides of the leaf blade; while in young leaves, the veins are faint and smooth. The leaves are brittle and unwatery if folded. The leaf sheath has a purple-black pigment of spots or streaks.

Stem: The stem is smooth and succulent, not hollow inside. It has pale green, pseudobulbs stem and some buds or flower buds. The leaf sheath is close to the stem, containing 4-5 white stripes running from the base of the internodes.

Morphological and structural characteristics of orchids include growth patterns, leaves, flowers, pseudobulbs, and roots. Flowers are the most important organs for species identification. The structure of orchids is mainly petals, sepals, pollen, flower pillars, and lip petals (Castro & Singer, 2019). In the morphological description of *D. anosmum* Lindl previously, some authors have described similar characteristics such as a balanced star-shaped flower pattern, scent, many color variations, and hairy petals (Burzacka-Hinz et al., 2022; Hartati et al., 2022; Nguyen et al., 2022).

3.2. Effect of substrate on the ability of keikis to sprout

The results of the substrate experiment affecting the ability of keikis to sprout are presented in Table 2.

Table 2: Effect of substrate on keiki's budding ability after 60 days of incubation.

Treatment	Budding time (days)	Budding rate of keiki (%)	Shoot length (cm)	Shoot diameter (cm)	Number of leaves
CT1	31.47 ^c ±0.57	46.62 ^c ±1.03	1.65 ^c ±0.10	0.31 ^b ±0.01	3.07 ^a ±0.21
CT2	25.80 ^b ±0.43	66.02 ^b ±0.89	2.34 ^{ab} ±0.08	0.35 ^b ±0.02	3.33 ^a ±0.19
CT3	20.93 ^a ±0.58	70.16 ^a ±0.85	2.54 ^a ±0.10	0.4 ^a ±0.02	3.67 ^a ±0.19
CT4	26.40 ^b ±0.57	66.77 ^b ±0.51	2.27 ^b ±0.06	0.33 ^b ±0.01	3.07 ^a ±0.21

Note: (Means ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$. (CT1: Keiki is placed on a plastic tray; CT2: Keiki is placed on a mixed coconut coir and rice husk charcoal (1:1, w/w); CT3: Keiki is placed on sand; CT4: Keiki is placed on a moss).

The growing medium affects the ability of keikis to sprout, although the results are different between experimental formulas. Keiki grown on a sand substrate (CT3) given that the best results this result compared to the control CT1 is much higher. Inmixed coconut coir and rice husk charcoal (1:1, w/w) (CT2) and moss (CT4) showed different

results but were not statistically significant, these two types of substrates are effective are similar (Table 2, fig 2). Previous studies have also shown that the medium used to grow keiki has an impact on the ability of keiki to sprout. The publication of Venturieri & Pickscius, (2013), and Colombo et al., (2015) on propagating orchids *D. nobile* Lindl using keiki, shows that two types of substrate gravel, and sand are suitable for keiki to bud.

3.3. Effect of growth stimulants on Keiki's ability to sprout shoots

Table 3: Effects of growth stimulants on the budding ability of Keiki after 60 days of incubation

CT	Growth stimulants (mg/L)		Budding time (days)	Budding rate (%)	Length of shoot (cm)	Shoot diameter (cm)	Number of leaves
	BAP	TDZ					
1	0	0	20.93 ^{ef} ±0.58	70.16 ^e ±0.85	2.54 ^f ±0.10	0.44 ^{de} ±0.02	3.67 ^{cd} ±0.19
2	100	0	19.47 ^{def} ±0.77	75.22 ^d ±1.05	2.74 ^{ef} ±0.10	0.4 ^{de} ±0.01	3.80 ^{cd} ±0.20
3	150	0	18.53 ^{cde} ±0.96	81.22 ^{bc} ±1.53	3.29 ^{cd} ±0.08	0.48 ^{cd} ±0.01	4.00 ^{abcd} ±0.20
4	200	0	14.53 ^{ab} ±0.87	86.56 ^a ±1.90	3.63 ^{ab} ±0.07	0.52 ^{bc} ±0.01	4.60 ^a ±0.19
5	250	0	16.53 ^{bc} ±0.89	82.56 ^b ±0.88	3.03 ^{de} ±0.10	0.42 ^e ±0.01	4.20 ^{abc} ±0.20
6	300	0	21.60 ^f ±0.64	77.22 ^{cd} ±0.83	3.38 ^{bc} ±0.09	0.44 ^{de} ±0.01	3.93 ^{bcd} ±0.21
7	0	100	20.27 ^{ef} ±0.57	73.89 ^{de} ±1.26	2.61 ^f ±0.13	0.46 ^{de} ±0.01	3.60 ^{cd} ±0.21
8	0	150	19.20 ^{def} ±0.92	77.36 ^{cd} ±1.31	3.01 ^{de} ±0.13	0.49 ^{cd} ±0.01	3.87 ^{bcd} ±0.22
9	0	200	17.33 ^{cd} ±1.04	80.29 ^{bc} ±1.39	3.37 ^{bc} ±0.12	0.53 ^b ±0.02	4.13 ^{abc} ±0.19
10	0	250	13.87 ^a ±0.74	87.22 ^a ±1.79	3.89 ^a ±0.08	0.62 ^a ±0.02	4.47 ^{ab} ±0.19
11	0	300	18.23 ^{cde} ±1.21	73.49 ^{de} ±1.22	2.81 ^{ef} ±0.08	0.42 ^e ±0.02	3.47 ^d ±0.19

Note: (Means ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.)

Without growth stimulants for keikis, the obtained results are not good (CT1; fig. 2B). This result is better improved with the influence of growth stimulants BAP or TDZ. The effectiveness of the growth stimulant on keiki increases gradually as its concentration also increases and reaches the best effect when using 200 mg/L for BAP (CT4) and 250 mg/L for TDZ (CT10) (Table 3, fig 2E, 2F). However, when the concentration exceeds the growth stimulant concentration threshold in CT4 and CT10, the effectiveness of keikis growth tended to reduce, this proves that when BAP and TDZ are too high, it will inhibit the budding process of keikis.

3.4 Effect of growth stimulants on the rooting ability of shoots from keikis

Growth stimulant NAA has a positive impact on the ability of plants to create roots. In this study, we used a concentration of 100-300 mg/L NAA sprayed directly on orchid shoots to investigate the rooting ability of the shoots. The research results are presented in Table 4.

D. anosmum 'tim hue' orchid shoots grown from keikis have strong rooting ability, 100% of experimental shoots rooted even without using growth stimulants (CT1, Fig 2G).

However, the quality of the roots of the shoots in each experiment was different. The rooting efficiency of orchid shoots was increased when using NAA. The most effective experiment was CT5 with an NAA concentration of 250 mg/L (Fig 2H). When increasing the NAA concentration to 300 mg/L, the rooting efficiency decreased (CT6), this proves that this NAA concentration is high causing the phenomenon of inhibition of the rooting process of *D. anosmum* 'tim hue' orchid shoots.

Table 4. Effects of growth stimulants on keiki's rooting ability after 60 days of experiment

CT	NAA (mg/l)	Rooting time (days)	Rooting rate (%)	Number of roots	Root length (cm)
1	0	18.67 ^d ±0.92	100	2.27 ^c ±0.25	2.21 ^d ±0.15
2	100	16.67 ^c ±0.87	100	2.73 ^{de} ±0.23	2.61 ^d ±0.17
3	150	13.27 ^d ±0.65	100	3.33 ^{cd} ±0.19	3.12 ^c ±0.16
4	200	11.93 ^c ±0.65	100	4.13 ^{ab} ±0.26	3.52 ^{bc} ±0.15
5	250	7.33 ^a ±0.55	100	4.60 ^a ±0.25	4.12 ^a ±0.20
6	300	9.60 ^b ±0.77	100	3.80 ^{bc} ±0.26	3.72 ^{ab} ±0.13

Note: (Means ±standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$).



Fig 2. Propagating *D. anosmum* 'tim hue' orchids from keiki and the effects of microbial preparations on the growth of orchid seedlings; **A, B, C, D:** Effect of substrate on keiki's budding ability after 60 days. (A. keiki is placed on a plastic tray; B. keiki is grown on a sand substrate; C. the keiki are placed on a moss substrate; D. Keiki is placed on a mixed coconut coir and rice husk charcoal (1:1, w/w)); **E, F:** Effect of growth stimulants on keiki's budding ability after 60 days (E. 200 mg/LBAP; F. 250 mg/L TDZ); **G, H:** Effect of growth stimulant NAA on the rooting ability of orchid shoots after 60 days (G. Without growth stimulants; H. Use 250 mg/L NAA).

4. CONCLUSION

D. anosmum Lindl. 'Tim hue' is an orchid species typical of Thua Thien Hue province - Vietnam, with many outstanding characteristics such as large leaf stems, balanced flower structure, large flowers, and solid purple color characteristics, and the flowers have a mild fragrance. *D. anosmum* Lindl. 'tim hue' is very suitable for propagation by keiki, with a Keiki budding rate of 70.16% in sand.

ACKNOWLEDGEMENTS

All experiments were conducted at the Cell Laboratory, Institute of Biotechnology, Hue University. Funding was supported by the Cell Laboratory and from the VinIF scholarship" Nguyen Huu Tho was funded by the Master, Ph.D. Scholarship Programme of Vingroup Innovation Foundation (VINIF), code VINIF.2023.TS.121"

REFERENCES

- Ban, N. T. (2005). *Checklist of Plant Species Vietnamese (Volume III)* (N. T. Ban (ed.)). Agricultural publishing house.
- Burzacka-Hinz, A., Narajczyk, M., Dudek, M., & Szlachetko, D. L. (2022). Micromorphology of Labellum in Selected *Dendrobium* Sw.(Orchidaceae, Dendrobieae). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 1–27.
- Castro, J. B., & Singer, R. B. (2019). A literature review of the pollination strategies and breeding systems in Oncidiinae orchids. *Acta Botanica Brasilica*, 33, 618–643. <https://doi.org/DOI: 10.1590/0102-33062019abb0111>.
- Colombo, R. C., Favetta, V., & de Faria, R. T. (2015). Cutting size in the vegetative propagation of *Dendrobium nobile* Lindl. *Agronomy Science and Biotechnology*, 1(2), 73–76.
- De, L. C. (2020). Morphological diversity in orchids. *International Journal of Botany Studies*, 5, 229–238.
- De, L. C., Rampal, & Singh, D. R. (2015). Techniques for production of quality planting materials in orchids. *International Journal of Development Research*, 5(6), 4587–4591.
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., Iles, W. J. D., Clements, M. A., Arroyo, M. T. K., & Leebens-Mack, J. (2015). Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1814), 282–292.
- Gurung, C. T., & Gurung, A. (2014). Chemical growth regulator mediated propagation of *Dendrobium 'Rinnapa'* Lek Dee Dee and its comparative analysis with other methods of propagation. *Pleione*, 8(2), 361–366.
- Hartati, S., Samanhudi, & Cahyono, O. (2022). Morphological characterization of five species of *Dendrobium* native to Indonesia for parent selection. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(5), 2648–2654.
- Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, 5, 375–391.
- Martin, K. P., & Madassery, J. (2006). Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies.

Scientia Horticulturae, 108(1), 95–99.

Nguyen, D. T., Nguyen, O. T., Ho, T. T., Nguyen, T. H., La, H. T. T., & Nguyen, C. K. T. (2022). Effects of hormone and fertilizers on early flower induction of *Dendrobium anosmum* hybrid seedlings under ex vitro condition. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10(5), 1168–1179. [http://dx.doi.org/10.18006/2022.10\(5\).1168.1179](http://dx.doi.org/10.18006/2022.10(5).1168.1179)

Suryaningsih, N. L. S., Hisa, L., & Limbongan, A. A. (2018). The Keiki Formation and the Flowering of Pseudobulb of *Dendrobium johannis* Rchb. f. *Indian Journal of Public Health Reserch & Development*, 9(2), 216–220.

Tran, K. T., Ha, T. T. T., Vu, D. X., Nguyen, T. V. T., Nguyen, H. Van, Pham, L. T., & Nguyen, T. X. (2021). In vitro propagation of indigenous Phu Tho's 5-petaled white orchid (*Dendrobium anosmum* Lindl.). *Journal of Science and Technology Hung Vuong University*, 25(4), 85–93.

Venturieri, G. A., & Pickscius, F. J. (2013). Propagation of noble dendrobium (*Dendrobium nobile* Lindl.) by cutting. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35, 501–504.

LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ VÀ PHƯƠNG PHÁP NHÂN GIỐNG SINH DƯỠNG TỪ CHỒI NGỦ CỦA THÂN (KEIKIS)

Nguyễn Hữu Thọ^{1,3}, Nguyễn Thị Oanh¹, Trương Thị Bích Phượng², Nguyễn Thị Kim Cúc^{1*}

Abstract. Lan giả hạc tím huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) mang nhiều đặc điểm nổi bật như thân và lá có kích thước lớn, mặt hoa cân đối, hoa to, có màu tím đặc trưng và có mùi thơm dịu. Nghiên cứu đã lựa chọn được giá thể phù hợp cho nhân giống bằng keikis là cát với tỷ lệ nảy mầm của keiki 70,16%. Hai chất kích thích sinh trưởng BAP và TDZ có ảnh hưởng đến khả năng nảy chồi của keiki. Nồng độ tốt nhất cho kích thích nảy chồi keiki là 200 mg/L đối với BAP và 250 mg/L đối với TDZ. Chất kích thích sinh trưởng thực vật được sử dụng để kích thích ra rễ là NAA với nồng độ sử dụng hiệu quả nhất là 250 mg/L.

Từ khoá: *Dendrobium anosmum* Lindl., nhân giống từ keiki, đặc điểm hình thái, chế phẩm vi sinh.

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường Đại học Khoa học Huế, Đại học Huế

³Trường Cao đẳng Cơ điện-Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ

*Email: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn

ĐẠI HỌC HUẾ
NHIỀU TÁC GIẢ

BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

Thành phố Huế, ngày 25 – 26 tháng 9 năm 2024

Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào;
Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp;
Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ
Huế, 2024

Biên mục trên xuất bản phẩm của Thư viện Quốc gia Việt Nam

Báo cáo khoa học Hội nghị Khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học 2024: Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào; Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp; Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào : Thành phố Huế, ngày 25 - 26 tháng 9 năm 2024 / Nguyễn Hồng Chiên, Lưu Ngọc Quyên, Nguyễn Thị Kim Linh, Mai Thị Phương Nga... – Huế : Đại học Huế, 2024. - 1314 tr. : hình vẽ, ảnh ; 27cm

ĐTTS ghi: Đại học Huế. - Thư mục cuối mỗi bài

ISBN 978-604-489-393-8

1. Công nghệ sinh học 2. Báo cáo khoa học 3. Kỹ yếu hội nghị

660.6 - dc23

DUM0916p-CIP

Mã số sách: NC/505-2024

8. NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG <i>IN VITRO</i> CÂY HOA ĐÀO CHUÔNG (<i>Enkianthus quinqueflorus</i>) TẠI KHU BẢO TỒN THIÊN NHIÊN BÀ NÀ - NÚI CHÚA. Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Ly Na, Nguyễn Dương Thúy Hà, Đặng Ngọc Minh	460
9. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA DIMETHYL SULFIDE (DMS) ĐẾN TẠO BIẾN DỊ LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ (<i>Dendrobium anosmum</i> Lindl). Nguyễn Hữu Thọ, Nguyễn Thị Oanh, Lê Thị Thu Hằng, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc	467
10. DETERMINATION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR THE ENHANCEMENT IN SAPONINS EXTRACTION FROM ĐĂNG SÂM (<i>Codonopsis pilosula</i> Nannf.). An D.X. Nguyen, Uyen P. Le, Nghi B.P. Nguyen, Phuc N.T. Le, Phu H. Le	474
11. ĐỊNH DANH PHẦN TỬ VÀ NHÂN GIỐNG <i>in vitro</i> LAN KIẾM TIÊN VŨ (<i>Cymbidium finlaysonianum</i>). Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Nguyễn Thị Từ Vy, Nguyễn Thị Xuân Hiền, Huỳnh Văn Biết, Huỳnh Hữu Đức	480
12. NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH <i>IN VITRO</i> CÂY CẨM CHƯỞNG NATALIE THÔNG QUA NUÔI CÂY ĐÌNH CHỒI. Lê Văn Tường Huân	487
13. ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CƯỜNG ĐỘ ÁNH SÁNG, NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG VÀ MẬT ĐỘ MẪU CÂY ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY HOA CHUÔNG (<i>Sinningia speciosa</i>) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG RSM (RESPONSE SURFACE METHOD). Đỗ Đăng Giáp, Trần Trọng Tuấn, Nguyễn Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Xuân Trang, Nguyễn Thị Thu Hằng, Hoàng Văn Nam, Ngô Thị Thanh Nhân, Võ Thanh Phúc, Liêu Mỹ Đông, Đặng Thị Kim Thúy	493
14. TÁI SINH CHỒI <i>IN VITRO</i> TỪ MẪU CÂY PHÁT HOA CỦA GIỐNG LAN HẢI PHẮC ĐỎ (<i>Phragmipedium Memoria</i> Dick Clements) NHẬP NỘI. Vũ Quốc Luận, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Thị Như Mai, Nguyễn Thị Kim Linh, Tạ Đình Vương, Trần Thị Tâm, Vũ Thị Tư, Nguyễn Ngọc Sơn, Dương Tấn Nhựt	502
15. <i>IN VITRO</i> PROPAGATION OF OF Aloe 'Pink Blush' (Kelly Griffin) – AN ATTRACTIVE ORNAMENTAL PLANT. Minh-An Le, Pham Thi Thanh-Thuy, Tran Binh-Minh	508
16. ENHANCING THE DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS DERIVED FROM SMALL BOVINE OOCYTES THROUGH PRE-MATURATION CULTURE WITH L-ASCORBIC ACID. Cao Hoang Nam, Pham Truong Duy, Lac Duong Hung, Hoang Minh Hung, Nguyen Van Thuan, Bui Hong Thuy	515
17. ESTABLISHMENT OF STORAGE METHOD FOR CLONED BOVINE EMBRYOS BEFORE TRANSFERRING TO SURROGATE COW. Pham Truong Duy, Le Nguyen Lam Ngoc, Pham Minh Chien, Pham Quoc Dinh, Giang Trung Hieu, Cao Hoang Nam, Nguyen Do Kha, Bui Hong Thuy, Nguyen Van Thuan	520
18. ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG VÀ HÀM LƯỢNG MÔI TRƯỜNG MS ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA HOA TÍM BA TỬ' (<i>Exacum affine</i> Balf. F. Ex Regel) <i>IN VITRO</i> Lê Nguyễn Lan Thanh, Trần Thị Sơn Tiên, Nguyễn Phạm Hồng, Loan, Võ Thị Lan Hân	525
19. EVALUATION OF THE DEVELOPMENT OF INTERSPECIES SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER (iSCNT) EMBRYO USING RECEIPT BOVINE OOCYTE. Cao Thuy Khanh, Pham Minh Chien, Giang Trung Hieu, Cao Hoang Nam, Pham Truong Duy, Doan Dai Thien, Bui Hong Thuy, Nguyen Van Thuan	533
20. EFFECTS OF LOCATION OF SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER ON EPIGENETIC MODIFICATION AND PREIMPLANTATION DEVELOPMENT OF CLONED BOVINE EMBRYOS. Nguyen Gia Bao, Nguyen Do Kha, Pham Minh Chien, Cao Hoang Nam, Bui Hong Thuy, Nguyen Van Thuan	538
21. ENHANCING THE INNER CELL MASS CELL NUMBERS AND IMPLANTATION POTENTIAL OF BOVINE SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS BY USING MELATONIN DURING <i>IN VITRO</i> MATURATION OF OOCYTES. Cao Hoang Nam, Pham Truong Duy, Giang Trung Hieu, Nguyen Do Kha, Nguyen Van Thuan, Bui Hong Thuy	543

CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

1. ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA NHÓM VI KHUẨN LACTIC <i>Lactobacillus</i> spp. ĐỐI KHÁNG VỚI LOÀI VI KHUẨN <i>Edwardsiella ictaluri</i> & <i>Aeromonas hydrophila</i> GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA BỘT (<i>Pagasianodon hypophthalmus</i>). Nguyễn Thành Luân, Phạm Quỳnh Vân, Phạm Quỳnh Anh, Nguyễn Tam Minh Hòa, Diệp Hà Như Ý	550
2. NGHIÊN CỨU TẠO TINH BỘT KHÁNG TIÊU HÓA TỪ CHUỐI TIÊU HỒNG (<i>Musa paradisiaca</i> L.). Mai Vũ Hoàng Giang, Trương Thị Chiên, Đào Ngọc Ánh, Đỗ Thị Kim Trang, Trần Bình Minh, Vũ Xuân Tạo	557

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA DIMETHYL SULFIDE (DMS) ĐẾN TẠO BIẾN DỊ LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ (*Dendrobium anosmum* Lindl)

Nguyễn Hữu Thọ^{1,4}, Nguyễn Thị Oanh¹, Lê Thị Thu Hằng³, Trương Thị Bích Phượng², Nguyễn Thị Kim Cúc^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tĩnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, Số 77 Nguyễn Huệ, TP. Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

³Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế, Số 102 Phùng Hưng, P. Đông Ba, TP. Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

⁴Trường Cao đẳng Cơ điện, Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ, QL1A, KV8, P. Bùi Thị Xuân, TP. Quy Nhơn, Bình Định, Việt Nam

TÓM TẮT

Gây đột biến bằng hóa chất là một trong những biện pháp thường được sử dụng để chọn tạo giống thực vật. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng Dimethyl sulfide để gây đột biến trên giống lan Giả hạc tím Huế với mục đích chọn tạo được một số kiểu hình có giá trị thẩm mỹ và giá trị kinh tế cao. Xử lý mô sẹo lan Giả hạc tím Huế bằng Dimethyl sulfide với các nồng độ từ 0; 50; 100; 200; 400; 800 ppm trong các mốc thời gian khác nhau từ 2-10 giờ. Kết quả nghiên cứu sau 8 tuần nuôi cấy ghi nhận tỷ lệ mô sẹo còn sống đạt cao nhất là 73,62% ở thí nghiệm nồng độ DMS 50 ppm và xử lý trong 2 giờ, tuy nhiên số mẫu có biểu hiện hình thái khác so với đối chứng chỉ đạt 4,43%. Xử lý mô sẹo bằng DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ cho số mẫu biến dị hình thái lớn (14,93%). Các biến đổi ban đầu của mô sẹo sau khi xử lý DMS là những thay đổi về hình thái và màu sắc. Các tế bào biểu mô, khí khổng, hệ thống mạch dẫn của các chồi phát triển từ mô sẹo được xử lý DMS đều có những thay đổi chủ yếu là về hình dạng, trật tự sắp xếp. Từ những kết quả này chúng tôi tiếp tục nuôi cấy mô sẹo để tạo thành cây hoàn chỉnh nhằm chọn lọc các kiểu hình khác nhau phục vụ công tác chọn tạo giống lan Giả hạc tím Huế.

Từ khóa: Biến dị, cấu trúc tế bào, *Dendrobium anosmum* Lindl., Dimethyl sulfide (DMS), mô sẹo, thay đổi hình thái.

MỞ ĐẦU

Những năm gần đây, nhu cầu sưu tầm và trồng các loại hoa, cây cảnh có biến đổi về thân, lá, hoa tăng cao, đặc biệt lan Giả hạc là một trong những cây cảnh được nhiều người quan tâm. Lan Giả hạc có tên khoa học là *Dendrobium anosmum*, thuộc chi *Dendrobium*, họ Orchidaceae. Lan Giả hạc có hình thái, màu sắc và kích thước đa dạng nên được đánh giá là một trong những loài hoa, cây cảnh có giá trị trên thế giới (Teixeira da Silva *et al.*, 2015). Ở Việt Nam, lan Giả hạc phân bố từ Bắc vào Nam, trên mỗi vùng miền thì loài lan này có một số đặc điểm hình thái và thời điểm ra hoa riêng để nhận biết (Huyền, 2007). Lan Giả hạc tím Huế là một trong những giống lan đặc trưng của Thừa Thiên Huế, với đặc điểm hoa to, cánh viền, màu tím hồng đặc trưng và có mùi thơm dịu, mặt hoa cân đối, đây là một trong những giống lan Giả hạc được nhiều người quan tâm tìm kiếm (Tho *et al.*, 2024). Lan Giả hạc tím Huế mặc dù có giá trị thẩm mỹ cao nhưng ít có những biến dị di truyền nên độ đa dạng mặt hoa thấp hơn so với một số giống lan Giả hạc khác. Với mục tiêu tạo ra nhiều thay đổi hơn về kiểu hình, đa dạng nguồn nguyên liệu cho chọn lọc, đáp ứng nhu cầu đa dạng người chơi lan, làm tăng giá trị của dòng lan này, chúng tôi thực hiện nghiên cứu tạo đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng DMS.

DMS là một chất alkyl hóa đơn chức có 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 bases như vị trí N7 của guanin và vị trí N3 của adenin (Lawley, 1974), dẫn đến đột biến chuyển tiếp GC \rightarrow AT (Singer, Grunberger, 1983). Đã có những nghiên cứu về tác động gây đột biến của DMS trên cây trồng như trên cây Đậu tây (Sekhi *et al.*, 2022), DMS đã làm thay đổi một số đặc điểm sinh hoá trên cây Đậu tây như hàm lượng diệp lục, proline, enzyme..., trên cây Xà cừ (Mostafa, 2015), trên cây Huỳnh liên (Mostafa, Alhamed, 2016), DMS đã làm thay đổi khả năng tăng trưởng, thành phần hoá học trong cây, thay đổi hình thái và màu sắc của hoa, lá. DMS chưa được sử dụng nhiều trong việc tạo đột biến trên lan, nghiên cứu này được xem là đầu tiên trong việc sử dụng DMS để tạo ra biến dị trên cây lan Giả hạc *D. anosmum* Lindl.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mô sẹo có kích thước đồng đều từ 0,2-0,3 cm được tạo ra từ chồi ngủ của thân lan Giả hạc tím Huế được nuôi cấy *in vitro*. Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS cơ bản (Murashige, Skoog, 1962) có 30 g/L sucrose, 7 g/L agar, 0,7 g/L than hoạt tính và bổ sung các chất kích thích sinh trưởng thực vật thích hợp ở từng giai đoạn khác nhau. Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8, được khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm, trong 15 phút. Mẫu được giữ trong phòng nuôi ở nhiệt độ: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, mật độ thông lượng photon quang hợp trong khoảng $13,5 - 27 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày (Tho *et al.*, 2023).

Xử lý hóa chất

Mô sẹo lan khỏe mạnh, không có dấu hiệu nhiễm nấm khuẩn, có màu xanh lá, sinh trưởng tốt được sử dụng để xử lý hóa chất DMS. Hóa chất cho vào môi trường MS lỏng để đạt được các nồng độ theo từng công thức thí nghiệm (0, 50, 100, 200, 400, 800 ppm) và mỗi công thức thí nghiệm được xử lý trong một thời gian nhất định (2, 4, 6, 8, 10 giờ). Các chỉ tiêu theo dõi được ghi lại sau 8 tuần xử lý hóa chất. Những chỉ tiêu đánh giá bao gồm tỷ lệ sống của mẫu xử lý, tỷ lệ mẫu có phát triển hình thành mầm chồi và kích thước của mẫu còn sống, tỷ lệ mẫu có hình thái biến dị.

Phân tích đặc điểm biến đổi

Sử dụng chỉ thị hình thái: Quan sát, phân tích hình thái (Hình dạng mô sẹo, hình dạng và màu sắc lá mầm, chồi) của mẫu xử lý DMS so sánh với mẫu đối chứng không xử lý DMS.

Sử dụng chỉ thị tế bào: Được tiến hành theo phương pháp nghiên cứu với kính hiển vi của tác giả Trần Công Khánh (2005). Thực hiện làm tiêu bản tạm thời quan sát dưới kính hiển vi các mẫu mô sẹo và mẫu lá, thân, rễ của cây con *invitro* phát triển từ mô sẹo xử lý DMS giai đoạn ra rễ để đánh giá các biến đổi về hình dạng, kích thước, sắp xếp của tế bào, mạch dẫn của mô sẹo và chồi lan sau khi xử lý hóa chất so với mẫu đối chứng không xử lý DMS.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát 15 mẫu. Số liệu thu được được xử lý bằng phần mềm SPSS 26 và được phân tích Duncan's test với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$. Hình ảnh được phân tích bằng phần mềm Imageji 1.8.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xử lý hóa chất đột biến DMS

Bảng 1. Kết quả xử lý mẫu mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy

CT	Nồng độ xử lý (ppm)	Thời gian xử lý (h)	Chỉ tiêu theo dõi sau khi xử lý bằng DMS			
			Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu có phát triển mầm chồi (%)	Tỷ lệ mẫu có hình thái biến dị (%)	Kích thước mẫu sống (cm)
ĐC	0	0	95,56±2,94 a	88,89±1,11 a	0,00±0,00 g	0,86±0,05 a
CT1	50	2	73,62±1,32 b	53,32±2,34 b	4,43±0,63 e	0,85±0,0 a
CT2	100	2	54,44±2,94 d	32,22±2,94 d	8,38±1,19 d	0,75±0,02 bc
CT3	200	2	33,33±3,85 g	21,11±2,22 e	12,19±1,50 bc	0,80±0,02 ab
CT4	400	2	7,78±2,22 jk	4,44±1,11 gh	3,71±0,38 ef	0,71±0,02 cd
CT5	800	2	0,00±0,00 m	0,00±0,00i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT6	50	4	66,58±2,95 c	37,49±2,11 c	14,93±1,91 a	0,67±0,01 de
CT7	100	4	24,44±1,11 h	14,44±1,11 f	7,77±0,63 d	0,65±0,04 de
CT8	200	4	7,78±1,11 jk	3,33±0,00 ghi	3,33±0,00 ef	0,61±0,02 efg
CT9	400	4	3,33±1,92 klm	1,11±1,11 hi	1,11±1,11 fg	0,56±0,05 fgh
CT10	800	4	1,11±1,11 lm	1,11±1,11 hi	1,11±1,11 fg	0,53±0,02 h
CT11	50	6	47,74±1,08 e	18,68±0,73e	13,56±1,09 ab	0,68±0,01 cde
CT12	100	6	10,00±1,92 j	5,56±1,11 g	3,89±0,48 ef	0,69±0,02 cde
CT13	200	6	2,22±1,11 lm	1,11±1,11 hi	2,22±1,11 efg	0,53±0,02 h

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

CT14	400	6	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT15	800	6	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT16	50	8	41,43±1,13 f	12,59±1,35 f	10,23±1,35 cd	0,61±0,04 efg
CT17	100	8	5,56±1,11 jkl	4,44±1,11 gh	2,72±1,43 efg	0,62±0,02 ef
CT18	200	8	1,11±1,11 lm	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,52±0,00 h
CT19	400	8	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT20	800	8	0,00±0,00 m	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT21	50	10	19,62±0,77 i	6,78±0,85 g	3,03±0,72 ef	0,56±0,05 fgh
CT22	100	10	2,22±1,11 lm	1,11±1,11 hi	1,11±1,11 fg	0,54±0,02 gh
CT23	200	10	1,11±1,11 lm	0,00±0,00 i	0,00±0,00 g	0,51±0,00 h
CT24	400	10	0,00±0,00 m	0,00±0,00 h	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i
CT25	800	10	0,00±0,00 m	0,00±0,00 h	0,00±0,00 g	0,00±0,00 i

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

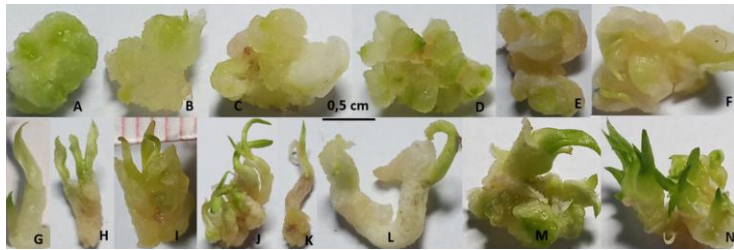
Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mô sẹo còn sống khi được xử lý bằng DMS cao nhất đạt được là 73,62% (CT1). Tỷ lệ mẫu có mầm chồi phát triển ở công thức này là 53,32%, tuy nhiên số mẫu có biểu hiện hình thái khác so với đối chứng lại thấp chỉ đạt 4,43%. Công thức xử lý bằng DMS với nồng độ xử lý 50 ppm trong 4 giờ, có số mẫu biến dị hình thái lớn nhất đạt 14,93% (CT6). Các công thức thí nghiệm khác, tỷ lệ mẫu biến dị đều thấp hơn 14%, thậm chí công thức CT9, CT10, CT22 chỉ đạt 1,11% mẫu biến dị. Khi xử lý mô sẹo bằng DMS với nồng độ 400 ppm trở lên trong thời gian 6-10 giờ thì các mẫu đã bị chết 100% đến thời điểm 8 tuần sau xử lý. Các công thức CT14, CT15, CT19, CT24 và CT25 xử lý ở nồng độ 800 ppm trong 2 giờ cũng có kết quả tương tự. Ở thí nghiệm CT18 và CT23 đều ghi nhận có mẫu sống nhưng tỷ lệ rất thấp (1,11%), mẫu không phát triển mầm chồi và có màu úa vàng, mức tăng trưởng kém, kích thước mẫu chỉ đạt 0,52 cm và 0,51 cm. Kích thước của mô sẹo xử lý DMS còn sống sau 8 tuần nuôi cấy đạt được trong khoảng 0,51 – 0,86 cm, cao nhất ở công thức đối chứng (0,86 cm) và CT1 (0,85 cm) (bảng 1).

Gây đột biến bằng DMS được Mostafa (2015) sử dụng trên cây Xà cừ (*Khaya senegalensis*) để tạo ra các giống mới có đặc tính tốt hơn. Hạt cây Xà cừ ngâm trong dung dịch DMS (0, 1000, 2000, 3000, 4000 và 5000 ppm) trong 15 giờ. Kết quả cho thấy các nồng độ 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm đã cho những biến dị về số lượng cành lá, chiều cao cây, màu sắc và tốc độ tăng trưởng (Mostafa, 2015). Một nghiên cứu khác của Mostafa và Alhamd (2016) trên cây hoa Huỳnh liên (*Tecoma stans*), tiến hành ngâm hạt trong dung dịch DMS ở nồng độ 0, 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm trong 15 giờ để tạo ra biến dị di truyền. Kết quả thử nghiệm cho thấy với các nồng độ thử nghiệm đều có những cây biến dị với các đặc điểm khác nhau về lá, hoa, màu sắc, kích thước cây và hoa (Mostafa, Alhamd, 2016). Một công bố khác của Victoria Vasko và Victor Kyrychenko (2016) trên cây hoa Hướng dương (*Helianthus annuus*), tác giả đã sử dụng DMS nồng độ 0,01 – 0,05% để xử lý hạt trong 18 giờ. Nghiên cứu cũng đã cho thấy DMS đã tác động làm thay đổi số lượng cánh hoa, màu sắc, kích thước cây của cây Hướng dương ở thế hệ 1 và 2 so với cây đối chứng (Vasko, Kyrychenko, 2016).

Như vậy, qua kết quả nghiên cứu này của chúng tôi và những công bố của các nhà khoa học trước đây có thể thấy được DMS là một chất có tác dụng mạnh lên giai đoạn sớm của phôi dẫn đến những biến đổi về hình thái sau đó và ở các thế hệ tiếp theo. Hóa chất này 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.

Hình thái phát triển của mô sẹo sau khi xử lý hóa chất

Mô sẹo sau khi được xử lý bằng DMS sau thời gian nuôi cấy 3-4 tuần bắt đầu xuất hiện các hình thái khác với đối chứng. Biểu hiện đầu tiên đó là về màu sắc, màu xuất hiện như trắng (hình 1B, hình 1C), hơi vàng hoặc nâu (hình 1E, hình 1F) những mô sẹo này bắt đầu chết ở tuần thứ 4-5. Một số mô sẹo còn sống thì sinh trưởng có hình thành các phiến mỏng, màu trắng hơi xanh hoặc hơi vàng nâu bao bên ngoài. Các phiến này uốn lượn và gấp khúc, và nó không có khả năng phát triển thành chồi. Các mảng phiến mỏng này sẽ úa vàng, chết sau đó 1-2 tuần (hình 1E, hình 1F). Những mô sẹo còn sống thì khi phát triển thường có màu xanh, bắt đầu có lá mầm và lá mầm thường to, dày và ngắn hơn, có màu xanh lá đậm so với mẫu đối chứng (hình 1M, hình 1N), một số khác có hình thái lá mầm bị biến dạng nhiều, mầm không phát triển được (hình 1H, hình 1I, hình 1J, hình 1K, hình 1L).

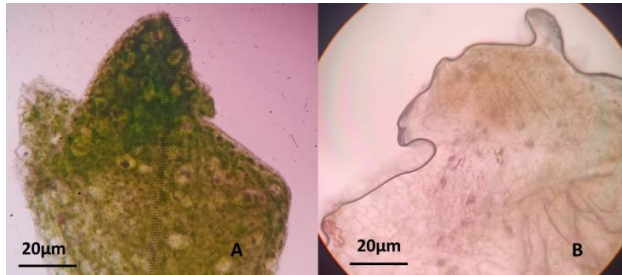


Hình 1. Một số hình dạng bất thường của mô sẹo và chồi sau khi xử lý DMS

A, G: Mẫu không xử lý hóa chất; B-F, H-N: Mẫu được xử lý bằng DMS.

Đặc điểm tế bào mô lá, thân và rễ

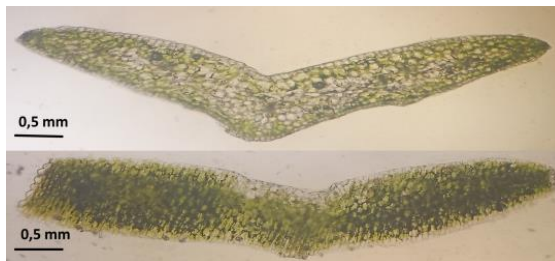
Thực hiện làm tiêu bản để quan sát đỉnh sinh trưởng, thân non, đầu rễ và biểu mô lá của các mẫu thí nghiệm. Đỉnh sinh trưởng ở mẫu đối chứng và xử lý DMS về hình thái đã có sự biến đổi khác nhau. Mẫu được xử lý DMS có đỉnh sinh trưởng hình dạng không ổn định, biến dạng nhiều vị trí, tế bào có xu hướng kéo dài, mật độ diệp lục thấp (hình 2B). Ngược lại, đỉnh sinh trưởng ở mẫu đối chứng có màu xanh đậm, tế bào xếp chặt chẽ với nhau, hình dạng tế bào tròn, và ổn định, ít có sự biến đổi hình dạng (hình 2A). Kết quả này cho thấy DMS đã ảnh hưởng tới sự sắp xếp tế bào, tới cấu trúc mô của đỉnh sinh trưởng lan Giả hạc tím Huế.



Hình 2. Đỉnh sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế được quan sát dưới kính hiển vi

A. Mẫu đối chứng không xử lý hóa chất; B. Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

Quan sát mặt cắt ngang phiến lá của 2 mẫu thí nghiệm (lá cây đối chứng và cây xử lý DMS) cho thấy 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, phiến lá có bề dày $0,78 \pm 0,03$ mm (bảng 2, hình 3B). 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 lá, có bề dày trung bình là $0,69 \pm 0,04$ mm, lượng diệp lục phân bố đều về hai bên mặt lá (bảng 2, hình 3A). Như vậy, DMS đã làm thay đổi hình thái tế bào, phân bố diệp lục trong lá, độ dày mỏng của phiến lá.



Hình 3. Mặt cắt ngang của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi (thước tỉ lệ 1 mm)

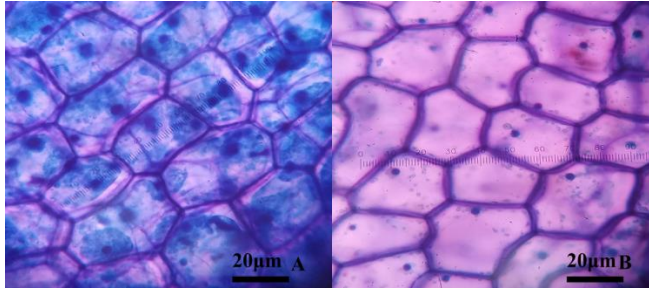
A: Lá đối chứng không xử lý hóa chất; B: Lá xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

Các tế bào biểu mô lá được quan sát từ mẫu được xử lý bằng DMS, có sự thay đổi lớn về hình dạng và trật tự sắp xếp, kích thước tế bào thì không thay đổi nhiều, có thành tế bào dày, nhân tế bào nhỏ so với đối chứng (Bảng 2, hình 4).

Bảng 2. Một số kích thước và số liệu tế bào

Mẫu thí nghiệm	Bó mạch dẫn trong thân non		Kích thước tế bào biểu mô		Đường kính nhân tế bào biểu mô lá (μm)	Chiều dày phiến lá (mm)	Lông hút của rễ	
	Số lượng (bó mạch/thân)	Đường kính (μm)	Chiều dài (μm)	Chiều rộng (μm)			Lông hút/ mm^2	Chiều dài (mm)
Đối chứng	21,27 \pm 0,21a	71,89 \pm 1,17a	28,62 \pm 1,14a	16,02 \pm 0,83a	3,84 \pm 0,20a	0,69 \pm 0,04b	252,47 \pm 10,90a	0,64 \pm 0,02a
DMS	19,33 \pm 0,13b	58,35 \pm 2,91b	27,60 \pm 1,25a	13,27 \pm 0,55b	2,95 \pm 0,12b	0,78 \pm 0,03a	247,13 \pm 10,16a	0,43 \pm 0,02b

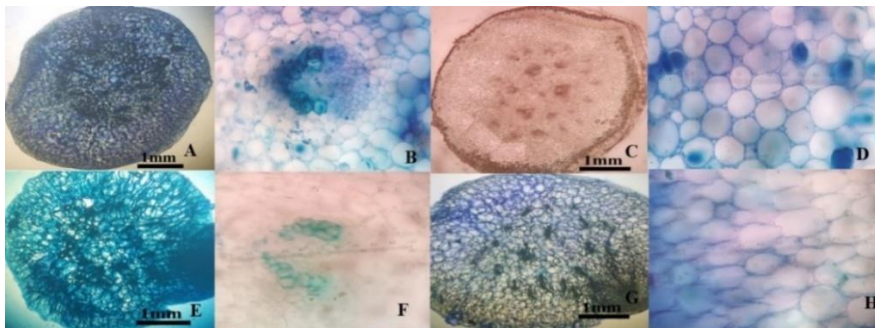
Các chữ cái khác nhau (a,b) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$, Duncan's test.



Hình 4. Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế

A: Tế bào mẫu lá đối chứng không xử lý hóa chất; B: Tế bào mẫu lá xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

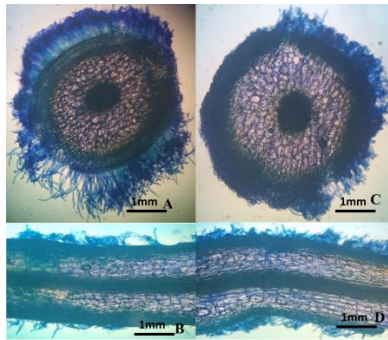
Giải phẫu phần thân non cho thấy rõ sự khác biệt giữa cây được xử lý DMS và cây đối chứng, số lượng bó mạch trong cấu trúc thân non của cây đối chứng trung bình 21,27 \pm 0,21 bó mạch/thân, dao động trong khoảng 20-22 bó mạch, sắp xếp thành nhiều vòng tròn từ ngoài vào trong đồng tâm, bó mạch tròn, kích thước tương đồng nhau và có đường kính 71,89 \pm 1,17 μm . Các tế bào xung quanh có hình tròn sắp xếp trật tự, kích thước tương đồng nhau (bảng 2, hình 5A, hình 5B, hình 5C, hình 5D). Mẫu chồi xử lý bằng DMS có số lượng bó mạch trong thân ít hơn đạt trung bình 19,33 \pm 0,13 bó mạch/thân, dao động trong khoảng 19-20 bó mạch, các bó mạch sắp xếp thưa, không đều nhau, bó mạch dẹp và có đường kính 58,35 \pm 2,91 μm , tế bào mô xung quanh có xu hướng thay đổi hình dạng nhiều, không đồng đều, lớp vỏ bao bên ngoài thân mỏng hơn so với đối chứng (bảng 2, hình 5E, hình 5F, hình 5G, hình 5H).



Hình 5. 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 thân chồi xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ;
A, E, C, G: Mặt cắt ngang; B, F: Bó mạch dẫn; D, H: Tế bào xung quanh mạch dẫn.

Quan sát hình thái giải phẫu của rễ ở 2 mẫu cây thí nghiệm (đối chứng 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 có lông hút phân bố đều, số lượng nhiều ở miền lông hút của rễ có mật độ 252,47 \pm 10,90 lông hút/ mm^2 , chiều dài đạt 0,64 \pm 0,02 mm (bảng 2, hình 6A, hình 6B). Cây xử lý DMS có rễ có kích thước to, lớp tế bào bao bên ngoài rất dày, rễ có lớp lông hút nhỏ, số lượng lông hút đạt 247,13 \pm 10,16 lông hút/ mm^2 về mặt thống kê không khác biệt so với đối chứng. Tuy nhiên, chiều dài chỉ đạt 0,43 \pm 0,02 mm, ngắn hơn rất nhiều so với đối chứng (bảng 2, hình 6C, hình 6D).



Hình 6. Hình giải phẫu rễ lan Già hạch 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 DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

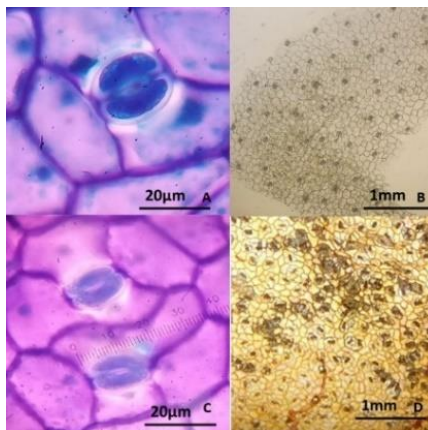
Đặc điểm tế bào khí khổng

Quan sát đặc điểm của khí khổng cho thấy chiều dài, chiều rộng, diện tích khí khổng và mật độ tế bào đạt lần lượt 14,84 μm ; 12,52 μm ; 158,82 μm^2 và 212,73 tế bào/ mm^2 . Kết quả này không có sự khác biệt so với mẫu đối chứng (bảng 3, hình 7). Điều này gợi ý rằng đột biến ít có ảnh hưởng tới đặc điểm tế bào khí khổng của lan.

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

Mẫu	Tế bào khí khổng			
	Chiều dài (μm)	Chiều rộng (μm)	Diện tích (μm^2)	Mật độ tế bào/ mm^2
Cây đối chứng	15,79 \pm 0,56a	13,33 \pm 0,56a	168,66 \pm 13,29a	235,80 \pm 4,30a
Cây xử lý DMS	14,84 \pm 0,56a	12,52 \pm 0,54a	148,82 \pm 11,47a	212,73 \pm 3,90a

Các chữ cái khác nhau (a,b) 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.



Hình 7. Hình thái khí khổng của lan Già hạch tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy chồi

A, B: Khí khổng ở lá cây đối chứng; C, D: Khí khổng ở lá cây xử lý DMS.

KẾT LUẬN

Xử lý mô sẹo bằng DMS với nồng độ 50 ppm, trong thời gian 4 giờ cho kết quả tỷ lệ mô sẹo biến đổi hình thái nhiều nhất đạt 14,93%. Nồng độ DMS và thời gian xử lý càng cao dẫn đến tỷ lệ sống của mô sẹo càng thấp. Tỷ lệ sống chỉ đạt từ 0 – 7,78% khi xử lý ở nồng độ lớn hơn 200 ppm. Các thay đổi của mô sẹo sau khi xử lý DMS chủ yếu là những thay đổi về hình thái, kích thước, màu sắc. Phân tích các chồi phát triển từ mô sẹo có biến đổi sau khi xử lý DMS, nhận thấy ở cấp độ tế bào có những thay đổi về hình dạng, trật tự sắp xếp, mật độ của các loại tế bào biểu mô lá, khí khổng, mạch dẫn.

Lời cảm ơn: Tất cả thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm Tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Kinh phí được phòng thí nghiệm hỗ trợ và từ nguồn học bổng VinIF. “Nguyễn Hữu Thọ được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thực sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.TS.121 ”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Huyền DD (2007). Tập 9: Họ Lan - Orchidaceae Juss. Chi hoàng thảo - *Dendrobium* Sw., *Thực vật chí Việt Nam (Flora of VietNam)*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1–219.
- Khánh TC (2005). *Phương pháp nghiên cứu với kính hiển vi*. NXB Y học.
- Lawley PD (1974). Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis. In *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Elsevier, 23 (3).
- Mostafa GG (2015). Effect of some chemical mutagens on the growth, phytochemical composition and induction of mutations in *Khaya senegalensis*. *International Journal of Plant Breeding Genetics*, 9(2): 57–67. <https://doi.org/10.3923/ijpb.2015.57.67>
- Mostafa GG, Alhamd MFA (2016). Effect of Dimethyl Sulphate on the Growth, Induction of Mutations and Their Identification by Peroxidase Isozyme in *Tecoma stans*. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 10(2): 91–97. <https://doi.org/10.3923/ijpb.2016.91.97>
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.
- Sekhi YS, Hamad RM, Neamah SI (2022). Role of dimethyl sulfate on biochemical characteristics of fragaria ananassa duch under salinity stress in vitro. *The Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 53(1): 111–121.
- Singer B, Grunberger D (1983). Molecular biology of mutagens and carcinogens, 1st ed. *Plenum Publishing Corporation*, 233 Spring Street, New York, N.Y. 10013...
- Teixeira da Silva JA, Cardoso JC, Dobránszki J, Zeng S (2015). *Dendrobium* micropropagation: a review. In *Plant Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1754-4>
- Tho NH, Oanh NT, Phuong TTB, Cuc NTK (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. <https://doi.org/DOI: 10.15625/vap.2024.0094>
- Tho NH, Oanh NT, Phuong TTB, Thanh P, Linh HK, Cuc NTK (2023). Conservation of *Dendrobium anosmum* Lindl. 'Tim Hue' by in vitro propagation. *Propagation of Ornamental Plants*, 23(2): 39–48.
- Vasko V, Kyrychenko V (2016). Variability of valuable economic traits in M1 and M2 sunflower generations influenced by dimethyl sulfate and γ -rays. *Žemės Ūkio Mokslai*, 23(4): 168–177.

RESEARCH ON THE EFFECT OF DIMETHYL SULFIDE (DMS) ON INDUCING VARIATION IN *DENDROBIUM ANOSMUM* LINDL 'TIM HUE' ORCHID

Nguyen Huu Tho^{1,4}, Nguyen Thi Oanh¹, La Thi Thu Hang³, Truong Thi Bich Phuong², Nguyen Thi Kim Cuc^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

²University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue City, Thua Thien Hue, Thua Thien Hue, Vietnam

³University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung street, Hue City, Vietnam

⁴College Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam, KV8, Bui Thi Xuan Ward, Quy Nhon city, Binh Dinh, Vietnam

SUMMARY

Chemical mutagenesis is one of the commonly used methods for plant breeding. In this study, we used Dimethyl sulfide (DMS) to induce mutations in the *Dendrobium anosmum* Lindl 'Tim Hue' to select morphotypes with high aesthetic and economic value. Treatment of *D. anosmum* 'Tim Hue' orchid callus with Dimethyl sulfide at concentrations of 0, 50, 100, 200, 400, and 800 ppm at different time points ranging from 2 to 10 hours. After 8 weeks of culture, the results showed that the highest survival rate of callus was 73.62% at a DMS concentration of 50 ppm for 2 hours. However, the number of samples exhibiting morphological differences compared to the control was only 4.43%. The experiment with the highest morphological variation rate (14.93%) was observed at a DMS concentration of 50 ppm for 4 hours. Initial changes in the callus after DMS treatment included alterations in morphology and color. The epithelial cells, stomata, and vascular systems of shoots grown from DMS-treated callus exhibited changes, mainly in shape and arrangement. Based on these results, we continued cultivating the mutated callus to develop complete plants, aiming to select various morphotypes for further breeding of *Dendrobium anosmum* Lindl 'Tim Hue' orchid.

Keywords: Variation, cellular structure, *Dendrobium anosmum* Lindl, Dimethyl sulfide (DMS), callus tissue, morphological changes.

* Author for correspondence: Tel: 0943112476; Email: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ

07 Hà Nội, TP. Huế - Điện thoại: 0234.3834486

Website: <http://huph.hueuni.edu.vn>

Chịu trách nhiệm xuất bản

Giám đốc - Tổng biên tập: TS. Trần Bình Tuyên

Biên tập viên

Tôn Nữ Quỳnh Chi - Trần Thị Hồng My

Biên tập kỹ thuật

Ngô Văn Cường

Trình bày, minh họa

Minh Hoàng

Sửa bản in

Hồng Thanh - Thanh Thúy

Đối tác liên kết xuất bản

Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

Đường Nguyễn Đình Tư, Phường Phú Thượng, Thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế

BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024 NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

Thành phố Huế, ngày 25 – 26 tháng 9 năm 2024

**Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào;
Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp;
Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào**

In 270 bản, khổ 19x27cm Công ty Cổ phần in và Dịch vụ Giáo dục Huế: số 02 Sóng Hồng, phường Phú Bài, thị xã Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế. Số xác nhận đăng ký xuất bản: 2680-2024/CXBIPH/0-77/ĐHH. Quyết định xuất bản số 505/QĐ/ĐHH-NXB, cấp ngày 28 tháng 8 năm 2024. In xong và nộp lưu chiểu năm 2024.

ISBN: 978-604-489-393-8

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VI KHUẨN NỘI SINH TỪ MỘT SỐ GIỐNG LAN RỪNG

Nguyễn Hữu Thọ^{1,4}, Trương Thị Bích Phương², Hồ Thị Xuân Tuy¹, Phạm Thành³,
Nguyễn Thị Kim Cúc^{1*}

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

² Trường Đại học khoa học, Đại học Huế, Số 77 Nguyễn Huệ, TP Huế, Thừa Thiên Huế

³ Trường Đại học sư phạm, Đại học Huế, Số 34 Lê Lợi, TP Huế, Thừa Thiên Huế

⁴ Khoa Nông Lâm nghiệp, Trường Cao đẳng Cơ điện, Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ, TP. Quy Nhơn, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Kim Cúc <ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 20-03-2023; Hoàn thành phản biện: 03-06-2023; Ngày chấp nhận đăng: 22-04-2024)

Tóm tắt. Vi khuẩn nội sinh là các vi khuẩn cư trú trong các mô thực vật mà không gây ra những tổn thương cho cây chủ, chúng có vai trò tăng cường hỗ trợ sinh trưởng thực vật trong cả điều kiện bình thường và những điều kiện bất lợi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn nội sinh từ các giống lan rừng Giả hạc (*Dendrobium anosmum*), Giáng hương tam bảo sắc (*Aerides falcata*), Kiều vàng (*Dendrobium thyrsiflorum*), Hoàng thảo vảy rồng (*Dendrobium lindleyi*), lan kiếm (*Cymbidium finlaysonianum*). Hình thái khuẩn lạc của các chủng được phân lập chủ yếu có màu trắng (73,4%), trơn nhầy (60%), mép tròn đều (63,3%), một số ít có bề mặt khô ráp hoặc bóng nhẵn, viền mép dạng gợn sóng. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hóa sinh cho thấy 18/30 chủng có khả năng phân giải lân; 15/30 chủng có khả năng sinh IAA; 16/30 chủng có khả năng cố định đạm; và 18/30 chủng có khả năng sinh NH₃. Trong đó, 3 chủng vi sinh vật được ký hiệu là L4, L6, C4, có đặc điểm trội hơn các chủng khác đã được lựa chọn để định danh, và được lần lượt xác định là *Burkholderia* sp., *Bacillus cereus* và *Pseudomonas boreopolis*. Đây là những chủng vi sinh vật tiềm năng có thể ứng dụng trong nghiên cứu phát triển các chế phẩm vi sinh dùng trong kích thích sinh trưởng của lan.

Từ khóa: Bacillus, Burkholderia, IAA, Pseudomonas, vi khuẩn nội sinh

Isolation of endogenous bacteria from wild orchids

Nguyen Huu Tho^{1,4}, Trương Thị Bích Phương², Hồ Thị Xuân Tuy¹, Phạm Thành³,
Nguyễn Thị Kim Cúc^{1*}

¹ Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

² University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue City, Thua Thien Hue, Vietnam

³ Hue University of Education, Hue University, 34 Le Loi, Hue City, Thua Thien Hue, Vietnam

⁴ College Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam, Quy Nhon city, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Kim Cuc <ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn>

(Received: 20 March 2024; Revised: 0. June 2023; Accepted: 22 April 2024)

Abstract. Endophytic bacteria reside in plant tissues without causing damage to the host and enhance plant growth under both normal and adverse conditions. In this study, 30 strains of endophytic bacteria were isolated from different wild orchids, including *Dendrobium anosmum*, *Aerides*

falcata, *Dendrobium thyrsiflorum*, *Dendrobium lindleyi*, and *Cymbidium finlaysonianum*. The colony morphology of the isolated strains was mainly white (73.4%), and slimy (60%), with regularly rounded edges (63.3%), a few had a dry or glossy surface and a wavy edge. The results of biochemical characterization studies showed that 18/30 strains could decompose phosphorus; 15/30 strains could produce producing IAA; 16/30 strains could fix nitrogen; and 18/30 strains were likely to generate NH₃. Among them, three isolated strains, named L4, L6, and C4, as outstanding characteristics than other strains, were selected for identification and identified as *Burkholderia* sp., *Bacillus cereus*, and *Pseudomonas boreopolis*, respectively. These microbes are potential strains that can be used as microbial products for agricultural applications, especially in growing orchid seedlings.

Keywords: *Bacillus*, *Burkholderia*, endogenous microorganisms, IAA, *Pseudomonas*

1 Mở đầu

Những ảnh hưởng có lợi của vi sinh vật đối với sự phát triển của thực vật như cố định đạm, phân giải lân, kali khó tan, thúc đẩy sự phát triển của chồi và rễ, kiểm soát hoặc ngăn chặn dịch bệnh và cải thiện cấu trúc đất đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu... [1]. Một số vi sinh vật có ích được nghiên cứu và sử dụng phổ biến trong nông nghiệp có thể kể đến như *Rhizobia*, *Mycorrhizae*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Streptomyces* và một số loài khác [2]. Vi sinh vật nội sinh là một nhóm vi sinh vật được quan tâm gần đây, là những vi sinh vật cộng sinh với thực vật, sống nội sinh trong các mô thực vật mà không gây ra bất kỳ tác hại nào cho cây chủ [3–5]. Các vi khuẩn nội sinh thuộc các chi *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* và *Pseudomonas* thường được tìm thấy ở các cây trồng nông nghiệp [6], chúng có vai trò quan trọng trong sinh trưởng, phát triển của cây trồng và góp phần duy trì tính bền vững trong sản xuất nông nghiệp [7].

Vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ nhiều loài thực vật trong đó bao gồm cả các cây trồng nông nghiệp và cây cỏ dại [8]. Tuy nhiên, nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây hoa lan (*Orchidaceae*) và ứng dụng thực tiễn của nó vẫn còn hạn chế. Đối với hoa lan, đặc biệt là hoa lan rừng có một hệ vi sinh vật cộng sinh rất phong phú, điều này có thể là một trong những nguyên nhân chính giúp cho lan rừng có một sức sống

manh mẽ, khả năng đề kháng tốt với nhiều loại sâu bệnh [9]. Ngược lại lan nuôi cấy mô, lan công nghiệp thì sức sống yếu hơn, khả năng chống chịu sâu bệnh cũng kém hơn, điều này một phần nguyên nhân có thể do những loại lan này không có hệ vi sinh cộng sinh bên trong như lan rừng. Đã có những công trình nghiên cứu ứng dụng các vi sinh vật cộng sinh vào lan nhằm nâng cao chất lượng của các giống lan công nghiệp [9,10].

Khác với các thực vật khác, hạt của các loài lan không có nội nhũ và chúng phải phụ thuộc vào một loại nấm nội sinh *Rhizoctonia* để nảy mầm, phát triển và thích nghi [11]. Ngoài ra cũng có nhiều chủng vi sinh vật nội sinh ở thân, lá, rễ của cây giúp thúc đẩy các quá trình phát triển của cây, cũng như giúp kháng lại một số loại bệnh. Faria và cộng sự [12] đã phân lập vi khuẩn nội sinh từ phong lan và tiềm năng của chúng để thúc đẩy sự phát triển của thực vật. Nghiên cứu của Shah S. và cộng sự về vi sinh vật nội sinh trong phong lan *Vanda cristata* cho thấy có sự ảnh hưởng nhất định của vi sinh vật nội sinh tới sự phát triển của thực vật [13]. Nghiên cứu của Héctor Herrera và cộng sự đã phân lập và xác định được một số vi khuẩn nội sinh từ mô rễ của hoa lan trên cạn từ miền Nam Chile [14]. Tsavkelova và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu về vi khuẩn cư trú bên trong rễ của lan biểu sinh [15] và một nghiên cứu khác về vi sinh vật nội sinh trong rễ lan và khả năng sinh auxin của chúng [16]. Bên cạnh đó, một số chủng nấm nội sinh trên cây hoa lan như

Penicillium sp., *Fusarium* sp. [17], chi *Fusarium*, *Unidentified II* [18].

Các giống lan có thể sinh sống ở nhiều môi trường ngoại cảnh khác nhau tạo nên một sự đa dạng trong quần thể các vi khuẩn nội sinh, gắn kết cùng những đặc trưng riêng biệt so với hệ vi sinh vật của môi trường đất xung quanh [19]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật nội sinh từ các mẫu lan rừng được thu thập ở khu vực miền trung Tây Nguyên gồm Bình Định, Gia Lai, Kon Tum, Thừa Thiên Huế, hướng đến mục tiêu phát triển sản phẩm phân bón hữu cơ có nguồn gốc từ vi sinh vật ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp bền vững.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Các mẫu lan rừng được thu thập ở Bình Định, Gia Lai, Kon Tum, Thừa Thiên Huế. Các giống lan được thu thập gồm có Giả hạc (*Dendrobium anosmum*), Giáng hương tam bảo sắc (*Aerides falcata*), Kiều vàng (*Dendrobium thyrsiflorum*), Hoàng thảo vảy rồng (*Dendrobium lindleyi*), lan kiếm (*Cymbidium finlaysonianum*).

2.2 Môi trường nuôi cấy vi sinh

Môi trường Luria-Bertani (LB) dùng nuôi cấy vi khuẩn cho định danh [20] 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), MnSO_4 (0,002 g), 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; K_2HPO_4 : 2 g/L; KNO_3 : 2 g/L; casein: 0,3 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,05 g/L; 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 streptomycetes 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; K_2HPO_4 : 0,2 g/L; NaCl: 0,2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g/L; K_2SO_4 : 0,1 g/L CaCO_3 : 5 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

2.3 Thời gian và địa điểm

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế từ tháng 9/2021-8/2022.

2.4 Phương pháp

Phân lập vi khuẩn nội sinh

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 [21]. Để kiểm tra khả năng các vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, lấy 200 μL

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.

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 μ 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 xuất hiện một lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh [22,23].

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 [22].

Hình thái vi khuẩn trên các đĩa môi trường được theo dõi bằng cách đo kích thước và quan sát hình thái các dạng khuẩn lạc bao gồm các chỉ tiêu: màu sắc, hình dạng, độ nổi và dạng bìa khuẩn lạc bằng mắt thường. Đối với những khuẩn lạc có kích thước quá nhỏ thì sử dụng kính lúp để quan sát [24].

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 h ủ, tiến hành khảo sát hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào. Các dòng vi khuẩn phân lập được khảo sát định tính khả năng hòa tan Photpho trên môi trường Pikovaskya đặc [25] thông qua vòng sáng phân giải tạo ra xung quanh khuẩn lạc trên môi trường [26].

Xác định khả năng cố định đạm

Lựa chọn các khuẩn lạc đã phân lập cấy 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, hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào vi khuẩn, đường kính khuẩn lạc phát triển [27].

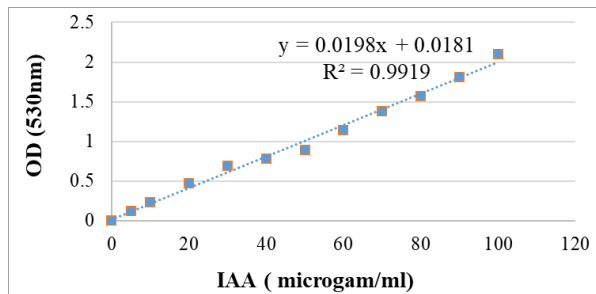
Xác định khả năng sinh NH₃

Xác định khả năng sinh NH₃ của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập bằng phương pháp định tính của Cappuccino & Sherman [28,29]. Các dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi trong ống 10 mL nước peptone, nuôi lắc 150 vòng/phút, trong 48-72h ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó cho 0,5 mL thuốc thử Nessler (K_2HgI_4) 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 [30,31], màu sắc phụ thuộc vào hàm lượng amoniac sinh ra.

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 h, 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

đồ thị hàm lượng IAA tổng hợp được càng cao [32]. Hàm lượng IAA sinh ra được xác định bằng đồ thị đường chuẩn (Hình 1). Đo cường độ màu trên máy quang phổ so màu ở bước sóng 530 nm.



Hình 1. Đường chuẩn IAA được xây dựng ở dãy nồng độ IAA từ 0 đến 100 µg/ml

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 [33].

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 mồi thuận 27F (5'-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG-3') và mồi ngược 1492R (5'-ACGG (CT) TACCTTGTTACGA CTT-3') [34].

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 mồi 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 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.

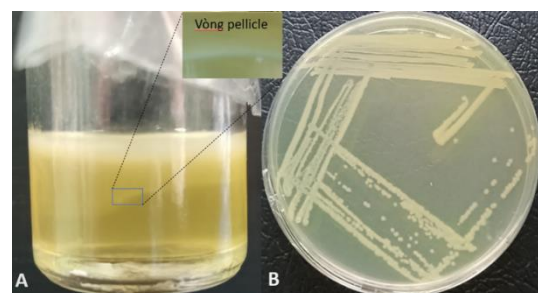
Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình của ba phép đo cùng với sai số chuẩn. Đối với phân tích thống kê, ANOVA nhân tố đơn (phân tích phương sai) sau đó là kiểm tra nhiều phạm vi của Duncan's được thực hiện bằng phần mềm SPSS.16. Sự khác biệt về giá trị trung bình được coi là có ý nghĩa ở $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả phân lập vi sinh vật

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 chiếm 73,4% (trắng sữa (30%), trắng trong (26,7%), trắng đục (16,7%)) một số ít chủng có màu vàng chiếm 10%, vàng nhạt chiếm 10%, hồng chiếm 3,3% hoặc cam chiếm 3,3%. Ngoài ra, đặc điểm bề mặt khuẩn lạc là trơn nhầy chiếm 60%, một số khác thì khô ráp chiếm 16,7%, hoặc bóng nhẵn chiếm 23,3%. Mép của khuẩn lạc qua quan sát thấy thường tròn đều chiếm 63,3% hoặc dạng lượn sóng chiếm 36,7% (bảng 1). Kích thước của khuẩn lạc nuôi cấy trên môi trường phân lập sau 48 h đạt từ 1-5 mm, có dạng tế bào là hình tròn hoặc hình que. Các mô tả về đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh tương tự cũng được tìm thấy trong các nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh và Đỗ Minh Thu [23]; Nguyễn Thị Thúy Duy và cộng sự [35].



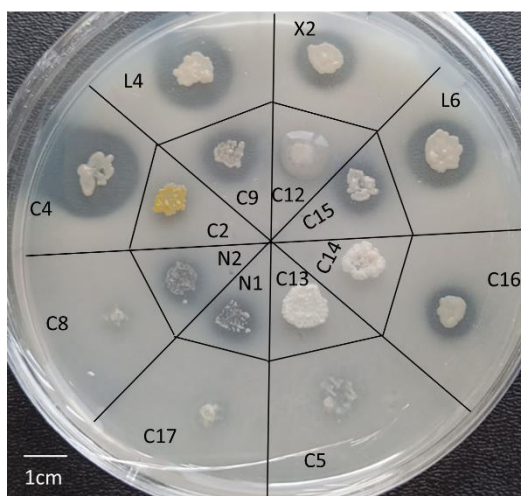
Hình 2. Phân lập và tạo dòng thuần khiết các vi khuẩn nội sinh. (A: phân lập vi khuẩn nội sinh trong môi trường bán lỏng NA; B: Tạo dòng thuần khiết)

3.2 Một số đặc tính hoá sinh của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập được

Các chủng vi khuẩn đã phân lập được tiếp tục thử nghiệm trên các môi trường khác nhau để xác định các đặc tính hóa sinh. Các hoạt tính được kiểm tra gồm khả năng phân giải lân, khả năng sinh NH_3 , khả năng cố định nitơ trên môi trường không chứa nitơ, khả năng sinh IAA. Kết quả thử nghiệm được thể hiện qua bảng 1.

Khả năng phân giải lân

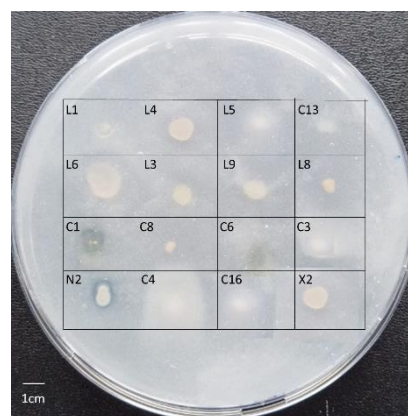
Trong nghiên cứu này, với 30 chủng đã phân lập và xác định được 18 chủng có khả năng phân giải lân, đây là hoạt tính hòa tan tri-canxi photphat (TCP) có trong môi trường Pikovaskya. Tuy nhiên khả năng phân giải lân ở mỗi chủng là khác nhau, mức độ đánh giá thông qua vòng sáng phân giải sau 72 h nuôi. Đường kính vòng sáng được hình thành sau nuôi cấy trên môi trường dao động từ 2 - 15 mm. Kết quả thử nghiệm đã chọn được 3 chủng có khả năng phân giải lân cao là L4 với đường kính vòng sáng phân giải lân là 15 mm, đường kính khuẩn lạc là 5 mm; Chủng L6 có đường kính vòng sáng 13 mm, đường kính khuẩn lạc 6 mm và chủng C4 là 15 mm và 6 mm (Bảng 1, Hình 3).



Hình 3. Thử nghiệm khả năng phân giải lân của vi sinh vật nội sinh trên môi trường có chứa tricalcium photphat

Khả năng cố định đạm

Trong số 30 chủng được phân lập, cấy thử nghiệm trên môi trường không có nitơ Ashby agar, sau 72 h nuôi cấy có 16 chủng phát triển được trên môi trường này. Điều này chứng minh chúng có khả năng cố định nitơ thành NH_4^+ để có thể hấp thu và sinh trưởng. Tuy nhiên khả năng cố định nitơ của 16 chủng đó là khác nhau, dựa vào kích thước khuẩn lạc phát triển để xác định. Kích thước của khuẩn lạc sau thời gian nuôi cấy của các chủng phát triển được có đường kính từ 2-16 mm, thí nghiệm cũng ghi nhận 3 chủng L4, L6, C4 có đường kính khuẩn lạc cao, thứ tự là 16 mm, 16 mm, 15 mm (Bảng 1, Hình 4).



Hình 4. Thử nghiệm khả năng phát triển trên môi trường không có Nitơ của các chủng vi khuẩn đã phân lập

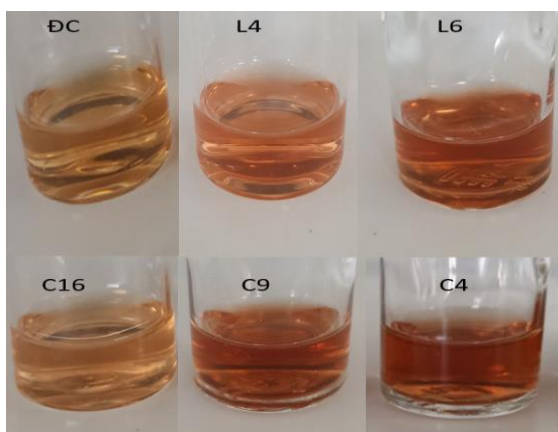
Khả năng sinh IAA

Kết quả xác định khả năng tổng hợp IAA cho thấy trong số 30 chủng được phân lập có 15 chủng có khả năng sinh IAA, dựa vào mức độ đậm nhạt của màu sắc thay đổi có thể xác định những chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp IAA cao hay thấp (Bảng 1, 2). Thí nghiệm cũng xác định 4 chủng L4, L6, C9, C4 là có tiềm năng sinh IAA cao nhất, trong đó chủng L6, C9 và C4 có dung dịch thay đổi màu sắc đậm nhất (màu nâu đậm), còn chủng L4 thì màu nhạt hơn, chủng C16 thay đổi màu sắc ít nhất và giống với sự thay đổi màu của 10 chủng còn lại (Hình 5). Qua xác định

hàm lượng IAA sinh ra cũng khẳng định lại khả năng sinh IAA của 4 chủng L4, L6, C9, C4 là mạnh nhất với hàm lượng theo thứ tự 34,10 µg/ml; 38,44 µg/ml; 36,98 µg/ml và 41,47 µg/ml. Ngoài ra, có 4 chủng sinh hàm lượng IAA từ 1-10 µg/ml; 5 chủng có hàm lượng IAA 11-20 µg/ml và 2 chủng có hàm lượng IAA sinh ra 21-30 µg/ml (bảng 1, 2). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về khả năng sinh IAA của các chủng vi sinh vật nội sinh cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Bảo Trâm và công sự (2017) về khả năng tổng hợp IAA của vi sinh vật trong đất trồng sâm [36].

Bảng 1. Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập từ rễ lan

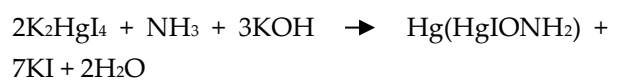
Hàm lượng IAA (µg/ml)	Số chủng	Tỷ lệ chủng có khả năng sinh IAA (%)
0	15	50.00
1 - 10	4	13.33
11 - 20	5	16.67
21 - 30	2	6.67
>30	4	13.33
Tổng số	30	100



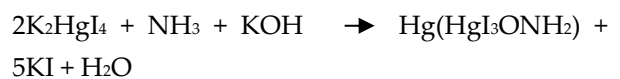
Hình 5. Thử nghiệm khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh đã phân lập; ĐC: ống nghiệm đối chứng (môi trường LB lỏng và thuốc thử Salkowski) L4, L6, C9, C4 các chủng vi khuẩn có sinh IAA mạnh, C16 chủng sinh IAA rất ít

Khả năng sinh NH₃

Kết quả khảo sát khả năng sinh NH₃ của các chủng đã phân lập trình bày ở hình 6, trong số 30 chủng có được 18 chủng có khả năng sinh NH₃. Dựa vào màu sắc thay đổi khi cho thuốc thử nessler vào môi trường đã nuôi cấy vi khuẩn sau 48 h. Màu biểu hiện là màu vàng, nâu hoặc nâu sẫm là chứng tỏ có sự xuất hiện của NH₃, màu càng nâu đậm thì hàm lượng càng cao. Phản ứng thí nghiệm theo phương trình phản ứng:

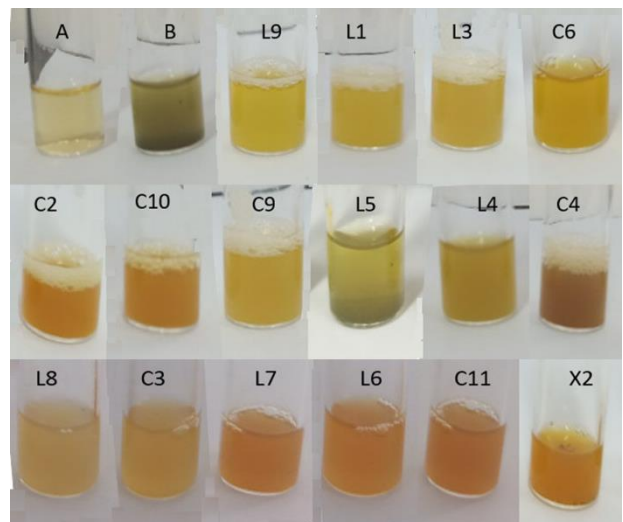


(màu vàng)



(màu nâu)

Thí nghiệm cũng lựa chọn được 6 chủng có màu đậm nhất cho khả năng sinh NH₃ đó là chủng L4, L6, L7, C4, C11, X2 (Hình 6, bảng 1).



Hình 6. Thử nghiệm khả năng sinh NH₃ của một số chủng vi khuẩn nội sinh được lựa chọn; A, B: 2 ống nghiệm đối chứng (A: môi trường LB lỏng, B: môi trường LB lỏng và thuốc thử nessler); các ống nghiệm có màu vàng, nâu sẫm là những ống nghiệm có phản ứng với thuốc thử nessler chứng tỏ có sinh NH₃

Bảng 2. Một số đặc điểm khuẩn lạc và đặc tính hoá sinh của các chủng vi khuẩn phân lập sau 72h nuôi cấy

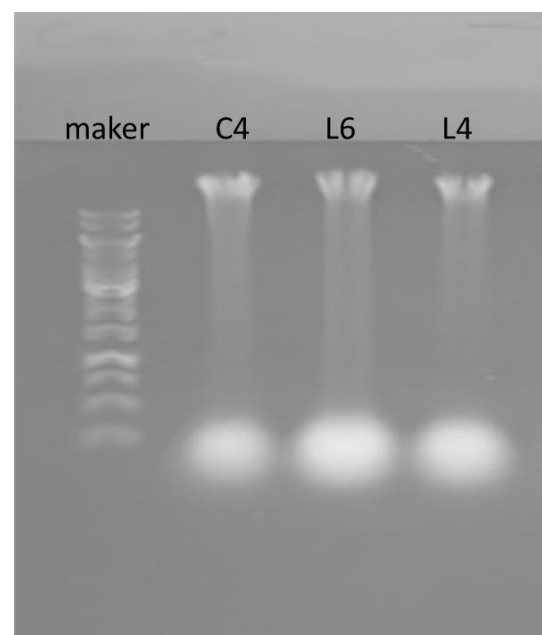
Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc tính hoá sinh					
	Màu sắc	Mép	Bề mặt	Phân giải lân			Sinh NH ₃	Ø khuẩn lạc trên MT Ashby (mm)	Hàm lượng IAA sinh ra (µg/ml)
				Ø vòng sáng phân giải và khuẩn lạc(mm)	Ø khuẩn lạc (mm)	Ø vòng sáng phân giải lân (mm)			
L1	Vàng	Lượn sóng	Tron bóng	15	11	4	+	2	0,00
L2	Trắng đục	Lượn sóng	Tron bóng	13	10	3	-	-	0,00
L3	Trắng sữa	Tròn đều	Tron nhày	16	8	8	+	11	0,00
L4	Trắng sữa	Tròn đều	Khô ráp	20	5	15	+++	16	34,10
L5	Trắng sữa	Tròn đều	Tron nhày	14	7	7	+	6	0,00
L6	Trắng trong	Tròn đều	Tron nhày	19	6	13	+++	16	38,44
L7	Vàng nhạt	Tròn đều	Tron nhày	16	5	11	+++	-	11,68
L8	Trắng sữa	Tròn đều	Tron nhày	17	8	9	++	7	0,00
L9	Trắng sữa	Tròn đều	Tron nhày	17	6	11	+	10	13,19
C1	Trắng trong	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	0,00
C2	Vàng	Lượn sóng	Tron nhày	4	4	0	+	5	6,58
C3	Trắng đục	Tròn đều	Tron nhày	7	5	2	+	9	26,83
C4	Trắng trong	Tròn đều	Tron nhày	21	6	15	+++	15	41,47
C5	Trắng đục	Lượn sóng	Khô ráp	10	10	0	-	-	16,22
C6	Trắng trong	Lượn sóng	Tron nhày	6	6	0	++	-	0,00
C7	Vàng nhạt	Tròn đều	Tron nhày	3	3	0	-	-	11,73
C8	Trắng đục	Tròn đều	Tron nhày	7	7	0	-	6	7,33
C9	Trắng sữa	Tròn đều	Tron nhày	16	10	6	+	-	36,98
C10	Vàng nhạt	Tròn đều	Khô ráp	2	2	0	+	8	0,00
C11	Vàng	Tròn đều	Tron nhày	15	6	9	+++	4	0,00
C12	Trắng trong	Tròn đều	Tron bóng	6	6	0	-	-	7,13
C13	Trắng sữa	Lượn sóng	Tron bóng	4	4	0	-	4	0,00

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc tính hoá sinh					
	Màu sắc	Mép	Bề mặt	Phân giải lân			Sinh NH ₃	Ø khuẩn lạc trên MT Ashby (mm)	Hàm lượng IAA sinh ra (µg/ml)
				Ø vòng sáng phân giải và khuẩn lạc(mm)	Ø khuẩn lạc (mm)	Ø vòng sáng phân giải lân (mm)			
C14	Trắng sữa	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	17,48
C15	Trắng sữa	Lượn sóng	Tron nhày	8	4	4	-	6	0,00
C16	Trắng đục	Tròn đều	Tron nhày	10	6	4	+	6	4,61
C17	Trắng trong	Tròn đều	Tron bóng	4	4	0	-	-	0,00
N1	Trắng trong	Tròn đều	Tron bóng	5	2	3	-	3	22,89
N2	Trắng trong	Tròn đều	Tron nhày	5	3	2	+	8	0,00
X1	Cam	Lượn sóng	Tron nhày	5	5	0	-	2	0,00
X2	Trắng hồng	Lượn sóng	Tron 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

3.3 Kết quả định loại phân tử các chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập

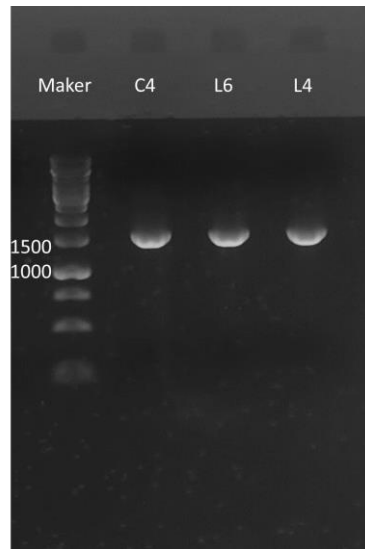
Dựa trên kết quả đánh giá các đặc tính hoá sinh của 30 chủng vi sinh được phân lập, đã chọn được 3 chủng có đặc tính tốt nhất về khả năng phân giải lân, khả năng cố định đạm, khả năng sinh NH₃, và khả năng sinh IAA để nhận diện bằng cách giải trình tự gen và lập cây phát sinh loài. 3 chủng được chọn đó là L4, L6 và C4. Cả 3 chủng được nuôi trong môi trường LB lỏng qua đêm để thu sinh khối phục vụ tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp tách cột. DNA tổng số của 3 chủng đã được tách thành công (Hình 7) để dùng làm khuôn mẫu nhân gen mã hóa 16S rRNA dùng trong định loại phân tử.



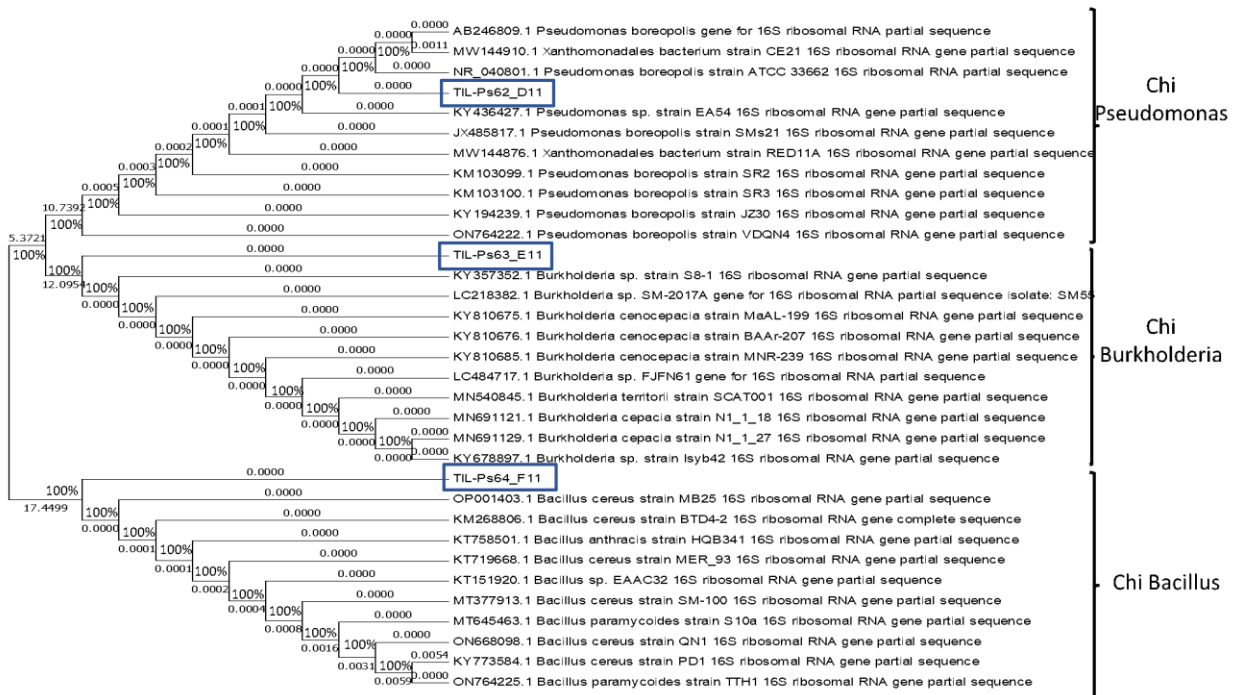
Hình 7. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn đã phân lập. Maker: Generuler 1kb DNA ladder (Thermofisher)

Đoạn gen có kích thước khoảng gần 1500 bp đã được nhân lên ở 3 chủng nghiên cứu (Hình 8) và gửi đi giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự của 3 chủng vi khuẩn được sử dụng để so sánh với trình tự DNA của các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI bằng phần mềm BLASTN. Kết quả cho thấy trình tự của các chủng vi khuẩn phân lập có độ

tương đồng cao với các trình tự trên GenBank (98-100%), và các dòng vi khuẩn tương đồng đều thuộc các chi có đại diện là vi khuẩn nội sinh. Cụ thể, 3 chủng gửi đi giải trình tự được xác định là chủng L4 thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia*; chủng L6 thuộc chi vi khuẩn *Bacillus*; chủng C4 thuộc chi vi khuẩn *Pseudomonas*.



Hình 8. Gen mã hóa 16S rRNA của vi khuẩn. Maker: Generuler 1kb DNA ladder (Thermofisher)



Hình 9. 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

Kết quả xây dựng cây phân loại của chủng C4 phân lập từ các mẫu lan rừng thu thập được trong quá trình nghiên cứu, cho thấy nó có mức độ tương đồng cao với các chủng *Pseudomonas* khác với độ tương đồng 99-100% như các chủng ON764222.1; KY194239.1; KM103100.1,... điều này có thể khẳng định rằng chủng C4 được lựa chọn là chủng thuộc chi *Pseudomonas* và đặc biệt chủng C4 rất gần với loài *Pseudomonas boreopolis* với mức tương đồng 100%, vì vậy chủng C4 cũng thuộc dòng vi khuẩn này (Hình 9). Các đặc tính hoá sinh của chi vi khuẩn *Pseudomonas* trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Oliveira Danyllo Amaral de và cộng sự về *Pseudomonas* [37], tương tự trong nghiên cứu của Đỗ Thành Luân và cộng sự về khả năng sinh IAA và cố định đạm của vi khuẩn nội sinh trong đó có *Pseudomonas* [38].

Kết quả giải trình tự của chủng L6 cũng được sử dụng để tìm kiếm các trình tự tương đồng bằng BLASTN trên NCBI, kết quả các trình tự tìm kiếm có mức tương đồng rất cao 99 -100%, đều thuộc chi *Bacillus* như các vi khuẩn có mã đăng ký ON764225.1; ON668098.1 MT645463.1, ... điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn đã phân lập L6 thuộc chi vi khuẩn *Bacillus*. Đặc biệt là gần với dòng *Bacillus cereus* (hình 9) với mức tương đồng là 100%. Vì vậy có thể xem chủng L6 là dòng vi khuẩn *Bacillus cereus*. Những đặc điểm về hoạt tính hoá sinh của chủng vi khuẩn này cũng tương đồng với nghiên cứu đã có của Akhtar Nosheen và cộng sự [39], hay trong nghiên cứu của Nguyễn Đức Thành và cộng sự [40].

Giống với chủng C4 và L6, kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng với trình tự của chủng L4 trên NCBI cũng có mức tương đồng rất cao với chi vi khuẩn *Burkholderia*. Các chủng như KY678897.1; MN691129.1; MN691121.1, ...mức độ tương đồng với chủng L4 là 98-99.5%. Kết quả này cũng khẳng định được chủng vi khuẩn nội sinh L4 phân lập được thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia* (Hình 9). Được định danh là chủng *Burkholderia* sp. với mức tương đồng là 99.5 %,

đây cũng là một chi vi khuẩn có nhiều đại diện vi khuẩn nội sinh cho sự phát triển của thực vật, các hoạt tính của *Burkholderia* sp. trong nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của Hau-Hsuan Hwang và cộng sự [41].

Như vậy trong nghiên cứu này 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 trong lĩnh vực sản xuất phân bón, chế phẩm vi sinh.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng, các chủng có sự đa dạng về hình thái khuẩn lạc và đặc điểm hoá sinh. Có 18/30 chủng có khả năng phân giải lân; 15/30 chủng có khả năng sinh IAA; 16/30 chủng có khả năng cố định đạm phát triển trên môi trường Ashby agar; và 18/30 chủng có khả năng sinh NH₃. Nghiên cứu đã lựa chọn 3 chủng có hoạt tính hóa sinh cao lần lượt được xác định là chủng L4 thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia*; chủng L6 thuộc chi vi khuẩn *Bacillus*; chủng C4 thuộc chi vi khuẩn *Pseudomonas*.

Hỗ trợ tài chính

Nghiên cứu này được hỗ trợ thông qua nhóm nghiên cứu mạnh, mã số NCM.DHH2020.13.

Mâu thuẫn lợi ích

Các tác giả tuyên bố không có mâu thuẫn nào liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Tài liệu tham khảo

1. Christina A, Christopher V, Bhore SJ. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacogn Rev* [Internet]. 2013;7:11-16.
2. Souza R de, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2015;38:401-419.
3. Ahmed M, Hussain M, Dhar MK Isolation of microbial endophytes from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir. *J Nat Prod Plant Resour.* 2012;2:215-220.
4. Strobel G, Daisy B, Castillo U Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod.* 2004;67:257-268.
5. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol.* 1997;43:895-914.
6. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol.* 2011;14:435-443.
7. Singh JS. Plant growth promoting rhizobacteria. *Resonance.* 2013;18:275-281.
8. White JF, Kingsley KL, Zhang Q Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Manag Sci.* 2019;75:2558-2565.
9. Tsavkelova E. Bacteria associated with orchid roots. *Bact Agrobiol plant growth responses.* 2011;221-258.
10. Teixeira da Silva JA, Tsavkelova EA, Zeng S Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta.* 2015;242:1-22.
11. Hợp T. Phong lan Việt Nam. Hà Nội: NXB Nông Nghiệp Hà Nội; 1988.
12. Faria D, Dias A, Melo I Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;29.
13. Shah S, Chand K, Rekadwad B A prospectus of plant growth promoting endophytic bacterium from orchid (*Vanda cristata*). *BMC Biotechnol.* 2021;21:16.
14. Herrera H, Sanhueza T, Novotná A Isolation and identification of endophytic bacteria from mycorrhizal tissues of terrestrial orchids from southern Chile. *Diversity.* 2020;12:55.
15. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology.* 2004;73:710-715.
16. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res.* 2007;162:69-76.
17. Shah S, Shah B, Sharma R. Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production. *BMC Microbiol.* 2022;22:101.
18. Chand K, Shah S, Sharma J. Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. *Plant Signal Behav.* 2020;15:1744294.
19. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Lobakova ES. Microbiota of the Orchid rhizoplane. *Mikrobiologiya.* 2001;70:567-573.
20. Schmidt KL, Peterson ND, Kustus RJ. A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004;186:785-793.
21. Kumar A, Singh R, Yadav A Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. *3 Biotech.* 2016;6:60.
22. Lynch NHN, Hiệp NH. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng cố định đạm, hòa tan lân, tổng hợp IAA nội sinh trong cây cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre ex A. froehner) trồng tại tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 2019;55:34-40.
23. Minh NT, Thu ĐM. 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.* 2017;1022-1032.
24. Đức VTM. *Thực tập vi sinh vật học.* Hà Nội: NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội; 2001.
25. Puente ME, Bashan Y, Li CY. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 2004;6:629-642.
26. Giang NV, Thu PP, Hà CD. 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.* 2018;60.

27. Lan PTN, Xuân LTT, Châu NTB. 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. 2020.
28. Cappuccino, J. C.; Sherman N. Microbiology: A laboratory manual. 3. ed. New York Benjamin/Cummings Pub. 1992;125-179.
29. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res. 2008;163:173-181.
30. Kifle MH, Laing MD. Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. Front Plant Sci. 2016;6:1225.
31. K.Geetha, E.Venkatesham, A.Hindumathi. Original Research Article Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on Vigna Radita (L.) R.Wilczek. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014;3(6):977-809.
32. Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl Environ Microbiol. 1991;57:535-538.
33. Russell DW, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor; 2001.
34. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods. 2003;55:541-555.
35. Thi Thuy DN, Hà ĐTT, Nhứt ĐT. 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. 2019;55:10-20.
36. Trâm TB, Hiền NT, Sơn PH. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp IAA (Indole Acetic Acid) từ đất trồng sâm Việt Nam ở Quảng Nam. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 2017;33(2):219-226.
37. Oliveira DA de, Ferreira S da C, Carrera DLR. Characterization of *Pseudomonas* bacteria of *Piper tuberculatum* regarding the production of potentially bio-stimulating compounds for plant growth. Acta Amaz. 2021;51:10-19.
38. Luân ĐT, Nghĩa NK. Khảo sát khả năng kích thích nảy mầm và sinh trưởng rau muống của một số dòng vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 2020;56:37-46.
39. Akhtar N, Ilyas N, Yasmin H. Role of *Bacillus cereus* in Improving the Growth and Phytoextractability of *Brassica nigra* (L.) K. Koch in Chromium Contaminated Soil. Molecules. 2021;26.
40. Thành ND, Quyết NT, Hằng ĐTT. Đặc điểm sinh học và định danh chủng vi khuẩn *Bacillus altitudinis* T1008 phân lập từ đất nhiễm mặn. Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 2020;62.
41. Hwang H-H, Chien P-R, Huang F-C. A Plant Endophytic Bacterium, *Burkholderia seminalis* Strain 869T2, Promotes Plant Growth in Arabidopsis, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables. Microorganisms. 2021;9:1703.



Establishment of callus-derived polyploid lines for the Purple Gia Hac orchid (*Dendrobium anosmum* Lindl.) via colchicine treatments

Tho Nguyen Huu^{1,4} · An Nguyen Hoang² · Tuy Ho Thi Xuan³ · Cuc Nguyen Thi Kim¹ · Phuong Truong Thi Bich² 

Received: 6 January 2026 / Accepted: 10 April 2026
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2026

Abstract

The Purple Gia Hac orchid (*Dendrobium anosmum*) is one of the most popular orchid species in Vietnam and has been excessively exploited due to its high aesthetic value. Therefore, genetic conservation and improvement efforts are essential for the preservation and development of this species. In plant breeding, colchicine-based polyploidization offers advantages over traditional hybridization by overcoming infertility and incompatibility barriers. In this study, we established the first protocol for polyploidization of *D. anosmum* callus, regeneration of in vitro plantlets from colchicine-treated calli, and acclimatization of micropropagated plantlets. Immersion of calli in 50 mg/L colchicine for two hours was optimal, yielding calli with the highest proportion of mutant phenotypes. MS medium supplemented with 1.5 mg/L 6-benzylaminopurine and 0.5 mg/L α -naphthaleneacetic acid was optimal for shoot regeneration, producing maximum mean shoot height (2.34 cm) and leaf number per shoot (3.33) after eight weeks of culture. The exhibition of enlarged morphological characteristics, including thickened and swollen stems and leaves, was found in shoots regenerated from colchicine-treated calli. Microscopic anatomical comparisons revealed that colchicine-treated plantlets/shoots had enlarged leaf epidermal cells, stomata, nuclei, and root hairs relative to untreated controls. Candidate polyploid lines also showed alterations in pigment contents and produced flowers with more intense purple coloration and color patches. Karyotyping confirmed high proportions of polyploid cells (66.19–84.48%) in candidate lines. These results demonstrate that colchicine-induced polyploidization holds promise for the aesthetic improvement of *D. anosmum* through subsequent selection of stable polyploid lines.

Key message

The first study for polyploidy induction in *Dendrobium anosmum* by colchicine treatments

Keywords *Dendrobium anosmum* · Colchicine · Polyploidy · Shoot regeneration

Communicated by Nhut Tan Duong

✉ Phuong Truong Thi Bich
ttbphuong@hueuni.edu.vn

- ¹ Institute of Biotechnology, Hue University, Provincial Highway 10, Hue City 49000, Vietnam
- ² Hue University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue City 49000, Vietnam
- ³ Institute for Creative Initiatives in Global Health, Duy Tan University, 254 Nguyen Van Linh, Da Nang 550000, Vietnam
- ⁴ College of Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam, KV8, Bui Thi Xuan Ward, Quy Nhon City, Binh Dinh, Vietnam

Introduction

Dendrobium is one of the most important genera in the family Orchidaceae, comprising approximately 1,800 species that are widely distributed across many countries, including China, Japan, India, the Philippines, Indonesia, Australia, Papua New Guinea, Vietnam, and the Pacific islands (Chase et al. 2015; Zakizadeh et al. 2020; Nguyen et al. 2022). This orchid genus is commercially cultivated as ornamental plants (Zakizadeh et al. 2020) and is renowned for its year-round availability, morphological diversity, and long flowering period (Revathi and Thomas 2022). Beyond its aesthetic value, certain *Dendrobium* orchids have also been used in traditional tonics for immunity enhancement, stomach nourishment, and thirst relief (Zhou et al. 2016; Zhang et al. 2023; Wang et al. 2023). The Purple Gia Hac

(*D. anosmum* Lindl.) is the most popular species in Vietnam's orchid market (Nguyen et al. 2022). Known for its large, fragrant flowers, this species has been overexploited from the forests of Lam Dong and other northern provinces (Nguyen et al. 2022). Therefore, genetic conservation and improvement efforts for *D. anosmum* are essential not only to preserve its presence in the wild but also to develop diverse genetic resources for commercial breeding.

There are various methods of plant breeding, including hybridization, radiation breeding, and polyploidy induction (Chen et al. 2021; Wang et al. 2023). Despite being widely used, hybridization-based breeding efforts are often hindered by infertility and incompatibility in interspecific and intergeneric crosses (Vilcherrez-Atoche et al. 2022; Wang et al. 2023). Polyploidy induction serves as an effective alternative, overcoming the challenges associated with crossbreeding (Wang et al. 2023). Polyploid plants exhibit several advantageous traits compared to their diploid counterparts, including enhanced vigor, increased organ size, higher yield, improved product quality, greater resistance to biotic and abiotic stresses, the potential for seedless product production, and protection against deleterious mutations (Yenchon and Te-Chato 2014; Sattler et al. 2016; Huy et al. 2019; Zakizadeh et al. 2020). In orchid breeding, polyploidy induction plays a crucial role in hybridization, genetic improvement, and the development of premium species (Miguel and Leonhardt 2011; Huy et al. 2019; Zakizadeh et al. 2020). Polyploid orchids are highly valued in the commercial market due to their large flowers, intensified coloration, thick vegetative organs, high fertility, and superior adaptability (Miguel and Leonhardt 2011; Zakizadeh et al. 2020; Bolaños-Villegas and Chen 2022; Vilcherrez-Atoche et al. 2022; Wang et al. 2023). Colchicine is the most commonly used antimitotic agent for plant polyploidy induction (Zhang and Gao 2021). In orchids, colchicine treatment concentrations range from 0.01% to 1.00% (w/v), depending on the species (Silva et al. 2000; Sarathum et al. 2010; Vichiato et al. 2014; Zakizadeh et al. 2020). Colchicine-based polyploidy induction has been successfully applied to numerous species within the genus *Dendrobium* (Sarathum et al. 2010; Yenchon and Te-Chato 2014; Vichiato et al. 2014; Zakizadeh et al. 2020; Zhang and Gao 2021, Revathi and Thomas 2022; Liu et al. 2023; Wang et al. 2023). However, to date, no study has been conducted on the *in vitro* induction of polyploid *D. anosmum* using colchicine.

Considering the significant potential of polyploidization in orchid breeding and the lack of scientific research on this topic in *D. anosmum*, this study was conducted to establish the first *in vitro* protocol for polyploidy induction in this species. Our candidate polyploid *D. anosmum* lines regenerated from colchicine-treated callus exhibited not only increased size in micromorphological traits but also enhanced color

intensity. These findings hold great promise for commercial breeding programs.

Materials and methods

Plant materials

Primary calli (0.3–0.5 cm in diameter) were used as the starting material for the establishment of *in vitro* polyploid lines. The calli were originally induced from stem segments containing dormant buds of *D. anosmum* under *in vitro* conditions. Callus induction was carried out on Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 7 g/L agar, 30 g/L sucrose, 0.5 g/L activated charcoal, 60 g/L finely ground potato, 100 mL/L coconut water, 1.5 mg/L thidiazuron, and 0.5 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) (Nguyen Huu et al. 2024). For proliferation, calli were subcultured on the same medium formulation. All callus cultures were maintained and propagated in the Laboratory of Cytology, Institute of Biotechnology, Hue University. Only healthy and vigorously growing calli were selected for subsequent colchicine treatments.

Colchicine stock solution preparation

Ten grams of colchicine powder (Duchefa Biochemie, the Netherlands) was dissolved in 25 mL of 90% ethanol. Autoclaved distilled water was then added to the solution to reach a total volume of 1 L, resulting in a colchicine concentration of approximately 10,000 mg/L. The prepared colchicine stock solution was subsequently filtered (pore size: 0.22 μ m) and stored in dark conditions, at 20–25 °C until use.

Colchicine treatment

Various colchicine concentrations (0, 50, 100, 200, 400, and 800 mg/L) were added to liquid MS medium supplemented with 30 g/L sucrose. Undifferentiated green calli were then cultured in different colchicine-supplemented MS media for different durations (2, 4, 6, 8, and 10 hours) on an orbital shaker at 120 rpm (GFL, Germany) to determine the optimal treatment time and concentrations.

Following treatment, the calli were washed three times with autoclaved distilled water and dried on autoclaved paper towels in a laminar airflow cabinet. The treated calli were subsequently cultured on basal MS medium containing 30 g/L sucrose and 8 g/L agar for eight weeks. After the culture period, the calli were dissected into 2–10 parts, depending on their size, to determine the proportion of colchicine-induced phenotypic alterations (from this point, these alterations will be referred as “mutant phenotypes”

for brevity). Calli that exhibited mutant phenotypes across their entire surface were considered to have a 100% mutant proportion. Dead or non-growing calli were considered to have 0% of mutant phenotypes. There were 90 calli (30 calli \times 3 replicates) in each time treatment, totaling 450 calli observed in each colchicine concentration treatment. Ninety calli were also observed in the control group.

Colchicine-treated calli (putative mutant calli) were characterized by a brittle and porous structure with irregularly sized cell blocks and heterogeneous coloration, ranging from dark green and light yellow to whitish-green and brown. In contrast, untreated calli (controls) were uniformly green, exhibited a compact texture, and were characterized by smooth surfaces with numerous bud formations. Moreover, control calli displayed relatively homogeneous size and morphology.

Shoot regeneration

Surviving colchicine-treated calli were subcultured on MS medium (containing 30 g/L sucrose and 8 g/L agar) supplemented with various combinations of 6-benzylaminopurine (BA) and NAA for eight weeks to determine the optimal conditions for shoot regeneration. BA and NAA concentrations ranged from 0 to 2 mg/L and 0 to 1 mg/L, respectively. 675 callus samples were observed in total (5 BA treatments \times 3 NAA treatments \times 3 replicates \times 15 calli). The most effective culture medium for shoot regeneration was identified based on the number of shoots per callus, shoot height (cm), and the number of leaves per shoot.

Microscopic anatomical observations

Fifteen *in vitro* plantlets or 3-month-old shoots were randomly sampled from both colchicine-treated and untreated groups. Micromorphological features were observed from organs, including leaves, the main stem, and the roots. Leaf blade thickness (mm), cell length (μm), cell width (μm), and nucleus diameter (μm) were observed from *in vitro* leaves and their epidermal tissues. Vascular bundle number and vascular bundle diameter (μm) were observed from main stems. Root hair number per mm^2 and root hair length (μm) were recorded from *in vitro* roots for each sample. Additionally, stomatal characteristics, such as length (μm), width (μm), area (μm^2), and density (cell number/ mm^2), were also observed. Microscopic observations were conducted using an Olympus CX43 microscope (Olympus, Japan). The recorded micromorphological features for each sample were mean values calculated from five microscopic fields.

Photosynthetic pigment quantification

Six leaf samples from the control *in vitro* plantlets and five candidate polyploid lines, surviving the colchicine treatments and exhibiting clear mutant phenotypes on leaf and main stems, were collected to quantify photosynthetic pigment content. The putative mutant lines were named L2, L5, L6, L16, and L17.

Briefly, 0.25 g of fresh leaf tissue, excluding veins, was cut and placed in a mortar containing 0.2 g of CaCO_3 . The leaf samples were then homogenized and transferred to test tubes containing 10 mL of 80% (v/v) acetone for five minutes. The mixtures were subsequently filtered through cotton in a funnel, yielding green solutions, which were then transferred to a UV-1800 UV/VIS spectrophotometer (Rayleigh Instruments, China) for absorbance measurements at 470, 645, and 663 nm. The measurements were technically replicated three times for each sample. Photosynthetic pigment contents (chlorophyll a – C_{Chla} , chlorophyll b – C_{Chlb} , and carotenoids) were determined using the following equations, which were mentioned in a previous study (Hung et al. 2022).

$$C_{Chla} = \frac{V \times (12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645})}{m} \text{ (mg/g)}$$

$$C_{Chlb} = \frac{V \times (22.9 \times A_{645} - 4.64 \times A_{663})}{m} \text{ (mg/g)}$$

$$C_{carotenoid} = \frac{V \times \left[\frac{1000 \times A_{470} - 1.82 \times (12.25 \times A_{663} - 2.97 \times A_{645})}{-85.02 \times (21.5 \times A_{645} - 5.1 \times A_{663})} \right]}{198 \times m} \text{ (mg/g)}$$

Where A_{470} , A_{645} , and A_{663} are absorbance levels at 470, 645, and 663 nm, respectively; m is sample mass (g); and V is 80% acetone volume (mL).

Total chlorophyll ($C_{Chla} + C_{Chlb}$) and carotenoid contents were used in comparisons among the lines.

Karyotyping

Karyotyping for ploidy level determination of the five candidate mutant lines (L2, L5, L6, L16, and L17) was conducted following previously established protocols (Manton 1950; Rahayu et al. 2015).

Root apices (5 mm) of candidate lines were excised, placed in 1.5-mL Eppendorf tubes containing 100 μL of 0.1% colchicine to prevent the polymerization of tubulin (Kamath et al. 2008), facilitating observation and image acquisition. The samples were incubated for 30 minutes at 28–30 °C. The colchicine solution was then discarded, and 200 μL of 0.5% sodium acetate was added, followed by a 30-minute incubation at room temperature. The samples

were subsequently fixed in Carnoy's solution for four hours, followed by washing steps using 70% ethanol. Staining was performed using 1% methylene blue or carmine red at room temperature for five minutes. The stained samples were then divided into 1–2 mm segments, placed on glass slides, and gently pressed under coverslips (Kirov et al. 2014). Based on chromosome number, the quantities of diploid and polyploid cells were recorded in ten microscopic fields for each sample.

Culture conditions

In vitro cultures were incubated in a closed room with air filtering and ventilation, at the temperature of 25 ± 2 °C and the humidity of 50–60%, under white fluorescent light bulbs, with the light intensity from 13.5–27 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ and the light regime of 8 h/day.

Acclimatization

The untreated and candidate mutant plantlets were acclimatized in a nursery. Light intensity was reduced by 50% using black shading nets. The irradiance level was monitored with a portable light intensity meter (LT300, Extech Instruments, USA). The temperature was maintained within the range of 25–30 °C by misting. The plantlets were watered once daily in the morning when the temperature was below 30 °C and twice daily, in the morning and afternoon, when the temperature exceeded 30 °C. The plantlets were grown on a substrate mixture of coconut coir and rice husk ash (1:1, w/w) (Nguyen Huu et al. 2023). One gram of NPK fertilizer with an N:P:K:Mg ratio of 6:40:6:15 was applied to each plantlet monthly. The acclimatization period lasted three months.

Data analysis

In the colchicine treatment and shoot regeneration experiments, a two-way analysis of deviance based on generalized linear models was conducted (Hastie and Pregibon 1992; Chambers and Hastie 1997; Venables and Ripley 2002; Dobson and Barnett 2018; McCullagh and Nelder 2018). Colchicine concentration and treatment duration were used as independent variables for the colchicine treatment experiment, while BA and NAA concentrations were used as independent variables for the shoot regeneration experiment. The dependent variables were the mutant proportion (%) for the colchicine treatment experiment and the number of shoots per callus, shoot height (cm), and the number of leaves per shoot for the shoot regeneration experiment. Statistical analyses were performed using the ``anova()`` and ``glm()`` functions from the ``stats`` package in R (<http://www.R-project.org/>). Mean comparisons were conducted using

the ``emmeans`` package (<https://rvlenth.github.io/emmeans/>) or Games-Howell's post hoc test (Games and Howell 1976) when the ``emmeans`` package did not function properly with the models.

To compare microscopic anatomical features between the control and colchicine-treated groups, a two-sample independent t-test (Student 1908) was performed using the ``t.test()`` function in R. The ``var.equal`` argument was set to ``TRUE`` or ``FALSE`` depending on the results of F-tests for variance homogeneity, conducted using the ``var.test()`` function. If the normality assumption of the t-test was not met, as assessed by the ``shapiro.test()`` function (Shapiro and Wilk 1965), the Wilcoxon rank sum test (``wilcox.test()`` function) was used as an alternative (Bauer 1972; Hollander et al. 2014) to compare the two groups. All statistical functions used were part of the ``stats`` package in R.

To compare pigment content and polyploid cell percentage among the five candidate mutant lines, analysis of variance (ANOVA) or Welch's test was performed using the ``aov()`` or ``oneway.test()`` functions in R (Welch 1951; Chambers et al. 1992). Post hoc comparisons were conducted using Tukey's HSD or Games-Howell tests (Tukey 1949; Games and Howell 1976) with the ``tukey_hsd()`` and ``games_howell_test()`` functions from the ``rstatix`` package (<https://rpkgs.datanovia.com/rstatix/>). The choices of functions for ANOVA and post hoc tests were based on variance homogeneity assessed by Bartlett's test (Bartlett 1937) with the ``bartlett.test()`` function from the ``stats`` package in R. Residual normality was evaluated using the ``ols_test_normality()`` function (<https://olsrr.rsquaredacademy.com/>), based on different tests (Kolmogorov 1933; Smirnov 1948; Anderson and Darling 1954; Shapiro and Wilk 1965; Stephens 1986).

Results

Colchicine treatment

As presented in Supplementary File S1, the interaction between colchicine concentration and treatment duration did not have a significant effect on the mutant proportion ($p > 0.05$), whereas their individual effects were significant ($p < 0.05$). Therefore, colchicine concentration and treatment duration are independent factors, and the optimal protocol for colchicine-based polyploidization in *D. anosmum* can be determined by selecting the concentration and duration that result in the highest mutant proportions.

In general, increasing colchicine concentrations and prolonged exposure to the chemical had negative effects on the detected mean mutant proportion since dead calli were considered to have 0% of mutant phenotypes (Fig.

1K). Specifically, the mean mutant proportion decreased substantially from its peak values of 20.28% and 15.73% at the optimal colchicine concentration of 50 mg/L and an exposure duration of two hours, respectively, to 0.22% and 3.13% at 800 mg/L colchicine and a treatment duration of 10 hours (Fig. 1K).

As mentioned, high colchicine concentrations and treatment durations could negatively affect callus vitality and

growth. Specifically, although a two-hour treatment was the optimal duration for polyploidization in *D. anosmum*, increasing colchicine concentrations from 50 to 800 mg/L resulted in a noticeable reduction in callus size. A similar trend was observed in calli exposed to the optimal colchicine concentration (50 mg/L) for varying durations, ranging from two to ten hours (Fig. 1A–J). Additionally, necrotic brown or growth inhibited calli were observed in treatments

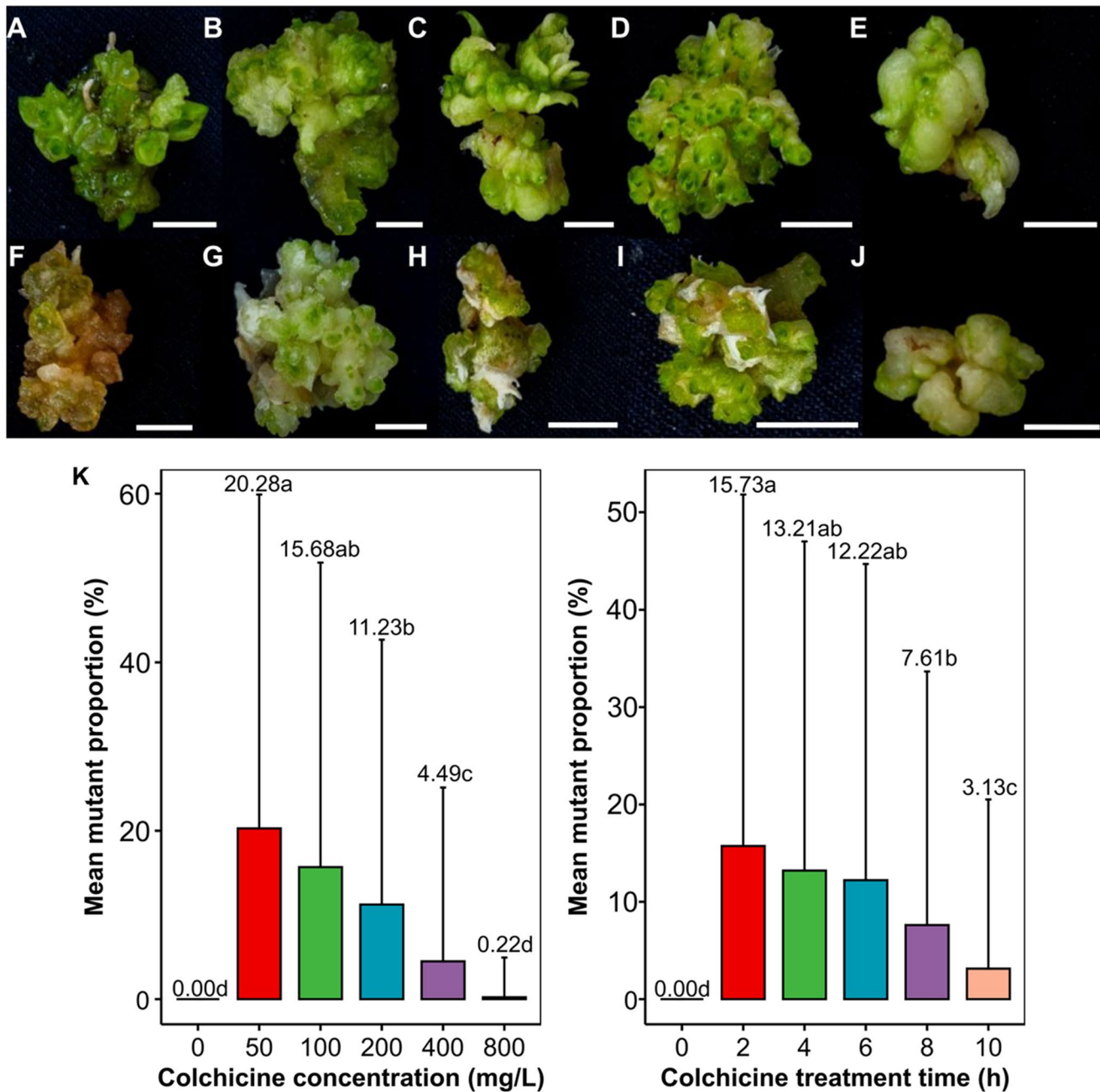


Fig. 1 Phenotypic observations of untreated (A) and colchicine-treated (B–J) calli and optimization of colchicine treatment for *D. anosmum* polyploidization (K). Callus growth and vitality decreased following exposure to colchicine for 2 h at increasing concentration gradients: 50 (B), 100 (C), 200 (D), 400 (E), and 800 (F) mg/L. A similar trend

was observed in calli treated with 50 mg/L colchicine for varying durations: 4 h (G), 6 h (H), 8 h (I), and 10 h (J) (scale bars: 5 mm). In panel K, means sharing the same letters do not differ significantly ($p > 0.05$) according to Games–Howell’s post hoc test. Error bars represent standard deviations

with high colchicine concentrations and extended exposure durations (Fig. 1F, J).

Shoot regeneration

Different combinations of BA and NAA had minimal effects on shoot multiplication from *D. anosmum* callus exposed to colchicine. However, they significantly influenced shoot growth, as indicated by shoot height and leaf number in the deviance analysis results (Supplementary File S2).

Consistent with the deviance analysis, the mean shoot numbers across all BA+NAA treatments were low (ranging from 0.64 to 2.36 shoots per callus), exhibited high variance, and were generally not significantly different from one another (Fig. 2, Supplementary File S2). Therefore, no BA+NAA combination could be identified as optimal for shoot multiplication.

Regarding shoot height and leaf number, MS medium supplemented with 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA produced the best-developed shoots, with an average height of 2.34 cm and 3.33 leaves per shoot (Figs. 2, 3). This BA+NAA combination was not significantly different from several others, including 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA, 1.5 mg/L

BA + 1.0 mg/L NAA, and 2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA in terms of shoot height, and 1.5 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA regarding leaf number. However, 1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA can still be considered the optimal combination, as it was significantly distinct from most other treatments, and the means of the other aforementioned combinations were not significantly different from lower mean values in emmeans-based pairwise comparisons (Fig. 2, Supplementary File S2).

We observed morphological modifications in shoots regenerated from colchicine-treated calli (colchicine-derived shoots), such as thicker main stems compared to control shoots (Fig. 4). In several cases, swelling of the main stem was observed in colchicine-derived shoots (Fig. 4B). In addition, the formation of many short internodes was observed in several colchicine-derived shoots (Fig. 4D).

Microscopic anatomical observations

The success of the colchicine treatments was additionally indicated by increases in the microscopic anatomical features of treated shoots and plantlets compared with untreated controls. Specifically, stomata in colchicine-treated shoots

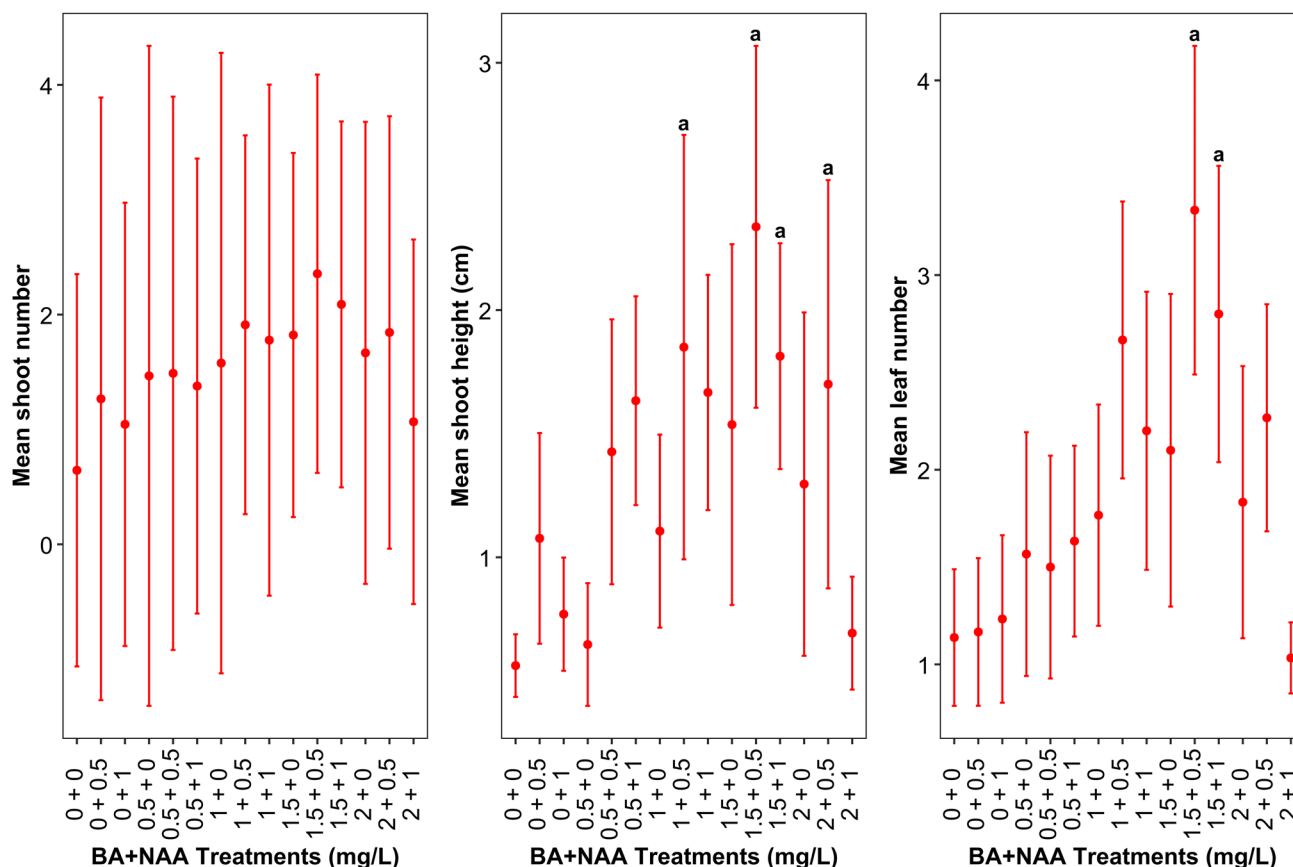


Fig. 2 Optimization of BA-NAA concentrations for shoot multiplication of *D. anosmum* callus treated with colchicine. Data points represent mean values, and error bars indicate standard deviations (mean±SD). Means sharing the same letters are not significantly different ($p>0.05$)

Fig. 3 Observations of shoot clusters cultured on basal MS medium (A) and MS medium supplemented with 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA (B). Scale bars: 10 mm

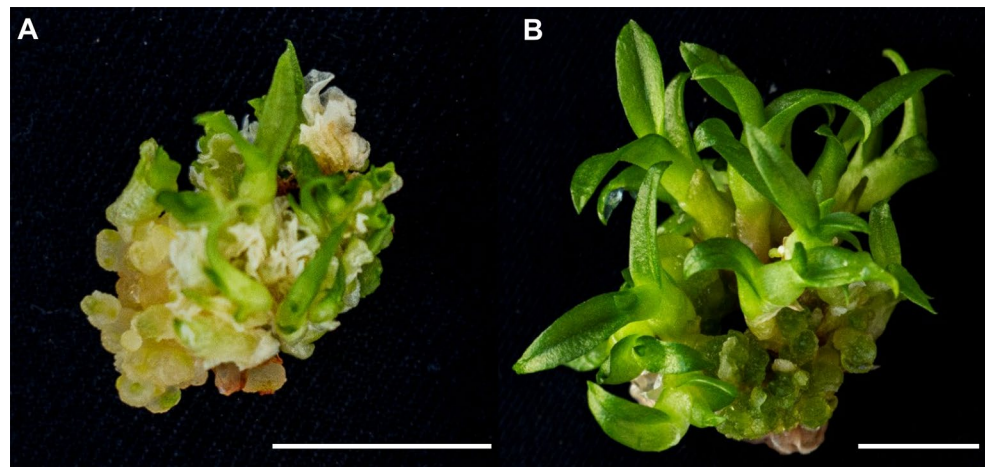


Fig. 4 Morphological observations of shoots generated from untreated callus (A) and from calli exposed to colchicine (B, C, D). To illustrate morphological features of treated-callus-derived shoots, shoots from calli treated with 50 mg/L for 2 h (B), 50 mg/L for 6 h (C), and 200 mg/L for 4 h (D) were taken as examples. Scale bars: 5 mm

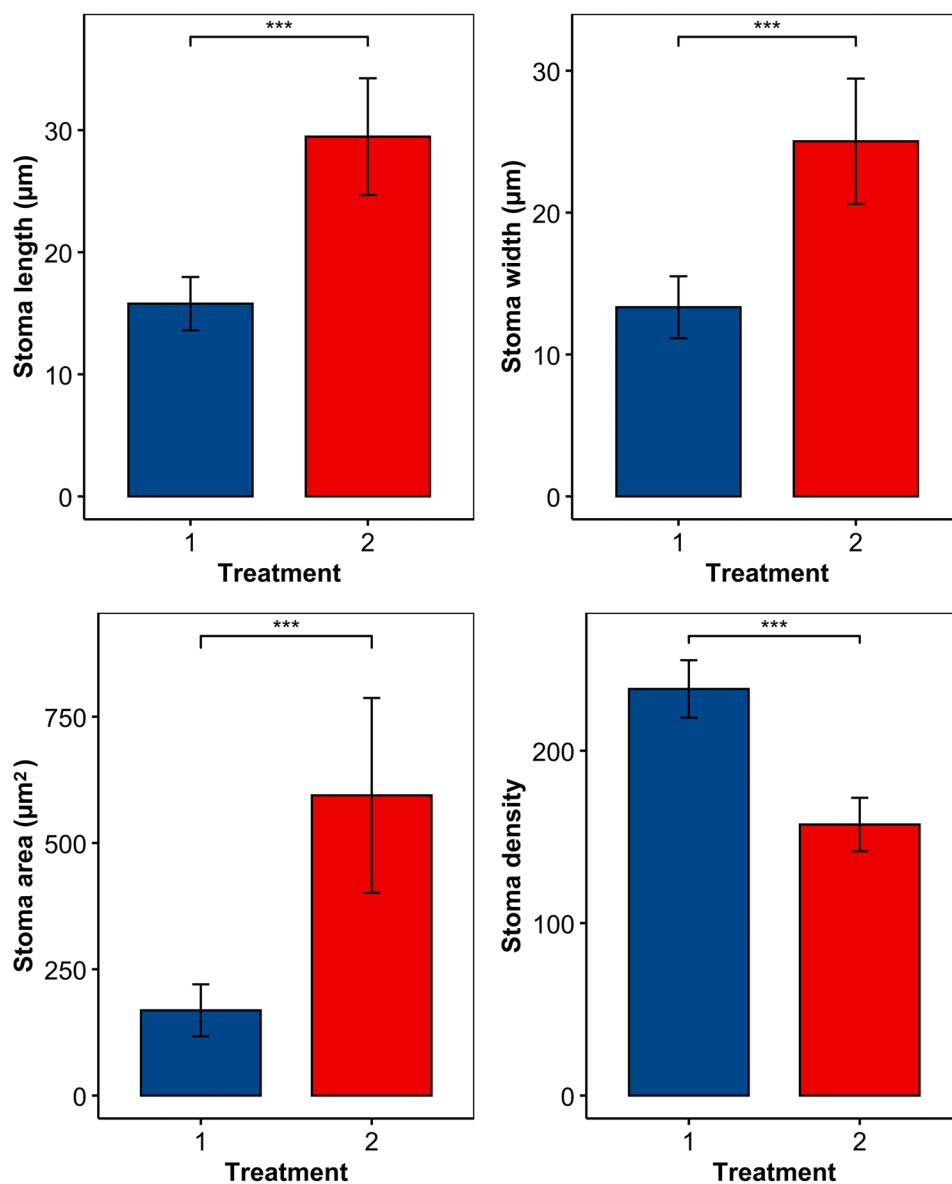


were, on average, approximately 3.5 times the area of those in the control group (Figs. 5, 6A, B). However, stomatal density in potential polyploid shoots was significantly lower than that in untreated shoots, showing a 33.33% reduction (Fig. 5).

The “giga” effect was also observed in various cell types, as evidenced by significant increases in leaf epidermal cell dimensions and leaf blade thickness (Fig. 6C–F). Nevertheless, mean epidermal cell length and width increased only slightly in potential polyploids, with differences of 4.45 μ m

and 2.47 μ m, respectively, between treated and untreated shoots (Fig. 7). Leaf epidermal cells from colchicine-treated plantlets and shoots exhibited greater variation in shape compared with those from the control group (Fig. 6E, F). Similar to stomata, root hairs in colchicine-treated shoots were longer but fewer in number than those in the controls (Fig. 7, Supplementary File S3, Figure S3-3). In contrast to other anatomical features, vascular bundles in the main stems of potential polyploid shoots showed an increase in number, with an almost threefold rise compared with the

Fig. 5 Observations of stomatal features in colchicine-untreated (1) and colchicine-treated (2) shoots. The values are presented as means \pm standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences between the groups (** $p < 0.001$)



controls, while the vascular bundle diameter in treated shoots was approximately half that of untreated shoots (Fig. 7). In the main stems of colchicine-treated plantlets and shoots, vascular bundles were scattered, whereas those in control main stems were arranged in concentric circles (Supplementary File S3, Figure S3-1). Additionally, the mean nucleus diameter of leaf epidermal cells in colchicine-treated shoots increased by 51.71% compared with the controls, suggesting an increase in genetic material (Fig. 7; Supplementary File S3, Figure S3-2).

Photosynthetic pigment quantifications

Different candidate polyploid lines of *D. anosmum* generated from colchicine-treated calli exhibited significant

variations in pigment contents, as indicated by the results of ANOVA and post-hoc tests (Supplementary File S4). Regarding chl contents, most selected candidate polyploid lines did not show higher levels of total chl compared to the control, except for line L17 (Fig. 8). Specifically, the highest observed value for total chl in L17 was 1.32 mg/g. In contrast to chl, carotenoid content was higher in three out of five candidate polyploid lines (lines L2, L5, and L17) compared to the control, ranging from 0.205 to 0.227 mg/g. Lines L6 and L16 exhibited the lowest values across all pigment types (Fig. 8, Supplementary File S4).

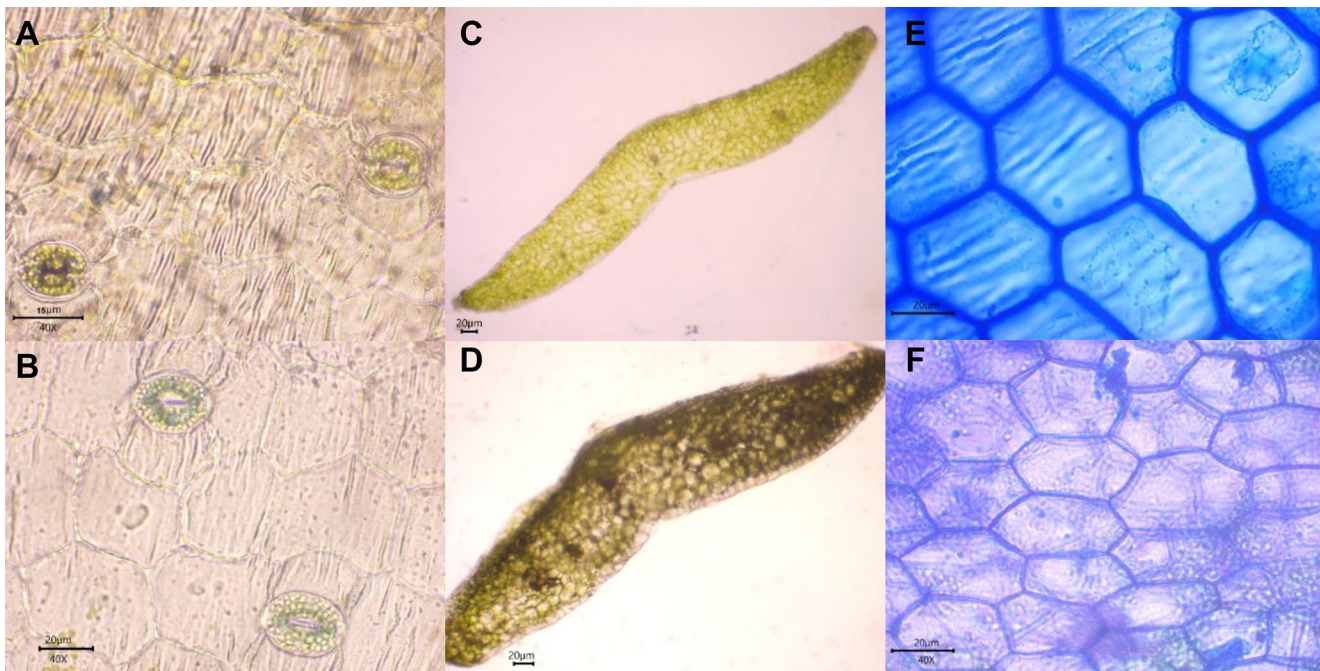


Fig. 6 Observations of microscopic leaf anatomical features, including stomatal size (A, B), leaf blade thickness (C, D), and leaf epidermal cell dimensions (E, F), were conducted for the control (A, C, E) and for shoots or plantlets regenerated from colchicine-treated calli (B, D, F)

Karyotyping

As expected, polyploid cells (Supplementary File S5) were found only in the five candidate polyploid lines (L2, L5, L6, L16, and L17) (Fig. 9). The mean polyploid percentages of these candidate lines were generally not significantly different from one another. Specifically, only the mean percentages of L6 and L17 differed significantly ($p < 0.05$), as indicated by the post hoc test (Fig. 9, Supplementary File S6). L17 exhibited the highest mean proportion of polyploid cells (84.48%), followed closely by L5 and L16, with mean proportions of 76.22% and 72.60%, respectively (Fig. 9). Although the proportions of polyploid cells observed in the microscopic fields of the candidate polyploid lines were high, diploid cells were also present, indicating that the candidate lines were mixoploid (Fig. 9).

Observations of acclimatized plantlets' flowers

After three months of acclimatization, we observed the flower phenotypes from the acclimatized control and candidate polyploid lines. The flowers of three candidate polyploid lines, L2, L6, and L16, exhibited a more intense purple coloration compared to the flowers of control plants. Flowers from the L5 and L6 lines also displayed purple dots on the petals (Fig. 10). L17 was the only candidate polyploid line that showed no obvious difference in flower color compared to the control (Fig. 10F).

Discussion

Although colchicine is a commonly used agent for inducing polyploidy in plants, it is highly cytotoxic, as it blocks mitosis and alters cellular differentiation processes (Pintos et al. 2007; Potenza and Tellez-Iñón 2015; Forkosh et al. 2020; Wang et al. 2023). Therefore, optimization of colchicine concentration and treatment duration is critical for effective polyploidy induction (Wang et al. 2023). The cytotoxic effects of colchicine were clearly observed in our study using *D. anosmum* callus as explants. Specifically, increasing colchicine concentrations from 50 to 800 mg/L and extending exposure time from 2 to 10 h resulted in dead or growth-inhibited calli, leading to a reduction in the proportion of observed mutant phenotypes. Our analysis indicated that colchicine concentrations of 50–100 mg/L and exposure times of 2–4 h are suitable for polyploidy induction in *D. anosmum* callus.

Cytokinins and auxins are crucial phytohormones controlling shoot and leaf formation and growth (Reinhardt et al. 2000; Duclercq et al. 2011; Hill and Schaller 2013; Novak et al. 2014; Wu et al. 2021). In orchids, cytokinins are combined with auxins to establish a high cytokinin-to-auxin ratio, which is required for shoot formation (Hadley and Harvais 1968; Harvais 1982; Novak et al. 2014). The *D. anosmum* shoot regeneration results presented in Fig. 2 are consistent with previous studies on cytokinin-to-auxin ratios in shoot and leaf development. Specifically, increases in shoot height and leaf number were observed as the

Fig. 7 Observations of various microscopic anatomical features in colchicine-untreated (1) and colchicine-treated (2) shoots. The values are presented as means \pm standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences between the groups (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

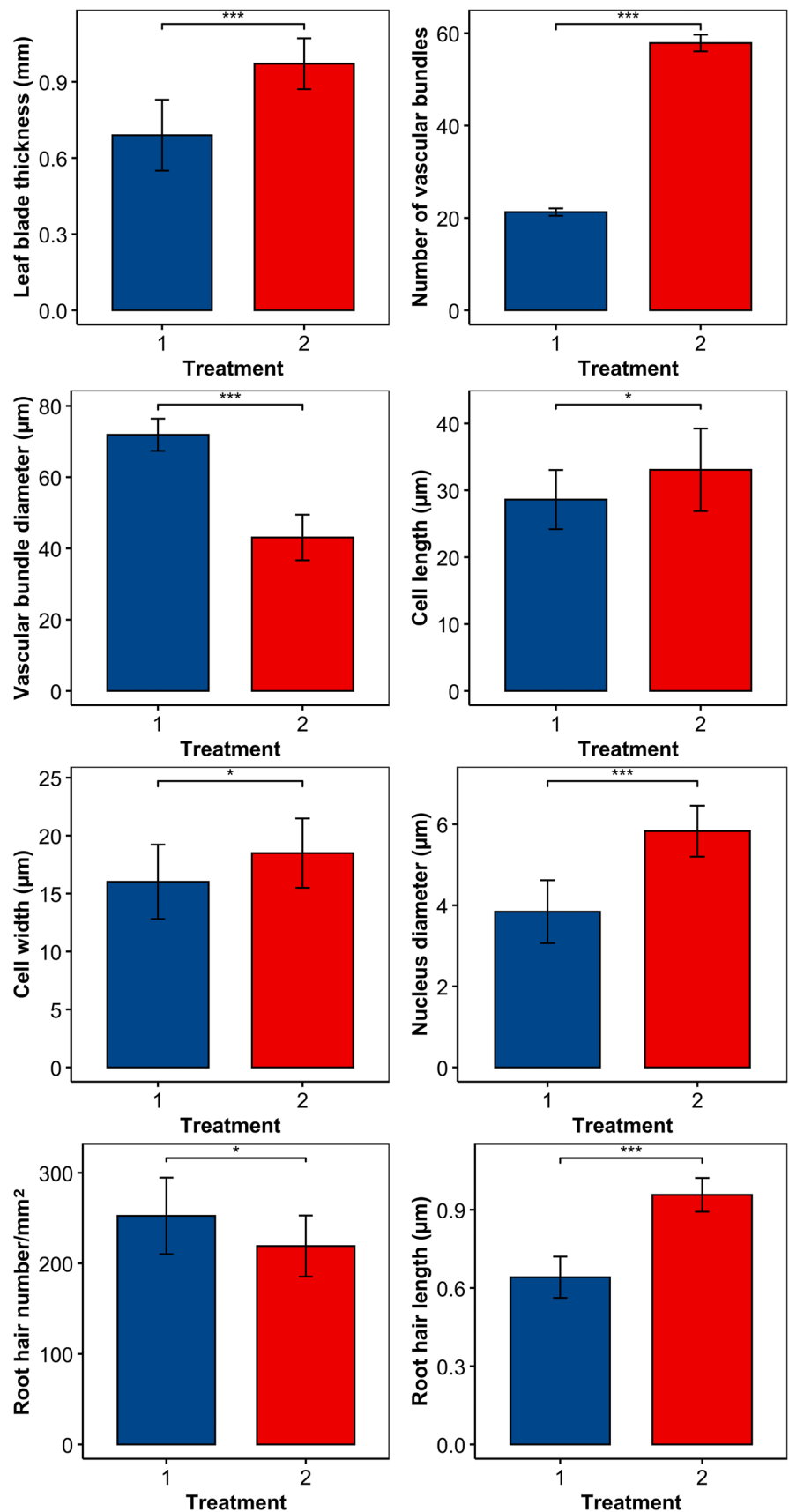


Fig. 8 Quantification of photosynthetic pigment contents in control (L1) and candidate polyploid (L2, L5, L6, L16, and L17) lines. Different letters show significant differences among the represented mean values ($p < 0.05$)

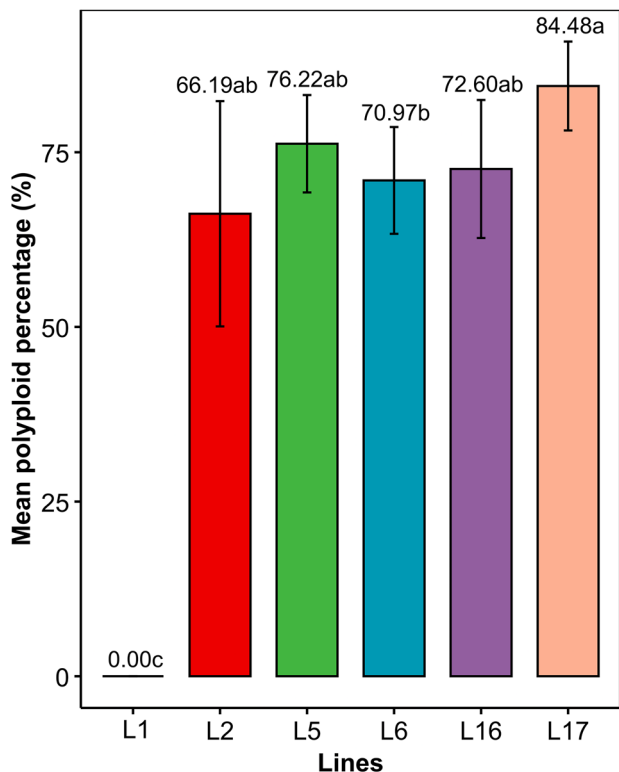
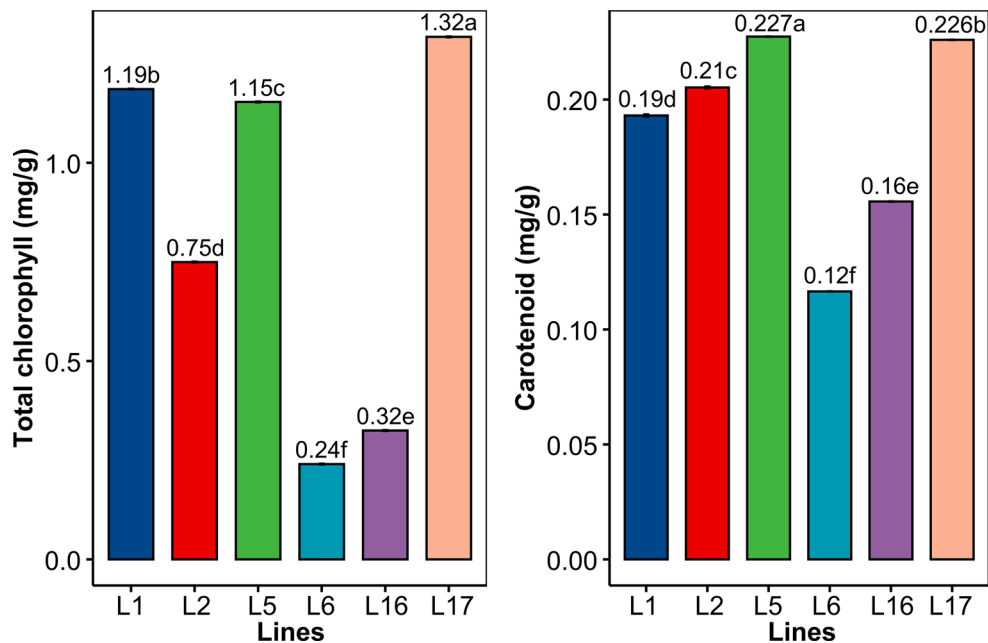


Fig. 9 Comparisons of polyploid percentages determined by karyotyping among five candidate polyploid (L2 to L17) and control (L1) lines. The values are means \pm standard deviation. Means with a letter in common are not significantly different according to Games-Howell's test ($p > 0.05$)

concentrations of BA in BA+NAA combinations increased, reaching peak values at 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA. BA and NAA were previously used for shoot regeneration of *D. anosmum* by Nguyen et al. (2022), who reported that 1.5 mg/L BA and 0.3 mg/L NAA was the most effective combination among those tested for shoot regeneration from protocorms (Nguyen et al. 2022). Another study reported that MS medium supplemented with 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA was optimal for the multiplication of shoots regenerated from *D. anosmum* nodal segments (Nguyen Huu et al. 2023). Although the optimal BA+NAA combinations identified in previous studies are similar to those in our study, we did not observe strong effects of BA+NAA combinations on shoot multiplication. This discrepancy may be attributed to the tissue- and developmental stage-specific effects of plant growth regulators, particularly auxins, on shoot formation (Novak et al. 2014).

One of the most important effects of polyploidy in plants is the increase in organ size, commonly referred to as the “gigas” effect (Sattler et al. 2016). Within the genus *Dendrobium*, morphological differences between polyploid in vitro plantlets and their diploid counterparts have been documented in numerous species, including swollen or thicker stems, thicker, harder, or miniaturized leaves, shorter stems and internodes, and fewer roots (Sarathum et al. 2010; Zhang and Gao 2021, Revathi and Thomas 2022; Liu et al. 2023; Wang et al. 2023). Consistent with these previous studies, we also observed swollen shoot stems with thick, miniaturized leaves and a rough texture in callus-derived *D. anosmum* shoots following colchicine treatment.

Colchicine treatment not only modifies overall plantlet morphology but also alters the microscopic anatomical

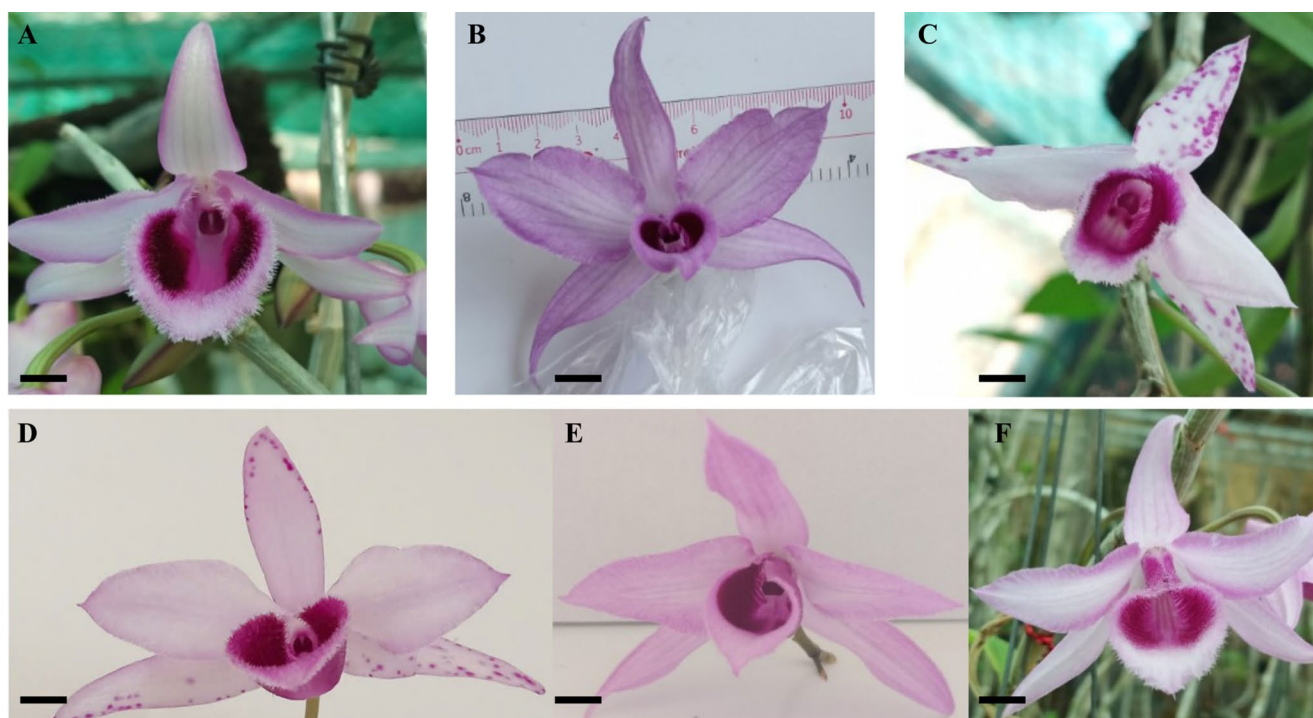


Fig. 10 Flower color observations from acclimatized plants of the control (A) and candidate polyploid lines, including L2 (B), L5 (C), L6 (D), L16 (E), and L17 (F). Scale bars: 10 mm

features of plantlets exposed to the chemical. Stomatal size is frequently used as an indicator of polyploidy in *Dendrobium* plantlets. In our study, larger stomata occurring at lower densities were observed in candidate polyploid plantlets/shoots, consistent with reports in other *Dendrobium* species (Zhang and Gao 2021, Revathi and Thomas 2022; Liu et al. 2023; Wang et al. 2023). In addition to increased stomatal size, thicker leaves were observed in candidate polyploids, as previously described for *D. cariniferum* and *D. wardianum* (Zhang and Gao 2021; Wang et al. 2023). Moreover, similar to *D. cariniferum*, *D. anosmum* plantlets regenerated from colchicine-treated callus exhibited larger leaf epidermal cells than the controls (Zhang and Gao 2021).

Unlike many previous studies on *Dendrobium* polyploidization, we also detected changes in additional micromorphological features of candidate polyploid *D. anosmum* plantlets/shoots. First, polyploid plantlets exhibited an increased number of vascular bundles compared with diploid plantlets, a feature also reported in other species such as *Juncus effusus* and *Panax vietnamensis* (Xu et al. 2010; Hieu et al. 2025). Second, roots of candidate polyploid plantlets had longer root hairs than those of control plantlets, a trait previously reported in *Arabidopsis thaliana* (Stetter et al. 2015). Finally, *D. anosmum* plantlets derived from colchicine treatments exhibited increased nuclear size, consistent with observations in other plant species (Tank and Thaker 2014; Nezhad and Mansouri 2019; Chopkar et al. 2023).

Another set of morphological changes induced by colchicine involves modifications in pigment contents, including chlorophyll and carotenoids, as well as alterations in flower coloration. With respect to carotenoid content, colchicine has been reported to increase the levels of this pigment in polyploid plants across numerous species (Hias et al. 2017; Lv et al. 2024; Zhang et al. 2024; Nourozi et al. 2025). In contrast, the effects of colchicine on chlorophyll content appear to be species specific. Colchicine treatment increased chlorophyll levels in *Catharanthus roseus*, *Actinidia chinensis*, *Malus × domestica*, and *Dendrobium* ‘Sonia’ (Hias et al. 2017; Zakizadeh et al. 2020; Lv et al. 2024; Nourozi et al. 2025), while it reduced chlorophyll content in *Lycium chinense*, *Gladiolus grandiflorus*, and *Juncus effusus* (Xu et al. 2010; Manzoor et al. 2018; Zhang et al. 2024). Because of its ability to modify plant pigment contents, colchicine can also induce changes in flower color. For example, flowers of *Dendrobium* ‘Transient White Rika’ and ‘Florenza’ derived from colchicine-treated plants exhibited reddish-purple patches compared with the original pure white coloration (Sukamto et al. 2025). Studies on polyploidization of *Gladiolus grandiflorus* have similarly reported shifts from dark flowers to lighter and more highly saturated colors (Manzoor et al. 2018). Consistent with these reports, we observed pigment content modifications in *D. anosmum*, with three out of five candidate polyploid lines showing increased carotenoid content and four out of

five lines showing decreased chlorophyll content. We also observed flowers with more saturated purple coloration and dark purple patches on light purple petals. These results demonstrate that colchicine-based polyploidization can be used to enhance the aesthetic value of *D. anosmum*.

Karyotyping of the five candidate polyploid *D. anosmum* lines revealed that, although the majority of cells were polyploid, all five lines were mixoploid. This outcome may be attributed to the fact that the callus used in this study had entered a phase of rapid growth and formed multicellular meristematic masses prior to colchicine treatment, leading to the development of mixoploid buds (Xu et al. 2018). Based on these results, further propagation and selection of progeny from the five candidate lines are required to identify lines producing polyploid gametes capable of generating fully non-mixoploid plants.

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11240-026-03456-5>.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the Cell Biology Laboratory, Gene Technology Laboratory, and Enzyme and Protein Technology Laboratory of the Institute of Biotechnology (Hue University) for providing access to equipment and research facilities. The authors also thank Mr. Le Duy Quy (Faculty of Agriculture and Forestry, College of Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam) for technical assistance with photographic documentation of callus phenotypes and shoot clusters cultured on basal MS medium.

Author contributions N.H. Tho: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Project administration, Writing – original draft preparation, and validation. H.T.X. Tuy: Methodology, Investigation, Resources. N.H. An: Formal analysis, Data curation, Visualization, Writing - review and editing. N.T.K. Cuc: Supervision, Methodology, Writing – review and editing. T.T.B. Phuong: Supervision, Conceptualization, Methodology, Writing – review and editing. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding This research was funded by the Cell Laboratory, Institute of Biotechnology, Hue University. Additional funding support was provided by the VinIF scholarship (VINIF.2023.TS.121). The study was also supported by Associate Professor Truong Thi Bich Phuong and Dr. Nguyen Thi Kim Cuc.

Data availability All data supporting the findings of this study are available within the paper (Supplementary Material 7, available data) and its Supplementary Information.

Declarations

Ethical statement This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Competing interests The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

References

- Anderson TW, Darling DA (1954) A test of goodness of fit. *J Am Stat Assoc* 49(268):765–769. <https://doi.org/10.1080/01621459.1954.10501232>
- Bartlett MS (1937) Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc R Soc Lond A* 160(901):268–282. <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- Bauer DF (1972) Constructing confidence sets using rank statistics. *J Am Stat Assoc* 67(339):687–690. <https://doi.org/10.1080/01621459.1972.10481279>
- Bolaños-Villegas P, Chen F-C (2022) Advances and perspectives for polyploidy breeding in orchids. *Plants* 11(11):1421. <https://doi.org/10.3390/plants11111421>
- Chambers JM, Freeny AE, Heiberger RM (1992) Analysis of variance; designed experiments. In: Chambers JM, Hastie TJ (eds) *Statistical models in S*, 1st edn. Routledge, New York, pp 49
- Chambers JM, Hastie TJ (1997) *Statistical models in S*. Chapman & Hall, London
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, Schuiteman A (2015) An updated classification of Orchidaceae. *Bot J Linn Soc* 177(2):151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- Chen R, Feng Z, Zhang X, Song Z, Cai D (2021) A new way of rice breeding: polyploid rice breeding. *Plants* 10(3):422. <https://doi.org/10.3390/plants10030422>
- Chopkar K, Sharma B, Maurya S, Rawte S, Thakur K, Jha Z (2023) In-vitro induction of polyploidy in Niger (*Guizotia abyssinica* L.F. Cass) through colchicine treatment. *Environ Ecol* 41(3C):2031–2038. <https://doi.org/10.60151/envec/GPKH2737>
- Dobson AJ, Barnett AG (2018) *An introduction to generalized linear models*. Chapman and Hall/CRC, New York
- Duclercq J, Sangwan-Norreeel B, Catterou M, Sangwan RS (2011) De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Sci* 16(11):597–606. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.004>
- Forkosh E, Kenig A, Ilan Y (2020) Introducing variability in targeting the microtubules: review of current mechanisms and future directions in colchicine therapy. *Pharmacol Res Perspec* 8(4):e00616. <https://doi.org/10.1002/prp2.616>
- Games PA, Howell JF (1976) Pairwise multiple comparison procedures with unequal N's and/or variances: a monte carlo study. *J Educ Stat* 1(2):113–125. <https://doi.org/10.3102/10769986001002113>
- Hadley G, Harvais G (1968) The Effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytol* 67(2):441–445. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1968.tb06393.x>
- Harvais G (1982) An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Can J Bot* 60(12):2547–2555. <https://doi.org/10.1139/b82-309>
- Hastie TJ, Pregibon D (1992) *Generalized linear models*. In: Chambers JM, Hastie TJ (eds) *Statistical models in S*, 1st edn. Routledge, New York, pp 53
- Hias N, Leus L, Davey MW, Vanderzande S, Van Huylenbroeck J, Keulemans J (2017) Effect of polyploidization on morphology in two apple (*Malus × domestica*) genotypes. *Hortic Sci* 44(2):55–63. <https://doi.org/10.17221/7/2016-HORTSCI>
- Hieu PV, Linh NTK, Long NV, Vy TT, Dung NX (2025) Polyploidization of Ngoc Linh Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) by colchicine treatment. *S F J Dev* 6(1):e4892. <https://doi.org/10.46932/sfjdv6n1-003>
- Hill K, Schaller GE (2013) Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. *Plant Signal Behav* 8(10):e25709. <https://doi.org/10.4161/psb.25709>

- Hollander MA, Wolfe D, Chicken E (2014) Nonparametric statistical methods. Wiley, New Jersey
- Hung ĐQ, Giáp ĐĐ, Tâm TTT et al (2022) Effects of light-emitting diodes in micropropagation of *Dendrobium anosmum* Di Linh Taly. J Sci Technol IUH 53:48–55. <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v53i05.4186>
- Huy NP, Tam DTT, Luan VQ, Tung HT, Hien VT, Ngan HTM, Duy PN, Nhut DT (2019) *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. Sci Hortic 252:283–290. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.063>
- Kamath A, Mehal W, Jain D (2008) Colchicine-associated ring mitosis in liver biopsy and their clinical implications. J Clin Gastroenterol 42(9):1060–1062. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31803815b4>
- Kirov I, Divashuk M, Van Laere K, Soloviev A, Khrestaleva L (2014) An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. Mol Cytogenet 7(1):21. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-21>
- Kolmogorov A (1933) Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. Giorn Ist Ital Attuari 4:83–91
- Liu Y, Duan S-D, Jia Y, Hao L-H, Xiang D-Y, Chen D-F, Niu S-C (2023) Polyploid induction and karyotype analysis of *Dendrobium officinale*. Horticulturae 9(3):329. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030329>
- Lv H, Zhou Y, Tian H, Fei Z, Li D, Zhong C (2024) New insights into colchicine-mediated tetraploidy in *Actinidia chinensis* ‘Dong-hong’. Hort J 93(3):273–281. <https://doi.org/10.2503/hortj.QH-136>
- Manton I (1950) The spiral structure of chromosomes. Biol Rev 25(4):486–508. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1950.tb00770.x>
- Manzoor A, Ahmad T, Bashir MA, Baig MMQ, Quresh AA, Shah MKN, Hafiz IA (2018) Induction and identification of colchicine induced polyploidy in *Gladiolus grandiflorus* ‘White prosperity’. Folia Hortic 30(2):307–319. <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0026>
- McCullagh P, Nelder JA (2018) Generalized linear models. Routledge, Boca Raton
- Miguel TP, Leonhardt KW (2011) *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin. Sci Hortic 130:314–319. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.002>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15(3):473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nezhad FS, Mansouri H (2019) Induction of polyploidy by colchicine on the green algae *Dunaliella salina*. Russ J Mar Biol 45(2):106–112. <https://doi.org/10.1134/S1063074019020093>
- Nguyen HT, Dinh ST, Ninh TT, Nong HT, Dang TTT, Khuat QV, Dang ATP, Ly MT, Kirakosyan RN, Kalashnikova EA (2022) *In vitro* propagation of the *Dendrobium anosmum* Lindl. collected in Vietnam. Agronomy 12(2):324. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020324>
- Nguyen Huu T, Nguyen Thi O, La Thi Thu H et al (2024) Research on the effect of dimethyl sulfide (DMS) on inducing variation in *Dendrobium anosmum* Lindl. “Tim Hue” orchid. In: Proceedings of 2024 Vietnam National Conference on Biotechnology Conference, Hue University Publishing House, Hue, Vietnam, pp 467–473
- Nguyen Huu T, Nguyen Thi O, Truong Thi Bich P et al (2023) Conservation of *Dendrobium anosmum* Lindl. ‘Tim Hue’ by *in vitro* Propagation. Propag Ornament Plants 23:39–48
- Nourozi E, Hedayati A, Madani H, Hosseini B, Hemmaty S (2025) *In vitro* synthetic polyploidization and enhancement of anticancer compounds in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don important cultivars. Sci Rep 15(1):6563. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-91103-y>
- Novak SD, Luna LJ, Gamage RN (2014) Role of auxin in orchid development. Plant Signal Behav 9(10):e972277. <https://doi.org/10.4161/psb.32169>
- Pintos B, Manzanera JA, Bueno MA (2007) Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. J Plant Physiol 164(12):1595–1604. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.11.012>
- Potenza M, Tellez-Iñón MT (2015) Colchicine treatment reversibly blocks cytokinesis but not mitosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res 114(2):641–649. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4227-8>
- Rahayu EMD, Sukma D, Syukur M et al (2015) Induksi poliploidi menggunakan kolkisin secara *in vivo* pada bibit anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume). Buletin Kebun Raya 18:41–48
- Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. Plant Cell 12(4):507–518. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.507>
- Revathi BS, Thomas B (2022) *In vivo* polyploidy induction in *Dendrobium crumenatum* through colchicine treatment. J Appl Hort 24(03):317–321. <https://doi.org/10.37855/jah.2022.v24i03.56>
- Sarathum S, Hegele M, Tantivivat S, Nanakorn M (2010) Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Eur J Hort Sci 75:123–127. <https://doi.org/10.1079/ejhs.2010/1591099>
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta 243(2):281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52(3–4):591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Silva PAKXDME, Callegari-Jacques S, Bodanese-Zanettini MH (2000) Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Cienc Rural 30(1):105–111. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000001000017>
- Smirnov N (1948) Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions. Ann Math Statist 19(2):279–281. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730256>
- Stephens MA (1986) Tests based on EDF statistics. In: D’Agostino RB, Stephens MA (eds) Goodness-of-fit-techniques, 1st edn. Routledge, New York, pp 98
- Stetter MG, Schmid K, Ludewig U (2015) Uncovering genes and ploidy involved in the high diversity in root hair density, length and response to local scarce phosphate in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 10(3):e0120604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120604>
- Student (1908) The probable error of a mean. Biometrika 6(1):1. <https://doi.org/10.2307/2331554>
- Sukamto DS, Danuji S, Putri HR, Komaria N (2025) Colchicine colchicine-induced Phenotypic alterations in *Dendrobium* ‘Transient White Rika’ and ‘Florenza’: valuable material for genetics-based learning modules. J Penelit Pendid IPA 11(4):542–549. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v11i4.10727>
- Tank JG, Thaker VS (2014) Systemic control of cell division and endoreduplication by NAA and BAP by modulating CDKs in root tip cells of *Allium cepa*. Biomed Res Int 2014:1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/453707>
- Tukey JW (1949) Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics 5(2):99. <https://doi.org/10.2307/3001913>
- Venables WN, Ripley BD (2002) Modern applied statistics with S. Springer, New York
- Vichiato MRDM, Vichiato M, Pasqual M, Rodrigues FA, Castro DMD (2014) Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Crop Breed Appl Biotechnol

- 14(3):154–159. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n3a23>
- Vilcherrez-Atoche JA, Iiyama CM, Cardoso JC (2022) Polyploidization in orchids: from cellular changes to breeding applications. *Plants* 11(4):469. <https://doi.org/10.3390/plants11040469>
- Wang F, Zhuo X, Arslan M, Ercisli S, Chen J, Liu Z, Lan S, Peng D (2023) In vitro induction of polyploidy by colchicine in the protocorm of the orchid *Dendrobium wardianum* Warner. *Hort Sci* 58(11):1368–1375. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI17355-23>
- Welch BL (1951) On the comparison of several mean values: an alternative approach. *Biometrika* 38(3–4):330. <https://doi.org/10.1093/biomet/38.3-4.330>
- Wu W, Du K, Kang X, Wei H (2021) The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development. *Hortic Res* 8(1):118. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00558-3>
- Xu C, Zhang Y, Huang Z, Yao P, Li Y, Kang X (2018) Impact of the leaf cut callus development stages of *Populus* on the tetraploid production rate by colchicine treatment. *J Plant Growth Regul* 37(2):635–644. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9763-x>
- Xu L, Najeeb U, Naeem MS, Daud MK, Cao JS, Gong HJ, Shen WQ, Zhou WJ (2010) Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine. *Biologia Plant* 54(4):659–663. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0117-9>
- Yenchon S, Te-Chato S (2014) Polyploidy induction of *Dendrobium formosum* by colchicine treatment in vitro. *Acta Hort* 1025(1025):81–88. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1025.12>
- Zakizadeh S, Kaviani B, Hashemabadi D (2020) In Vivo-induced polyploidy in *Dendrobium* ‘Sonia’ in a bubble bioreactor System using colchicine and oryzalin. *Braz J Bot* 43(4):921–932. <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00654-z>
- Zhang Q, Fu X, Liu H, Chen Y, Chen S, Niu H, Luo Y, Lei H, Zhang D (2023) A systematical review on ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects of *Dendrobium nobile* Lindl. *Phytochem Rev* 22(3):743–780. <https://doi.org/10.1007/s11101-023-09858-z>
- Zhang R, Rao S, Wang Y, Qin Y, Qin K, Chen J (2024) Chromosome doubling enhances biomass and carotenoid content in *Lycium chinense*. *Plants* 13(3):439. <https://doi.org/10.3390/plants13030439>
- Zhang X, Gao J (2021) Colchicine-induced Tetraploidy in *Dendrobium cariniferum* and its effect on plantlet morphology, anatomy and genome size. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 144(2):409–420. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01966-4>
- Zhou X-M, Zheng C-J, Gan L-S, Chen G-Y, Zhang X-P, Song X-P, Li G-N, Sun C-G (2016) Bioactive phenanthrene and bibenzyl derivatives from the stems of *Dendrobium nobile*. *J. Nat. Prod* 79(7):1791–1797. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00252>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.