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

NGUYỄN HỮU THỌ

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2026

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

NGUYỄN HỮU THỌ

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

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

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

HUẾ, 2026

LỜI CAM ĐOAN

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

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

Huế, ngày 8 tháng 5 năm 2026

Tác giả luận án

Nguyễn Hữu Thọ

LỜI CẢM ƠN

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

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

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

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

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

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

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

Thành Phố Huế, ngày 8 tháng 5 năm 2026

Tác giả luận án

Nguyễn Hữu Thọ

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN……i
LỜI CẢM ƠN……ii
MỤC LỤC…… iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT……vi
DANH MỤC SƠ ĐỒ HÌNH ẢNH……viii
DANH MỤC BẢNG BIỂU……ix
MỞ ĐẦU 1
Mục tiêu nghiên cứu 2
Nội dung nghiên cứu 3
Phạm vi nghiên cứu 3
Ý nghĩa khoa học và thực tiễn 3
Ý nghĩa khoa học 3
Những điểm mới của luận án 4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU 5
1. Tổng quan chi lan Hoàng Thảo *(Dendrobium)* và loài lan Giả hạc tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) 5
1.1. Chi lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*) 5
1.2. Lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) 5
1.2.1 Phân loại thực vật 5
1.2.2 Phân bố 6
1.2.3. Đặc điểm của lan Giả hạc 6
1.2.4. Đặc điểm bộ nhiễm sắc thể (NST) của lan Giả hạc 8
1.2.5. Giá trị của lan Giả hạc 9
1.2.5.1. Giá trị kinh tế của lan Giả hạc 9
1.2.5.2. Giá trị dược liệu của lan Giả hạc 11
1.2.6. Lan Giả hạc tím Huế 12
2. Tổng quan nghiên cứu các phương pháp nhân giống lan Giả hạc 13
2.1. Nhân giống truyền thống 13
2.2. Nhân giống in-vitro lan Giả hạc 14
3. Các yếu tố ảnh hưởng đến cây con sinh trưởng ở vườn 18
3.1. Ánh sáng 18

3.2. Nhiệt độ 18
3.3. Độ ẩm 18
3.4. Nước 19
3.5. Giá thể trồng 19
4. Vi sinh vật nội sinh thực vật 20
5. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến 21
5.1. Khái niệm 21
5.2. Sơ lược về tạo đột biến bằng tác nhân hoá học 21
6. Một số phương pháp phân tích đa dạng di truyền ở thực vật 23
6.1. Phân tích đa dạng hình thái 24
6.2. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào chỉ thị sinh lý – sinh hoá 25
6.3. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào chỉ thị phân tử RAPD 25
7. Một số kết quả nghiên cứu có liên quan đến đề tài 27
7.1. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô 27
7.2. Tạo giống đột biến bằng phương pháp thực nghiệm 31
7.3. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử 34
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 35
2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu 35
2.2. Vật liệu nghiên cứu 36
2.2.1. Vật liệu thực vật 36
2.2.2. Hoá chất thí nghiệm 36
2.2.3. Điều kiện phòng và môi trường nuôi cấy 38
2.3. Phương pháp nghiên cứu 39
2.3.1 Tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* cho lan Giả hạc tím Huế 39
2.3.2. Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm 46
2.3.3. Đánh giá đặc điểm hình thái và di truyền của các dòng lan đột biến 49
2.3.4. Quy trình tái sinh lại một số dòng đột biến được chọn lọc 53
2.3.5. Xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm 55
2.3.6. Phương pháp xác định các chỉ tiêu nghiên cứu 59
2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu 60
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 61
3.1. Tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* từ mẫu lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) 61

3.1.1 Nhận diện và thu thập dòng lan Giả hạc tím Huế làm cây đầu dòng 61
3.1.2 Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế 63
3.2 Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm 81
3.2.1 Gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng Colchicine hoặc Dimethyl sulphate 81
3.2.2 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi 94
3.2.3 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi xử lý đột biến..... 100
3.2.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ của chồi đột biến 102
3.3. Đánh giá đặc điểm hình thái/di truyền của các dòng lan đột biến.....104
3.3.1. Đặc điểm hình thái của cây đột biến 105
3.3.2. Đặc điểm tế bào cây đột biến 111
3.3.3. Đa dạng di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử RAPD 123
3.4 Quy trình tái sinh lại một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến có triển vọng 128
3.4.1 Tái sinh mô sẹo từ chồi của một số dòng đột biến 128
3.4.2 Tái sinh chồi từ mô sẹo của của các dòng đột biến……..…….128
3.4.3. Nhân nhanh chồi của các dòng đột biến 130
3.4.4. Kết quả ra rể tạo cây hoàn chỉnh từ các chồi đột biến..... 130
3.5 Xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm.....132
3.5.1. Nghiên cứu giá thể phù hợp để ra bầu cây con. 132
3.5.2. Ảnh hưởng giá thể trồng đến các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến giai đoạn vườm ươm.....134
3.5.3. Điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng) ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến ra vườn..... 136
3.5.4 Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến 138
3.5.5 Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế.....144
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 145
1. Kết luận.....145
2. Đề nghị.....145
DANH MỤC CÁC BÀI BÁO, CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 146
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....147
PHỤ LỤC……..……..……159

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

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

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

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

DANH MỤC SƠ ĐỒ HÌNH ẢNH

TT	Tên sơ đồ, hình ảnh.	Trang
Hình 1.1	Hình thái của *Dendrobium anosmum* Lindl.	**7**
Hình 1.2	Nhiễm sắc thể của *Dendrobium anosmum*	9
Hình 1.3	Hoa lan Giả hạc tím Huế *(D. anosmum* Lindl.*)*	12
Hình 2.1	Mẫu lan Giả hạc tím Huế	36
Hình 3.1	Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* lindl.)	61
Hình 3.2	Các giai đoạn phát triển của hạt lan Giả hạc tím Huế	67
Hình 3.3	Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của lan Giả hạc tím Huế từ protocorm.	68
Hình 3.4	Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy	69
Hình 3.5	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy	74
Hình 3.6	Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.	75
Hình 3.7	Tái sinh chồi *in-vitro* từ đoạn thân Giả hạc tím Huế	76
Hình 3.8.	Nhân nhanh chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy	79
Hình 3.9.	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy	81
Hình 3.10	Hình thái protocorm sau khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 4 tuần.	82
Hình 3.11	Hình thái protocorm xử lý bằng colchicine hoặc DMS được nuôi cấy sau 8 tuần	84
Hình 3.12	Trạng thái mô sẹo khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 4 tuần	91
Hình 3.13	Trạng thái mô sẹo khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 8 tuần	91
Hình 3.14.	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của protocorm đã xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy	94
Hình 3.15	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của mô sẹo đã xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy.	97
Hình 3.16	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng nhân chồi đã xử lý hoá chất.	100
Hình 3.17.1	Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy.	102
Hình 3.17.2	Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng DMS sau 8 tuần nuôi cấy.	103
Hình 3.18	Một số hình dạng bất thường của protocorm xử lý hoá chất	104
Hình 3.19	Một số hình dạng bất thường của mô sẹo xử lý hoá chất.	105
Hình 3.20	Hình thái chồi tái sinh từ mô sẹo và protocorm xử lý hoá chất.	107
Hình 3.21	Hình thái biến dị mặt hoa của một số dòng đột biến.	109

Hình 3.22	Hình thái mặt hoa được dàn trải trên mặt phẳng của một số dòng lan đột biến (M1 là hoa đối chứng)	109
Hình 3.23	Đỉnh sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế được quan sát dưới kính hiển vi.	111
Hình 3.24	Mặt cắt ngang của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi	112
Hình 3.25	Biểu đồ bề dày của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi	112
Hình 3.26	Biểu đồ kích thước (chiều dài, chiều rộng) và đường kính nhân của tế bào biểu mô lá	113
Hình 3.27	Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế	114
Hình 3.28	Biểu đồ số lượng bó mạnh và đường kính bó mạnh dẫn trong thân non của lan Giả hạc tím Huế	114
Hình 3.29	Hình thái giải phẫu mặt cắt ngang của thân chồi lan Giả hạc tím Huế	115
Hình 3.30	Hình giải phẫu rễ lan Giả hạc tím Huế.	116
Hình 3.31	Biểu đồ thể hiện mật độ và chiều dài lông hút của rễ lan Giả hạc tím Huế	116
Hình 3.32	Hình thái khí khổng của lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy chồi	117
Hình 3.33	Bộ nhiễm sắc thể lan Giả hạc tím Huế quan sát dưới kính hiển vi	121
Hình 3.34	Hình thái NST và sơ đồ karyotype của lan Giả hạc tím Huế	121
Hình 3.35	Kết quả sàng lọc mồi PCR-RAPD trên mẫu lan được xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 8 giờ có ký hiệu mẫu là M5	124
Hình 3.36	Cây phân nhóm di truyền 34 dòng lan Giả hạc tím Huế.	126
Hình 3.37	Sơ đồ các bước thực hiện tái sinh một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến	131
Hình 3.38	Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây con lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* ở vườn ươm	132
Hình 3.39	Thí nghiệm ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng sinh trưởng của *vitro* Giả hạc tím Huế đột biến đột biến ở vườn ươm.	136
Hình 3.40	Phân lập và tạo dòng thuần khiết các vi khuẩn nội sinh	138
Hình 3.41	Ảnh hưởng của các chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng.	140
Hình 3.42	Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh CP2 đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến sau 3 tháng ở vườn ươm.	141
Hình 3.43	Sơ đồ quy trình nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế	143

DANH MỤC BẢNG BIỂU

TT	Tên bảng biểu	Trang
Bảng 2.1	Kí hiệu và trình tự của 63 mồi RAPD sử dụng trong nghiên cứu	37
Bảng 2.2	Trình tự nucleotide của các cặp mồi	40
Bảng 2.3	Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng tới tỷ lệ nhiễm của mẫu	42
Bảng 2.4	Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành protocorm	44
Bảng 2.5	Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành mô sẹo	44
Bảng 2.6	Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi	45
Bảng 2.7	Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi	46
Bảng 2.8	Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ	46
Bảng 2.9	Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng colchicine trên protocorm/mô sẹo	47
Bảng 2.10	Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng DMS trên protocorm/ mô sẹo	48
Bảng 2.11	Thành phần phản ứng PCR	53
Bảng 3.1	Điều kiện tối ưu cho nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím huế từ hạt các giai đoạn vào mẫu, tạo protocorm và tái sinh chồi.	63
Bảng 3.2	Điều kiện tối ưu cho nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím huế từ đoạn thân có mắt ngủ	70
Bảng 3.3	Ảnh hưởng của BA và IAA đến khả năng nhân chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.	78
Bảng 3.4	Ảnh hưởng của IAA và NAA đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy	80
Bảng 3.5	Kết quả xử lý mẫu protocorm bằng colchicine sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy	85
Bảng 3.6	Kết quả xử lý mẫu protocorm bằng Dimethyl sulphate (DMS) sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy	86
Bảng 3.7	Kết quả xử lý mẫu mô sẹo bằng colchicine sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy	89
Bảng 3.8	Kết quả xử lý mẫu mô sẹo bằng Dimethyl Sulphate (DMS*)* sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy	90
Bảng 3.9	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm được xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy	95
Bảng 3.10	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo được xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy	98
Bảng 3.11	Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân của chồi xử lý hoá chất sau 8 tuần	100
Bảng 3.12	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy	101

Bảng 3.13	Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi xử lý bằng DMS sau 8 tuần nuôi cấy	102
Bảng 3.14	Một số đặc điểm hình thái của mẫu lan Giả hạc tím Huế đối chứng không xử lý hoá chất và mẫu được xử lý hoá chất (colchicine, DMS)	108
Bảng 3.15	Đặc điểm của tế bào khí khổng trên biểu bì lá sau 3 tháng nuôi cấy.	118
Bảng 3.16	Hàm lượng chlorophyll và carotenoid của một số dòng lan Giả hạc tím Huế xử lý hoá chất (mẫu lá thu ở giai đoạn sau khi cấy chồi *in-vitro* được 8 tuần)	120
Bảng 3.17	Kết quả khuếch đại PCR dựa trên mỗi mồi RAPD của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế	123
Bảng 3.18	Chỉ số đa dạng di truyền quần thể lan Giả hạc tím Huế cho mỗi mồi RAPD	125
Bảng 3.19	Khả năng tái sinh mô sẹo hoặc chồi của một số dòng đột biến sau 12 tuần	127
Bảng 3.20	Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo dòng đột biến ở các dòng đột biến được chọn sau 8 tuần nuôi cấy	128
Bảng 3.21	Khả năng nhân nhanh chồi của các chồi đột biến sau 8 tuần nuôi cấy	129
Bảng 3.22	Khả năng ra rễ của chồi ở một số dòng lan đột biến sau 8 tuần nuôi cấy	130
Bảng 3.23	Ảnh hưởng của giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con *in-vitro* Giả hạc tím Huế trong vườn ươm sau 12 tuần trồng.	133
Bảng 3.24	Ảnh hưởng giá thể trồng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây con *invitro* Giả hạc tím Huế ở một số dòng đột biến trong vườn ươm sau 12 tuần.	134
Bảng 3.25	Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng thích nghi, sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến sau 3 tháng ở vườn ươm.	136
Bảng 3.26.	Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng.	140
Bảng 3.27	Hiệu quả của chế phẩm vi sinh đến khả năng sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế *in-vitro* đột biến giai đoạn vườn ươm.	142

MỞ ĐẦU

Hiện nay, có khoảng 750 chi với 35.000 loài lan tự nhiên và 75.000 giống lan do kết quả chọn lọc và lai tạo [120]. Để đa dạng hoá các dòng/giống lan thì ngoài việc tìm kiếm các giống tự nhiên con người còn tạo ra các dòng/giống mới thông qua lai tạo, đột biến và mỗi năm tạo ra hàng trăm giống lan mới để đáp ứng nhu cầu thị trường về màu sắc, hình dáng và khả năng kháng bệnh [58].

Trong tự nhiên, *Dendrobium* là một trong sáu chi phong lan phổ biến được ưa chuộng do các giá trị về thẩm mỹ, dược liệu, và kinh tế mà chi lan này mang lại. Theo Trần Văn Bảo (1999), lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là loài lan rừng ở Việt Nam có nhiều trên dãy núi Trường Sơn từ Nam ra Bắc [4]. Lan Giả hạc được nhiều người lựa chọn do có đặc điểm thân lá và mặt hoa đẹp, mùi thơm, đặc biệt là giống lan này còn có những dòng đột biến rất có giá trị về thẩm mỹ, được người chơi săn tìm và sưu tầm. Các dòng lan Giả hạc thuộc chi Hoàng thảo (*Dendrobium)*, thường có thân thòng hướng xuống, mọng nước. Mặt hoa của các dòng thuộc loài này có nhiều biến thể khác nhau tạo nên sự độc đáo cho từng dòng, tất cả các điều này làm cho giá lan Giả hạc trong những năm gần đây tăng lên nhiều [120]. Hiện nay, các đột biến của lan Giả hạc chủ yếu là phát sinh tự nhiên do đó số lượng rất ít, chưa đa dạng, đồng thời mức độ ổn định di truyền của các đột biến này qua các thế hệ cũng chưa được kiểm chứng [10], [47]. Phương pháp tạo giống lan đột biến phổ biến hiện nay chủ yếu là chiếu xạ gây đột biến (tia Gamma, tia X), sử dụng hóa chất gây đột biến (như Ethyl methanesulfonate (EMS)**,** Colchicine), lai tạo truyền thống qua thụ phấn chọn lọc, và nuôi cấy mô kết hợp chọn lọc biến dị [100].

Mỗi vùng miền của Việt Nam có một vài dòng lan Giả hạc đặc trưng có sự khác biệt về hình thái thân, lá, mặt hoa và thời điểm nở. Thành phố Huế nằm giữa hai miền Bắc Nam, có hệ thực vật phong phú trong đó có cả một số dòng lan Giả hạc, điển hình là dòng lan Giả hạc tím Huế. Giả hạc tím Huế ngoài các đặc điểm chung của lan Giả hạc còn mang những nét đặc trưng riêng như khuôn hoa lớn, cánh sáp có viền, mùi thơm dịu, với màu tím Huế đặc trưng, đặc biệt thời gian nở hoa vào tháng 5-6 khác với các loại giả hạc khác là nở vào tháng 2-3, nhưng nguồn giống còn hạn chế, chưa có những đột biến điển hình được tìm thấy, giá trị kinh

tế chưa cao. Đồng thời, lan Giả hạc tím Huế ngoài tự nhiên hiện nay rất khan hiếm do bị khai thác quá mức, việc khai thác không kiểm soát *D. anosmum* Lindl. nói riêng và các loài lan rừng khác nói chung đang xảy ra ở nhiều nơi như Tây Nguyên, Lâm Đồng, các tỉnh miền núi phía Bắc. Hầu hết các loài lan rừng ở Việt Nam đều có tên trong Sách đỏ Việt Nam và nhiều loài trong số đó đang ở mức đặc biệt nguy cấp [1]. Ngoài ra, việc thu hẹp môi trường sống do các tác động của thiên tai, con người và khả năng nhân giống tự nhiên thấp dẫn đến số lượng lan rừng ngày càng ít đi nhanh chóng [43]. Trên đây là những nguyên nhân chính dẫn đến sự suy giảm mức độ đa dạng sinh học các loài trong tự nhiên trong đó có loài lan *D. anosmum* Lindl.

Vì vậy, để góp phần phát triển dòng lan này chúng tôi thực hiện đề tài **"*Nghiên cứu tạo một số dòng lan Giả hạc tím Huế (Dendrobium anosmum* Lindl.*) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm"*** nhằm tạo ra một số dòng đột biến có giá trị từ nguồn giống lan bản địa này, cũng như làm đa dạng nguồn vật liệu cho quá trình lựa chọn giống hoặc phục vụ sản xuất giống lan này, phát triển ngành nghề hoa cây cảnh, đồng thời đề tài còn nhân giống *in-vitro* cây mẹ đầu dòng góp phần bảo tồn nguồn gen của giống lan bản địa.

Mục tiêu nghiên cứu

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

Mục tiêu cụ thể:

- Hoàn thiện quy trình nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.*).*

- Tạo được một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng cách sử dụng colchicine và dimethyl sulphate (DMS) tác động lên mô sẹo và protocorm.

- Đánh giá được đặc điểm biến dị hình thái và di truyền của dòng đột biến.

- Đánh giá được ảnh hưởng của một số yếu tố (môi trường dinh dưỡng, chất điều hoà sinh trưởng, giá thể trồng, chế độ chiếu sáng, chế phẩm vi sinh) tới sinh trưởng, phát triển của các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.

Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* từ lan Giả hạc tím Huế.

- Nghiên cứu tạo dòng Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm.

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

- Nghiên cứu xây dựng quy trình huấn luyện cây con ra vườn ươm và ảnh hưởng chế phẩm vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu quá trình gây đột biến thực nghiệm bằng colchicine và DMS trên vật liệu nuôi cấy *in vitro*. Nghiên cứu sự phát sinh biến dị di truyền và hình thái của các dòng lan sau xử lý đột biến, làm cơ sở khoa học cho sàng lọc và lựa chọn dòng đột biến phục vụ định hướng chọn tạo giống lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) Nghiên cứu được thực hiện tại Viện công nghệ sinh học, Đại học Huế trong thời gian từ 5/2021 đến 5/2024.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Ý nghĩa khoa học

- Bổ sung vào khoá phân loại dòng lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl.*)* được thu thập tại Huế những đặc điểm đặc trưng về hình thái và phân tử để nhận dạng.

- Hoàn thiện quy trình nhân giống lan Giả hạc tím Huế bằng nuôi cấy *in-vitro.*

- Xây dựng quy trình tạo giống lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm.

- Đánh giá các biến đổi cây đột biến bằng các chỉ thị hình thái, tế bào và phân tử từ đó làm cơ sở lựa chọn các dòng đột biến triển vọng.

Ý nghĩa thực tiễn

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

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

- Hoàn thiện quy trình từ nhân giống tới huấn luyện và chăm sóc cây con cho các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.

- Tạo ra một số dòng lan giả hạc Tím Huế đột biến có hình thái khác biệt, có nguồn biến dị phong phú, cung cấp nguồn vật liệu cho quá trình chọn lọc và tạo giống.

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

Những điểm mới của luận án

- Nghiên cứu là lần đầu mô tả chi tiết các đặc điểm nhận dạng về hình thái và phân tử dòng lan Giả hạc tím thu thập tại Huế, kết quả bổ sung vào khoá phân loại các đặc điểm nhận dạng loài này.

Lần đầu tiên xây dựng quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên lan Giả hạc tím Huế bằng hoá chất colchicine và dimethyl sulphate. Phân lập được một số chủng vi sinh vật nội sinh từ lan rừng và ứng dụng chế phẩm vi sinh nội sinh trong chăm sóc cây lan con ở vườn ươm, góp phần định hướng phát triển mô hình chăm sóc lan theo hướng sinh học, bền vững.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

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

1.1. Chi lan Hoàng Thảo *(Dendrobium)*

Chi lan Hoàng Thảo *(Dendrobium)* là một trong những chi quan trọng nhất trong họ phong lan (Orchidaceae), *Dendrobium* bao gồm 1600 loài lan biểu sinh. Các chi này có đặc điểm thân giả hành dài hay thân giả có lá mềm dọc theo chiều dài thân, ở một số loài lan có giả hành ngắn hoặc phình to. Giả hành *Dendrobium* có 4 loại chính: (a) giả hành dạng thân gỗ (cane woody), (b) giả hành dạng thân trụ (cane cylindric), (c) giả hành dạng thân chùy (cane clavate fleshy), và (d) giả hành dạng củ tròn (bulbous round), đại diện điển hình là *D.anosmum*, *D. bigibbum*, *D. nobile*, và *D. lindleyi*. Kích thước lá từ 2,5 cm đến 40 cm, dày, rụng lá hoặc thường xanh. Hoa của chi *Dendrobium* có thể ra trực tiếp trên thân giả hành, mọc riêng lẻ hoặc thành từng cụm, hoặc là các chuỗi hoa mọc ra từ các nách lá hay đỉnh ngọn. Cụm hoa ở đầu hoặc cuối và được sắp xếp từ một đến vài chục hoa với kích thước và phạm vi màu hoa vô cùng đa dạng [90].

Dendrobium phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, miền Bắc và Đông Úc. Đa số các loài này nằm trong Công ước quốc tế về buôn bán các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp (CITES). Có 107 loài thuộc chi *Dendrobium* đã được tìm thấy ở Việt Nam và chúng phân bố rộng rãi trên khắp mọi miền của nước ta. Các loài thuộc chi *Dendrobium* giá trị thẩm mỹ cao được nhiều người lựa chọn [141], ngoài ra, chi lan này còn là những dược liệu có giá trị đối với sức khỏe con người như tác dụng loại bỏ các chất độc hại tích luỹ trong mô, tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể, giảm lượng đường trong máu và kéo dài tuổi thọ [176], [201].

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

1.2.1 Phân loại thực vật

Theo hệ thống phân loại APG III năm 2009 [64], lan Giả hạc *(Dendrobium anosmum* Lindl.*)* được phân loại như sau:

Giới: *Plants* (thực vật)

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

Lớp: *Liliopsida* (Một lá mầm)

Bộ: *Asparagales* (Măng tây)

Họ: *Orchidaceae* (phong lan)

Chi: *Dendrobium* (Hoàng thảo)

Tên Khoa học: *Dendrobium anosmum* Lindl.

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

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

1.2.2 Phân bố

Lan Giả hạc (*D. anosmum* Lindl) được phân phối rộng rãi từ Philippines đến New Guinea, bao gồm Borneo và nhiều hòn đảo của Indonesia, trên các bán đảo ở Malaysia, Thái Lan, Lào, Việt Nam và Sri Lanka [88]. Trong rừng núi chúng thường mọc ở độ cao dưới 750 m. Ở các khu vực Bulolo và Wau thuộc Papua New Guinea, chúng sống phổ biến trên cây có vỏ xù xì và gỗ mục, ở độ cao 1300 m so với mực nước biển [126]. Giống lan này được Lindley đặt tên từ năm 1845, thường mọc ở các quốc gia Đông Nam Á, nhưng nay phổ biến khắp thế giới bởi vì khá dễ trồng, nhiều hoa và hương thơm ngào ngạt [106].

Ở Việt Nam, lan Giả hạc có ở hầu khắp các tỉnh thành trong cả nước, đặc biệt nhiều trên dãy Trường Sơn [2] và mang các đặc tính gen và hình thái khác nhau theo địa lí, độ cao, độ ẩm và nhiệt độ, cũng từ đó cây mang nặng đặc tính vùng miền thể hiện qua thân lá và hoa [146], [35].

1.2.3. Đặc điểm của lan Giả hạc

- Thân: thân giả hành, dạng đa thân, chiều dài của thân có thể đạt tới 1,2 m, thân có đốt mềm mại buông rủ xuống, thân có màu xanh, mọng nước. Thân giả hành sau khi ra hoa sẽ dần khô lại hoặc nếu trên thân còn mắt ngủ thì tiếp tục nuôi dưỡng mắt ngủ để lên chồi mới. Thân giả hành ra mới sau mỗi mùa hoa, thường sẽ phát triển từ mầm gốc [92].

- Lá: lá có hình thoi thuôn dài, mọc cách so le, màu xanh bóng, ngả vàng và rụng trước khi đến mùa ra hoa 2-3 tháng thường là mùa thu - đông, có bẹ lá ôm thân, không có cuống lá, tùy xuất xứ có cây lá hơi tròn, có vùng lại nhỏ dài [92].

Hình 1.1 : Hình thái của *Dendrobium anosmum* Lindl. [92]

- Hoa: tập hợp thành chùm hoặc đơn lẻ, phát triển từ chồi hoa ở các mắt ngủ trên giả hành. Hoa giả hạc thuộc loại hoa mẫu 3. Có 6 cánh hoa, trong đó có 3 cánh hoa ngoài cùng gọi là 3 cánh dài. Nằm kề bên trong có xen kẽ với 3 cánh dài là 3 cánh hoa. Hai cánh bên thường giống nhau, cánh còn lại nằm ở phía dưới của hoa, thường có màu sắc và hình dạng đặc biệt khác hẳn 2 cánh kia được gọi là cánh môi. Chính cánh môi quyết định giá trị thẩm mỹ hoa lan. Giữa hoa có một trụ nổi là bộ phận sinh dục của hoa. Trụ chứa cả nhị và nhụy nên được gọi là trục - hợp - nhụy. Phần nhị nằm bên trên của trục, thường có nắp che chở, bên trong chứa 4 khối phấn màu vàng, có dạng thuôn hơi cong lưỡi liềm. Hoa Giả hạc có bầu hạ, thuôn dài kéo theo cuống. Bầu hoa lan có 3 ô gọi là 3 tâm bì (hoặc đính noãn trung trụ) hoặc đính noãn bên. Trong bầu chứa vô số các hạt nhỏ li ti gọi là tiểu noãn nằm trên 3 đường dọc theo chiều dài của 3 mép tâm bì. Sau khi thụ phấn, thụ tinh, các tiểu noãn sẽ biến đổi và phát triển thành hạt, trong khi đó bầu noãn sẽ to phát triển thành quả [83].

Hoa lan Giả hạc có mùi thơm dễ chịu, đường kính hoa trung bình từ 7 – 10 cm, tuy nhiên có một số biến thể nhỏ hoặc lớn hơn, thậm chí là không nở hoàn toàn. Trên một thân

thường có nhiều cụm hoa, thường mỗi cụm hoa có từ 1-3 hoa, một cây có thể ra đến 50 – 70 hoa. Màu sắc hoa đa dạng, thay đổi từ màu hồng đậm đến tím nhạt và có trải qua màu sắc biến đổi trung gian. Các yếu tố màu sắc của hoa có phần nhạt, đậm từ viền hoa đến cuống hoa. Thông thường loài hoa này sẽ nở kéo dài trong khoảng thời gian là 3 tuần, điều kiện thời tiết xấu sẽ bị héo và rụng sớm và ngược lại nếu trong điều kiện khí hậu thời tiết mát mẻ thì thời gian hoa nở kéo dài hơn [92], [125].

- Mùi hương: hoa lan Giả hạc luôn có mùi hương, dịu nhẹ, thơm ngát, thoang thoảng trong khắp không khí [92].

- Thời điểm ra hoa: hoa thường nở rộ vào thời điểm cuối xuân - đầu hè, khoảng thời gian tháng 3 – tháng 6 hàng năm, hoa nở khoảng 2 – 3 tuần là bắt đầu tàn [125].

- Quả và hạt lan: Sự tạo quả của hoa lan nói chung và lan Giả hạc nói riêng trong tự nhiên rất khó do cấu tạo đặc biệt của hoa và thường phải nhờ côn trùng thụ phấn. Quả lan thuộc loại quả nang, quả có dạng thuôn dài đến hình trụ ngắn phình ở giữa. Khi chín quả nở ra theo 3 đến 6 đường nứt dọc, mảnh vỏ còn dính lại với nhau ở phía đỉnh và phía gốc. Ở một số loài, khi chín quả không nứt ra nên hạt chỉ ra khỏi quả khi quả bị mục nát. Bên trong chứa rất nhiều hạt, nhỏ li ti, phải trải qua 2 – 18 tháng hạt mới chín khi chín hạt có màu vàng. Hạt cấu tạo bởi một khối chưa phân hóa, không có nội nhủ, trên một mạng lưới nhỏ xốp chứa đầy không khí**,** khối lượng hạt rất nhỏ (chỉ vài microgam (µg)), rất nhẹ dễ phát tán nhờ gió. Thông thường, cần có nấm cộng sinh hỗ trợ tạo các chất cần thiết để hạt lan nảy mầm, đặc biệt ở đầu các giai đoạn phát triển [43].

- Rễ : rễ lan Giả hạc nhỏ có đường kính 1 - 1,5 mm, bám dính, có hình trụ có nhánh từ bậc 1 bậc 2 cho đến bậc 3 hoặc không phân nhánh và thường rất dài, có màu xanh nhạt, trắng hoặc xanh - trắng. Khác với những loài đơn thân rễ mọc thẳng đứng từ thân và thường xen kẽ với lá thì rễ của lan Giả hạc chủ yếu mọc từ gốc giả hành [92].

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

Số lượng nhiễm sắc thể đầu tiên của loài *Dendrobium* đã được Hoffman ghi lại vào năm 1929, số lượng nhiễm sắc thể của loài này có thể giao động từ 2n=38 đến 2n=114. Có

sự khác biệt về kích thước nhiễm sắc thể ở các loài khác nhau, hầu hết các loài thuộc *Dendrobium* đều có nhiễm sắc thể nhỏ (1- 3 μm), nhưng một số loài như *D. macrophyllum, D. spectabile* và *D. anosmum* (*superbum*) có nhiễm sắc thể lớn gấp 3 đến 4 lần so với các loài khác kích thước từ 1,88 – 2,51 μm . Số lượng nhiễm sắc thể của loài *D. anosmum* (*superbum*) là 2n = 38, kích thước lớn đạt 2,51 ± 0,11 μm [194]. Mặc dù một số loài biểu hiện sự khác biệt đáng kể về kích thước nhiễm sắc thể trung bình, nhưng không thể phân biệt hay nhận dạng loài bằng thông số này [194]. *D. anosmum* là một trong những bộ nhiễm sắc thể bổ sung lớn nhất trong chi trong khi *D. linguella* có bộ nhiễm sắc thể nhỏ nhất.

Ở một số khu vực địa lý khác nhau thì số lượng NST của các loài *Dendrobium* đặc trưng của vùng đó là khác nhau, phần lớn số NST ở các loài là 2n = 38 như ở loài *D. nobile* và *D. moniliforme* [85]. Một số ít loài có 2n = 40, 2n = 36 hoặc 2n = 76 hay 80. Ở loài *D. kingianum* có các mức bội thể như 2n = 38, 3n=57, 4n = 76 và 6n = 114 [104].

Hình 1.2. Nhiễm sắc thể của *Dendrobium anosmum* [193]; A. bộ NST tế bào soma (1800X); B. Phân tích Karyotypes bộ NST.

1.2.5. Giá trị của lan Giả hạc

1.2.5.1. Giá trị kinh tế của lan Giả hạc

Lan Giả hạc là giống lan phổ biến được nhiều người ưa chuộng nhờ vào vẻ đẹp ấn tượng cùng hương thơm quyến rũ. Hoa có màu sắc rất đa dạng, tinh tế, mỗi màu sắc lại mang một đặc điểm hình thái khác nhau, và hoa có độ bền lâu. Vì vậy mà nó là loài hoa đầu tiên được đưa về trồng tại Hawai vào đầu những năm 1986 từ Philippines [104]. Mùi hương của lan Giả hạc rất đặc trưng và quyến rũ, hầu hết các nhà sưu tầm lan đều có giống

lan này, việc chiêm ngưỡng vẻ đẹp và tận hưởng mùi thơm của hoa lan làm cho tâm hồn con người như được giao hòa cùng thiên nhiên.

Lan giả hạc có giá trị kinh tế cao, từ năm 1945, loài hoa này đã được sử dụng để kinh doanh hoa cắt cành và cây cảnh ở Hawai [104]. Hiện nay, thì loài hoa này càng ngày càng có giá trị ở các nước trên thế giới như Úc, Mỹ, Thái Lan, Hà Lan, Pilippines, Hawai,… Cụ thể giá trị hoa Lan xuất khẩu trên thế giới tăng mạnh từ hơn 193 triệu USD năm 2016 đến khoảng hơn 217 triệu USD năm 2018. Đứng đầu trong ngành xuất khẩu hoa lan là Thái Lan, sau đó là Hà Lan, còn Việt Nam hiện đang đứng vị trí rất khiêm tốn trong thị trường xuất khẩu lan thế giới [199]. Kim ngạch xuất khẩu của mặt hàng hoa lan Việt Nam đạt 4 triệu USD trong năm 2018, chủ yếu sang các thị trường Nhật Bản (72,5%) và Mỹ (11,3%). Nếu so với thị phần của các quốc gia khác, thì mặt hàng hoa lan xuất khẩu của Việt Nam chiếm tỉ trọng rất nhỏ[40].

Việt Nam rất có lợi thế về các giống lan rừng quý hiếm, đa dạng về chủng loại nhưng việc khai thác và phát triển nguồn tài nguyên này hiện nay chưa tương xứng với tiềm năng [32]. Hiện nay ở Việt Nam, các mô hình, các nông trường và cơ sở phát triển lan giống số lượng nhiều, chất lượng cao chỉ tập trung ở một số địa phương như Đà Lạt, Thành Phố Hồ Chí Minh, Hà Nội còn những địa phương khác chưa thực sự khai thác được hết tiềm năng. Điều này do chủ yếu các cơ sở cung cấp giống lan đều tạo ra cây giống bằng phương pháp truyền thống, dẫn đến số lượng giống tạo ra không nhiều, không đồng đều về chất lượng để có thể đáp ứng nhu cầu trong nước và xuất khẩu [46].

Những năm gần gân đây, các địa phương cũng đã chú trọng đẩy mạnh phát triển nghề trồng hoa cây cảnh, đặc biệt là tập trung vào những loại hoa mang lại hiệu quả kinh tế cao trong đó có hoa lan. Theo Sở Nông nghiệp và phát triển nông thôn thành phố Hồ Chí minh năm 2022, Thành phố đã xuất khẩu được 200.000 cây kim ngân, lan *Mokara*, *Dendrobium* với kim ngạch xuất khẩu 500.000 đô la Mỹ. Thị trường xuất khẩu chủ yếu Campuchia, Mỹ, Nhật Bản, Hà Lan, Canada. Hiện toàn Thành phố đang có 2.325 ha trồng hoa, cây cảnh, trong đó, có 370 ha trồng hoa lan, chiếm gần 16% và mỗi héc-ta mang về cho nông dân mỗi năm từ 800 triệu đến 1 tỉ đồng [14]. Tỉnh Thừa Thiên Huế cũng có những

chính sách tập trung phát triển nghề trồng hoa cây cảnh, trong đó có hoa lan. Đặc biệt các mô hình nông nghiệp đô thị, các mô hình này vừa đem lại kinh tế cho nhà vườn vừa tạo cảnh quan đẹp cho Thành phố. Năm 2018, UBND tỉnh Thừa Thiên Huế (cũ) đã phê duyệt dự án xây dựng mô hình sản xuất một số loài hoa lan bản địa giá trị cao tại tỉnh Thừa Thiên Huế (cũ), trong dự án có lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) [34].

1.2.5.2. Giá trị dược liệu của lan Giả hạc

Nhiều loài *Dendrobium* ngoài tác dụng trang trí cho không gian sống còn có giá trị chữa bệnh. *D. officinale* Kimura & Migo là cây thuốc quý được dùng hỗ trợ điều trị các bệnh lao, sốt, đau họng, đau lưng, đau dạ dày, viêm ruột,…[73]; *D. anosmum* Lindl. và *D. nobile* Lindl.. được dùng để chữa suy nhược cơ thể, căng thẳng, đau họng và suy nhược sinh lý ở nam giới [27].

Các loài có tầm quan trọng về mặt y học bao gồm *D. nobile, D. chrysanthum, D. officinale, D. loddigessi, D. fimbriatum var. oculatum, D. moniliforme,* và *D. candidum.* Chúng đã được sử dụng như các phương thuốc dân gian truyền thống để điều trị các bệnh khác nhau, chẳng hạn như viêm dạ dày teo mãn tính, tiểu đường và bệnh tim mạch. Các nghiên cứu hóa thực vật trước đây về các loài *Dendrobium* đã dẫn đến việc phân lập đa dạng các loại hợp chất, chẳng hạn như các alkaloid, bibenzyls, phenanthren, fluorenones, sesquiterpenoid, lignan, flavonoid, và polysaccharid. Các hợp chất này đã được báo cáo là có tác dụng bảo vệ thần kinh, chống ung thư, chất chống oxy hóa, chống viêm và các hoạt động điều hòa miễn dịch. Đặc biệt, đã có nhiều báo cáo về cơ chế hoạt động chống ung thư của chúng, bao gồm cả quá trình tự hủy và di chuyển tế bào [143].

D. anosmum Lindl. được nghiên cứu chiết xuất etanolic, glucose để điều trị giảm đường huyết, cung cấp phương pháp điều trị hoặc thuốc thay thế cho bệnh nhân đái tháo đường [82], ngoài ra còn có 4 hợp chất khác đã được tách chiết từ lan này là alkaloid, flavonoid, tannin, và phenol [157]. Các thử nghiệm sàng lọc hóa chất thực vật và hoạt động chống oxy hóa đã được thực hiện để xác định loại hợp chất và hoạt động chiết xuất là chất chống oxy hóa trên lan *D. anosmum* var. gigantea. Môi trường dinh dưỡng có bổ sung hormone tăng trưởng NAA, BA

được nuôi huyền phù. Sàng lọc thực vật được thực hiện bằng phương pháp thử nghiệm tại chỗ. Hoạt tính chống oxy hóa đã được thử nghiệm bằng phương pháp DPPH [157].

1.2.6. Lan Giả hạc tím Huế

Mỗi địa phương có những dòng Giả hạc đặc trưng, như Giả hạc Thái Nguyên [48], Giả hạc Hoà Bình [146], Giả hạc Phú Thọ [110], Giả hạc Quảng Trị [47], Giả hạc Di Linh [7], nhưng dòng lan Giả hạc đặc trưng của Huế hầu như không được để cập và ít tài liệu tham khảo, dựa trên tìm hiểu thì nhóm nghiên cứu đã tìm được Giả hạc tím Huế với những đặc điểm đặc trưng như thân, lá to, xanh mướt xen kẻ những sọc tím, hoa to, cánh sáp, màu tím đặc trưng của Huế, có viền trên cánh hoa, mùi thơm dịu nhẹ hơi giống mùi oải hương. Mặt hoa Giả hạc tím Huế là một trong những mặt hoa giả hạc đẹp, cân đối, độ bền lâu trong điều kiện nắng ráo (7-10 ngày), được nhiều người yêu thích và sưu tầm. Nguồn gốc của lan Giả hạc tím Huế là một dòng của lan Giả hạc *(D. anosmum* Lindl.*)* được phân bố khu vực thành phố Huế, trong nghiên cứu này chúng tôi đã khảo sát ở một số nhà vườn như vườn lan Thiên An (Thuỷ Bằng, Xuân Thuỷ), vườn lan Lộc Hồng (08 Đoàn Hữu Trưng, Phước Vĩnh), vườn Lan Đô Nguyễn (18 Thạch Hãn, Thuận Hoà) có nuôi trồng dòng lan Giả hạc này. Đã từ lâu lan Giả hạc tím Huế được người chơi lan đưa từ rừng về thuần dưỡng ở điều kiện nhân tạo và đã thích nghi, phát triển tốt với điều kiện khí hậu, thời tiết của thành phố Huế .

Hình 1.3. Hoa lan Giả hạc tím Huế *(D. anosmum* Lindl.*)* (*Nguyễn Hữu Thọ (2021), hình được chụp trong quá trình nghiên cứu).*

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

2.1. Nhân giống truyền thống

Nhân giống thuyền thống có thể thực hiện bằng hình thức nhân giống sinh dưỡng hoặc gieo hạt. Nhân giống sinh dưỡng là hình thức nhân giống vô tính xảy ra ở thực vật trong đó một cây mới được tạo ra từ một phần của cây bố mẹ hoặc phát triển từ một cấu trúc sinh sản chuyên biệt. Đối với lan nhân giống bằng phương pháp này có thể thực hiện bằng cách tách bụi [142] các cây lan sau khi đã phát triển thành những bụi lan lớn sẽ được tách chiết ra trồng để hình thành những bụi lan mới, hoặc bằng thân giả, tức là sử dụng thân giả khoẻ mạnh, không sâu bệnh được cắt thành những đoạn ngắn có chứa những mầm ngủ (kie), hoặc tách nhánh, ở một số loài lan thường có hiện tượng tạo cây con trên giả hành một cách tự nhiên, khi cây con này có rễ là có thể tách ra khỏi giả hành để trồng [142]. Ưu điểm của phương pháp nhân giống sinh dưỡng là cây con được tạo ra là giống hoàn toàn cây mẹ. Phương pháp này cho phép thực vật tránh được quá trình hình thành các cơ quan sinh sản hữu tính tốn năng lượng và phức tạp như ra hoa, quả và hạt, nhân giống sinh dưỡng giúp cây con đạt đến giai đoạn trưởng thành nhanh hơn. Trong tự nhiên, điều đó làm tăng cơ hội để cây phát triển thành công và về mặt thương mại nó giúp tiết kiệm rất nhiều thời gian và tiền bạc vì giảm thời gian canh tác [54]. Thực hiện phương pháp này không đòi hỏi kỹ thuật cao, dễ thực hiện, tiết kiệm chi phí và thời gian. Nhược điểm lớn của nhân giống sinh dưỡng là hệ số nhân giống thấp, phương pháp làm hạn chế đa dạng di truyền của loài có thể dẫn đến giảm năng suất và dần bị thoái hoá giống. Các cá thể nhân giống sinh dưỡng có bộ gen đồng nhất, nên toàn bộ quần thể đều dễ mẫn cảm với sự xâm nhiễm của virus, vi khuẩn và nấm gây bệnh, đặc biệt khi cây giống ban đầu có mang mầm bệnh [54].

Hình thức nhân giống bằng gieo hạt: Trong thực tế hoa lan ít khi nhân giống hữu tính, vì hạt lan rất nhỏ, không có nội nhũ, kỹ thuật gieo ươm phức tạp, cần có nấm cộng sinh hạt mới nẩy mầm, do đó tỷ lệ nảy mầm thấp và tính phân ly lớn khi trồng bằng hạt, khó duy trì được đặc tính tốt của cây mẹ. Nhưng cũng chính vì mang tính di truyền phức tạp, phân ly lớn nên là cơ hội tốt cho các nhà tạo giống và đông đảo người trồng hoa lan tuyển chọn được những giống lan quý. Vì vậy nhân giống bằng hạt cũng là một trong những

khâu quan trọng trong tạo giống lan [167]. Có hai cách nhân giống lan bằng hạt là gieo hạt trực tiếp lên giá thể trồng hoặc gieo hạt trong môi trường *in-vitro*. Ưu điểm của phương pháp nhân giống bằng hạt là tiết kiệm chi phí, đa dạng hóa giống cây trồng, và tăng khả năng chịu đựng của cây trồng, tạo ưu thế lại, nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng. Nhân giống bằng hạt tạo ra cây con nhanh, cây đồng loạt, cùng kích cỡ, cùng độ tuổi, kỹ thuật đơn giản, cây con thích nghi tốt, bộ rễ khoẻ, tuổi thọ cao. Tuy nhiên, phương pháp có một số nhược điểm là cây con tạo ra dễ thoái hoá giống và chất lượng giống cây không đồng đều vì hiện tượng phân tính. Cây giống từ hạt có thời gian phát triển lâu cho sản phẩm chậm hơn và khó khiểm soát được chất lượng so với các phương pháp khác [167].

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

Nhân giống *in-vitro* là phương pháp nhân giống vô tính tiên tiến nhất hiện nay. Bộ phận để nhân giống có thể là ngọn cây, ngọn cành, nhánh, lá, hoa, rễ cây, cũng có thể là hạt. Cây giống *in-vitro* có đặc điểm sạch bệnh, cây sinh trưởng và phát triển tốt, độ đồng đều cao. Phương pháp có hệ số nhân giống cao so với các phương pháp khác [62]. Phương pháp nhân giống *in-vitro* có các yếu tố ảnh hưởng như:

a. Vật liệu nuôi cấy

Việc lựa chọn vật liệu nuôi cấy quyết định đến sự thành bại của quá trình nhân giống *in-vitro*. Về nguyên tắc mọi tế bào của các mô chuyên hoá đều có tính toàn năng, nghĩa là đều có thể nuôi cấy thành công. Thực tế cho thấy các loại tế bào và mô khác nhau có mức độ nuôi cấy thành công khác nhau. Tế bào non (như mô phân sinh, đỉnh sinh trưởng) có khả năng phân chia mạnh, chưa phân hóa chuyên sâu, và mang tính toàn năng cao, giúp quá trình phản phân hóa thành mô sẹo (callus) và tái sinh cơ quan dễ dàng hơn, nâng cao tỷ lệ thành công, đồng thời tế bào non thường sạch bệnh. Như vậy, tế bào và mô phôi non là triển vọng nhất, rồi đến các tế bào của đỉnh sinh trưởng như: mô phân sinh đỉnh ngọn, đầu rễ, lá non, tượng tầng,... sau đó là các tế bào sinh dục như noãn bào và tế bào hạt phấn ở giai đoạn non [62].

Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím đã được thực hiện thành công trên vật liệu là hạt. Hạt lan được gieo trên môi trường dinh dưỡng để phát triển thành các protocorm từ đó

thực hiện những giai đoạn nhân giống *in-vitro* tiếp theo. Trong nghiên cứu của Đặng Thị Thu Hà và Phạm Thu Hà (2020) thực hiện trên hạt lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl) [13], nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) nhân giống lan Giả hạc tím đột biến cũng được thực hiện bằng hạt [47]. Ngoài ra lan Giả hạc tím còn được nhân giống *in-vitro* thành công bằng chồi ngủ của thân như nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021) [110].

b. Điều kiện vô trùng

Đây là điều kiện cơ bản đầu tiên của quá trình nuôi cấy *in-vitro.* Nếu điều kiện này không được đảm bảo thì mẫu nuôi cấy hoặc môi trường sẽ bị nhiễm, mô nuôi cấy bị chết, các thí nghiệm ở giai đoạn sau sẽ bị ngừng lại. Do đó, trong toàn bộ quá trình nuôi cấy *in-vitro* cần đảm bảo điều kiện vô trùng tuyệt đối. Để đảm bảo điều kiện vô trùng cần có phương pháp khử trùng mẫu thích hợp, phương tiện khử trùng hiện đại, buồng và bàn nuôi cấy vô trùng. Chọn đúng phương pháp khử trùng sẽ cho tỷ lệ sống cao, môi trường dinh dưỡng thích hợp sẽ đạt tốc độ sinh trưởng nhanh [62].

Một số loại chất khử trùng đã được sử dụng hiệu quả để khử trùng mẫu là quả lan hoặc đoạn thân lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl) như cồn 96º và đốt trên ngọn lửa đèn cồn [13]; $HgCl_2$ 0,1% [44]; NaClO 2% [77]; H_2O_2 3% [180].

c. Môi trường nuôi cấy

Mỗi loại cây có hình thái và yêu cầu dinh dưỡng riêng. Hơn nữa, nhu cầu dinh dưỡng cho các mô trong mỗi bộ phận của cây là khác nhau [182]. Tìm ra môi trường nuôi cấy mô thực vật thích hợp cho từng đối tượng cây trồng là một thách thức trong giai đoạn đầu, vì một môi trường thích hợp là môi trường mô phỏng được nguồn dinh dưỡng sẵn có từ tự nhiên, điều này sẽ giúp cho cây phát triển tốt [182]. Các thành phần cơ bản bao gồm nguyên tố đa lượng (N, P, K, S, Mg, Ca,...) [166], nguyên tố vi lượng (Fe, Cu, Bo, Zn, Mn, Co, I,...) [166], nguồn carbon (các loại đường khoảng 20-30 mg/L) [62], chất hữu cơ bổ sung (chủ yếu là vitamin, nước dừa, khoai tây, chuối…) [166], chất điều hòa sinh trưởng như auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic, ethylene và các chất làm đông đặc (thường dùng agar) [166]. Các thành phần cơ bản phải được kết hợp ở một nồng độ cố định [182].

Trong nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím (*D. anosmum* Lindl) môi trường dinh dưỡng được dùng phổ biến nhất là môi trường MS có bổ sung thêm một số chất hữu cơ như đường, nước dừa, khoai tây, chuối và agar như trong các nghiên cứu của Đặng Thị Thu Hà và Phạm Thu Hà (2020) [13], nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) [47], nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021) [110].

d. Các chất điều hoà sinh trưởng

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật hay phytohormon (hormon thực vật) là các phân tử tín hiệu có bản chất hoá học khác nhau, tồn tại ở hàm lượng rất nhỏ (nồng độ µg, ng), được hình thành tại một nơi nhưng gây hiệu ứng sinh học mạnh tại một nơi (mô, cơ quan) khác cách xa nguồn, do đó nó phải di chuyển. Trong cơ thể thực vật, hormone điều hoà và phối hợp quá trình trao đổi chất, sinh trưởng và phát sinh hình thái thường phụ thuộc vào các tín hiệu hóa học từ một phần này đến một phần khác của cơ thể. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật rất quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật vì chúng đóng vai trò quan trọng trong việc kéo dài thân, tính hướng và ưu thế ngọn. Chúng thường được phân loại thành các nhóm sau: auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic và ethylen [166]. Tỉ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái trong các hệ thống nuôi cấy. Đối với sự tạo phôi, để tạo callus và rễ trần có tỉ lệ auxin/cytokinin cao, trong khi ở trường hợp ngược lại sẽ dẫn đến sự sinh sản chồi và chồi nách [86].

Trong nhân giống *in-vitro* các giống lan thuộc chi *Dendrobium* sử dụng rất nhiều loại chất điều hoà sinh trưởng như BA, NAA, IAA, DTZ, Kn… đều mang lại hiệu quả tốt. Trong nghiên cứu của Lê Thị Luận và cộng sự (2020) về nhân giống *in-vitro* cây lan Giả hạc Hawaii (*D. adastra*) đã sử dụng môi trường có bổ sung thêm BA hoặc Kn giai đoạn gieo hạt và nhân chồi, ở giai đoạn ra rễ môi trường được bổ sung NAA hoặc IBA [118]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2021) nhân giống *in-vitro* cây lan *D. anosmum* Lindl đã sử dụng môi trường dinh dưỡng có bổ sung BA và NAA giai đoạn gieo hạt và nhân chồi [11]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Thị Hải Yến và Nguyễn Thu Hường (2021) nhân giống *in-vitro* lan *D. anosmum* Lindl cũng đã bổ sung BA, NAA vào

môi trường dinh dưỡng giai đoạn gieo hạt, giai đoạn nhân chồi là bổ sung BA, và giai đoạn ra rễ là bổ sung NAA [48]. Trong nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) [47], nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021) [110] cũng đều sử dụng các chất điều hoà sinh trưởng BA, NAA, IBA để bổ sung vào môi trường dinh dưỡng dùng trong nuôi cấy *in-vitro* lan Giả hạc tím.

e. Điều kiện nuôi cấy in-vitro

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

+ Ánh sáng: là yếu tố cần thiết cho sự phát triển và phát sinh hình thái của các mô nuôi cấy. Ánh sáng có ảnh hưởng tới mẫu cấy thông qua thời gian chiếu sáng, cường độ và chất lượng ánh sáng, vì ánh sáng là một trong những tín hiệu chính được thực vật tiếp nhận bởi vì nó là nguồn năng lượng cho quá trình quang hợp và các quá trình sinh hóa như sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp [60]. Thời gian chiếu sáng thích hợp là 8 - 12 giờ/ngày. Cường độ ánh sáng ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái mô nuôi cấy. Cường độ ánh sáng cao kích thích sinh trưởng của mô sẹo trong khi cường độ thấp gây nên sự tạo chồi, cường độ thích hợp cho nuôi cấy mô là từ 1000 - 7000 lux [60]. Các nghiên cứu về thời gian chiếu sáng như của Lê Thiên Vinh (2022), đã sử dụng điều kiện chiếu sáng 8 giờ/ngày trong nhân giống *in-vitro* lan *D. anosmum* Lindl có hiệu quả rất tốt [47]. Sorgato và cộng sự (2020) cho thấy ảnh hưởng tốt của ánh sáng đến loài *D. nobile, D. phalaenopsis* sau 16 giờ chiếu sáng/ngày [178].

+ Nhiệt độ: là nhân tố có ảnh hưởng rõ rệt đến sự phân chia tế bào và các quá trình trao đổi chất của mô nuôi cấy, đồng thời nó có ảnh hưởng tới sự hoạt động của auxin, do đó làm ảnh hưởng đến khả năng ra rễ của cây mô [153]. Ở nhiệt độ trung bình thì hoạt động trao đổi chất tốt hơn, còn ở nhiệt độ cao lại khích thích ra nhiều tế bào không có tổ chức. Trong nuôi cấy mô, nhiệt độ thường được duy trì ổn định, ban ngày từ 25 - 30°C và ban đêm từ 17 – 20°C [153].

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

Ngoài ra, cần phải chú ý tới độ pH của môi trường vì nó ảnh hưởng khá rõ nét đến khả năng hoà tan các chất khoáng trong môi trường. Sự ổn định của môi trường, khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của cây. Nếu pH thấp (< 4,5) hoặc cao (> 7,0) đều gây ức chế sinh trưởng, phát triển của cây trong nuôi cấy *in-vitro* nên việc xác định được độ pH ban đầu của môi trường cho quá trình sinh trưởng và phát triển của mô cấy là cần thiết. Độ pH thường được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật nói chung từ 5,6 – 6 [87].

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

3.1. Ánh sáng

Lan Giả hạc thuộc nhóm cây ưa ẩm và ánh sáng tán xạ, vì vậy ánh sáng là yếu tố quan trọng đầu tiên cần được cân nhắc trong quá trình trồng và chăm sóc; ánh sáng khoảng từ 50-70% là phù hợp cho cây sinh trưởng, phát triển hiệu quả nhất. Thời kì sinh trưởng không nên để cây tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời dễ làm cháy lá non, cây chậm phát triển. Chỉ nên cho cây tiếp xúc với ánh nắng nhẹ khi chuẩn bị ra hoa là thích hợp nhất [104], [105].

3.2. Nhiệt độ

Lan Giả hạc chịu lạnh và nóng rất tốt. Cây có thể chịu được 38°C vào mùa nóng và 3,3°C vào mùa lạnh. Các loài lan Giả hạc tự nhiên đều có sức sống mãnh liệt. Cây có thể sống trên kẽ đá, trên cây đang sinh trưởng, cây đã mục khô, thảm thực vật đã mục nát. Mỗi khi gặp những điều kiện sống bất lợi như trong điều kiện khô hạn thì rễ cây sẽ mọc ra nhiều và vươn dài ra rất nhanh để đi tìm nguồn nước; hoặc cây sẽ mọc ra nhiều cây con trên những đốt thân, đốt cành hoa đã già sau mỗi mùa rụng lá hoặc sau khi ra hoa [104], [105].

3.3. Độ ẩm

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

3.4. Nước

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

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

3.5. Giá thể trồng

Có thể dùng xơ dừa, khúc gỗ, thân cây để trồng lan hay ghép vào dớn. Ngoài ra có thể trồng Giả hạc trong chậu nhựa, chậu đất nung, chậu gỗ, chậu dớn,… thoát nước tốt, tránh tình trạng ứ đọng nước trong chậu quá lâu làm thối cây. Chọn chậu kích thước nhỏ vì giả hạc thích sống chật chội [52].

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

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

Tóm lại trồng và chăm sóc lan Giả hạc phải luôn đảm bảo các điều kiện về nhiệt độ, ánh sáng, nước, độ ẩm để lan Giả hạc phát triển, đồng thời cũng cần đảm bảo các yêu cầu về dinh dưỡng, và phòng trừ sâu bệnh hại cho cây lan. Có thể dùng một số loại phân bón qua lá, phân chậm tan để bổ sung dinh dưỡng cho cây hoặc các loại chế phẩm vi sinh, phân vi sinh [52]. Đặc biệt chú ý đến công tác phòng trừ sâu bệnh hại như thối nhũn vào mùa mưa, sâu cắn lá,…

4. Vi sinh vật nội sinh thực vật

Vi sinh vật nội sinh thực vật (Endophytic bacteria) hiểu theo nghĩa đen là vi khuẩn cư trú bên trong cây. Sharma và cộng sự (2020) định nghĩa vi khuẩn nội sinh là những "vi

khuẩn cư trú trong mô thực vật sống mà không làm tổn hại đáng kể hoặc đạt được lợi ích khác ngoài việc đảm bảo cư trú" [171].

Vi khuẩn nội sinh thực vật hiện diện phổ biến trong hầu hết tất cả các loài thực vật, chúng sống tiềm ẩn hoặc tích cực xâm chiếm nội mô thực vật một cách cục bộ hoặc hệ thống. Vi khuẩn nội sinh bắt nguồn từ các cộng đồng vi khuẩn biểu sinh vùng rễ và lá, cũng như từ hạt hoặc các vật liệu nhân giống vô tính. Nhiều nghiên cứu cho rằng vùng rễ là nguồn vi khuẩn nội sinh chính, từ đó chúng xâm chiếm vào bên trong mô tế bào thực vật. Vì vậy, vi khuẩn nội sinh thường được phát hiện ở rễ với mật độ cao ngay từ những giai đoạn đầu của sự phát triển [119].

Rễ được xem là vị trí ưa thích nhất, từ đó vi khuẩn xâm nhập vào bên trong cơ thể thực vật. Sau khi xâm nhập được vào bên trong cây chủ, vi khuẩn nội sinh sẽ cư trú ở các ổ nội sinh (endophytic niche). Các ổ nội sinh sẽ bảo vệ vi khuẩn nội sinh khỏi các tác động xấu từ môi trường, đồng thời giúp chúng xâm chiếm và thiết lập bên trong tế bào, mô thực vật. Những vi khuẩn nội sinh thường xâm chiếm khoảng gian bào và được phân lập từ tất cả các bộ phận của cây như rễ, thân, lá, quả và kể cả hạt [107].

Vai trò của vi khuẩn nội sinh thực vật đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước. Cơ chế của những tác động có lợi của vi khuẩn nội sinh đối với cây chủ tương tự như của các vi khuẩn vùng rễ có khả năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật. Điều này là do hầu hết các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ nội mô các loài thực vật khỏe mạnh và có thể được xem như nội sinh không bắt buộc và có khả năng sống bên ngoài mô thực vật như những vi khuẩn vùng rễ [107].

Vi khuẩn nội sinh thực vật thúc đẩy sinh trưởng của cây chủ một cách trực tiếp thông qua tăng cường tổng hợp kích thích tố sinh trưởng thực vật auxin (IAA), tăng hàm lượng các chất khoáng, giúp cố định đạm sinh học, phân giải lân khó tan, hoặc gián tiếp thông qua tăng khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh, giảm sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây [181]. Ngoài ra, chúng còn có thể giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm [181]. Trong một số trường hợp chúng có thể đẩy mạnh tốc độ nẩy mầm của hạt, thúc đẩy sự hình thành cây con trong điều kiện bất lợi. Ngoài ra, vi khuẩn nội sinh còn có thể ngăn chặn

mầm bệnh phát triển bằng cách tổng hợp các chất nội sinh trung gian, qua đó tiếp tục tổng hợp các chất chuyển hóa và các hợp chất hữu cơ mới. Vi khuẩn nội sinh cũng có một số tác dụng có lợi khác như sản sinh siderophore, giúp phần nào thoả mãn nhu cầu về sắt của cây chủ, giúp cây phòng chống lây nhiễm các mầm bệnh [181]. Như vậy, có thể thấy rằng tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn nội sinh trong sản xuất nông nghệp bền vững là rất lớn.

Một số nghiên cứu đã gợi ý rằng vi sinh vật nội sinh phân lập từ lan có khả năng hỗ trợ thực vật phát triển hiệu quả do có khả năng phân giải lân, khả năng tổng hợp chất kích thích sinh trưởng và đặc biệt là khả năng kháng lại một số tác nhân gây bệnh [181]. Như vậy, vi sinh vật nội sinh trong lan có thể coi là một trong những đối tượng tiềm năng trong việc nuôi trồng lan an toàn, tuy nhiên hiện nay ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào tập trung vào hướng khai thác nguồn vi sinh vật nội sinh của lan, đặc biệt là định hướng sử dụng vi sinh vật nội sinh trong hỗ trợ sinh trưởng, phát triển của các dòng lan đột biến có giá trị kinh tế cao.

5. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến

5.1. Khái niệm

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

Mục đích của gây đột biến là làm thay đổi vật chất di truyền để tạo ra giống đột biến có phẩm chất và năng suất tốt. Các giống đột biến tạo ra có những thay đổi về hình thái, màu sắc, thân, lá, hoa; các tính trạng về giảm chiều cao, đột biến diệp lục tố, kháng sâu bệnh, tăng cường độ quang hợp và chín sớm, tạo ra những kiểu hình khác lạ và có lợi cho nhu cầu con người [133].

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

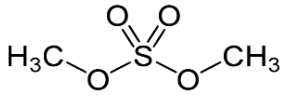
Cơ sở khoa học của việc tạo đột biến liên quan đến cơ chế sao chép DNA và cách thức các yếu tố môi trường có thể tương tác với DNA để gây ra thay đổi. Ở cấp độ tế bào các đột biến ảnh hưởng trực tiếp đến nhiễm sắc thể (NST) về cấu trúc hoặc số lượng, cơ sở

của những thay đổi này liên quan đến các bất thường trong quá trình nhân đôi, phân ly và tổ hợp của NST [6].

Các chất hoá học gây đột biến làm tổn hại trực tiếp hoặc gián tiếp đến vật chất di truyền của sinh vật. Các chất này có thể tác động trực tiếp lên DNA, gây tổn thương trực tiếp lên DNA và thường dẫn đến lỗi trong quá trình sao chép. Tuy nhiên, một số chất hoá học lại có thể tác động lên cơ chế sao chép và phân chia nhiễm sắc thể. Nhiều chất gây đột biến không tự chúng gây đột biến, nhưng có thể tạo thành các chất chuyển hóa gây đột biến thông qua các quá trình tế bào, ví dụ thông qua hoạt động của hệ thống cytochrome P450 và các oxygenase khác như cyclooxygenase [111].

Hiện nay, những hoá chất gây đột biến được sử dụng phổ biến để tạo ra những biến đổi trong vật chất di truyền như colchicine, acenaphthene, oryzalin, dimethyl sulphate (DMS), 2 Aminopurine (2-AP), ethylene imine (EI), diethyl sulfate (DES), ethyl nitrosourethane (ENU), ethyl methane sulfonate (EMS), methyl methane sulfonate (MMS), 5-bromodeoxyuridine (BrdU), axit nitrous , hydroxyl amin và natri azide [84]. Trong số đó colchicine là hoá chất được dùng phổ biến nhất trong tạo đột biến đa bội ở thực vật, nó mang lại hiệu quả đa bội cao, hòa tan trong nước, bền nhiệt, có thể hấp khử trùng và dễ dàng áp dụng cho các mô thực vật [84]. Đối với dimethyl sulphate (DMS) là một methyl hóa mạnh, có khả năng gây biến đổi trong cấu di truyền, gây ra đột biến điểm, DMS thường được sử dụng trong nghiên cứu đột biến gen để tìm hiểu chức năng của gen hoặc cải thiện các đặc tính sinh học, chẳng hạn như nâng cao hiệu quả sản xuất của cây trồng [97].

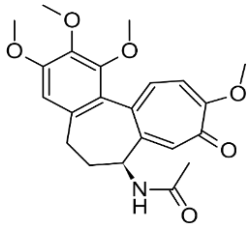
5.3. Gây đột biến bằng dimethyl sulphate ($C_2H_6O_4S$)



Dimethyl sulphate là di-este của metanol và acid sulfuric, chất lỏng dầu không màu, có mùi giống hành tây nhẹ. Thông qua cơ chế alkyl hóa DNA, đặc biệt là gắn nhóm methyl vào các bazơ nitơ, làm sai lệch quá trình sao chép và phiên mã, cụ thể DMS phản ứng với DNA thông qua phản ứng thay thế hai phân tử (S_N2), tạo thành một phức hợp chuyển tiếp với nucleophile mạnh, đặc biệt là nitrogen bazơ như vị trí N^7 của guanin và vị trí N^3 của adenin. Nó phản ứng ít với các trung tâm nucleophilic yếu hơn trong DNA, chẳng hạn như vị trí O^6 của guanin [97]. Do đó, N^7-

metylguanin và N^3 - methyladenine là các sản phẩm bổ sung DNA chính được hình thành khi dimethyl sulphate phản ứng với DNA trong ống nghiệm hoặc *in-vivo,* còn O^6 - methylguanine được hình thành ở mức rất thấp. Sự methyl hóa này làm thay đổi cấu trúc bazơ, dẫn đến sai cặp (mis-pairing) trong quá trình nhân đôi DNA, ví dụ như O^6-methylguanine có thể bắt cặp với thymine thay vì cytosine → gây đột biến chuyển đổi (transition mutation), dẫn đến đột biến chuyển tiếp GC → AT [174].

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



Colchicine là chất mà thường được sử dụng để gây ra đa bội trong thực vật và cho kết quả tốt nhất. Colchicine được áp dụng rất có hiệu quả đối với cả hai nhóm thực vật một và hai lá mầm. Về cơ bản, colchicine ngăn chặn sự hình thành vi ống trong quá trình phân chia tế bào, do đó các nhiễm sắc thể không tách ra như bình thường. Kết quả cuối cùng là một tế bào có số lượng nhiễm sắc thể gấp đôi bình thường. Nếu tế bào này phân chia một lần nữa trong tương lai, thì số lượng nhiễm sắc thể nhân đôi sẽ được truyền cho các tế bào con và tạo ra cây đa bội, có những cây đa bội không thể phát triển và sinh sản nhưng cũng có những cây đa bội có thể có lá và hoa lớn hơn cây lưỡng bội. Các bộ phận của cây thường được sử dụng làm vật liệu xử lý như: rễ, hoa, chồi nách, mô sẹo, protocorm,…[37].

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

Đa dạng di truyền là sự đa dạng về thành phần gen giữa các cá thể trong cùng một loài và giữa các loài khác nhau, là sự đa dạng về gen có thể di truyền trong một quần thể hoặc giữa các quần thể. Để đánh giá đa dạng di truyền có một số phương pháp như dựa vào chỉ thị hình thái, chỉ thị sinh lý-sinh hoá và quan trọng nhất là dựa vào các chỉ thị phân tử DNA như chỉ thị RFLP, AFLP, RAPD, SSR hay ISSR [67]. Ngoài ra một số trình tự gen như vùng *ITS*, vùng *rbc*L,vùng *trn*L, vùng *mat*K thường được sử dụng làm chỉ thị DNA trong nghiên cứu đa dạng di truyền, phân loại, nhận dạng loài và xây dựng "mã vạch DNA" cho thực vật. Đây là những vùng gen có đặc điểm tiến hóa phù hợp, giúp phân biệt các loài một cách chính xác và đáng tin cậy.

6.1. Phân tích đa dạng hình thái

Hình thái thực vật là hình dáng bên ngoài của thực vật. Nó được áp dụng cho bất kỳ loài nào và bao gồm các chi tiết về các đặc điểm sinh dưỡng và sinh sản để tạo thành một hệ thống thông tin của loại thực vật đó, có thể được sử dụng để so sánh chung các loài thực vật có cấu trúc tương tự hoặc so sánh chi tiết trong một loài để xác định giống (cây trồng) hoặc xác định loài thực vật [197]. Các đặc điểm hình thái được quan sát và sử dụng làm chỉ thị để phân loại hay nhận diện loài gồm có [78]:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Các dấu hiệu sinh lý là những đặc điểm thường liên quan đến phản ứng của thực vật với các yếu tố môi trường, nó có thể bao gồm các đặc điểm như khả năng chịu hạn, chịu mặn, hiệu quả quang hợp, trao đổi chất và hấp thu dinh dưỡng. Vì những đặc điểm này thường liên quan trực tiếp với khả năng tồn tại và khả năng sống sót của thực vật nên chúng cung cấp manh mối về cấu trúc di truyền của thực vật có thể chịu trách nhiệm cho những phản ứng này [131].

Tương tự, các dấu hiệu sinh hóa như protein và enzyme có thể cung cấp thông tin quan trọng về sự đa dạng di truyền của thực vật. Một số dấu hiệu này liên quan đến việc kiểm tra các protein hoặc enzyme cụ thể khác nhau giữa các cá nhân, thường là do đột biến gen. Phân tích isozyme là một kỹ thuật phổ biến được sử dụng để phân tích những khác biệt này ở mức độ protein. Các enzyme, được mã hóa trực tiếp bởi các gen, có thể biểu hiện các biến thể (allozyme) do sự khác biệt trong các gen cơ bản. Những allozyme này sau đó được sử dụng làm chất đánh dấu để đánh giá các biến thể và tính đa dạng di truyền [95].

Bằng cách xem xét cả các dấu hiệu sinh lý và sinh hóa, các nhà nghiên cứu có thể thu thập được sự hiểu biết toàn diện hơn về sự đa dạng di truyền của thực vật. Sự đa dạng này đóng một vai trò quan trọng trong sự tồn tại lâu dài và khả năng thích ứng của các loài thực vật, đặc biệt là trước sự thay đổi môi trường. Việc giải mã sự đa dạng này có thể giúp đưa ra các quyết định bảo tồn và nỗ lực nhân giống nhằm tạo ra các giống cây trồng có phẩm chất và năng suất cao [131].

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

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

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

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

RAPD là một phương pháp phân tích các chuỗi DNA đa hình là kết quả của sự khuếch đại ngẫu nhiên nhiều vị trí của khuôn mẫu DNA đích dựa trên nền tảng PCR. Kỹ thuật PCR là kỹ thuật nhân bản DNA trong ống nghiệm bằng cách sử dụng enzyme DNA polymerase chịu nhiệt, nó gồm ba giai đoạn: biến tính (tách mạch DNA), gắn mồi (annealing), và kéo dài (extension), dựa vào nguyên lý thay đổi nhiệt độ luân phiên ở các giai đoạn và kết quả cuối cùng tạo ra hàng triệu bản sao của đoạn DNA mục tiêu trong thời gian ngắn [26]. PCR-RAPD sử dụng các đoạn mồi đơn ngẫu nhiên có 8-10 nucleotide có tỷ lệ GC cao (60-80%) và nhiệt độ bắt cặp thấp (36-40ºC), kỹ thuật này thường tạo ra 3-20 sản phẩm khuếch đại cho mỗi mồi. Các vùng được khuếch đại bằng kỹ thuật này thường nằm rải rác trong genome, phần lớn chúng là các trình tự nucleotide lặp lại [26], [56].

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

RAPD sử dụng cho nhiều mục đích, từ các nghiên cứu ở cấp độ cá thể như nhận dạng di truyền đến các nghiên cứu liên quan đến các loài có quan hệ họ hàng gần như đa dạng di

truyền. RAPD cũng đã được áp dụng trong các nghiên cứu lập bản đồ gen, di truyền quần thể, di truyền tiến hóa phân tử và nhân giống cây trồng và vật nuôi [26].

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

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

RAPD là kỹ thuật nhạy với những thay đổi nhỏ trong hệ gen, chỉ cần một nucleotide thay đổi tại vị trí bắt cặp cũng có thể tạo ra sự xuất hiện/mất band [26], [56]. Với mục tiêu của đề tài là phát hiện sự khác biệt di truyền giữa các dòng đột biến thực nghiệm, đặc biệt là biến dị nhỏ trong hệ gen, phương pháp RAPD là phù hợp và được nhiều nghiên cứu trên *Dendrobium* sử dụng [59], [102].

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

7.1. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô

Ngoài nước

Trên thế giới, hoa lan được giới nhà khoa học quan tâm từ rất sớm bắt đầu từ trong thế chiến thứ II. Lan Giả hạc được thử nghiệm nhân giống bằng phương pháp gieo hạt *in-vitro* bởi các nhà khoa học đến từ trường đại học Haiwai từ năm 1972 -1978. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô nhanh hơn, dễ hơn, và rẻ hơn so với phương pháp nhân giống tự nhiên [104].

Một nghiên cứu khác về môi trường nuôi cấy, tác giả thử nghiệm nuôi cấy hạt lan Giả hạc trên bốn môi trường khác nhau bao gồm Hyponex, Murashige và Skoog (MS), OKF1 và Knudson C (KC). Kết quả cho thấy là hạt nảy mầm tốt nhất trên môi trường nuôi cấy MS với thời gian nảy mầm là 50 ngày, trong khi trên những môi trường khác là dài hơn với 59 ngày. Cây con trên môi trường MS cũng sinh trưởng và phát triển về thân, lá, rễ tốt hơn các môi trường khác [51].

Sự nảy mầm của hạt lan *D. antentum* trong ống nghiệm xuất hiện tốt trên môi trường Growmore 10 - 55 - 10 bổ sung 10% nước dừa (GCw) và môi trường Growmore 10-55-10 bổ sung 50 g/L chiết xuất hành lá [149]. Trong nghiên cứu của Bhowmik & Rahman (2020), sự nảy mầm của hạt *in-vitro* và sự phát triển của cây con *D. transparens* Wall ex Lindl. đã được đánh giá trên môi trường thạch KC; MS; PM và MVW có ba nguồn carbohydrate khác nhau: sucrose, glucose và lactose. Môi trường PM được chứng minh là tốt nhất cho sự nảy mầm sớm và hình thành PLB, sau đó là môi trường MS [63]. Việc nhân giống đại trà có thể được tiến hành thông qua các phương pháp công nghệ sinh học sử dụng kỹ thuật *in-vitro* thông thường với việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đã nhân giống thành công với lan *D. lineale* (Rolfe.) and *Vanda tricolor* (Lindl.) [170].

Nhiều giống lan thuộc *Dendrobium* có nguy cơ tuyệt chủng đã được nghiên cứu và nhân giống thành công nhờ phương pháp nuôi cấy mô. Maharjan và cộng sự (2020), đã nhân giống *in-vitro* thành công loài lan *D. chryseum* Rolfe có nguy cơ tuyệt chủng từ protocorms trên môi trường ½ Ms có bổ sung một số kích thích sinh trưởng Kn, BA, GA3, IAA, IBA, và NAA ở các nồng độ 0,5 – 2 mg/L vào giai đoạn khác nhau [127]. Tối ưu hóa được quy trình nhân giống *in-vitro* cây *D. heterocarpum* Wall. ex. Lindl. và đánh giá độ chính xác di truyền dòng vô tính của các cây tái sinh: Một số loài lan có tầm quan trọng trong dược liệu đang có nguy cơ mất đi. Môi trường dinh dưỡng phù hợp nhân giống là MS có bổ sung kích thích sinh trưởng Kn, NAA, tỷ lệ này mầm đạt 95%, khả năng tái sinh chồi cao 18 chồi/mẫu, tỷ lệ sống của cây con khi trồng trên giá thể hỗn hợp xơ dừa: giăm gỗ (1:1 w/w) đạt 87% [124]. Lan *D. lineale* được đưa vào phụ lục II CITES do *D. lineale* có tiềm năng lớn làm hoa cắt cành và là cây đầu dòng của các loài lan lai. Nuôi cấy *in-vitro* được

sử dụng để nhân giống lan này hàng loạt nhằm mục đích nhân giống thương mại cũng như bảo tồn. Môi trường nuôi cấy bổ sung các chất hữu cơ có thể làm tăng sự phát triển của cây con kết quả cho thấy khả năng ra rễ đạt 3 rễ/chồi, dài 3,96 mm/rễ, chiều dài của lá đạt 10,58 mm và có hàm lượng diệp lục đạt 1,58 mg/g [140].

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật luôn ảnh hưởng rất lớn đến các quá trính nhân giống *in-vitro*. Việc tìm ra loại PGR và liều lượng dùng cho mỗi giai đoạn vi nhân giống để phù hợp từng loại cây luôn là những vấn đề được các nhà khoa học nghiên cứu. Harahap và cộng sự (2020) đã nghiên cứu tác động của PGR trong các giai đoạn nhân giống *in-vitro* của lan thuộc chi *Dendrobium* nhận thấy môi trường bổ sung BA (0, 1, 2, 3 mg/L) và nước dừa (0%, 5%, 10%) là phù hợp với cây lan thuộc chi *Dendrobium*. Bổ sung chất hữu cơ như nước dừa, khoai tây, chuối,… vào môi trường nuôi cấy cũng rất hiệu quả cho sự phát triển của lan *D. anosmum* Lindl. [89].

Ngoài các nghiên cứu với mục đích nhân giống thì có nhiều nghiên cứu về giá thể phù hợp để trồng những loại lan này ở vườn ươm. Những giá thể thường được sử dụng là vỏ dừa, xơ dừa, gạch vụn, than củi, trấu hun, bản dớn, vỏ thông, bản gỗ,… Trong nghiên cứu của Lakshanthi & Seran (2019) đã ghi nhận về tỷ lệ sống, chiều dài chồi, số lá/cây, chiều rộng lá, số rễ/cây, chiều dài rễ dài nhất sau khi cấy sang điều kiện *ex-vitro* tốt nhất ở nghiệm thức trồng trên vỏ dừa: gạch vụn: than củi: đá dăm theo tỷ lệ 1:1:1:1 cho tỷ lệ sống hơn 90% ở 4 tuần sau khi cấy sang điều kiện *ex-vitro* [117].

Những nghiên cứu trên thế giới từ trước đến nay đối với các giống lan vẫn tập trung chủ yếu về di truyền, nhân giống để bảo tồn những loại lan có nguy cơ mất đi, hay những loài lan có giá trị cao về dược liệu, kinh tế. Còn ít nghiên cứu về các yếu tố tác động đến sinh trưởng phát triển ở các giai đoạn của cây khi trồng ngoài vườn hoặc khi đưa vào môi trường tự nhiên để trồng bảo tồn. Thời gian các nghiên cứu chưa đủ dài để theo dõi hết chu kỳ sinh trưởng của lan. Ngoài ra các nghiên cứu cũng chưa đánh giá đúng thực chất các giá trị mà cây lan mang lại đặc biệt là các dòng lan đột biến, các giống lai tạo. Phân bố của các nghiên cứu về lan cũng chưa đồng đều chủ yếu tập trung ở Mỹ, Trung Quốc, Úc, Anh, Brazil [196].

Trong nước

Hiện nay, hầu hết các loại lan Giả hạc rừng của Việt Nam đã bị khai thác cạn kiệt nên để duy trì và phát triển những giống lan này đã đặt ra yêu cầu phải tìm ra những phương pháp nhân giống nhanh, hiệu quả. Để đáp ứng nhu cầu này đã có nhiều nghiên cứu nhân giống trong phòng thí nghiệm bằng phương pháp nuôi cấy *in-vitro* về các loại lan tại Việt Nam được thực hiện [18]. Nhóm nghiên cứu Phan Văn Hoài Luân và cộng sự (2024), đã nhân giống *in-vitro* thành công lan Giả hạc trên môi trường MS có bổ sung hormone thực vật IBA và BA [28].

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Diễm và cộng sự (2021) đã đưa ra một số biện pháp kỹ thuật trồng và chăm sóc cây lan Giả hạc Di Linh (*D. anosmum* DL.) từ cây con *in-vitro*. Qua nghiên cứu này cho thấy, giá thể phù hợp nhất cho cây con Giả hạc Di Linh gieo hạt *in-vitro* ra bầu ươm là giá thể xơ dừa và trấu hun (tỷ lệ 1:1), cây con có tỉ lệ sống 100%, với số lá mới đạt 43,33%. Nhóm phân bón hoá học và nhóm phân bón hữu cơ là hai nhóm phân hiệu quả cho cây ra bầu ươm [7]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Thị Hải và cộng sự (2022) đã nhân giống *in-vitro* thành công lan từ hạt *D. anosmum* Lindl ở Hoà Bình trên môi trường MS có bổ sung kích thích sinh trưởng Kn, NAA, BA; Môi trường MS + 1,0 mg/L Kn + 0,5 mg/L NAA + 30 g sucrose + 8,0 g agar mỗi lít, pH 5,7–5,8 là môi trường tối ưu để tăng chiều dài chồi. Môi trường MS + 1,0 g than hoạt tính + 30 g sucrose + 8,0 g agar/L, pH 5,7–5,8 là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của chồi sau 6 tuần nuôi cấy, chiều dài chồi trung bình là 1,09 cm, số lượng trung bình của chồi là 1,09 cm, số lá là 6,13, số rễ trung bình là 3,17 và chiều dài rễ trung bình là 1,11 cm, cao hơn lần lượt khoảng 3,3, 4,17, 3,41 và 1,67 lần so với đối chứng (không có than hoạt tính) [146]. Một số dòng đột biến của *D. anosmum* cũng được nghiên cứu và nhân giống thành công bằng phương pháp nhân giống *in-vitro,* như Giả hạc 5 cánh trắng Phú Thọ từ chồi ngủ của thân [187], hoặc từ hạt của lan *D. anosmum* Lindl. ở Quảng Trị [47], hay ở An Giang [11].

Ngoài ra một số nghiên cứu về những nhân tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng, phát triển của cây lan như ánh sáng, giá thể, phân bón,…Trong nghiên cứu của Đào Quốc Hưng và cộng sự, (2021) thể protocorm (PLB) *D. anosmum* Di Linh Taly được nghiên cứu bằng nuôi

cấy *in-vitro* dưới đèn FL (đèn huỳnh quang) và dưới đi-ốt phát quang có sự kết hợp màu xanh và đỏ (LED BR 30:35). Tỷ lệ chồi tạo PLB ở đèn LED 30B:35R là 38 – 42%, gấp 3,8 – 4,2 lần so với đèn FL (10%). Số lượng rễ trên mỗi chồi dưới đèn LED 30B:35R là 3,67 – 5,16, nhiều hơn đáng kể so với đèn FL (1,95 rễ trên mỗi chồi). Chiều dài gốc dưới đèn LED 30B:35R là 3,42 – 4,14 mm trong khi dưới đèn FL là 2,97 mm. Các cây con *in-vitro* đều thích nghi tốt trong môi trường nhà kính. LED 30B:35R có thể thúc đẩy đáng kể sự sinh trưởng và phát triển của chồi và rễ *D. anosmum* Di Linh Taly, tăng hiệu quả chi phí trong vi nhân giống [20]. Hay nghiên cứu tối ưu các điều kiện nhân giống cho lan *D. thyrsiflorum* từ môi trường dinh dưỡng, kích thích sinh trưởng, giá thể trồng [150]. Một nghiên cứu khác về ảnh hưởng của hormone và phân bón đến sự ra hoa sớm của cây giống lai *D. anosmum* trong điều kiện *ex-vitro* [145]. Nghiên cứu của Trương Thị Bích Phượng và cộng sự (2022) về tác dụng của chiết xuất vi khuẩn lam đối với quá trình nhân giống *in-vitro* của *D. anosmum* Lindl., kết quả nhân giống *in-vitro* cho thấy dịch chiết vi khuẩn lam có tác dụng tăng cường khả năng nhân chồi và ra rễ của cây lan *D. anosmum* Lindl. [36].

Mặc dù đã có một số nghiên cứu về nhân giống *in-vitro* các loại lan. Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng chỉ dừng lại ở việc hoàn thiện quy trình nhân giống, chưa đi sâu vào nghiên cứu di truyền, nghiên cứu các tính trạng biến dị cũng như tạo dòng biến dị từ việc tạo đột biến thực nghiệm.

7.2. Tạo giống đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

Hơn 3500 giống đột biến thuộc hơn 240 loài thực vật bao gồm ngũ cốc, đậu, hạt có dầu, rau, trái cây, sợi và hoa cây cảnh đã được phát triển và tung ra vào năm 2022 là bằng chứng cho thấy việc sử dụng thành công kỹ thuật đột biến trong chọn tạo giống thực vật [108]. Đối với hoa lan, nhiều giống thương mại đã được chọn thông qua gây đột biến bằng colchicine, Huy và cộng sự (2019) đã nghiên cứu ảnh hưởng của colchicine trên trên chồi non *in-vitro* của loài *Paphiopedilum villosum*. Nghiên cứu đã cho tỷ lệ cảm ứng đa bội đạt 19,88% ở nghiệm thức xử lý colchicine 50 µM xử lý 6 ngày. Trong số các cây con đa bội thu được, các cây tứ bội chiếm 88,24% [98].

Nghiên cứu của Bunnag & Hongthongkham (2015) thực hiện nhằm tìm ra điều kiện tối ưu để tạo đa bội thể *in-vitro* cho lan *D. draconis* Rchb.f., thí nghiệm thực hiện trên protocorm ở môi trường MS chứa nồng độ colchicine khác nhau (0-0,1%, v/v) và duy trì trong bóng tối trong 1, 2, 3 hoặc 4 ngày ở 25 ±2°C. Kết quả các cây đa bội thu được có lá dày hơn, màu xanh đậm với các tế bào bảo vệ lớn hơn khi so với các cây lưỡng bội. Tuy nhiên, số lượng tế bào bảo vệ trên một đơn vị diện tích được quan sát thấy đối với các cây đa bội được tạo ra thấp hơn so với số lượng được tìm thấy ở các cây lưỡng bội, điều này có thể là do sự gia tăng kích thước của các tế bào bảo vệ [66].

Sabzehzari và cộng sự (2019) đã đánh giá các đặc điểm hình thái, giải phẫu, tế bào, hoá sinh trên loài *Plantago psyllium* sau khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,1, 0,3 và 0,5% (w/v) trong thời gian 6, 12, và 24 giờ. Kết quả xác định bộ nhiễm sắc thế ở thể tứ bội (2n = 4x = 24), ở thể lưỡng bội nguyên vẹn (2n = 2x = 12). Kích thước của thể tứ bội lớn hơn thể lưỡng bội về số cành, hạt và hạt phấn, độ dày của lá và chiều cao cây. Khí khổng của thể tứ bội lớn hơn với mật độ thấp hơn so với thể lưỡng bội. Số lượng lục lạp trong các tế bào bảo vệ, cùng với hàm lượng chất diệp lục và caroten đều cao hơn ở các thể tứ bội, nghiên cứu cũng cho thấy rằng quá trình tứ bội hóa cải thiện hàm lượng chất nhầy của hạt cho mục đích thương mại [168].

Ngoài ra còn có nhiều nghiên cứu về lĩnh vực tạo giống cây trồng nhờ thực hiện các biện pháp gây đột biến để tạo ra những sai khác về kiểu hình như trên đối tượng lan *Phalaenopsis* [135], *Cymbidium* [183] hay trên *Dendrobium* [172].

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

và khả năng chống lại mầm bệnh. Hơn nữa, lai giống phong lan với cảm ứng đa bội đã được sử dụng để tạo ra các giống lai cải tiến [189].

Trong tạo giống cây trồng đột biến ngoài tạo giống cây đa bội thì các nhà nghiên cứu còn chỉnh sửa, thay đổi cấu trúc di truyền của cây trồng, nhằm tạo ra nhiều biến dị, tìm kiếm các đặc điểm có lợi cho con người. Phương pháp dễ thực hiện, ít chi phí có hiệu quả cao và ít gây ảnh hưởng đến sức sống của cây trồng nhất là gây đột biến điểm thay thế cặp cặp base nitơ [97] bằng phương pháp hoá học được sử dụng nhiều.

Tạo giống đột biến bằng xử lý dimethyl sulphate (DMS) được các nhà nghiên cứu tiến hành thành công trên nhiều đối tượng cây trồng vì chất này có khả năng tạo ra đột biến điểm thay thế cặp base nitơ. Trong nghiên cứu của Mostafa (2015) sử dụng trên cây Xà cừ *(Khaya senegalensis)* để tạo ra các giống mới có đặc tính tốt hơn. Ông đã sử dụng hạt cây Xà cừ ngâm trong dung dịch DMS đã tạo ra các cây có biến đổi về số cành và lá, chiều cao cây, màu sắc thân cây, màu sắc cuống lá. Nghiên cứu cũng tạo ra những cây Xà cừ có tốc độ tăng trưởng nhanh [136]. Một nghiên cứu khác Mostafa và Alhamd (2016) trên cây hoa Huỳnh liên (*Tecoma stans)* đã dùng hạt để ngâm trong dung dịch DMS nhằm tạo đột biến. Kết quả tạo ra được những cây Huỳnh liên biến đổi về số lượng, màu sắc hoa, hình dạng, kích thước lá và chiều cao cây [137].

Sử dụng DMS đã tạo ra những biến đổi của cây trồng về hình thái như chiều cao cây, kích thước hoa, màu sắc hoa, lá, số lượng lá, hoa hay các biến đổi về tốc độ sinh trưởng, thời gian nở hoa, hàm lượng diệp lục…đều có những biến đổi theo hướng tốt và có triển vọng để phát triển giống cho thương mại như cây hoa Hướng dương *(Helianthus annuus)*[188], cây Muồng hoàng yến (*Enna occidentalis* (L.) Link) [184], cây rau Sam *(Portulaca oleracea* L.) [152].

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

Phương pháp gây đột biến thực nghiệm kết hợp với nuôi cấy mô, đồng thời kết hợp với phân tích DNA để chọn lọc các dòng đột biến, đây là phương pháp tối ưu trong công tác tạo chọn giống hiện nay [72], vì phương pháp có nhiều lợi thế rõ ràng như: (a) sử dụng hiệu quả các chất gây đột biến bằng hóa chất và vật lý ở liều thấp; (b) tỷ lệ đột biến cao; và (c) đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả trong việc nhân giống vô tính *in-vitro* của cá thể đột biến cung cấp nguyên liệu đầy đủ để sàng lọc thêm cũng như giảm sự hình thành thể khảm (cá thể có nhiều hơn một hệ gen). Tiêu biểu như nghiên cứu của Srivastava và cộng sự (2018), đã phát triển quy trình tạo đột biến *in-vitro* ở lan *Aerides crispa* Lindl, kết quả đã lựa chọn được các dòng có hình thái độc đáo [179].

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

Vì chu kỳ sinh trưởng của lan rất dài nên việc chọn lọc các đột biến qua khảo sát hình thái gặp nhiều khó khăn và tốn thời gian. Vì vậy, phân tích di truyền sau xử lý đột biến rất hữu ích để phân lập nhanh các dòng đột biến, trong đó kỹ thuật RAPD rất phổ biến để xác định các biến dị di truyền của các dòng đột biến khi so sánh với các cấy đối chứng không xử lý đột biến. Trên lan, RAPD được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền ở nhiều loài *Dendrobium* [59]. Ngoài ra các chỉ thị phân tử AFLP, ISSR, SSR, cũng được sử dụng để đánh giá, phân tích đa dạng di truyền.

Chỉ thị phân tử RAPD rất hiệu quả trong việc phân tích bộ gen, điều tra mức độ đa dạng di truyền từ đó cung cấp các dữ liệu quan trọng để bảo tồn và phát triển các giống cây trồng có nguy cơ tuyệt chủng. Trong nghiên cứu của Phuong và cộng sự, (2022) đã phân tích 20 mẫu lan Ngọc điểm bằng chỉ thị RAPD để phân tích các giống lai của *Coelogyne pandurate, C. rumphii* đã đánh giá được các biến dị di truyền khác với cây bố mẹ [91] làm cơ sở phân loại và bảo tồn. Việc phân tích đa dạng, và tính ổn định di truyền sẽ chính xác hơn khi có sự kết hợp của 2 chỉ thỉ thị phân tử, trong nghiên cứu của Joshi và cộng sự (2023) về vi nhân giống và đánh giá tính ổn định di truyền của *D. transparens* Wall. Ex Lindl. sử dụng chỉ thị RAPD và ISSR đã cho kết qua rất tốt [102], hay khả năng ứng dụng chỉ thị SCoT và ISSR trong việc đánh giá đa dạng di truyền lan *Crepidium acuminatum* (D. Don) Szlach [185].

D. anosmum Lindl. phân bố ở nhiều vùng địa lý khác nhau và nó có những đặc điểm đặc trưng nên mức độ da dạng của lan này rất cao. Đã có những nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử như RAPD, SSR, ITS,… để phân loại và xác định mức độ đa dạng loài. Như nghiên cứu mối quan hệ di truyền của *D. anosmum* Lindl. var. và loài *semialba* dựa trên phân tích trình tự gen lục lạp *mat*K, *rbc*L [154]. Trong công bố của Lê Thị Ngọc Điệp và cộng sự (2020), vùng *ITS* cho tiềm năng cao hơn so với *matK* trong nhận diện lan *Dendrobium* với tỉ lệ nhận diện 100%, do đó, vùng *ITS* xem là tiềm năng trong nhận diện nhóm lan *Dendrobium* [8].

Ngoài ứng dụng trên các loại hoa lan, chỉ thị phân tử RAPD còn được áp dụng trên nhiều loài thực vật khác để phân tích đa dạng di truyền như trên cây chuối [96]; cây nghệ tây [134]; cây *Maerua oblongifolia* (Forssk.) A. Rich [138], cây mướp hương (*Luffa cylindrica* (L.) Roem) [16].

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

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

- *Đối tượng:*

+ Quá trình gây đột biến thực nghiệm bằng colchicine và DMS trên vật liệu nuôi cấy *in-vitro*.

+ Sự phát sinh biến dị di truyền và hình thái của các dòng lan sau xử lý đột biến.

+ Cơ sở khoa học cho sàng lọc và lựa chọn dòng đột biến phục vụ định hướng chọn tạo giống lan Giả hạc tím Huế.

- *Địa điểm:*

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

- Thời gian:

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

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu thực vật

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

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

Quả lan đã chín sinh lý và những đoạn thân có chứa chồi ngủ được thu trên cùng 1 cây lan Giả hạc tím Huế ban đầu lựa chọn là cây đầu dòng. Các mẫu thu thập đều khoẻ mạnh, không có vết bệnh dùng để nuôi cấy *in-vitro* tạo vật liệu khởi đầu cho nghiên cứu.

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

2.2.2. Hoá chất thí nghiệm

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

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

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

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

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

Bảng 2.1. Kí hiệu và trình tự của 63 mồi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

TT	Ký hiệu	Trình tự (5'-3')	TLTK	TT	Ký hiệu mồi	Trình tự (5'-3')	TLTK
1	P1	GTCCACACGG	[129]	33	OPA-13	CAGCACCCAC	[121]
2	P2	TCGGCGGTTC		34	OPA-14	TCTGTGCTGG	
3	P3	GGTGACGCAG		35	OPA-15	TTCCGAACCC	
4	P4	GTGGCATCTC		36	OPN-02	ACCAGGGGCA	[198]
5	P5	GGACTGGAGT		37	OPN-03	GGTACTCCCC	
6	P6	AGAGCCGTCA		38	OPN-04	GACCGACCCA	

7	P9	ACCCCCGAAG		39	OPN-06	GAGACGCACA	
8	P10	CACAGACACC		40	OPN-10	ACAACTGGGG	
9	P11	GTAGACCCGT		41	OPK-12	TGGCCCTCAC	[198]
10	P12	AAGCGACCTG		42	OPK-13	GGTTGTACCC	
11	P14	ACCGCGAAGG		43	OPK-16	GAGCGTCGAA	
12	P15	GGCACTGAGG		44	OPG-10	AGGGCCGTCT	[147]
13	P16	GGACCCAACC		45	OPG-17	ACGACCGACA	
14	P17	CAGCTCACGA		46	OPG-18	GGCTCATGTG	
15	P18	GTCGCCGTCA		47	OPBH-16	CTGCGGGTTG	[41]
16	P20	GGTGACGCAG		48	OPBH-19	GTCGTCCGGA	
17	OPB-01	GTTTCGCTCC	[121]	49	OPF-01	ACGGATCCTG	[33]
18	OPB-02	TGATCCCTGG		50	OPF-04	GGTGATCAGG	
19	OPB-03	CATCCCCCTG		51	OPF-05	CCGAATTCCC	
20	OPB-04	GGACTGGAGT		52	OPF-06	GGGAATTCG G	
21	OPB-05	TGCGCCCTTC		53	OPD-02	GGACCCAACC	[163]
22	OPB-06	TGCTCTGCCC		54	OPD-07	TTGGCACGGG	
23	OPB-08	GTCCACACGG		55	OPD-11	ACCCGGTCAC	
24	OPB-10	CTGCTGGGAC		56	OPD-16	AGGGCGTAAG	
25	OPB-17	AGGGAACGAG		57	OPH-14	ACCGTGGGTG	[69]
26	OPB-18	CCACAGCAGT		58	OPH-20	GGGAGACATC	
27	OPB-20	GGACCCTTAC		59	OPV-08	GGACGGCGTT	[50]
28	OPA-01	CAGGCCCTTC		60	OPO-04	AAGTCCGCTC	[128]
29	OPA-03	AGTCAGCCAC	[121]	61	OPAT-14	GTGCCGCACT	[61]
30	OPA-04	AATCGGGCTG		62	OPC-13	GGGGGTCTTT	[148]
31	OPA-07	GAAACGGGTG		63	OPAO-02	AATCCGCTGG	[74]
32	OPA-08	GTGACGTAGG					

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

2.2.3. Điều kiện phòng và môi trường nuôi cấy

2.2.3.1. Điều kiện phòng nuôi cấy

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

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

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

2.2.3.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy *in-vitro*: Các môi trường được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường ½ Murashige and Skoog (½ MS), MS, môi trường Vacin Went (VW), môi trường Hyponex (Hyp), môi trường Knusond C. Các môi trường thí nghiệm được bổ sung 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 100 ml/L nước dừa + 30 g/L khoai tây nghiền mịn. Tuỳ vào mỗi thí nghiệm mà PGR được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH 5,8 trước khi hấp khử trùng.

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

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

2.3. Phương pháp nghiên cứu

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

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

2.3.1.1 Nhận dạng và thu thập mẫu nghiên cứu

Các mẫu lan Giả hạc tím Huế được thu thập ở khu vực TP. Huế, trong đó cây lan lựa chọn làm cây mẹ để lấy mẫu cho nghiên cứu được lấy tại nhà vườn Lan Đô Nguyễn, 18 Thạch Hãn, TP. Huế (5/2021). Nghiên cứu sử dụng một cây mẹ làm cây đầu dòng để thu mẫu quả và đoạn thân chứa chồi ngủ để thực tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* cho nghiên cứu. Trong thời gian nghiên cứu các mẫu được trồng chăm sóc tại vườn lan Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Thời điểm thu thập mẫu cây đang có hoa nên đã xác định đúng được mặt hoa lan Giả hạc tím Huế, mô tả các đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế theo phương pháp mô tả đặc điểm hình thái hoa lan của De (2020) [78]. Định loại mẫu theo hai phương pháp:

a. Phương pháp hình thái so sánh

Việc xác định các đặc điểm hình thái được thực hiện theo phương pháp mô tả dựa trên quan sát trực tiếp các bộ phận của cây lan và tham khảo với công bố đã có như của Sri Hartati và cộng sự (2022) [92], Vu Quoc Luan và cộng sự (2022) [125]. Mẫu lan cũng được gửi để giám định tại Bảo tàng thiên nhiên Duyên hải miền Trung.

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

b. Phương pháp định danh phân tử

+ Tách chiết DNA

Mẫu lá non, mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế sau khi thu thập được tách chiết DNA tổng số theo phương pháp mô tả của Doyle (1991) cải tiến [80] (Quy trình cải tiến ở điểm bổ sung PVP hoặc β-mercaptoethanol để loại bỏ polyphenol, và điều chỉnh tỷ lệ dung môi, bổ sung thêm RNase A để tăng độ tinh sạch DNA) (Phụ lục 4). Chất lượng DNA tổng số được kiểm tra qua điện di với điện thế 100 V thời gian 15 phút trên gel agarose 1% trong đệm TAE Tris-Acetate-EDTA 1X và nhuộm bằng thuốc nhuộm Gelred (Biotium, Mỹ). DNA có $OD_{260/280}$ từ 1.8–2.0 được sử dụng. Các bước thực hiện điện di được mô tả ở phụ lục 4.

+ Phản ứng khuếch đại PCR

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

Bảng 2.2. Trình tự nucleotide của các cặp mồi

Tên mồi	Trình tự nucleotide (3'→ 5')	Tài liệu tham khảo
*rbc*La_F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	[5]
*rbc*La_R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	
ITS_4	TCCTCCGCTTATTGATATGC-	[123]
ITS_5	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	

*mat*K 390_F	CGATCTATTCATTCAATATTTC	[75]
*mat*K 1326_R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	
*trn*L_F	CGAAATCGGTAGACGCTACG	[113]
*trn*LR	ATTTGAACTGGTGACACGAG	

Thành phần phản ứng PCR: 25 µL GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega), 1µL mồi xuôi (10 pmol/µL, IDT, Mỹ), 1µL mồi ngược (10 pmol/µL, IDT, Mỹ), 100 ng DNA khuôn mẫu và bổ sung nước cất vô trùng cho đủ tổng thể tích 50 µL. Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại đoạn các đoạn gen: 95ºC/5phút; sau đó 30 chu kỳ tiếp theo với (95ºC /45 giây, 56ºC/45 giây, 72ºC/60 giây) và cuối cùng 72ºC/10 phút để hoàn thành phản ứng.

+ Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự gen

Tất cả các phản ứng đều được thực hiện trong máy luân nhiệt Máy luân nhiệt MJ mini thermal cycler (ThermoFisher, Mỹ). Các sản phẩm PCR được điện di bằng cách sử dụng gel agarose 1% và so sánh với thang chuẩn 1kb (Bioline, UK) để xác định kích thước của sản phẩm khuếch đại. Các sản phẩm khuếch đại PCR sau đó được tinh sạch bằng cách sử dụng ISOLATE II PCR và Gel Kit (Bioline, UK) và sau đó được thực hiện phản ứng giải trình tự gen trực tiếp với cặp mồi tương ứng trên máy ABI 3100 (Aplied Biosystems, Mỹ) tại công ty 1st Base - Malaysia (https://base-asia.com/), phương thức giải trình tự hai chiều.

+ Phân tích kết quả và xây dựng cây di truyền

Kết quả giải trình tự được xử lí bằng phần mềm BioEdit 7.0.5.3 và công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov) để xác định tên loài. Cây thể hiện mối quan hệ di truyền xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood và Tamura-Nei model bằng phần mềm MEGA X với 1000 lần bootstrap lặp lại [116].

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

a. Tạo vật liệu khởi đầu nuôi cấy in-vitro lan Giả hạc tím Huế

Thí nghiệm 1: Gieo hạt in-vitro

Quả lan sau khi chín sinh lý được thu thập mang về phòng thí nghiệm và làm sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy với xà phòng, được rửa lại một lần nữa với nước hấp vô trùng trong 1 phút ở tủ cấy vô trùng. Sau đó, quả được khử trùng bằng cách nhúng ngập toàn bộ quả vào trong cồn ethanol 96° và lắc nhẹ trong 30 giây. Quả được lấy ra và đốt qua với đèn cồn

trước khi quả được cắt đôi để lấy hạt [13]. Hạt lan được gieo vào môi trường MS bố trí thí nghiệm với thời gian chiếu sáng khác nhau (0 giờ, 4 giờ, 8 giờ và 12 giờ) để xác định hiệu quả của quy trình khử trùng và xác định thời gian chiếu sáng thích hợp cho hạt nảy mầm. Mỗi công thức thí nghiệm được tiến hành với 10 bì môi trường (8x12 cm), và lặp lại 3 lần.

Các chỉ tiêu đánh giá sau 12 tuần theo dõi bao gồm: Thời gian hạt nảy mầm (ngày) (Tính từ ngày gieo hạt đến ngày xuất hiện hạt nảy mầm. Quy ước hạt lan nảy mầm: khi hạt lan xuất hiện mầm lá xanh), tỷ lệ hạt nảy mầm (%), tỷ lệ hình thành protocorm (%), tỷ lệ hạt chết (%), tỷ lệ nhiễm (%).

Thí nghiệm 2: Tạo vật liệu khởi đầu in-vitro từ đoạn thân có chứa chồi ngủ

Các đoạn thân khỏe mạnh, sạch bệnh dài khoảng 15-20 cm của lan Giả hạc tím Huế có chồi nách được thu thập. Đầu tiên, các đoạn thân này được rửa dưới vòi nước chảy và lắc nhẹ trong xà phòng thương mại pha loãng trong 5 phút, sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước máy để loại bỏ hoàn toàn xà phòng. Sau đó, các mẫu được cắt thành các đoạn dài 6-7 cm và đặt vào bình tam giác dung tích 500 ml, được rửa lại bằng cách lắc chúng trong nước cất 2-3 lần mỗi 2 phút. Quá trình khử trùng được thực hiện trong tủ cấy bằng NaClO 2% trong 10 phút [77], H_2O_2 3% trong 10 -20 phút [180] và $HgCl_2$ 0,1% trong 5-10 phút [42] (Bảng 2.3). Cuối cùng, mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-4 lần trước khi đưa vào bì môi trường MS cơ bản (8x12 cm), mỗi bì 1 mẫu, mỗi thí nghiệm 30 mẫu, các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiễn và lặp lại 3 lần. Để đánh giá hiệu quả khử trùng các chỉ tiêu được ghi lại sau một tuần nuôi cấy bao gồm: tỷ lệ mẫu sạch (%), tỷ lệ chết (%), tỷ lệ nhiễm (%).

Bảng 2.3. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng tới tỷ lệ nhiễm của mẫu

Công thức	**Thời gian khử trùng (phút)**		
	NaClO (2%)	**H_2O_2 (3%)**	**$HgCl_2$ (0,1%)**
CT1	10	-	-
CT2	10	10	-
CT3	10	15	-
CT4	10	20	-
CT5	10	-	5
CT6	10	-	10
CT7	10	-	15

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

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo protocorm/mô sẹo

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

Mẫu hạt của quả lan hoặc các mẫu thân còn sống, không bị nhiễm nấm khuẩn của nội dung 2.3.1.2a vào mẫu sau 1 tuần được sử dụng làm nguyên liệu cấy vào các môi trường thí nghiệm. Cụ thể dùng các môi trường:

- CT1: Môi trường MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 [48].
- CT2: Môi trường ½ MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính, + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 [187].
- CT3: Môi trường VW + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 [23].
- CT4: Môi trường Hyp loại 20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L loại 6,5N-6P-19K) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 [160].
- CT5: Môi trường Knusond C + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8 [44].

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

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

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

- Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm/mô sẹo

Mẫu hạt của quả lan hoặc các mẫu thân còn sống, không bị nhiễm nấm khuẩn được cấy chuyền lên môi trường dinh dưỡng tối ưu và bổ sung riêng lẻ hoặc tổ hợp các chất điều hoà sinh trưởng NAA nồng độ 0,0 - 1,0 mg/L, BA nồng độ 0,0 – 2,0 mg/L,và TDZ nồng độ 0 – 2 mg/L để thăm dò khả năng tạo protocorm/mô sẹo của mẫu, thời gian theo dõi các chỉ tiêu đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy, thí nghiệm được bố trí theo các công thức bảng 2.4 và 2.5.

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

Công thức	NAA(mg/L)	BA (mg/L)
CT1	0,0	0,00
CT2	0,0	0,25
CT3	0,25	0,25
CT4	0,50	0,25
CT5	0,75	0,25
CT6	1,00	0,25
CT7	0,0	0,5
CT8	0,25	0,5
CT9	0,50	0,5
CT10	0,75	0,5
CT11	1,00	0,5

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

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

Công thức	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)
CT1	0,0	0,0	0,0
CT2	0,5	0,0	0,5
CT3	1,0	0,0	0,5
CT4	1,5	0,0	0,5

CT5	2,0	0,0	0,5
CT6	0,0	0,5	0,5
CT7	0,0	1,0	0,5
CT8	0,0	1,5	0,5
CT9	0,0	2,0	0,5

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

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

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

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

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

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

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

Chồi tái sinh (cao 1-2 cm, xanh tốt, không nhiễm nấm khuẩn) được tách riêng sau đó cấy chuyền sang môi trường nhân chồi. Môi trường để nhân chồi là môi trường dinh dưỡng tối ưu có bổ sung 1,5 mg/L BA và IAA nồng độ 0,0 – 0,7 mg/L. Thí nghiệm được bố trí ngẫu

nhiên, mỗi công thức được bố trí trong 5 bì môi trường, mỗi bì cấy 5 chồi và có 3 lần lặp lại, các công thức thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.7.

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

Công thức	BA (mg/L)	IAA(mg/L)	Công thức	BA (mg/L)	IAA(mg/L)
CT1	0,0	0,0	CT4	1,5	0,3
CT2	1,5	0,0	CT5	1,5	0,5
CT3	1,5	0,1	CT6	1,5	0,7

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

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

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

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

Công thức	IAA (mg/L)	NAA(mg/L)	Công thức	IAA (mg/L)	NAA(mg/L)
CT1	0,0	0,0	CT7	0,0	0,1
CT2	0,1	0,0	CT8	0,0	0,3
CT3	0,3	0,0	CT9	0,0	0,5
CT4	0,5	0,0	CT10	0,0	0,7
CT5	0,7	0,0	CT11	0,0	1,0
CT6	1,0	0,0			

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

Quá trình xử lý hoá chất đột biến và tạo dòng lan đột biến lan Giả hạc tím Huế được thực hiện theo các bước: Bước 1: Lựa chọn dòng tế bào mẹ; Bước 2: Gây đột biến bằng colchicine/DMS; Bước 3: Nuôi cấy *in-vitro*; Bước 4: Sàng lọc dòng chứa đột biến; Bước 5: Lưu giữ và nhân giống; Bước 6: Thực nghiệm trồng các dòng đột biến, quy trình được mô tả cụ thể ở phụ lục 5.

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

Thời gian và nồng độ colchicine, DMS xử lý được tham khảo theo công bố của Nguyễn Phúc Huy và cộng sự (2019) [98], Lita Soetopo và Dan Hosnia (2018) [175], Gehan và Alhamd (2016) [137], nồng độ 50–800 ppm với thời gian xử lý là 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ.

Protocorm/ mô sẹo *in-vitro* sau 60 ngày (kích thước ≤ 0,5 cm, khối lượng từ 0,02-0,1 g, không bị nhiễm nấm bệnh, khoẻ, sinh trưởng tốt) nuôi cấy từ mẫu của lan Giả hạc tím Huế, được ngâm trực tiếp vào môi trường có chứa hoá chất, sau thời gian xử lý mẫu rửa bằng nước cất vô trùng 2 lần sau đó cấy trên môi trường dinh dưỡng tối ưu, với số lượng 5 mẫu/bì. Các thí nghiệm thực hiện ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm 6 bì và lặp lại 3 lần. Các công thức thí nghiệm thể hiện qua bảng 2.9. và bảng 2.10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sử dụng chỉ thị hình thái đánh giá theo các tiêu chí sinh học: Theo dõi đặc điểm hình thái, đặc tính sinh học của cơ quan sinh dưỡng, cơ quan sinh sản theo các chỉ tiêu định tính và định lượng, từ những mẫu cây đã được xử lý colchicine, DMS và có biểu hiện ra các tính trạng biến dị. Cụ thể, trong các thông số hình thái gồm chiều cao cây, chiều dài và chiều rộng của lá, được đo bằng thang đo cm. Số lượng lá trên mỗi cây, hình dạng lá, màu sắc của cây đối chứng và cây đột biến được đánh giá bằng quan sát bằng mắt thường [78].

2.3.3.2. Đặc điểm tế bào của các dòng đột biến

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

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

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

- Quan sát tế bào khí khổng

Phân tích khí khổng được thực hiện bằng phương pháp của Jadrna và cộng sự (2009) [101]. Lấy một lớp biểu bì mỏng ở mặt dưới của lá (lá cây giai đoạn cây hoàn chỉnh) bằng mũi kim và đặt lên lam kính để làm tiêu bản. Tiêu bản được quan sát bằng kính hiển vi ở độ phóng đại 100x hoặc 400x. Kích thước khí khổng (chiều dài, chiều rộng) được đo trong quá trình quan sát bằng cách sử dụng thang đo dòng (trắc vi thị kính) được gắn vào thị kính. Xác định thể đa bội nếu chiều dài lỗ khí của chúng ≥1,25 × mức đối chứng [165]. Mật độ khí khổng được đếm trong 4 ô vuông cụ thể của trường nhìn kính hiển vi và sau đó tính ra cho 1 mm^2.

Ghi nhận các chỉ tiêu về khí khổng gồm kích thước khí khổng (chiều dài, chiều rộng (μm)), mật độ khí khổng/mm^2 và diện tích (μm^2) tế bào khí khổng.

- *Quan sát nhiễm sắc thể (NST)*

Phân tích nhiễm sắc thể được thực hiện theo phương pháp theo mô tả của Ilya Kirov và cộng sự (2014) [112]. Quan sát số lượng NST có thể được đếm bằng cách quan sát tiêu bản của đầu rễ của mẫu đột biến, các bước làm tiêu bản được mô tả ở phụ lục 6. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại vật kính 100x và thị kính là 10x, dùng dầu cho lên tiêu bản để quan sát.

-*Phương pháp lập karyotype*

Kiểu nhân của lan Giả hạc tím Huế lưỡng bội và đa bội được quan sát và phân tích ở mẫu đối chứng (2n) không xử lý colchicine và mẫu xử lý colchicine. Hình ảnh NST từ quan sát bằng kính hiển vi được chụp bằng máy ảnh hoặc ứng dụng camera trên kính hiển vi quan sát (PROVIEW-dùng cho máy tính), sau đó được xử lý bằng phần mềm ImageJ 1.8.0 và Microsoft Excel để phân tích đặc điểm NST. Các đặc điểm quan sát được là số lượng, kích thước và hình dạng NST, đây là cơ sở để lập karyotype. Phân tích karyotype thực hiện thông qua việc ghép cặp NST tương đồng dựa trên sự giống nhau về kích thước và hình dạng NST [93].

2.3.3.3. Đặc điểm hoá sinh của cây đột biến

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

Tổng hàm lượng chất diệp lục và carotenoid được chiết xuất bằng phương pháp chuẩn của Porra (2002) [156] (phụ lục 6). Hàm lượng chlorophyll a, b và carotenoid được tính theo công thức của Porra (2002) [156], [81], tính theo trọng lượng tươi:

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

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

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

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

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

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

a. Tách chiết DNA tổng số

Mẫu lá non của các dòng biến đổi hình thái sau khi thu thập được tách chiết DNA theo phương pháp mô tả ở phần 2.3.1.1

b. Phương pháp thực hiện phản ứng PCR-RAPD

Các mẫu DNA được phân tích kiểu gen dựa trên phản ứng PCR với các mồi ngắn (Bảng 2.1) để nhân bản ngẫu nhiên các đoạn DNA, theo phương pháp của Williams và cộng sự (1993) [195]. Phản ứng PCR-RAPD được thực hiện theo mô tả ở phụ lục 7.

** Điều kiện phản ứng PCR-RAPD*

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

Chương trình nhiệt cho phản ứng PCR-RAPD: Giai đoạn biến tính nhiệt độ 94^{o}C kéo dài 5 phút; sau đó 40 chu kỳ gia nhiệt tiếp theo bao gồm các giai đoạn: Biến tính DNA ở

94ºC trong 45 giây, gắn mồi ở 37ºC trong 60 giây, và tổng hợp DNA ở 72ºC trong 120 giây và cuối cùng hoàn thiện sản phẩm ở 72ºC trong 10 phút và lưu trữ ở 4ºC. Tất cả các phản ứng PCR-RAPD được thực hiện lặp lại 2 lần độc lập để đảm bảo tính ổn định và loại bỏ các band giả. Các band chỉ được chấp nhận nếu xuất hiện ổn định 100% ở cả hai lần lặp, có độ phân giải rõ ràng, cường độ ổn định (không quá mờ, không quá đậm). Các band không ổn định hoặc chỉ xuất hiện 1 lần đều bị loại.

Bảng 2.11. Thành phần phản ứng PCR-RAPD

Thành phần phản ứng PCR	Nồng độ	Thể tích cho 1 phản ứng
Đệm PCR	10x	2,5 µL
DNA khuôn	50 ng/µL	1 µL
dNTPs	2mM	2 µL
Mồi RAPD	10 µM	1 µL
Taq DNA pol	5U/µL	2 µL
H_2O (siêu sạch)	-	16,5 µL
Tổng thể tích cho 1 phản ứng PCR		25 µL

c. Phân tích kết quả và xây dựng cây phân nhóm di truyền

Kết quả điện di sản phẩm PCR-RAPD là các các band DNA, các band này được mã hóa bằng hệ nhị phân theo nguyên tắc dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các band, đánh số "1" nếu có xuất hiện band và số "0" nếu không xuất hiện band, dữ liệu này được dùng xây dựng cây phân nhóm di truyền bằng phần mềm NTSYS2.1 theo phương pháp UPGMA [162]. Nếu một band DNA (có kích thước cụ thể) xuất hiện ở mẫu a nhưng không xuất hiện ở mẫu b hoặc đồng thời xuất hiện ở cả a và b nhưng không xuất hiện ở các mẫu khác thì band DNA này gọi là band đa hình. Ngược lại nếu band DNA nào xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu thì gọi là band đồng hình. Tính các chỉ số *h (đa dạng gen Nei's (1973)), chỉ số đa dạng di truyền (*h) theo cách tính của Nei's được tính bằng: $^*h = 1-\sum pi^2$ (pi là tần số của alen thứ i tại locus đó) [144]; $*i_0$ (Chỉ số đa dạng di truyền Shannon $*i_0 = -\sum_{i=1}^{s}(pi * \ln pi)$, trong đó pi là tỷ lệ số lượng cá thể tương ứng với bật taxon thứ i trong bộ mẫu, s là độ phong phú của loài, Shannon (1949), [114]) bằng phần mềm Popgen 23.

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

2.3.4. Hoàn thiện quy trình tái sinh *in-vitro* một số dòng đột biến có triển vọng

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

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

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

Các mẫu chồi xử lý bỏ lá, cắt thành đoạn 1,5-2,0 cm, sau đó cấy lên môi trường dinh dưỡng tối ưu và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng theo công thức tốt nhất ở bảng 2.5. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, mỗi công thức gồm 6 bì môi trường, mỗi bì cấy 5 mẫu, và được lặp lại 3 lần.Các chỉ tiêu theo dõi được đánh giá sau 12 tuần nuôi cấy gồm thời gian hình thành mô sẹo/chồi (ngày), tỷ lệ số của mẫu (%), tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%), kích thước mô sẹo (cm), tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (cm).

b. Tái sinh chồi từ mô sẹo

Mô sẹo tái sinh của những dòng đột biến được lựa chọn với kích thước tương đồng (≥0,5 cm), khoẻ mạnh, không bị nhiễm nấm, vi khuẩn được cấy vào môi trường dinh dưỡng tài sinh chồi, môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng theo công thức thí nghiệm tốt nhất ở bảng 2.6 dùng cho tái sinh chồi từ mô sẹo đột biến. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, mỗi công thức gồm 6 bì môi trường, mỗi bì cấy 5 mẫu, và được lặp lại 3 lần.

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

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

a. Nhân chồi đột biến

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

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

b. Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

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

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

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

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

Cây lan Giả hạc *in-vitro* đủ tiêu chuẩn được đưa ra vườn ươm huấn luyện từ 15-20 ngày trước khi ra bầu. Giá thể dùng để trồng cây con là xơ dừa, trấu hun, dớn vụng vỏ thông, bảng dương xỉ [150].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Phân lập vi khuẩn nội sinh

Sử dụng các phần thân, lá, rễ của những mẫu lan rừng được thu thập ở Bình Định (cũ), Gia Lai (cũ), Kon Tum (cũ), TP. Huế. Các giống lan được thu thập gồm có Giả hạc (*D. anosmum*), Giáng hương tam bảo sắc (*Aerides falcata*), Kiều vàng *(D. thyrsiflorum),* Hoàng thảo vảy rồng (*D. lindleyi*), và lan kiếm *(Cymbidium finlaysonianum).* Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh được tiến hành theo mô tả của Kumar và cộng sự (2016) [115], được trình bày ở phụ lục 8. Sử dụng môi trường bán lỏng NA nuôi cấy tạo vòng pellicle [31]. Sau đó lấy vi khuẩn từ vòng pellicle lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường NA, LB, SCA, ISP2 đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc trên các đĩa môi trường được theo dõi bằng cách đo kích thước và quan sát hình dạng khuẩn lạc bao

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

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

Thực hiện phân tích các đặc điểm hoá sinh như khả năng phân giải lân [12], khả năng cố định đạm [24], khả năng sinh IAA [65], khả năng sinh NH_3 [137] và khả năng đối kháng [30] của các chủng vi vật nội sinh với vi sinh vật gây bệnh (vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên lan *(Erwinia carotovora)*), lựa chọn những chủng vi sinh có tiềm năng nhất để định danh và sử dụng để làm chế phẩm vi sinh chăm sóc cho cây lan *in-vitro* ở vườn ươm. Phương pháp thực hiện được mô tả ở phụ lục Phụ lục 9.

Định loại phân tử chuẩn vi sinh vật: DNA tổng số từ vi khuẩn được tách chiết theo mô tả của Sambrook và Russell [164], các vùng 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi thuận 27F (5'-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG-3') và mồi ngược 1492R (5'-ACGG (CT) TACCTTGTTACGACTT-3') [57] (Phụ lục 9).

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

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

Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 4 công thức và 3 lần lặp lại, mỗi công thức gồm có ít nhất 10 cây. Các cây ra bầu theo phương pháp đã được nghiên cứu ở nội dung 2.3.5.1 và bổ sung chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh gồm:

- Công thức 1: Chăm sóc theo điều kiện ở nội dung 2.3.5.1, không bổ sung chế phẩm dinh dưỡng vi sinh và được sử dụng là công thức đối chứng.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3.6. Phương pháp xác định các chỉ tiêu nghiên cứu

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Số rễ (rễ/mẫu cấy): đếm tổng số rễ trên một mẫu cấy.

- Chiều dài rễ (cm): được đo từ gốc rễ đến chóp rễ.

- Đường kính giả hành (cm): dùng thước kẹp đo đường kính ở vị trí giữa thân.

- Kích thước mô sẹo (cm): đo theo chiều có kích thước lớn nhất của mô sẹo.

- Chiều dài, chiều rộng tế bào (μm) : Dùng thước đo trong trắc vi thị kính, hoặc phần mềm ImageJ 1.8.0., đo chiều dài/rộng nhất của tế bào.

- Đặc điểm bên ngoài của mô sẹo, protocorm, chồi, rễ được đánh giá cảm quang qua quan sát bằng mắt đánh giá về màu sắc, hình dạng.

2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu

- Dữ liệu thu được từ tất cả các thí nghiệm được phân tích ANOVA (Analysis of Variance) một chiều để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Độ lệch chuẩn (SD) được tính để mô tả mức độ biến động của giữ liệu trong mỗi nghiệm thức. So sánh giá trị trung bình giữa các nghiệm thức được thực hiện bằng phương pháp Duncan ở mức ý nghĩa 5%. Phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 26.

- Các số liệu thô thu từ các nội dung nghiên cứu sẽ được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học nhờ phần mềm Office excel 2019.

- Đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các giống cũng dựa trên ma trận hệ số tương đồng (Similarity coefficient) và phân tích sơ đồ hình nhánh (Cluster) bằng phần mềm NTSYSpc v2.1 theo phương pháp UPGMA [162].

- Tính các chỉ số *h (đa dạng gen Nei's); *i_0 (chỉ số đa dạng di truyền Shannon) bằng phần mềm Popgen23.

- Các mẫu sau khi giải trình tự sẽ được truyền qua máy tính và phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.0.5.3. và MEGA X để xếp hàng (alignment) các trình tự để xác định vị trí và các dạng đột biến DNA.

- Hình ảnh tế bào được phân tích, đo, đếm bằng phần mềm ImageJ 1.8.0.

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

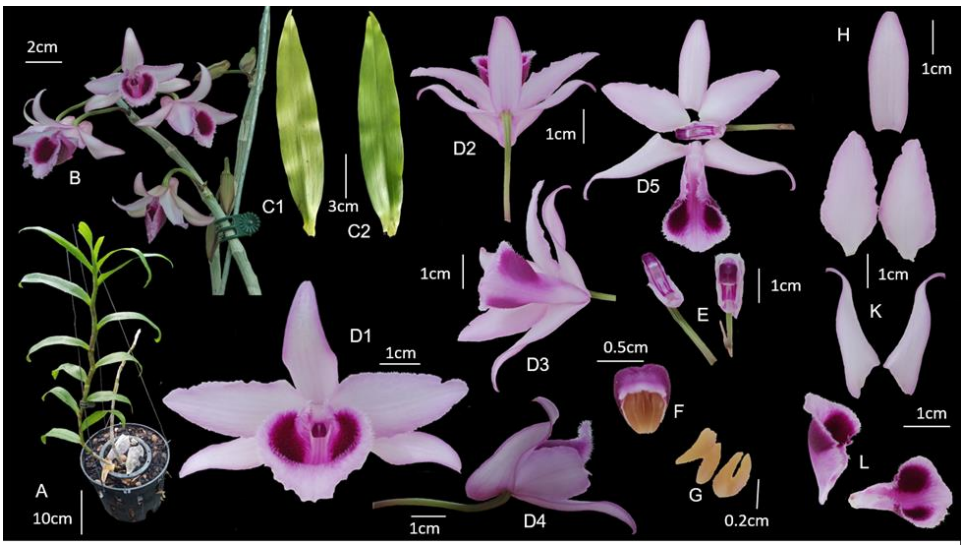
3.1. Tạo vật liệu khởi đầu *in-vitro* từ mẫu lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.)

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

-Nhận diện bằng đặc điểm hình thái:

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

Đặc điểm hình thái được mô tả đều thể hiện được đặc điểm chung của chi lan *Dendrobium.* Bên cạnh đó những đặc điểm chi tiết của hoa về màu sắc, cấu trúc hoa hay mùi hương có thể xác định được loài của mẫu lan này (Hình 3.1). Kết hợp với các mô tả hình thái về loài lan *D. anosmun* đã công bố trước đây như của Hartati và cộng sự (2022) [92], Vu Quoc Luan và cộng sự (2022) [125] có thể nhận định rằng lan Giả hạc tím Huế đang nghiên cứu là loài lan Giả hạc tím với tên khoa học là *D. anosmum* Lindl.



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

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

Những đặc điểm hình thái của *D. anosmum* ở Việt Nam đã được mô tả trước đây với các đặc điểm chung và riêng của loài; Tương tự, *D. anosmum* tím Huế cũng có những đặc điểm đặc trưng của loài *D. anosmum* và thêm vào những nét độc đáo về màu sắc, mùi hương. Đặc điểm hình thái cấu trúc của cây lan bao gồm các kiểu sinh trưởng, lá, hoa, giả hành và rễ. Hoa là cơ quan quan trọng nhất để nhận dạng loài. Cấu trúc của hoa lan chủ yếu là cánh hoa, đài hoa, phấn hoa, trụ hoa và cánh hoa môi [71]. Trong mô tả hình thái loài *D. anosmum* Lindl. trước đây của một số tác giả đã có những mô tả đặc điểm tương đồng như khuôn hoa hình sao cân đối, có mùi hương, có nhiều biến dị màu sắc, cánh hoa môi có nhiều lông mịn [68], [92], [145].

- *Nhận diện bằng chỉ thị phân tử*

Để có thêm cơ sở cũng cố cho nhận định về lan Giả hạc tím Huế chúng tôi tiếp tục định loại bằng chỉ thị phân tử. Trong nghiên cứu này, mẫu loài lan giả hạc (Giả hạc tím Huế - GHTH) thu thập ở TP. Huế đã được xác định tên khoa học dựa trên một số vùng gen thuộc hệ gen nhân và hệ gen lục lạp bao gồm *ITS; trnL; matK* và *rbcL*. Kết quả cho thấy cả 4 vùng gen thu nhận được từ loài lan Giả hạc tím Huế đều được giải trình tự thành công với kích thước thu được của các vùng gen tương ứng là 695 bp (*ITS*); 891 bp (*trnL*); 849 bp (*matK*) và 560 bp (*rbcL*) (Phụ lục 13). Sử dụng chương trình phân tích tương đồng trực tuyến BLAST trong NCBI, kết quả cho thấy trình tự nucleotide của các vùng gen thu được từ loài lan Giả hạc tím Huế độ tương đồng cao với các loài khác trong cùng chi *Dendrobium*. Từ 100 trình tự nucleotide của các loài thuộc chi *Dendrobium,* các loài có mức tương đồng cao với trình tự nucleotide của các vùng gen thu từ loài lan Giả hạc tím Huế được chọn làm dữ liệu phân tích tiến hoá phân tử và xây dựng cây phát sinh loài nhằm xác định tên khoa học của loài lan Giả hạc tím Huế (Mục II phụ lục 11, hình P11-3.2 phụ lục 11).

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

mẫu của loài *D. anosmum* Lindl. var. Semi alba thu được từ nhiều địa phương ở Việt Nam, cặp mồi này được đánh giá là hiệu quả cao trong định danh loài *D. anosmum* Lindl. var. Semi alba [154]; Lê Thị Ngọc Điệp và cộng sự (2020) sử dụng cặp mồi này nhằm xác định 30 mẫu thuộc chi *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam. Kết quả nhận diện được 10/16 loài thuộc chi *Dendrobium* [8].

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

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

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

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

Bảng 3.1: Điều kiện tối ưu cho nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím huế từ hạt các giai đoạn vào mẫu, tạo protocorm và tái sinh chồi.

TT	Giai đoạn nhân giống		Điều kiện tối ưu	Kết quả thử nghiệm
1	Vào mẫu hạt	Khử trùng mẫu	- Khử trùng quả lan bằng cồn 96º trong 30 giây và đốt qua ngọn lửa đèn cồn. Nuôi cấy với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày.	- Đạt hiệu quả cao, với tỉ lệ vô trùng trên 95% ở các thí nghiệm. - Thời gian nảy mầm là 41,33 ngày, tỷ lệ hạt chết thấp nhất là 20,36%, tỷ lệ nảy mầm và hình thành protocorm lần lượt là 64,76% và 60,89%.
		Môi trường	- CT1: Môi trường MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa, pH 5,8. - CT4: Môi trường Hyp loại 20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L loại 6,5N-	- Ở CT1 (MS): Thời gian nảy mầm 41,33 ngày, tỷ lệ nảy mầm 64,76 %, tỷ lệ hình thành protocorm 60,89 %, và tỷ lệ hạt chết của hạt 20,36 %. - Ở CT4 (Hyp) Thời gian này mầm 42,87 ngày, tỷ lệ nảy mầm 63,08 %, tỷ lệ hình thành protocorm 59,62 %, tỷ lệ hạt chết của hạt 20,36 % 22,71 %.

			6P-19K) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8	
2	Tạo Protocorm		- Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,75 mg/L NAA+ 0,5 mg/L BA	- Thời gian nảy mầm của hạt 23,27 ngày, tỷ lệ nảy mầm 93,46 %,, tỷ lệ hình thành protocorm 88,75 % và tỷ lệ hạt chết 4,43 %.
3	Tái sinh chồi từ protocorm		- Môi trường dinh dưỡng bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA	- Tỷ lệ tái sinh chồi đạt 96,00 %, số chồi là 2,76 chồi/mẫu, chồi cao 1,83 cm và số lá của chồi là 2,76 lá

a. Vào mẫu hạt lan Giả hạc tím Huế:

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

Quy trình khử trùng quả lan Giả hạc tím Huế đạt hiệu quả cao, với tỉ lệ vô trùng đều trên 95% ở các công thức thí nghiệm. Điều này có thể giải thích do hạt lan Giả hạc tím Huế được bảo vệ bởi vỏ quả dày nên ít có nguy cơ bị nhiễm nấm, khuẩn hơn những loại hạt không được bảo vệ bởi vỏ. Trước đây, phương pháp khử trùng bằng cồn 96º và đốt trên ngọn lửa đèn cồn đã được Đặng Thị Thu Hà và Phạm Thu Hà (2020) thực hiện trên quả lan phi điệp tím (*D. anosmum* Lindl) có tỉ lệ nhiễm 38,33% [13].

So sánh với một số nghiên cứu sử dụng phương pháp khử trùng bằng $HgCl_2$ trên một số loài lan cho thấy nghiên cứu của chúng tôi cho hiệu quả khử trùng tốt hơn hoặc tương đương so những công bố trước đó [44], [45]. Theo Nguyễn Quỳnh Trang và cộng sự (2013) khi sử dụng $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 9 phút để khử trùng quả lan Giả hạc, kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm đạt 4,75% và tỷ lệ chồi tái sinh đạt 23,81% [44]. Ở nồng độ $HgCl_2$ 0,1% được sử dụng khử trùng cho quả lan Hoàng Thảo Vôi (*D. cretaceum* Lindley) trong thời gian 5 – 10 phút thu được tỷ lệ nhiễm lên tới 20% [45]. Như vậy, so sánh hai phương pháp khử trùng bằng $HgCl_2$ và phương pháp khử trùng bằng cồn 96º thì thấy rằng hai phương

pháp cho kết quả vô trùng là tương đương nhưng khử trùng bằng cồn sẽ an toàn hiệu quả, và khả năng nảy mầm tốt hơn.

Nghiên cứu cho thấy thời gian chiếu sáng ảnh hưởng lớn đến khả năng nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế. Thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày cho kết quả tốt nhất, với thời gian nảy mầm là 41,33 ngày, tỷ lệ hạt chết thấp nhất là 20,36%, tỷ lệ nảy mầm và hình thành protocorm lần lượt là 64,76% và 60,89% (Bảng 3.1 và bảng P12-3.1 phụ lục 12). Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Lê Thiên Vinh (2022) trên lan Giả hạc (*D. anosmum*) đột biến nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô *in-vitro* trong điều kiện chiếu sáng 8 giờ/ngày có tỷ lệ hạt này mầm là tốt nhất, tỷ lệ nảy mầm luôn lớn hơn 70%. Nghiên cứu của Sorgato và cộng sự (2020) cho thấy ảnh hưởng ánh sáng đến khả năng nảy mầm của hạt lan thuộc chi *Dendrobium.* Đối với loài *D. nobile* sau 16 giờ chiếu sáng/ngày cho tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 50,60%, đối với loài lan *D. phalaenopsis* tỷ lệ này thu được là 82,70% [178]. Kết quả phân tích có thể thấy thời gian chiếu sáng ảnh hưởng lớn đến khả năng nảy mầm của hạt lan và tùy từng loại lan thời gian chiếu sáng sẽ có ảnh hưởng khác nhau.

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

b.Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng tạo protocorm

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng nhiều đến quá trình nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc. Ở CT1 (MS) và CT4 (Hyp) là 2 loại môi trường phù hợp để gieo hạt lan Giả hạc tím Huế với thời gian này mầm, tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ hình thành protocorm và tỷ lệ hạt chết của hạt theo thứ tự là 41,33 ngày, 64,76 %, 60,89 %, 20,36 % (CT1) và 42,87 ngày, 63,08 %, 59,62 %, 22,71 % (CT4). Kết quả

được đánh giá kém nhất là CT5 (KC) với thời gian nảy mầm hạt kéo dài 62,93 ngày, tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp nhất 40,27 %, tỷ lệ hình thành protocorm chỉ đạt 29,29 % trong khi đó tỷ lệ hạt chết lên đến 52,65 % (Bảng 3.1 và bảng P12-3.2 phụ lục 12). Những công bố trước đây về môi trường dùng để gieo hạt lan Giả hạc cũng cho thấy sự thích hợp của 2 loại môi trường MS và Hyp. Nghiên cứu của Lê Thị Luận và cộng sự (2020) về nhân giống *in-vitro* cây lan Giả hạc Hawaii (*D. adastra*) đã dùng môi trường MS cho tất cả các thí nghiệm khảo sát và đều cho kết quả rất tốt, đối với giai đoạn gieo hạt có tỷ lệ nảy mầm lên đến 98,5 % khi môi trường có bổ sung thêm kích thích sinh trưởng BA [118]. Môi trường MS cũng phù hợp với cây lan *D. antennatum* Lindl cho tỷ lệ nảy mầm đạt 100 % trong 37,8 ngày [149]. Môi trường Hyp phù hợp với lan *Dendrobium* 'Iriana Jokowi' tỷ lệ nảy mầm đối với hạt lan này trên môi trường Hyp là 92,86 % sau 3 tháng gieo [160]. Môi trường Hyp là một môi trường dinh dưỡng thương mại được sử dụng trong môi trường nuôi cấy để hạt giống lan nảy mầm và tái sinh cây con từ thể PLB có hiệu quả giống môi trường MS [160].

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

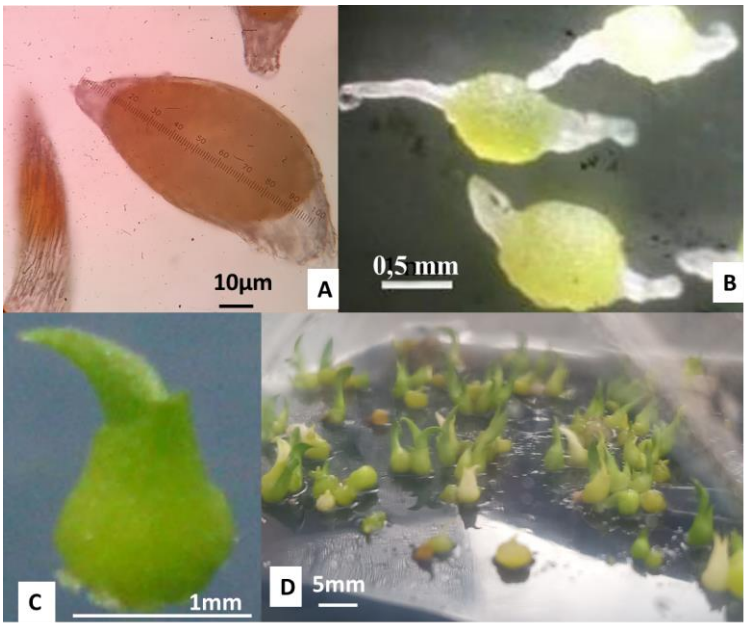
c. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm

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

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

tỷ lệ hình thành protocorm và tỷ lệ hạt chết lần lượt là 23,27 ngày, 93,46 %, 88,75 % và 4,43 %, kết quả này tốt hơn cả CT5 (Bảng 3.1, bảng P12-3.3 phụ lục 12). Tương tự CT6 khi tăng nồng độ NAA lên 1 mg/L kết quả lại giảm đi ở CT11 cụ thể thời gian nảy mầm của hạt là 29,53 ngày; tỷ lệ hạt nảy mầm là 84,68 %; tỷ lệ hình thành protocorm là 78,66 %; và tỷ lệ chết của hạt là 13,61 % (CT11, bảng P12-3.3 phụ lục 12), điều này chứng tỏ khi nồng độ kích thích sinh trưởng quá cao dẫn đến sự ức chế quá trình nảy mầm hình thành protocorm. Kết quả nghiên cứu trên lan Giả hạc (*D.anosmum*) của một số tác giả khác cũng cho thấy hiệu quả của kích thích sinh trưởng BA và NAA đối với khả năng nảy mầm và tạo protocorm của hạt luôn cho tỷ lệ rất cao trên 85 % [11], có trường hợp đạt 100 % [48].

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

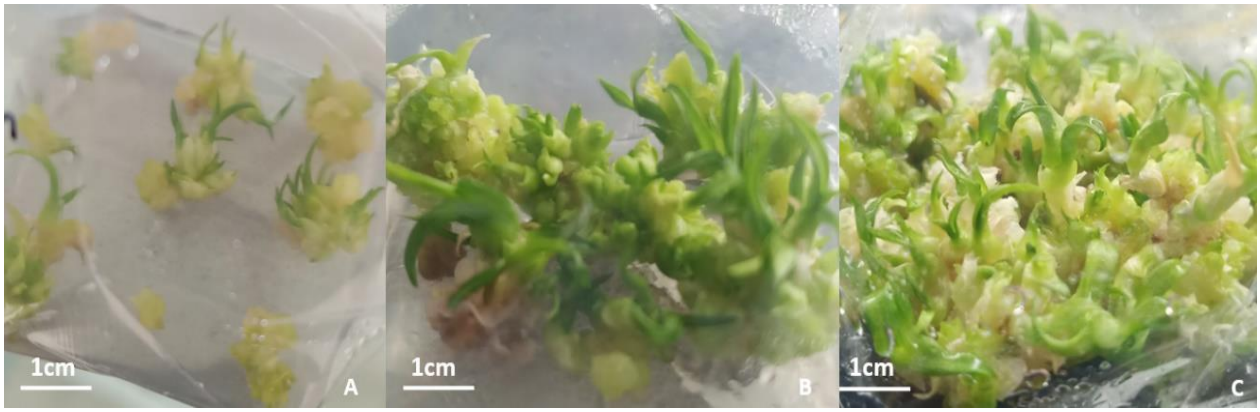


Hình 3.2. Các giai đoạn phát triển của hạt lan Giả hạc tím Huế được gieo trên môi trường MS + 0,75 mg/L NAA+ 0,5 mg/L BA, được chiếu sáng 8 giờ/ngày. (*A. Hạt lan mới lấy ra khỏi quả; B. Hạt lan gieo được 15 ngày; C. Protocrom hình thành từ hạt nảy mầm được 25 ngày; D. Protocrom hình thành từ hạt nảy mầm được 35 ngày.)*

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

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

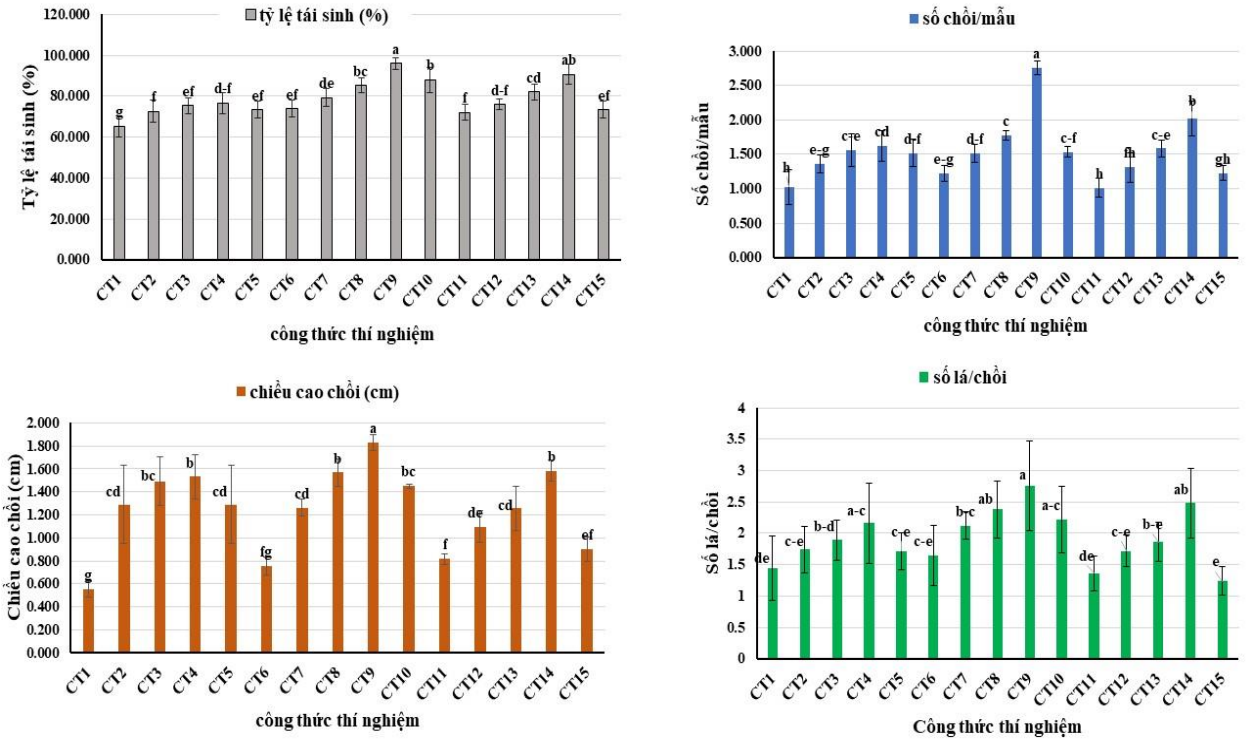
Kết quả nghiên cứu cho thấy tái sinh chồi từ protocorm rất hiệu quả trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA. Ở CT1 không bổ sung kích thích sinh trưởng cho kết quả tái sinh tương đối thấp với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 65,33 %, số chồi là 1,03 chồi/mẫu, chồi cao 0,55 cm và có số lá là 1,44 lá. Kết quả này tốt hơn khi môi trường bổ sung thêm BA và NAA, kết quả tốt nhất được ghi nhận ở CT9 khi bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 96,00 %, số chồi là 2,76 chồi/mẫu, chồi cao 1,83 cm và số lá của chồi là 2,76 lá (Hình 3.3, 3.4, bảng 3.1, bảng P12-3.4 phụ lục 12). Bổ sung kích thích sinh trưởng thấp hoặc cao hơn ngưỡng ở CT9 đều cho kết quả không tốt bằng CT9, điều này có thể do tỷ lệ auxin và cytokinin không phù hợp dẫn đến ức chế trong quá trình tái sinh chồi.



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

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Hải Yến và Nguyễn Thu Hương (2021) trên lan Giả hạc *D.anosmum* cũng cho thấy sự tương đồng, tác giả sử dụng BA và NAA để kích thích quá trình tái sinh chồi, nồng độ tốt nhất của nghiên cứu là 2 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA cho tỷ lệ tái sinh chồi 97,87 %, chồi xanh khoẻ [48]. Một nghiên cứu đáng chú ý khác khi nhân giống lan Giả hạc *D.anosmum* ở Hoà Bình của Nguyễn Thị Hải và cộng sự (2022) đã cho kết quả tỷ lệ tái sinh chồi từ protocorm đạt 100 % ở tất cả các thí nghiệm, tuy nhiên chồi ở môi trường có kích thích sinh trưởng thì cao hơn (0,69 cm) so với môi trường không

có kích thích sinh trưởng (0,33 cm) [146]. Kết quả này có sự khác biệt với nghiên cứu của chúng tôi về tỷ lệ tái sinh chồi, nguyên nhân có thể do khác nhau về giống lan, về chất lượng hạt được gieo và thành phần môi trường được sử dụng.



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

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

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

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

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

TT	Giai đoạn nhân giống		Điều kiện tối ưu	Kết quả thử nghiệm
1	Vào mẫu bằng đoạn thân	Khử trùng mẫu	-Xử lý mẫu bằng NaClO 2% và $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút (CT6).	-Mẫu sạch đạt tỷ lệ 66,67%, tỷ lệ mẫu chết 22,22%, tỷ lệ nhiễm của mẫu thấp 11,11%.
		Môi trường	- CT1: Môi trường MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa, pH 5,8. - CT4: Môi trường Hyp loại 20N-20P-20K 1 g/L + 1 g/L loại 6,5N-6P-19K) + 2 g peptone + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose, pH 5,8	-Tỷ lệ sống của mẫu 66,33 %, tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu 17,67 % và kích thước mô sẹo là 0,65 cm (CT1). -Tỷ lệ sống của mẫu là 71,00 %; tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu 14,67 % và và kích thước mô sẹo là 0,67 cm (CT4).
2	Tạo mô sẹo		- Môi trường dinh dưỡng bổ sung kết hợp 1,5 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA	-Thời gian hình thành mô sẹo 32,07 ngày, tỷ lệ sống của mẫu 86,67 %, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo là 64,33 % và kích thước mô sẹo đạt được là 0,97 cm
3	Tái sinh chồi	Từ đoạn thân	- Môi trường dinh dưỡng bổ sung 1,5 mg/L BA	-Tỷ lệ tái sinh chồi 88,89 %, số chồi trên một mẫu đạt 2,33 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi đạt 1,57 cm, có 3,24 lá/chồi.
		Từ mô sẹo	Môi trường dinh dưỡng bổ sung 1,5 mg/L BA với 0,5 mg/L NAA	-Tỷ lệ tái sinh chồi 78,67 %, số lượng chồi đạt 2,58 chồi/mẫu, chiều cao chồi là 1,71 cm và có số lá là 2,92.

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

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả khử trùng mẫu khi kết hợp giữa NaClO 2% và $HgCl_2$ 0,1% là tốt hơn so với kết hợp giữa NaClO 2% và H_2O_2 3%. Công thức thí nghiệm xử lý mẫu bằng NaClO 2% và $HgCl_2$ 0,1% trong 15 phút là cho tỷ lệ nhiễm chỉ 4,67%, tỷ

lệ mẫu sạch thu được đạt 31,33% nhưng mẫu chết chiếm tỷ lệ cao (64,08%). Trong khi đó, công thức có kết quả tốt nhất là khi xử lý mẫu bằng NaClO 2% và $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút (CT6) thu được mẫu sạch đạt tỷ lệ cao nhất (66,67%) và tỷ lệ mẫu chết chiếm tỷ lệ thấp (22,22%), và tỷ lệ nhiễm của mẫu thấp (11,11%) (Bảng 3.2. và bảng P12-3.5 phụ lục 12). Các công thức thí nghiệm phối hợp khác đều cho tỷ lệ mẫu sạch thấp, dao động từ 0 đến 33,33%, tương ứng với tỷ lệ mẫu nhiễm cao, dao động từ 44,44% đến 100% (Bảng P12-3.5 phụ lục 12). Việc tiếp xúc lâu dài với $HgCl_2$ có thể gây độc hoặc gây thoái hóa mô dẫn đến số lượng mẫu chết tăng lên (CT7, Bảng P12-3.5). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với quan sát của Hashim và cộng sự (2021) khi thực hiện khử trùng trên loài *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau [94].

Phương pháp khử trùng mẫu sử dụng hoá chất (NaOCl, EtOH, Tween 20 và $HgCl_2$) với các nồng độ khác nhau đối với cây lan trong nuôi cấy *in-vitro* cũng đã được nhiều tác giả công bố [83], [107]. Nghiên cứu của Dohling và cộng sự (2012) sử dụng phối hợp giữa NaClO 10% trong 10 phút và $HgCl_2$ 0,1% trong 2 phút đối với loài lan *D. longicornu* Lindl thu được tỷ lệ sống gần 90% [79]. Một nghiên cứu phối hợp khác giữa các chất khử trùng bao gồm EtOH 70% và $HgCl_2$ 0,1% trên loài lan *D. candidum* Wall ex Lindl cũng thu được tỷ lệ sống khá cao lên đến 97% [103]. Một nghiên cứu mới đây trên lan *D. anosmum* của Vì Thị Xuân Thuỷ và cộng sự (2022), khử trùng đoạn thân bằng HgCl2 0,1% trong 9 phút kép, đạt tỷ lệ mẫu sống, sạch cao nhất (47,86%) [42]. Kết quả của nghiên cứu này trên lan *D. anosmum* cơ bản thấp hơn các công bố trước đó, điều này có thể do mẫu thu thập có nguồn gốc tự nhiên thời gian thuần dưỡng chưa lâu nên còn lẫn tạp nhiều loài vi khuẩn và nấm trong đó có các vi sinh vật nội sinh. Mặt khác, có thể do loài lan *D. anosmum* nhạy cảm với các chất khử trùng trong đó có $HgCl_2$ hơn so với nhiều loài lan khác thuộc chi *Dendrobium* [191].

Như vậy, có thể thấy phương pháp khử trùng tốt nhất cho đoạn thân lan Giả hạc tím Huế là dùng kết hợp 2 chất khử trùng NaClO 2% và $HgCl_2$ 0,1% xử lý mẫu trong 10 phút.

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

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường phù hợp để hình thành mô sẹo từ đoạn thân có chồi ngủ của lan Giả hạc tím Huế là CT1 (MS) và CT4 (Hyp). Cụ thể kết quả tỷ lệ sống của mẫu, tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu và kích thước mô sẹo của CT1 là 66,33 %; 17,67 %; 0,65 cm; ở CT4 là 71,00 %; 14,67 % và 0,67 cm tuy kết quả có sự khác nhau nhưng không sai khác về mặt thống kê. Tuy nhiên, thời gian hình thành mô sẹo của 2 môi trường khác nhau, ở CT1 thời gian này là 69,60 ngày, đối với môi trường CT4 là 75,80 ngày. Trong các môi trường thí nghiệm, môi trường CT3 (VW) cho kết quả kém nhất với thời gian hình thành mô sẹo lên đến 94,50 ngày, tỷ lệ sống của mẫu chỉ đạt 45,67 %, tỷ lệ hình thành mô sẹo của mẫu rất thấp đạt 6,33 % và kích thước mô sẹo là 0,29 cm. Hai môi trường còn lại CT2 (1/2 MS) và CT5 (KC) có kết quả không tốt bằng hai môi trường CT1 và CT5 (Bảng P12-3.6 phụ lục 12)

Một số công bố về nghiên cứu tạo mô sẹo từ cơ quan sinh dưỡng của thực vật như nghiên cứu sự hình thành mô sẹo phát sinh phôi sinh dưỡng và cây con từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống địa lan lai vàng hoàng hậu (*Cymbidium hybrid* "fx750") của Trần Thị Ngọc Lan và Trần Thị Hoàn Anh (2017), đã cho thấy môi trường MS phù hợp với quá trình tạo protocorm-like bodie (PLB) hoặc mô sẹo, khi môi trường không bổ sung kích thích sinh trưởng thì tỷ lệ hình thành là 40 %, tỷ lệ này tăng lên 46 - 53 % khi môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng NAA và BA [25]. Thực hiện nhân giống *in-vitro* từ mẫu chồi cây lan *D. aurantiacum* của Nyuk Ling Ma và cộng sự (2020) cũng đã sử dụng môi trường dinh dưỡng MS cho quá trình cảm ứng tạo mô sẹo. Mô sẹo đã hình thành được trên môi trường này dù không có hormone sinh trưởng tỷ lệ hình thành rất cao lên đến 100 %, tuy nhiên thời gian hình thành lâu hơn so với các thí nghiệm môi trường có bổ sung kích thích sinh trưởng [126]. Qua kết quả nghiên cứu và phân tích chứng tỏ môi trường MS rất phù hợp cho quá trình cảm ứng tạo mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế.

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

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả của việc bổ sung kích thích sinh trưởng vào môi trường để kích thích tạo mô sẹo. Ở CT1 làm đối chứng không dùng kích thích sinh trưởng thì cho kết quả kém nhất, thời gian hình thành mô sẹo trung bình 69,60 ngày, tỷ lệ sống của mẫu 66,33 %, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo là 17,67 % và kích thước mô sẹo đạt được là 0,65 cm. Kết quả được cải thiện tốt hơn khi môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng, đạt kết quả tốt nhất được ghi nhận ở CT8 khi kết hợp 1,5 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA cụ thể là với thời gian hình thành mô sẹo 32,07 ngày, tỷ lệ sống của mẫu 86,67 %, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo là 64,33 % và kích thước mô sẹo đạt được là 0,97 cm (Bảng 3.2 và bảng P12-3.7 phụ lục 12). Khi nồng độ TDZ thấp hơn hoặc cao hơn nồng độ ở CT8 thì cho kết quả không tốt bằng, điều này cũng cho thấy nếu nồng độ kích thích sinh trưởng thấp thì không đủ để kích thích cảm ứng để tạo mô sẹo, ngược lại nếu nồng độ cao thì gây hại hoặc ức chế việc hình thành mô sẹo của mẫu lan Giả hạc tím Huế.

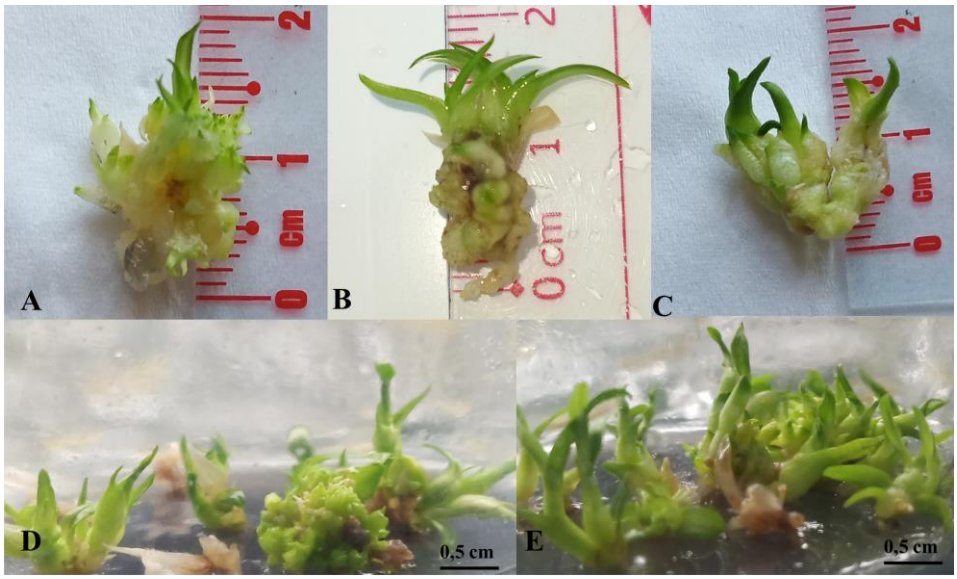
Nhiều nghiên cứu có liên quan đến chất điều hoà sinh trưởng ảnh hưởng đến khả năng hình thành mô sẹo trong nuôi cấy *in-vitro* trên nhiều đối tượng cây trồng trước đây đã được thực hiện, như nghiên cứu của Trần Trung Kiên và cộng sự (2021), nhân giống *in-vitro* cây lan Giả hạc 5 cánh trắng Phú Thọ (*D. anosmum*), đã ghi nhận với môi trường dinh dưỡng MS có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng TDZ và 2,4 D thì cho tỷ lệ tạo mô sẹo rất tốt, kết quả tốt nhất khi sử dụng 0,5 mg/L TDZ và 1,5 mg/L 2,4D thì tỷ lệ tạo mô sẹo từ đoạn thân đạt 56,29 % [110]. Trong nghiên cứu giống *in-vitro* lan kiếm phan trí (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) của Nguyễn Thị Điệp và Huỳnh Thị Kim (2020) đã cho thấy khi bổ sung chất điều hoà sinh trưởng vào môi trường dinh dưỡng MS thì cho kết quả tạo mô sẹo rất tốt, nồng độ cho kết quả tốt nhất để tạo mô sẹo cho lan này là 3 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA với tỷ lệ tạo mô sẹo 64,44 % [9]. Một nghiên cứu khác của Pyati (2023) về tái sinh *in-vitro* loài lan *D. crepidatum* Lindl. & Paxton thông qua sự phát triển của các thể giống protocorm,

đã ghi nhận kết quả tốt nhất ở môi trường dinh dưỡng ½ MS có bổ sung 1 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA cho tỷ lệ hình thành mô sẹo lên đến 83,3 % [158]. Những kết quả này khá tương đồng với kết quả nghiên cứu trong luận án, điều này cho thấy các chất khích thích sinh trưởng BA, NAA và TDZ phù hợp để khích thích quá trình tạo mô sẹo cho lan Giả hạc tím Huế.

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

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

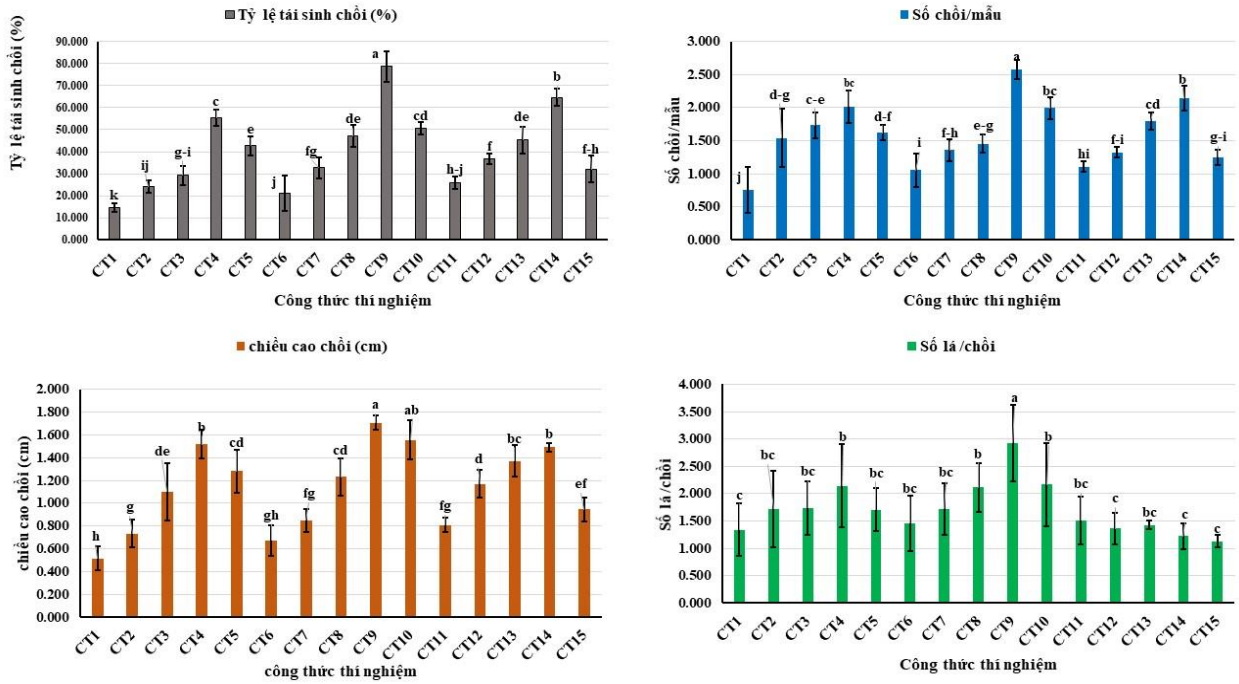
Chất điều hoà sinh trưởng là nhân tố quan trọng trong giai đoạn tái sinh chồi, BA và NAA là 2 chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng trong thí nghiệm này. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở biểu đồ hình 3.6, hình 3.5 và bảng P12-3.8 phụ lục 12 sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy. *A. Đối chứng, môi trường không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng; B. Môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA; C. Môi trường có bổ sung 1 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA; D. Chồi trong bì môi trường có bổ sung 2 mg/L BA; E. Chồi trong bì môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA.*

Kết quả thí nghiệm cho thấy với việc bổ sung 1,5 mg/L BA với 0,5 mg/L NAA vào môi trường dinh dưỡng đã đem lại hiệu quả rất tốt khi tái sinh chồi từ mô sẹo của lan Giả hạc tím Huế, với tỷ lệ tái sinh chồi 78,67 %, số lượng chồi đạt 2,58 chồi/mẫu, chiều cao chồi là 1,71 cm

và có số lá là 2,92 (CT9), kết quả này cao hơn rất nhiều so với đối chứng không sử dụng kích thích sinh trưởng với tỷ lệ tái sinh chồi là 14,68 %; số lượng chồi đạt 0,76 chồi/mẫu; chiều cao chồi là 0,51 cm và chồi có số lá 1,34 (Hình 3.5, 3.6, bảng P12-3.8 phụ lục 12). Khi nồng độ BA vượt ngưỡng 1,5 mg/L thì hiệu quả tái sinh chồi giảm đi, điều này cho thấy nồng độ BA quá cao sẽ gây ức chế lại quá trình tái sinh mô sẹo. Mặc khác, việc kết hợp với NAA cũng có tác dụng rất lớn, nồng độ NAA sử dụng ở 0,5 mg/L đem lại hiệu quả tốt hơn khi sử dụng ở nồng độ 1 mg/L (Hình 3.5, 3.6, bảng P12-3.8 phụ lục 12).



Hình 3.6: Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy. *Các chữ cái giống nhau trên cột cùng màu cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê (p < 0,05, Duncan's test)*

Trong một công bố của Silpa và Thomas (2021), tái sinh chồi từ mô sẹo của cây *Gymnostachyum febrifugum* Benth., tác giả sử dụng chất điều hoà sinh trưởng TDZ, BA, và NAA bổ sung vào môi trường dinh dưỡng MS để kích thích tạo chồi từ mô sẹo. Kết quả tốt nhất ghi nhận với tỷ lệ tái sinh chồi lên đến 94 %, và có số chồi trung bình đạt 44,6 chồi/mẫu khi sử dụng 2 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA [173]. Một nghiên cứu khác của

Ashok N. Pyati (2021) về nhân giống *in-vitro* lan *D. jerdonianum* Wight., nghiên cứu đã sử dụng chất điều hoà sinh trưởng TDZ, NAA, và BA để kích thích tạo chồi từ mô sẹo. Kết quả tốt nhất được ghi nhận khi môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,5 µm NAA và 4,54 µm TDZ, tỷ lệ tạo chồi đạt được 89,1 % [159]. Những kết quả nghiên cứu này có sự khác biệt với kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án, điều này có thể do mô sẹo lan Giả hạc tím Huế nhạy cảm với chất điều hoà sinh trưởng NAA và BA hơn so với *các loài khác*. Tuy nhiên nghiên cứu của luận án cũng khẳng định PGR có vai trò quan trọng với quá trình tái sinh chồi từ mô sẹo.

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

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

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

Hình 3.7. Tái sinh chồi *in-vitro* từ đoạn thân Giả hạc tím Huế (Nguyễn Hữu Thọ, 2023).
A.Tái sinh chồi in-vitro từ đoạn thân lan Giả hạc tím Huế sau 2 tuần nuôi cấy; B. Tái sinh chồi in-vitro từ đoạn thân lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA.

Từ kết quả bảng 3.2 và bảng P12-3.9 phụ lục 12 đã cho thấy sự ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh của chồi. Ở công thức đối chứng không sử dụng

BA thì kết quả kém nhất cụ thể tỷ lệ tái sinh chồi là 12,67 %; số chồi là 0,67 chồi/mẫu, chiều cao của chồi 0,56 cm, chồi có 1,89 lá trong khi đó công thức thí nghiệm có bổ sung 1,5 mg/L BA vào môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ tái sinh chồi lên đến 88,89 %, số chồi trên một mẫu đạt 2,33 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi đạt 1,57 cm, có 3,24 lá/chồi. Khi tăng nồng độ BA trong môi trường lên 2,0 mg/L thì kết quả thí nghiệm giảm xuống đáng kể với tỷ lệ tái sinh chồi 55,56 %, số chồi 1,67 chồi/mẫu, chiều cao trung bình chồi 1,07 cm và có 2,21 lá. Theo thí nghiệm này thì chứng tỏ với nồng độ BA 1,5 mg/L là nồng độ phù hợp cho sự tái sinh chồi của lan Giả hạc tím Huế từ đoạn thân. Sử dụng môi trường MS kết hợp với nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng khác nhau đã được sử dụng trong các nghiên cứu trước để nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và chồi bên của các giống lan. Trong công bố của Song và cộng sự (2013) cũng đưa ra kết luận rằng chồi ngủ đoạn thân của lan *D. officinale* hình thành mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L NAA [177]. Theo công bố của Vì Thị Xuân Thuỷ và công sự (2022) thì môi trường MS bổ sung 1,5mg/L là tốt nhất cho khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân lan *D. anosmum* với tỷ lệ tái sinh chồi là 72,58 %, chồi to khoẻ, xanh mướt [42].

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

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

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

Số liệu bảng 3.3 cho thấy, chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo chồi của lan Giả hạc tím Huế, môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cho hệ số nhân chồi (2,33 - 6,00 lần) vượt xa so với đối chứng (chỉ 1,13 lần). Môi trường dinh

dưỡng nuôi cấy bổ sung BA và IAA kết quả ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi và chất lượng chồi. Môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung 1,5 mg/L BA cho hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 2,33 lần, chồi nhỏ, màu xanh nhạt. Giữ nguyên nồng độ BA là 1,5 mg/L và bổ sung thêm nồng độ IAA đã làm tăng hệ số nhân chồi, chất lượng chồi cũng tốt hơn. Thử nghiệm nồng độ IAA từ 0,1-0,7 mg/L, kết quả thu được tốt nhất ở nồng độ IAA lên 0,5 mg/L thì hệ số nhân chồi cao nhất đạt 6,00 lần, chồi sinh trưởng tốt, to mập và có màu xanh lá đậm. Tiếp tục tăng nồng độ IAA lên 0,7 mg/L thì nhận thấy hệ số nhân chồi giảm xuống, chất lượng chồi cũng không tốt, chồi nhỏ và yếu. Trong một công bố trước đây đã cho thấy môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L α-NAA, kết quả được ghi nhật là tốt nhất với hệ số nhân là 8,33 lần, chồi to khoẻ, có màu xanh đậm [42].

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

Công thức	Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ IAA (mg/L)	Hệ số nhân	Chiều cao chồi (cm)	Đường kính chồi (cm)	Số lá/chồi	Đặc điểm chồi
CT1	0,0	0,0	$1,13 \pm 0,1^{e}$	$1,23 \pm 0,1^{d}$	$0,23 \pm 0,01^{c}$	$2,00 \pm 0,2^{c}$	Chồi nhỏ yếu, màu xanh hơi vàng.
CT2	1,5	0,0	$2,33 \pm 0,3^{d}$	$1,74 \pm 0,1^{c}$	$0,29 \pm 0,04^{c}$	$2,00 \pm 0,2^{c}$	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt.
CT3	1,5	0,1	$3,33 \pm 0,3^{c}$	$2,10 \pm 0,1^{b}$	$0,36 \pm 0,04^{b}$	$3,67 \pm 0,2^{b}$	Chồi trung bình, màu xanh nhạt.
CT4	1,5	0,3	$4,30 \pm 0,3^{b}$	$2,04 \pm 0,1^{b}$	$0,38 \pm 0,02^{b}$	$4,32 \pm 0,3^{a}$	Chồi mập, cao, màu xanh đậm.
CT5	1,5	0,5	$6,00 \pm 0,3^{a}$	$3,03 \pm 0,1^{a}$	$0,51 \pm 0,08^{a}$	$4,70 \pm 0,2^{a}$	Chồi mập, cao, màu xanh đậm.
CT6	1,5	0,7	$3,67 \pm 0,3^{bc}$	$2,13 \pm 0,1^{b}$	$0,35 \pm 0,04^{b}$	$3,67 \pm 0,2^{b}$	Chồi trung bình, màu xanh nhạt.

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

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

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

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

Giai đoạn cuối cùng trong nhân giống *in-vitro* là hình thành rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Giai đoạn này đảm bảo chồi ra rễ đồng đều và đạt tỉ lệ sống cao khi đem ra vườn ươm, chồi sử dụng cho thí nghiệm này phải đủ điều kiện là có từ 3-4 lá, và cao 3-4 cm. Vai trò chất điều hoà sinh trưởng mang tính chất quyết định là nhóm auxin, đây là nhóm chất có tác dụng lên tầng phát sinh của mẫu nuôi cấy và đặc biệt trong giai đoạn này có tác dụng hình thành rễ [70]. Chồi lan Giả hạc tím Huế được cấy vào môi trường MS cơ bản có bổ sung thêm 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa, 30 g/L sucrose, 7,0 g/L agar, 0,7 g/L than hoạt tính, và các chất điều hoà sinh trưởng (NAA, IAA) ở các nồng độ khác nhau. Kết quả sau 8 tuần được thể hiện ở bảng 3.4.

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

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

Công thức	Chất điều hoà sinh trưởng (mg/L)		Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Đặc điểm hình thái rễ, chồi
	IAA	NAA				
CT1	0,0	0,0	100	$1,60 \pm 0,2^{e}$	$1,19 \pm 0,1^{f}$	+
CT2	0,1	0,0	100	$2,67 \pm 0,3^{d}$	$1,49 \pm 0,3^{ef}$	+
CT3	0,3	0,0	100	$3,20 \pm 0,4^{cd}$	$1,83 \pm 0,3^{de}$	++
CT4	0,5	0,0	100	$4,27 \pm 0,3^{ab}$	$3,24 \pm 0,2^{b}$	+++
CT5	0,7	0,0	100	$3,67 \pm 0,4^{bc}$	$2,62 \pm 0,1^{c}$	+++
CT6	1,0	0,0	100	$3,33 \pm 0,4^{cd}$	$1,90 \pm 0,2^{de}$	++
CT7	0,0	0,1	100	$2,53 \pm 0,3^{d}$	$1,70 \pm 0,2^{de}$	++
CT8	0,0	0,3	100	$2,87 \pm 0,2^{cd}$	$2,40 \pm 0,2^{c}$	++
CT9	0,0	0,5	100	$3,33 \pm 0,2^{cd}$	$3,39 \pm 0,2^{b}$	+++
CT10	0,0	0,7	100	$4,60 \pm 0,4^{a}$	$3,96 \pm 0,2^{a}$	+++
CT11	0,0	1,0	100	$3,13 \pm 0,3^{cd}$	$2,17 \pm 0,2^{cd}$	++

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

Nghiên cứu của Đặng Thị Thắm và cộng sự (2018) cho thấy hiệu quả ra rễ trên môi trường ½ MS có bổ sung 0,5 mg/L NAA phù hợp cho quá trình tái sinh rễ *in-vitro* của *D. heterocarpum* Lindl. Số lượng rễ trung bình trên mỗi chồi là 4,4 và chiều dài trung bình là 3,12 cm. Trong môi trường chứa 0,5 mg/L IAA, số lượng rễ trung bình trên mỗi chồi là 1,8

với chiều dài 1,66 cm [76]. Lê Thị Luận và cộng sự (2020), đã tiến hành nhân giống lan *D. adastra* trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA, là môi trường tối ưu cho sự ra rễ của *D. adastra* với 4,13 rễ trên mỗi chồi và chiều dài 1,42 cm [118]. Như vậy kết quả nghiên cứu đã cho thấy 2 chất điều hoà sinh trưởng NAA, và IAA là phù hợp để kích thích cho chồi lan Giả hạc tím Huế ra rễ, và nó cũng có thể được ứng dụng trên các loài lan khác. Với môi trường dinh dưỡng được bổ sung 0,7 mg/L NAA là phù hợp nhất để kích thích chồi lan ra rễ.

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

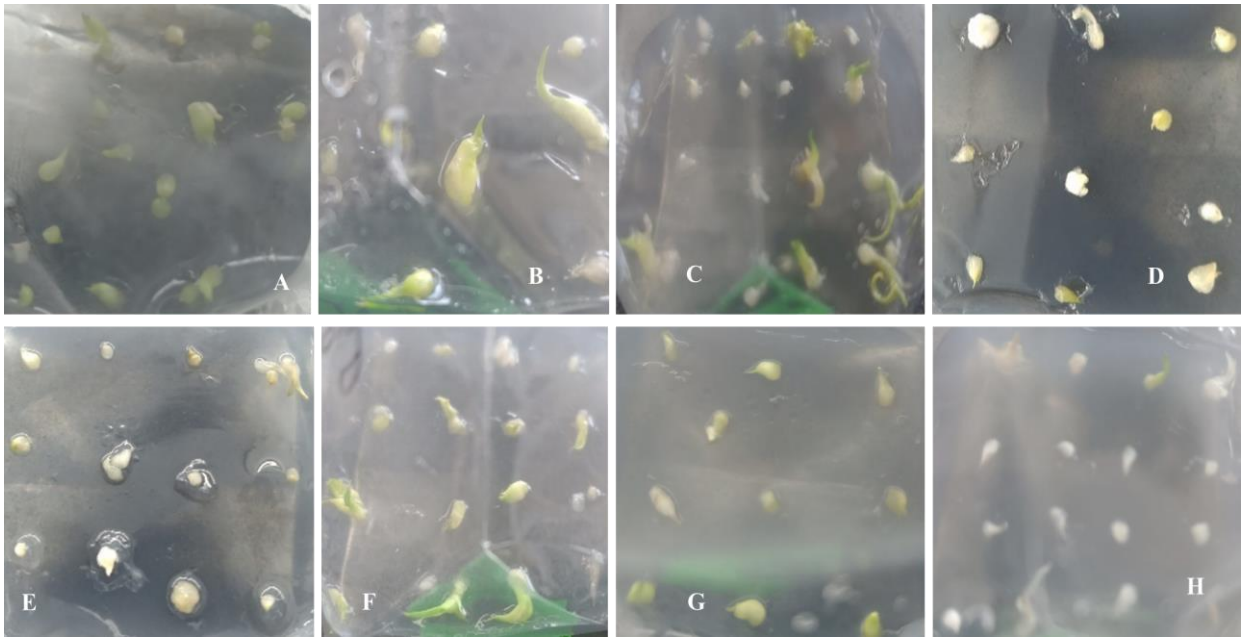
3.2 Tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

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

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

3.2.1.1 Gây đột biến trên protocorm lan Giả hạc tím Huế

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.5 và bảng 3.6 và hình 3.10. và hình 3.11. Sau thời gian 4 tuần nuôi cấy các thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của protocorm giảm dần khi nồng độ hoá chất và thời gian xử lý tăng lên. Những công thức thí nghiệm được xử lý colchicine và DMS ở nồng độ 800 ppm, thời gian xử lý 6, 8 và 10 giờ (CT_C15, CT_C20, CT_C25, CT_D20, CT_D25) protocorm bị chết 100%, chỉ riêng CT_D15 xử lý DMS vẫn còn 3,33% protocorm còn sống sót nhưng chưa có sự xuất hiện của mầm chồi, điều này cho thấy với nồng độ hoá chất 800 ppm xử lý trong 6-10 giờ là quá cao đối với protocorm. Với nồng độ hoá chất 800 ppm xử lý protocorm trong 2-4 giờ tỷ lệ sống thấp 3,33-11,11 % (CT_C5, CT_C10, CT_D5, CT_D10), những mẫu sống này chưa có mầm chồi hoặc có nhưng thấp (1,11 %). Những công thức còn lại đều có protocorm phát triển và có mầm chồi (Bảng 3.5; 3.6).

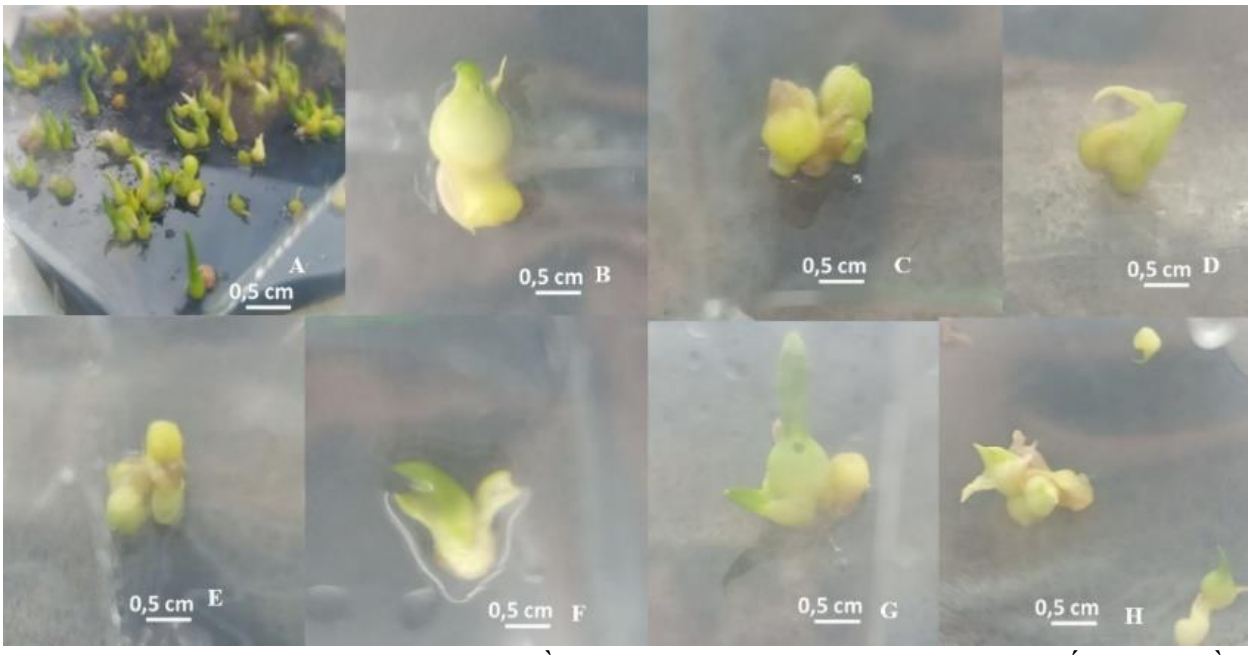


Hình 3.10. Hình thái protocorm sau khi xử lý bằng colchicine và DMS được nuôi cấy 4 tuần. *A. Đối chứng không xử lý hoá chất; B. Xử lý bằng colchicine 50 ppm trong 2 giờ; C. Xử lý bằng colchicine 200 ppm trong 4 giờ;; D. Xử lý bằng colchicine 400 ppm trong 10 giờ; E. Xử lý bằng colchicine 800 ppm trong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

Tỷ lệ mẫu sống cao nhất sau khi xử lý hoá chất với nồng độ là 50 ppm, xử lý trong 2 giờ cho kết quả đối với colchicine là 75,56 % (CT_C1), DMS là 87,22 % (CT_D1), bên cạnh đó số lượng mẫu có xuất hiện mầm chồi cũng đạt tỷ lệ cao nhất trong các thí nghiệm xử lý hoá chất, đạt 22,22 % khi xử lý colchicine và 43,89 % khi xử lý DMS. Kết quả này cho thấy với với nồng độ là 50 ppm, xử lý trong 2 giờ, mức độ tác động lên protocorm chưa cao. Khi nồng độ hoá chất xử lý tăng lên 200 ppm thấy có sự biến động lớn, tỷ lệ sống của mẫu chỉ đạt 57,78 % khi xử lý colchicine trong 2 giờ, tương tự khi xử lý bằng DMS là 51,11 %, tỷ lệ này còn giảm đi nhiều khi tăng thời gian xử lý lên 4, 6, 8, và 10 giờ. Tỷ lệ sống giảm đi nhỏ hơn 50 % khi nồng độ xử lý lớn hơn 400 ppm ở tất cả các khoảng thời gian xử lý và ở cả 2 loại hoá chất (Bảng 3.5; 3.6; hình 3.10).

Thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất, kết quả quan sát có sự khác biệt so với thời điểm 4 tuần. Tỷ lệ sống của mẫu giảm xuống, nhưng tỷ lệ protocorm có mầm chồi lại tăng lên, đặc biệt là có một số mẫu xuất hiện hình thái khác thường so với đối chứng. Hình thái của mẫu khác với đối chứng xuất hiện ngay ở công thức thí nghiệm CT_C1 (16,22 %,) và CT_D1 (7,83 %) (Bảng 3.5; 3.6) .

Thí nghiệm CT_C10, CT_D19, CT_D23 có tỷ lệ mẫu sống 2,22 % nhưng mẫu không có mầm chồi, mẫu có màu xanh nhạt hơi vàng, tăng trưởng kém chứng tỏ nồng độ và thời gian xử lý ở 3 công thức thí nghiệm này không phù hợp. Xử lý colchicine ở các công thức CT_C5, CT_C9, CT_C13, CT_C14, CT_C18, CT_C19, CT_C23, CT_C24 có tỷ lệ mẫu sống từ 1,11 – 15,56 %, có mầm chồi phát triển và đều biểu hiện hình thái khác biệt so với đối chứng, tỷ lệ phát sinh từ 1,11–13,33 %, khác biệt chủ yếu là hình dạng protocorm như phát triển không cân đối, không còn hình dạng bầu tròn như mẫu đối chứng, bề mặt xù xì, màu xanh không đều, hình dạng lá mầm dày hơn, xanh đậm, không còn thuôn dài như đối chứng và đặc điểm phát sinh chồi bị quắn phần đầu, mầm chồi to nhưng bề mặt có nhiều u gờ, thí nghiệm xử lý bằng colchicine có protocrom còn sống kích thước đa phần đều lớn hơn so với đối chứng và mẫu xử lý bằng DMS (Bảng 3.5; 3.6 và hình 3.10, 3.11). Kết quả này giống với các công thức thí nghiệm CT_D4, CT_D5, CT_D9, CT_D13, CT_D14, CT_D15, CT_D22, CT_D24 khi xử lý DMS, tuy nhiên tỷ lệ phát sinh chồi và có biến dị thấp hơn chỉ từ 1,11–5,56 % (Bảng 3.5; 3.6).



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

Công thức có số mẫu biểu hiện hình thái nhiều nhất ở xử lý hoá chất colchicine là CT_C7 (C.100 ppm - 4 giờ) kết quả cho được 35,56 % số mẫu có những thay đổi về kiểu hình và tỷ lệ mẫu sống, có mầm chồi đạt 46,64 % và có kích thước mẫu 0,62 cm, có thể thấy đây là một công thức rất có tiềm năng để tạo ra những dòng đột biến (Bảng 3.5, hình 3.11). Tỷ lệ tạo ra những thay đổi hình thái ở thí nghiệm xử lý bằng DMS thì thấp hơn, đạt kết quả cao nhất là 14,12 % ở CT_D6 (D.50 ppm - 4 giờ) xử lý bằng DMS; ngoài ra các công thức CT_D2, CT_D16 cũng có tỷ lệ hình thái biến dị cao là 13,37 % và 13,34 %. Những công thức thí nghiệm xử lý bằng DMS khác cho tỷ lệ hình thái biến dị dao động trong khoảng 1,11 – 11,36 %; còn thí nghiệm xử lý bằng colchicine là 11,11-31,67 % (Bảng 3.6).

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

Công thức	Nồng độ xử lý (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)	Chỉ tiêu theo dõi mẫu protocorm xử lý bằng colchicine						
			4 tuần			*8 tuần*			
			Tỷ lệ protocorm sống (%)	Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%)	Kích thước protocorm (cm)	Tỷ lệ protocorm sống (%)	Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%)	Tỷ lệ protocorm có thình thái biến dị (%)	Kích thước protocorm (cm)
ĐC	0		95,56±2,22^{a}	80,00±3,33^{a}	0,26±0,00^{fg}	86,68±3,33^{a}	70,00±1,92^{a}	0,00±0,00^{j}	0,45±0,01^{bc}
CT_C1	50	2	75,56±5,88^{b}	22,22±2,94^{b}	0,38±0,02^{a-e}	65,56±4,84^{b}	52,22±1,11^{bc}	16,22±2,26^{d-g}	0,61±0,06^{ab}
CT_C2	100	2	70,00±6,94^{b}	13,33±1,92^{cd}	0,39±0,03^{a-d}	60,00±5,77^{bc}	43,33±3,85^{cd}	18,89±2,22^{c-f}	0,61±0,03^{ab}
CT_C3	200	2	57,78±4,84^{c-e}	5,56±2,22^{ef}	0,37±0,03^{a-e}	55,56±4,01^{bc}	44,44±4,84^{cd}	27,44±3,23^{a-c}	0,65±0,05^{ab}
CT_C4	400	2	40,00±5,77^{gh}	0,00±0,00^{g}	0,29±0,04^{d-g}	28,89±6,19^{ef}	22,22±6,76^{g-i}	18,56±5,57^{c-f}	0,68±0,04^{a}
CT_C5	800	2	11,11±2,93^{l-o}	0,00±0,00^{g}	0,39±0,04^{a-d}	5,56±1,11^{k-n}	1,11±1,11^{mn}	1,11±1,11^{i}	0,63±0,04^{ab}
CT_C6	50	4	67,78±4,01^{bc}	20,00±1,92^{c}	0,35±0,01^{a-f}	64,44±4,01^{bc}	55,56±4,01^{b}	31,67±4,19^{ab}	0,60±0,04^{ab}
CT_C7	100	4	58,89±4,84^{cd}	11,11±1,11^{de}	0,31±0,02^{c-g}	54,44±4,01^{c}	46,64±5,09^{bc}	35,56±4,84^{a}	0,62±0,04^{ab}
CT_C8	200	4	44,44±4,84^{fg}	11,11±4,84^{de}	0,43±0,01^{a}	37,78±4,44^{de}	30,00±6,67^{e-g}	23,38±6,64^{b-e}	0,65±0,05^{ab}
CT_C9	400	4	14,44±2,94^{k-n}	1,11±1,11^{fg}	0,28±0,01^{e-g}	8,89±1,11^{i-n}	3,33±1,92^{mn}	3,33±1,92^{hi}	0,63±0,03^{ab}
CT_C10	800	4	4,44±1,11^{no}	1,11±1,11^{fg}	0,30±0,04^{c-g}	2,22±1,11^{n}	0,00±0,00^{n}	0,00±0,00^{j}	0,47±0,12^{bc}
CT_C11	50	6	52,22±2,22^{d-f}	18,89±2,94^{bc}	0,33±0,01^{a-g}	43,33±3,85^{d}	34,44±4,01^{d-f}	26,67±5,09^{a-d}	0,59±0,02^{ab}
CT_C12	100	6	44,44±4,84^{fg}	12,22±1,11^{d}	0,38±0,01^{a-e}	34,44±6,19^{d-f}	25,56±7,29^{e-h}	21,11±8,01^{b-f}	0,50±0,03^{a-c}
CT_C13	200	6	22,22±6,19^{i-l}	10,00±3,33^{de}	0,40±0,02^{a-c}	15,56±4,84^{hi}	7,78±4,01^{k-n}	7,78±4,01^{g-i}	0,56±0,01^{ab}
CT_C14	400	6	8,89±1,11^{m-o}	2,22±1,11^{f}	0,32±0,01^{b-g}	7,78±1,11^{i-n}	5,56±1,11^{l-n}	5,56±1,11^{g-i}	0,62±0,04^{ab}
CT_C15	800	6	0,00±0,00^{o}	0,00±0,00^{g}	0,00±00^{h}	0,00±0,00^{n}	0,00±0,00^{n}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{c}
CT_C16	50	8	47,78±1,11^{e-g}	18,89±1,11^{bc}	0,32±0,01^{b-g}	43,33±3,85^{d}	35,56±4,01^{de}	30,16±3,89^{ab}	0,58±0,01^{ab}
CT_C17	100	8	30,00±3,33^{hi}	13,33±1,92^{cd}	0,29±0,00^{d-g}	25,56±2,22^{fg}	24,44±2,94^{f-h}	18,89±2,22^{c-f}	0,58±0,01^{ab}
CT_C18	200	8	20,00±1,92^{i-m}	11,11±2,94^{de}	0,30±0,01^{c-g}	14,44±1,11^{i-l}	13,33±1,92^{i-l}	13,33±1,92^{e-h}	0,59±0,03^{ab}
CT_C19	400	8	5,56±1,11^{no}	1,11±1,11^{fg}	0,36±0,01^{a-e}	4,44±1,11^{l-n}	4,44±1,11^{l-n}	4,44±1,11^{hi}	0,62±0,03^{ab}
CT_C20	800	8	0,00±0,00^{o}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,01^{h}	0,00±0,00^{n}	0,00±0,00^{n}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{d}
CT_C21	50	10	23,33±3,85^{ik}	10,00±1,92^{de}	0,42±0,00^{a}	17,78±2,94^{gh}	16,67±1,92^{h-k}	12,22±2,22^{f-h}	0,62±0,02^{ab}
CT_C22	100	10	14,44±1,11^{k-n}	5,56±1,11^{ef}	0,36±0,02^{a-e}	13,33±1,23^{i-m}	12,22±1,11^{i-m}	11,11±2,22^{f-i}	0,63±0,03^{ab}
CT_C23	200	10	3,33±1,92^{no}	1,11±1,11^{fg}	0,30±0,08^{c-g}	3,33±1,92^{mn}	3,33±1,92^{mn}	3,33±1,92^{hi}	0,50±0,17^{a-c}
CT_C24	400	10	1,11±1,11^{no}	0,00±0,00^{g}	0,24±0,09^{gh}	1,11±1,11^{n}	1,11±1,11^{mn}	1,11±1,11^{i}	0,32±0,17^{cd}
CT_C25	800	10	0,00±0,00^{o}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{h}	0,00±0,00^{n}	0,00±0,00^{n}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{d}

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

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

Công thức	Nồng độ xử lý (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)	Chỉ tiêu theo dõi mẫu protocorm xử lý bằng *Dimethyl sulphate (DMS)*						
			4 tuần			8 tuần			
			Tỷ lệ protocorm sống (%)	Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%)	Kích thước protocorm (cm)	Tỷ lệ protocorm sống (%)	Tỷ lệ protocorm phát triển mầm chồi (%)	Tỷ lệ protocorm có hình thái biến dị (%)	Kích thước protocorm (cm)
ĐC	0	0	97,78±2,22^{a}	70,00±1,92^{a}	0,25±0,01^{a-c}	91,11±4,84^{a}	84,44±2,94^{a}	0,00±0,00^{i}	0,57±0,1^{a}
CT_D1	50	2	87,22±5,30^{b}	43,89±1,47^{b}	0,26±0,02^{ab}	71,22±2,86^{b}	48,56±1,83^{b}	7,83±0,92^{b-d}	0,46±0,01^{ab}
CT_D2	100	2	65,56±4,84^{c}	12,22±2,22^{e}	0,25±0,01^{a-c}	51,11±2,93^{d}	21,11±1,11^{de}	13,37±2,23^{a}	0,42±0,02^{b-d}
CT_D3	200	2	51,11±1,11^{d}	8,89±1,11^{ef}	0,22±0,01^{a-d}	40,00±1,92^{e}	17,78±1,11^{ef}	11,36±1,94^{ab}	0,37±0,01^{b-f}
CT_D4	400	2	17,78±1,11^{f}	4,44±1,11^{gh}	0,22±0,00^{a-d}	15,56±1,11^{gh}	5,56±1,11^{g-i}	5,56±1,11^{d-g}	0,39±0,01^{b-f}
CT_D5	800	2	8,89±1,11^{g}	0,00±0,00^{i}	0,20±0,01^{b-e}	6,67±0,06^{ij}	2,22±1,11^{h-j}	2,22±1,11^{f-h}	0,39±0,02^{b-e}
CT_D6	50	4	80,56±5,30^{b}	34,67±1,47^{c}	0,27±0,02^{a}	63,56±3,66^{c}	44,56±1,93^{b}	14,12±1,99^{a}	0,38±0,01^{b-f}
CT_D7	100	4	40,00±3,33^{e}	5,56±1,11^{fg}	0,26±0,00^{ab}	33,33±1,92^{f}	15,56±2,94^{f}	10,38±2,26^{a-c}	0,37±0,03^{b-f}
CT_D8	200	4	18,89±2,94^{f}	4,44±1,11^{gh}	0,20±0,00^{b-e}	12,22±2,22^{hi}	6,67±1,92^{gh}	4,33±0,55^{d-h}	0,38±0,01^{b-f}
CT_D9	400	4	5,56±1,11^{g}	0,00±0,00^{i}	0,18±0,01^{c-e}	3,33±1,92^{g}	1,11±1,11^{ij}	1,11±1,11^{gh}	0,34±0,07^{b-f}
CT_D10	800	4	3,33±1,92^{g}	1,11±1,11^{gh}	0,19±0,02^{c-e}	2,22±1,11^{g}	1,11±1,11^{ij}	1,11±1,11^{gh}	0,29±0,07^{d-f}
CT_D11	50	6	65,44±2,92^{c}	22,37±3,92^{d}	0,26±0,02^{ab}	57,78±4,84^{c}	31,70±2,17^{c}	10,69±1,75^{a-c}	0,36±0,04^{b-f}
CT_D12	100	6	18,89±2,94^{f}	4,44±1,11^{gh}	0,25±0,01^{a-c}	15,56±1,11^{gh}	8,89±1,11^{g}	6,80±1,93^{c-e}	0,35±0,01^{b-f}
CT_D13	200	6	7,78±2,22^{g}	1,11±1,01^{gh}	0,19±0,01^{c-e}	5,56±2,94^{ij}	3,33±1,92^{h-j}	3,33±1,92 $^{e-h}$	0,31±0,07^{c-f}
CT_D14	400	6	4,44±1,11^{g}	0,00±0,00^{i}	0,21±0,02^{a-e}	3,33±1,92^{j}	1,11±1,11^{ij}	1,11±1,11^{gh}	0,29±0,06^{d-f}
CT_D15	800	6	3,33±1,92^{g}	0,00±0,00^{i}	0,25±0.06^{a-c}	3,33±1,92^{j}	2,22±1,11^{h-j}	2,22±1,11^{f-h}	0,32±0,09^{b-f}
CT_D16	50	8	54,78±5,83^{d}	18,48±0,90^{d}	0,26±0,02^{ab}	48,78±2,44^{d}	23,78±2,34^{d}	13,34±2,24^{a}	0,45±0,03^{a-c}
CT_D17	100	8	17,78±1,11^{f}	3,33±0,87^{gh}	0,26±0,01^{ab}	14,44±1,11^{gh}	8,89±1,11^{g}	6,56±0,88^{c-f}	0,40±0,02^{b-d}
CT_D18	200	8	4,44±1,11^{g}	0,00±0,00^{i}	0,26±0,01^{ab}	3,33±0,00^{j}	2,22±1,11^{h-j}	1,11±1,11^{gh}	0,35±0,00^{b-f}
CT_D19	400	8	2,22±1,11^{g}	0,00±0,00^{i}	0,22±0,04^{a-d}	2,22±1,11^{j}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{i}	0,25±0,05^{fg}
CT_D20	800	8	0,00±0,00^{h}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{f}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{h}
CT_D21	50	10	25,34±5,09^{f}	12,78±1,47^{e}	0,26±0,02 ^{ab}	21,56±2,89^{g}	15,28±1,63^{f}	10,83±1,81^{a-c}	0,38±0,04^{b-f}
CT_D22	100	10	7,78±1,11^{g}	0,00±0,00^{i}	0,26±0,02^{ab}	6,67±1,92^{ij}	3,33±0,00^{h-j}	3,33±0,00^{e-h}	0,37±0,03^{b-f}
CT_D23	200	10	3,33±1,92^{g}	0,00±0,00^{i}	0,21±0,03^{a-e}	2,22±2,22^{j}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{i}	0,26±0,06^{e-g}
CT_D24	400	10	5,56±1,11^{g}	0,00±0,00^{i}	0,23±0,01^{a-d}	3,33±1,92^{j}	1,11±1,11^{ij}	1,11±1,11^{gh}	0,32±0,06^{b-f}
CT_D25	800	10	0,00±0,00^{h}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{f}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{h}

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

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

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

Kết quả 4 tuần nuôi cấy sau khi mô sẹo được xử lý colchicine cho thấy tỷ lệ sống của mô sẹo đạt cao nhất 57,78 % (CT_C1) so với đối chứng là 96,67 % điều này chứng tỏ mô sẹo chịu ảnh hưởng rất lớn bởi colchicine. Tỷ lệ sống của mô sẹo luôn thấp hơn 50 % khi xử lý bằng colchicine với nồng độ 200 ppm trở lên ở bất kỳ thời gian xử lý nào, tỷ lệ này thấp nhất ở các công thức CT_C15, CT_C20, CT_C25 với 0 % mẫu còn sống. Các thí nghiệm có mô sẹo xuất hiện mầm chồi rất thấp chỉ từ 1,11 – 22,22 % so với đối chứng thì tỷ lệ này là 85,56 %. Tuy nhiên kích thước của mô sẹo lại tăng, đạt giá trị cao nhất là 0,69 cm ở công thức đối chứng và 0,67 cm (CT_C13) (Bảng 3.7, hình 3.12).

Thí nghiệm xử lý bằng DMS sau 4 tuần có tỷ lệ sống cao nhất đạt 83,17 % (CT_D1). Tỷ lệ sống thấp nhất (0 %) ở các công thức CT_D20 và CT_D25 khi nồng độ DMS ở mức 800 ppm và thời gian xử lý là 8 giờ trở lên. Số lượng mô sẹo phát triển có mầm chồi khi xử lý bằng DMS cao nhất đạt 51,72 % (CT_D1) so với đối chứng là 76,67 %, các công thức thí nghiệm CT_D5, CT_D13, CT_D14, CT_D15, CT_D18, CT_D19, CT_D22, CT_D23, CT_D24 đều có mẫu sống nhưng mẫu chưa có phát triển xuất hiện mầm chồi. Đối với các công thức còn lại mẫu đều có xuất hiện mầm chồi với tỷ lệ từ 1,11 %-16,74 %. Những mô sẹo còn sống có kích thước dao động từ 0,51-0,63 cm so với ban đầu là 0,2-0,3 cm (Bảng 3.8; hình 3.12).

Kết quả sau 8 tuần theo dõi, cả hai thí nghiệm xử lý bằng colchicine và DMS kết quả so với thời điểm 4 tuần nuôi cấy thì đều cho thấy tỷ lệ mẫu sống có phần giảm xuống nhưng tỷ lệ mẫu có mầm chồi xuất hiện lại tăng lên, bên cạnh đó các mẫu mô sẹo phát triển cũng xuất hiện các hình thái khác biệt so với đối chứng. Giai đoạn 8 tuần sau khi xử lý colchicine, CT_C1 cho tỷ lệ mẫu sống 50 % và tỷ lệ mẫu có mầm chồi phát triển (40 %) cao nhất. Ở công thức thí nghiệm CT_C5, CT_C24 vẫn có mẫu sống với tỷ lệ lần lượt là 2,22 % và 1,11% tuy nhiên các mẫu này không phát triển được mầm chồi. Tỷ lệ mẫu có xuất hiện hình thái biến dị cao nhất là ở các công thức CT_C3, CT_C6, CT_C11 theo thứ tự là 24,67 %; 24,93 % và 25,69 %. Đối với các công thức CT_C10, CT_C14, CT_C19, CT_C23 có tỷ lệ mẫu sống rất thấp chỉ từ 1,11 %- 2,22 % nhưng đều phát triển

mầm chồi và có biểu hiện hình thái khác với đối chứng. Mô sẹo tăng trưởng đạt kích thước tốt nhất là CT_C11 (0,90 cm), ngoài các công thức có mẫu chết hoàn toàn thì những công thức còn lại mẫu đều có sự tăng trưởng kích thước từ 0,51-0,88 cm (Bảng 3.7; hình 3.13).

Khi được xử lý bằng DMS, tỷ lệ mô sẹo còn sống sau 8 tuần cao nhất đạt được là 73,62 %, tỷ lệ mầm chồi phát triển đạt 53,32 % tuy nhiên số mẫu có biểu hiện hình thái khác so với đối chứng thấp chỉ đạt 4,43 % (CT1). Công thức có số mẫu biến dị hình thái lớn nhất là 14,93 % (CT6), các công thức khác tỷ lệ này chỉ dao động ở mức 1,11-12,19 %. Khi xử lý mô sẹo bằng DMS với nồng độ 400 ppm trở lên trong thời gian 6-10 giờ các mẫu bị chết 100 % và ở nồng độ 800 ppm trong 2 giờ cũng có kết quả tương tự (Bảng 3.8). Kích thước của mẫu giai đoạn này đạt được trong khoảng 0,51 – 0,86 cm, cao nhất ở công thức đối chứng (0,86 cm) (Bảng 3.8; hình 3.13).

Mô sẹo đối chứng hình thái phát triển cân đối ra các hướng, có màu xanh lá nhạt, mầm chồi hình thành và phát triển đều, khối mô đặc mộng nước. Ngược lại, đối với các mô sẹo được xử lý hoá chất colchicine và DMS đều có sự khác biệt so với đối chứng, chủ yếu tập trung vào các đặc điểm như màu sắc, kích thước, hình dạng và đặc điểm mô. Những thay đổi cụ thể như mà xanh lá nhạt hơn và có ngã vàng, phát triển của mộ sẹo không đều theo các hướng, mô xốp. Một số ít mô sẹo có sự phát triển thành các phiến mỏng và một số bị chết một phần mô sẹo. Mầm chồi hình thành không đều, kích thước thước thường lớn đối với mô sẹo xử lý bằng colchicine.

Gây đột biến bằng sử dụng DMS được Mostafa (2015) sử dụng trên cây Xà cừ *(Khaya senegalensis)* để tạo ra các giống mới có đặc tính tốt hơn. Ông đã sử dụng hạt cây Xà cừ ngâm trong dung dịch DMS (0, 1000, 2000, 3000, 4000 và 5000 ppm) và trong 15 giờ. Kết quả đã ra cây có số cành, số lá tăng lên đáng kể, đồng thời các đặc điểm về hình dạng lá, màu của thân non, cuốn lá cũng thay đổi (từ xanh chuyển sang đỏ), đặc biệt là khả năng sinh trưởng được cải thiện tốt hơn [136]. Một công bố khác của Mostafa và Alhamd (2016) trên cây Cây hoa Huỳnh liên (*Tecoma stans)* đã sử dụng DMS (nồng độ 0, 200, 400, 600, 800 và 1000 ppm trong 15 giờ) để xử lý hạt mục tiêu tạo ra biến dị di truyền. Kết quả thu được các biến dị về tính trạng sinh dưỡng như hình dạng, kích thước lá, chiều cao cây, và một số đặc điểm biến dị ở số lượng, hình dạng và màu sắc hoa [137].

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

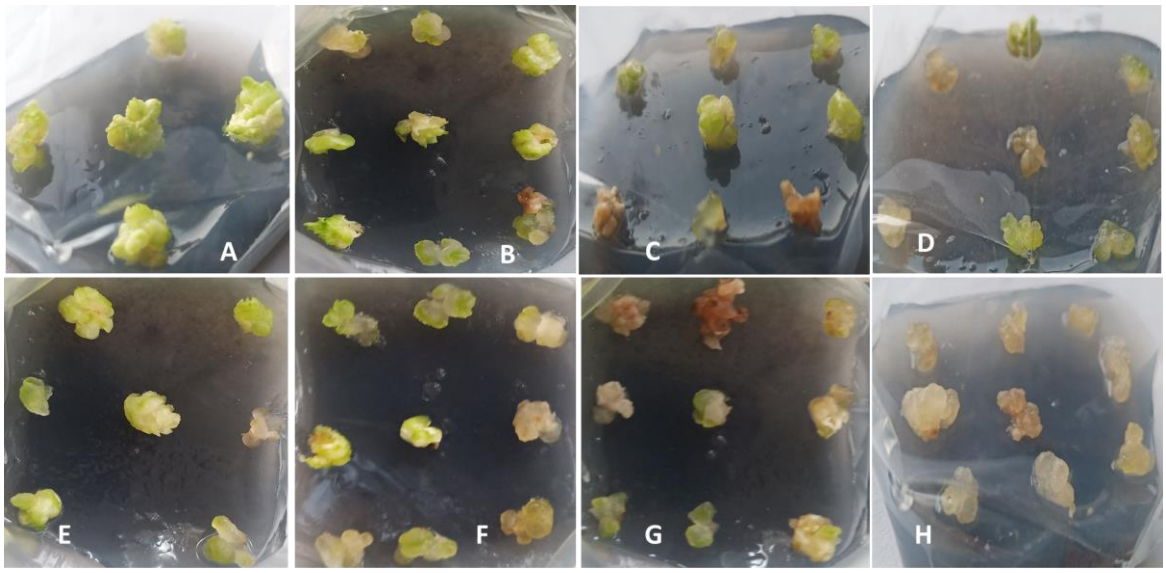
Công thức	Nồng độ xử lý (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)	Chỉ tiêu theo dõi mô sẹo xử lý bằng colchicine						
			4 tuần			8 tuần			
			Tỷ lệ mô sẹo sống (%)	Tỷ lệ mô sẹo phát triển mầm chồi (%)	Kích thước mô sẹo (cm)	Tỷ lệ mô sẹo sống (%)	Tỷ lệ mô sẹo phát triển mầm chồi (%)	Tỷ lệ mô sẹo có thình thái biến dị (%)	Kích thước mô sẹo (cm)
ĐC	0		96,67±1,93^{a}	85,56±1,11^{a}	0,69±0,04^{a}	96,67±1,93^{a}	94,44±2,94^{a}	0,00±0,00^{g}	0,79±,035^{a-e}
CT_C1	50	2	57,78±4,84^{b}	15,56±1,11^{c}	0,65±0,01^{a-c}	50,00±3,85 ^{b}	40,00±5,09^{b}	19,31±0,78^{b}	0,81±0,03^{a-e}
CT_C2	100	2	52,22±4,01^{c}	14,44±2,22^{cd}	0,65±0,02^{a-c}	43,33±3,85^{c}	31,11±4,01^{c}	23,33±1,92^{ab}	0,82±0,02^{a-d}
CT_C3	200	2	46,67±1,92^{cd}	6,67±1,92^{f-h}	0,61±0,03^{b-d}	37,78±2,94^{cd}	27,78±2,94^{cd}	24,67±2,91^{a}	0,81±0,03^{a-e}
CT_C4	400	2	33,33±1,92^{f}	0,00±0,00^{j}	0,55±0,01^{e}	24,44±1,11^{f}	13,33±1,92^{e}	11,33±1,02^{cd}	0,71±0,02^{d-g}
CT_C5	800	2	8,89±1,11^{j-l}	0,00±0,00^{j}	0,52±0,01^{e}	2,22±1,11^{jk}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,52±0,01^{i}
CT_C6	50	4	47,78±1,11^{cd}	14,44±1,11^{cd}	0,65±0,01^{a-c}	42,22±2,94^{cd}	27,78±1,11^{cd}	24,93±2,13^{a}	0,88±0,01^{ab}
CT_C7	100	4	44,44±1,11^{d}	13,33±1,92^{c-e}	0,64±0,01^{a-c}	42,22±1,11^{cd}	22,22±1,11^{d}	18,89±1,11^{b}	0,87±0,04^{a-c}
CT_C8	200	4	34,44±1,11^{f}	7,78±2,22^{fg}	0,63±0,01^{bc}	20,00±1,92^{fg}	13,33±1,92^{e}	13,33±1,92^{c}	0,76±0,02^{a-f}
CT_C9	400	4	15,56±1,11^{hi}	4,44±1,11^{g-j}	0,65±0,01^{a-c}	11,11±1,11^{hi}	8,89±1,11^{e-g}	7,78±1,11^{de}	0,82±0,02^{a-d}
CT_C10	800	4	5,56±1,11^{k-m}	2,22±1,11^{h-j}	0,53±0,01^{e}	1,11±1,11^{jk}	1,11±1,11^{h}	1,11±1,11^{fg}	0,60±0,06^{g-i}
CT_C11	50	6	46,67±1,92^{cd}	22,22±2,94^{b}	0,63±0,01^{a-c}	40,00±1,92^{cd}	31,11±4,01^{c}	25,69±4,19^{a}	0,90±0,03^{a}
CT_C12	100	6	37,78±2,92^{ef}	15,56±2,94^{c}	0,66±0,01^{a-c}	31,11±2,22^{e}	25,56±2,22^{cd}	20,97±2,00^{ab}	0,82±0,03^{a-d}
CT_C13	200	6	18,89±2,94^{h}	10,00±1,92^{d-f}	0,67±0,03^{ab}	15,56±1,11^{gh}	13,33±0,00^{e}	12,22±1,11^{cd}	0,80±0,02^{a-e}
CT_C14	400	6	7,78±1,11^{kl}	2,22±1,11^{h-j}	0,53±0,01^{e}	2,22±1,11^{jk}	2,22±1,11^{h}	2,22±1,11^{f}	0,70±0,09^{d-g}
CT_C15	800	6	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{f}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_C16	50	8	42,22±1,11^{de}	21,11±2,22^{b}	0,66±0,03^{ab}	36,67±1,92^{d}	26,67±1,92^{cd}	21,33±1,63^{ab}	0,86±0,04^{a-c}
CT_C17	100	8	25,56±1,11^{g}	10,00±1,92^{d-f}	0,60±0,01^{cd}	18,89±2,22^{g}	12,22±1,11^{e}	10,78±0,43^{cd}	0,80±0,05^{a-e}
CT_C18	200	8	11,11±1,11^{i-k}	5,56±1,11^{f-i}	0,55±0,02^{e}	6,67±0,00^{ij}	5,56±1,11^{f-h}	4,83±0,98^{ef}	0,68±0,05^{e-h}
CT_C19	400	8	3,33±1,93^{lm}	1,11±1,11^{ij}	0,57±0,04^{de}	1,11±1,11^{jk}	1,11±1,11^{h}	1,11±1,11^{fg}	0,63±0,11^{f-i}
CT_C20	800	8	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{f}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{h}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_C21	50	10	14,44±1,11^{h-j}	8,89±1,11^{e-g}	0,62±0,00^{bc}	11,11±1,11^{hi}	11,11±1,11^{ef}	10,11±0,35^{cd}	0,76±0,03^{b-f}
CT_C22	100	10	8,89±1,11^{j-l}	4,44±1,11^{g-j}	0,64±0,01^{a-c}	4,44±1,11^{jk}	4,44±1,11^{gh}	4,44±1,11^{ef}	0,74±0,01^{c-f}
CT_C23	200	10	5,56±1,11^{k-m}	1,11±1,11^{ij}	0,52±0,01^{e}	1,11±1,11^{jk}	1,11±1,11^{h}	1,11±1,11^{fg}	0,56±0,04^{hi}
CT_C24	400	10	1,11±1,11^{m}	0,00±0,00^{j}	0,51±0,00^{e}	1,11±1,11^{jk}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,52±0,00^{hi}
CT_C25	800	10	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{f}	0,00±0,00^{k}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}

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

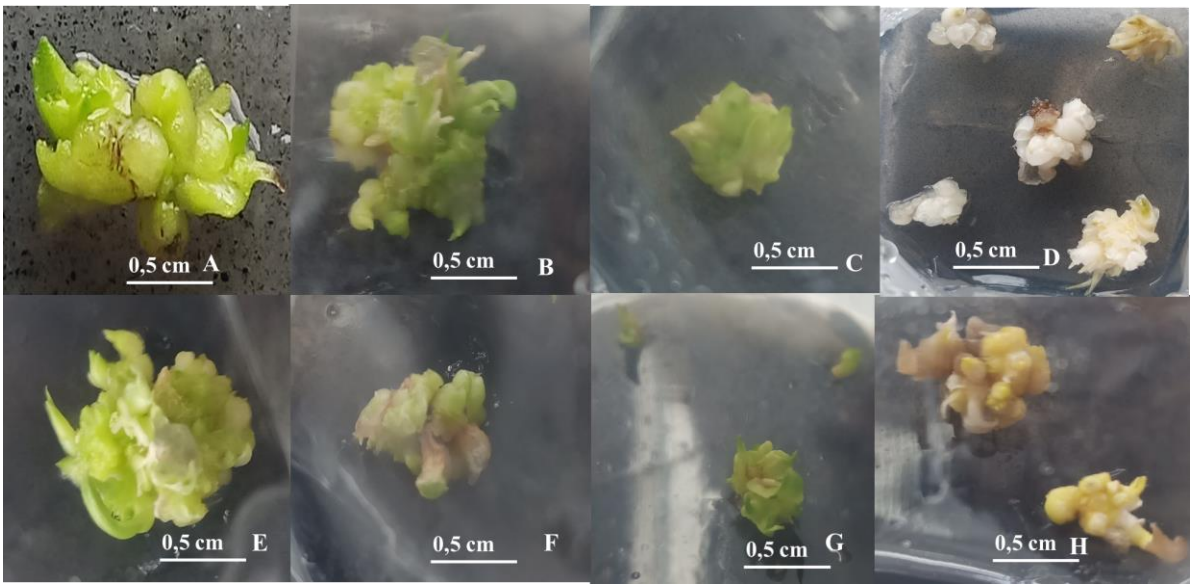
Bảng 3.8. Kết quả xử lý mẫu mô sẹo bằng Dimethyl Sulphate (DMS*)* sau 4 tuần và 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ xử lý (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)	Chỉ tiêu theo dõi mô sẹo xử lý bằng *Dimethyl Sulphate (DMS)*						
			4 tuần			*8 tuần*			
			Tỷ lệ mô sẹo sống (%)	Tỷ lệ mô sẹo phát triển mầm chồi (%)	Kích thước mô sẹo (cm)	Tỷ lệ mô sẹo sống (%)	Tỷ lệ mô sẹo phát triển mầm chồi (%)	Tỷ lệ mô sẹo có hình thái biến dị (%)	Kích thước mô sẹo (cm)
ĐC	0	0	96,67±1,93^{a}	85,56±1,11^{a}	0,69±0,04^{a}	95,56±2,94^{a}	88,89±1,11^{a}	0,00±0,00^{g}	0,86±0,05^{a}
CT_D1	50	2	57,78±4,84^{b}	15,56±1,11^{c}	0,65±0,01^{a-c}	73,62±1,32^{b}	53,32±2,34^{b}	4,43±0,63 ^{e}	0,85±0,0^{a}
CT_D2	100	2	52,22±4,01^{c}	14,44±2,22^{cd}	0,65±0,02^{a-c}	54,44±2,94^{d}	32,22±2,94^{d}	8,38±1,19^{d}	0,75±0,02^{bc}
CT_D3	200	2	46,67±1,92^{cd}	6,67±1,92^{f-h}	0,61±0,03^{b-d}	33,33±3,85^{g}	21,11±2,22^{e}	12,19±1,50^{bc}	0,80±0,02^{ab}
CT_D4	400	2	33,33±1,92^{f}	0,00±0,00^{j}	0,55±0,01^{e}	7,78±2,22^{jk}	4,44±1,11^{gh}	3,71±0,38^{ef}	0,71±0,02^{cd}
CT_D5	800	2	8,89±1,11^{j-l}	0,00±0,00^{j}	0,52±0,01^{e}	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_D6	50	4	47,78±1,11^{cd}	14,44±1,11^{cd}	0,65±0,01^{a-c}	66,58±2,95^{c}	37,49±2,11^{c}	14,93±1,91^{a}	0,67±0,01^{de}
CT_D7	100	4	44,44±1,11^{d}	13,33±1,92^{c-e}	0,64±0,01^{a-c}	24,44±1,11^{h}	14,44±1,11^{f}	7,77±0,63^{d}	0,65±0,04^{de}
CT_D8	200	4	34,44±1,11^{f}	7,78±2,22^{fg}	0,63±0,01^{bc}	7,78±1,11^{jk}	3,33±0,00^{g-i}	3,33±0,00^{ef}	0,61±0,02^{e-g}
CT_D9	400	4	15,56±1,11^{hi}	4,44±1,11^{g-j}	0,65±0,01^{a-c}	3,33±1,92^{k-m}	1,11±1,11^{hi}	1,11±1,11^{fg}	0,56±0,05^{f-h}
CT_D10	800	4	5,56±1,11^{k-m}	2,22±1,11^{h-j}	0,53±0,01^{e}	1,11±1,11^{lm}	1,11±1,11^{hi}	1,11±1,11^{fg}	0,53±0,02^{h}
CT_D11	50	6	46,67±1,92^{cd}	22,22±2,94^{b}	0,63±0,01^{a-c}	47,74±1,08^{e}	18,68±0,73^{e}	13,56±1,09^{ab}	0,68±0,01^{c-e}
CT_D12	100	6	37,78±2,92^{ef}	15,56±2,94^{c}	0,66±0,01^{a-c}	10,00±1,92^{j}	5,56±1,11^{g}	3,89±0,48^{ef}	0,69±0,02^{c-e}
CT_D13	200	6	18,89±2,94^{h}	10,00±1,92^{d-f}	0,67±0,03^{ab}	2,22±1,11^{lm}	1,11±1,11^{hi}	2,22±1,11^{e-g}	0,53±0,02^{h}
CT_D14	400	6	7,78±1,11^{kl}	2,22±1,11^{h-j}	0,53±0,01^{e}	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_D15	800	6	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{f}	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_D16	50	8	42,22±1,11^{de}	21,11±2,22^{b}	0,66±0,03^{ab}	41,43±1,13^{f}	12,59±1,35^{f}	10,23±1,35^{cd}	0,61±0,04^{e-g}
CT_D17	100	8	25,56±1,11^{g}	10,00±1,92^{d-f}	0,60±0,01^{cd}	5,56±1,11^{j-l}	4,44±1,11^{gh}	2,72±1,43^{e-g}	0,62±0,02^{ef}
CT_D18	200	8	11,11±1,11^{i-k}	5,56±1,11^{f-i}	0,55±0,02^{e}	1,11±1,11^{lm}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,52±0,00^{h}
CT_D19	400	8	3,33±1,93^{lm}	1,11±1,11^{ij}	0,57±0,04^{de}	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_D20	800	8	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{f}	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_D21	50	10	14,44±1,11^{h-j}	8,89±1,11^{e-g}	0,62±0,00^{bc}	19,62±0,77^{i}	6,78±0,85^{g}	3,03±0,72^{ef}	0,56±0,05^{f-h}
CT_D22	100	10	8,89±1,11^{j-l}	4,44±1,11^{g-j}	0,64±0,01^{a-c}	2,22±1,11^{lm}	1,11±1,11^{hi}	1.11±1,11^{fg}	0,54±0,02^{gh}
CT_D23	200	10	5,56±1,11^{k-m}	1,11±1,11^{ij}	0,52±0,01^{e}	1,11±1,11^{lm}	0,00±0,00^{i}	0,00±0,00^{g}	0,51±0,00^{h}
CT_D24	400	10	1,11±1,11^{m}	0,00±0,00^{j}	0,51±0,00^{e}	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{h}	0,00±0,00^{g}	0,00±0,00^{i}
CT_D25	800	10	0,00±0,00^{m}	0,00±0,00^{j}	0,00±0,00^{f}	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 giống nhau cho biết không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05, Duncan's test)



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



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

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

Theo Vasko và Kyrychenko (2016) trên cây hoa Hướng dương *(Helianthus annuus)*, tác giả đã sử dụng DMS với nồng độ 0,01 – 0,05 % để xử lý hạt trong 18 giờ, kết quả đã thu được những biến đổi về đặc điểm hình thái chiều cao, kích thước hoa, màu sắc, số lá ở 1, 2 thế hệ [188]. Ngoài ra, hiện nay để tăng hiệu quả tác động của DMS lên đối tượng cần xử lý, các nhà khoa học còn dùng các dẫn xuất của DMS [186].

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

Phát triển các phương pháp và kỹ thuật tạo giống đột biến hiệu quả bằng hoá chất thì Colchicine là một chất được lựa chọn hàng đầu để ứng dụng. Có tác động làm tăng số lượng nhiễm sắc thể hay còn gọi là đa bội là một trong những công cụ để cải thiện phẩm chất cây trồng. Thể đa bội đã đóng một vai trò quan trọng trong nhân giống cây trồng và cả sự tiến hóa của thực vật [161]. Một nghiên cứu trên lan *D. chrysotoxum* L. nghiên cứu dùng colchicine nồng độ 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 và 0,05 % (w/v) trong 1, 2, 3, 4 và 5 ngày để xử lý thể giống protocorm (PLB), kết quả là khoảng 84 % PLB sống sót và tỷ lệ mẫu tứ bội là 47 % [53]. Theo công bố của Deepti Srivastava và cộng sự (2018) tạo đột biến lan *Aerides crisa* Lindl., tác giả dùng colchicine (0,025-0,4 %) tác động lên protocorm xử lý trong 5 ngày. Kết quả ghi nhận tỷ lệ sống của protcorm sau 30 ngày xử lý đạt 42-58 %, tỷ lệ xuất hiện biến dị là 19-86 %, hiệu quả tạo biến dị cao khi có sự kết hợp với EMS hoặc tia gamma [179]. Nghiên cứu của Fei Wang và và cộng sự (2023) đã tạo dòng đa bội lan *D. wardianum* Warner bằng colchicine nồng độ 25, 75, 125, 250 và 500 µM, thời gian xử lý là 6, 8, 12 và 24 giờ, tác động lên protocorm. Kết quả được ghi lại sau 60 ngày nuôi cấy là tỷ lệ sống 62- 96 %, các mẫu đã có phân hoá chồi lá [190].

Kết quả nghiên cứu và những công bố trước đây đã cho thấy colchicine là một chất có tác động mạnh trong tạo biến dị cây trồng và có thể được áp dụng ở nhiều loại cây trồng có thể ở giai đoạn hạt, mô sẹo, protocorm, hoặc đỉnh sinh trưởng đều mang lại hiệu quả. Tuy nhiên nếu xử lý ở nồng độ cao và thời gian kéo dài thì tỷ lệ sống của mẫu thấp cũng như có nhiều biến đổi bất lợi cho cây [190]. Một tác động khác của colchicine là ở nồng độ thấp nó có tác dụng kích thích cho sự sinh trưởng, đẩy nhanh tốc độ tăng trưởng của tế bào, giúp tăng cường tổng hợp hormone tăng trưởng thực vật và thay đổi hoạt động các enzyme, từ đó làm tăng khả năng thích nghi của tế bào với môi trường [179].

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

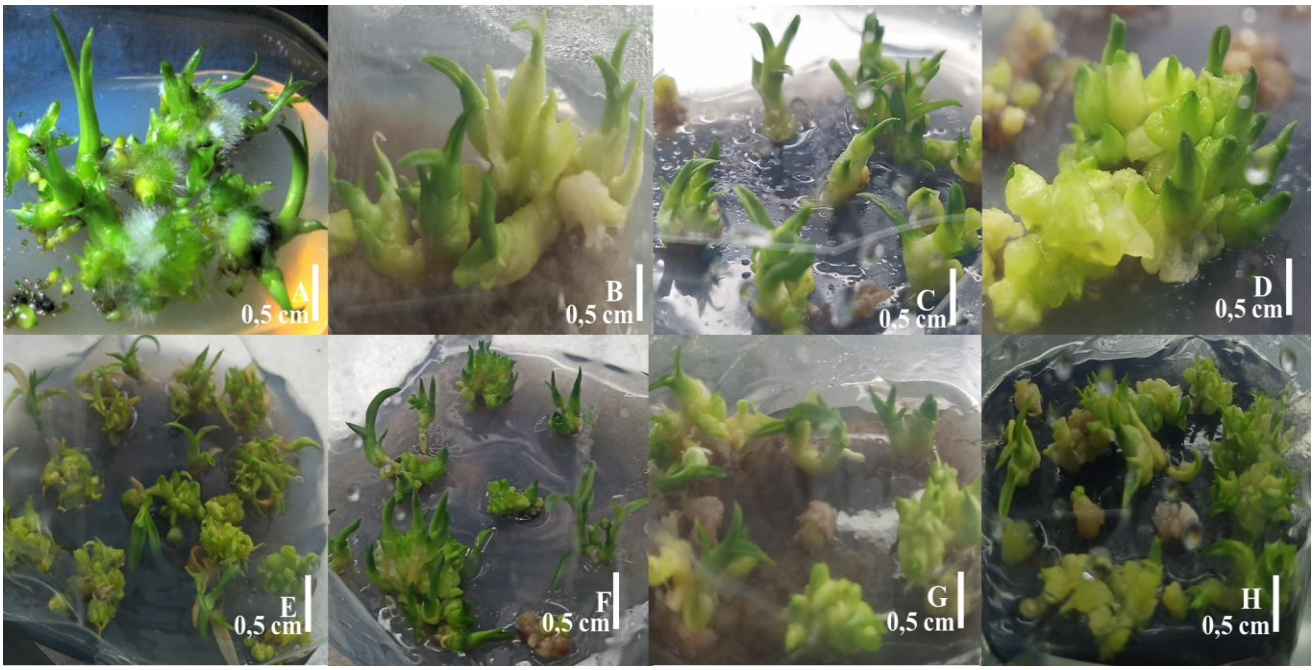
3.2.2.1 Tái sinh chồi từ protocorm sau khi xử lý hoá chất

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

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

Kết quả thí nghiệm khả năng tái sinh chồi của protocorm đã xử lý DMS thể hiện không tốt bằng khi so với protocorm được xử lý colchicine. Với nghiệm thức đối chứng (ĐC) cho tỷ lệ tạo chồi 60,36 %, số chồi trung bình đạt 1,57 chồi/mẫu, chiều cao 0,86 cm và có 1,75 lá/chồi, chồi thấp, nhỏ yếu, có màu xanh vàng, có ít lá hoặc chưa có lá. Khả năng tái sinh chồi cũng được cải

thiện khi môi trường dinh dưỡng bổ sung BA nồng độ 0,5-1,5 mg/L, với tỷ lệ tạo chồi dao động 66,77 – 74,65 %, trung bình đạt từ 1,56-2,55 chồi/mẫu, chiều cao từ 0,96-1,21 cm và có số lá từ 2,44-2,74 lá/chồi (CT1,2,3). Khả năng tái sinh chồi tốt nhất khi môi trường bổ sung kết hợp BA và NAA với nồng độ 0,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA cho kết quả tỷ lệ tạo chồi 95,68 %, trung bình 3,67 chồi/mẫu, chiều cao 2,00 cm/chồi và đạt 3,80 lá/chồi, chồi to khoẻ, có màu xanh đậm, lá nhiều. Khi nồng độ kích thích sinh trưởng bổ sung vào môi trường dinh dưỡng vượt ngưỡng 1 mg/L cho hiệu quả tái sinh chồi giảm xuống, và chất lượng chồi kém đi.



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

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm được xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy

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

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

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

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

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

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

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

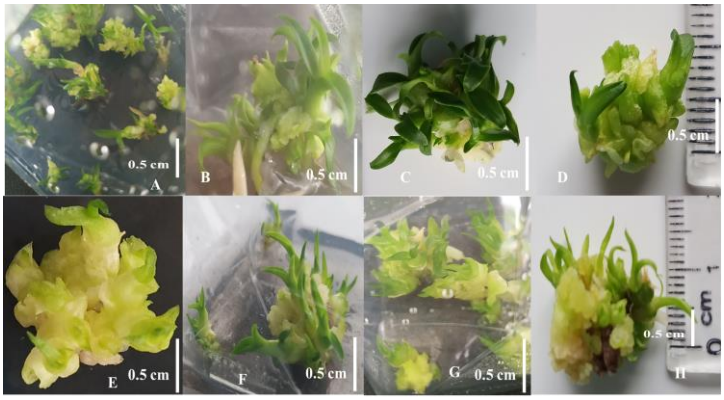
Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo xử lý bằng colchicine ở công thức đối chứng (ĐC) có tỷ lệ hình thành chồi 12,44 %, số chồi trung bình 0,64 chồi/mẫu, chiều cao chồi 0,56 cm, và có 1,15 lá/chồi, chồi có đặc điểm nhỏ yếu, có màu xanh hơi vàng, ít lá. Khi môi trường được bổ sung chất điều hoà sinh trưởng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

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

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

Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu về nuôi cấy *in-vitro* sử dụng DMS tác động vào giai đoạn mô sẹo hay protocorm để tạo đột biến. DMS được sử dụng tác động trực tiếp lên chồi ngủ hoặc hạt sau đó được trồng ở điều kiện *ex-vitro*. Theo Muniappan và cộng sự (2017), dùng đoạn đốt mầm cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) được xử lý DMS với nồng độ 2 - 10 mM, và cấy vào môi trường tái sinh chồi, sau 45 ngày nuôi cấy môi trường bổ sung 12 mg/L BA và 1 mg/L IAA cho hiệu quả tái sinh chồi tốt nhất, với tỷ lệ tái sinh chồi 90,2 %, và số chồi đạt 17,33 chồi/mẫu ở mẫu được xử lý DMS với nồng độ 6 mM [139].

Khả năng tái sinh chồi của protocorm và mô sẹo được xử lý bằng colchicine cũng đã có những công bố trước đây. Khả năng tái sinh chồi được ghi nhận bởi Atichart (2013) trên lan *D. chrysotoxum* thì PLB đã xử lý colchicine nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng bổ sung 0 – 1 mg/L NAA và 0 – 1 mg/L BA để tái sinh cây, kết quả cho thấy PLB được xử lý colchicine có khả năng tái sinh chồi cao từ 2,36 – 4,35 chồi/ mẫu [53]. Nghiên cứu của Aziz và cộng sự (2019) trên lan *Phalaenopsis amabilis*, cho khả năng tái sinh chồi từ protocorm đã được xử lý colchicine sau khi nuôi cấy 8 tuần trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung 0-1 mg/L BA và 0-1 mg/L TDZ được ghi nhận là từ 2,5 – 9, 5 chồi /mẫu [55].



Hình 3.15. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi của mô sẹo đã xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy. ***A****. Mô sẹo trên môi trường không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng (ĐC);* ***B.*** *Mô sẹo xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 1 mg/L NAA;* ***C****. Mô sẹo xử lý colchicine trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA;* ***D****. Mô sẹo xử lý colchicine trong môi trường có 2 mg/L BA và 1 mg/L NAA;* ***E.*** *Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 2 mg/L BA và 1 mg/L NAA;* ***F****. Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA;* ***G.*** *Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA và 1 mg/L NAA;* ***H.*** *Mô sẹo xử lý DMS trong môi trường có 1,5 mg/L BA.*

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo được xử lý hoá chất sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Chất điều hoà sinh trưởng (mg/L)		Chỉ tiêu theo dõi									
			Mô sẹo xử lý bằng colchicine					*Mô sẹo xử lý bằng dimethyl sulphate*				
	BA	NAA	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá tb/chồi	Đặc điểm chồi	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Đặc điểm chồi
ĐC	0,0	0,0	$12,44\pm0,94^{j}$	$0,64\pm0,06^{g}$	$0,56\pm0,03^{g}$	$1,15\pm0,05^{fg}$	+	$8,11\pm1,42^{i}$	$0,58\pm0,03^{d}$	$0,50\pm0,03^{d}$	$1,11\pm0,03^{e}$	+
CT1	0,5	0,0	$21,86\pm0,78^{hi}$	$1,47\pm0,05^{c-f}$	$0,65\pm0,05^{fg}$	$1,58\pm0,04^{d-g}$	+	$17,52\pm1,12^{gh}$	$1,20\pm0,23^{b-d}$	$0,61\pm0,08^{cd}$	$1,34\pm0,11^{de}$	+
CT2	1,0	0,0	$26,48\pm0,50^{gh}$	$1,57\pm0,06^{c-e}$	$1,11\pm0,18^{c-g}$	$1,75\pm0,05^{d-f}$	+	$21,81\pm1,30^{fg}$	$1,50\pm0,09^{a-c}$	$0,87\pm0,28^{b-d}$	$1,75\pm0,23^{b-e}$	++
CT3	1,5	0,0	$60,05\pm1,35^{c}$	$1,81\pm0,19^{b-d}$	$1,54\pm0,06^{b-d}$	$2,08\pm0,17^{c-e}$	++	$55,28\pm2,55^{bc}$	$1,81\pm0,19^{ab}$	$1,20\pm0,33^{a-d}$	$2,08\pm0,41^{a-d}$	++
CT4	2,0	0,0	$44,96\pm2,24^{e}$	$1,67\pm0,10^{b-e}$	$1,30\pm0,12^{b-f}$	$1,84\pm0,30^{d-f}$	++	$39,30\pm1,53^{d}$	$1,50\pm0,07^{a-c}$	$1,06\pm0,20^{b-d}$	$1,44\pm0,17^{c-e}$	++
CT5	0,0	0,5	$18,98\pm1,26^{i}$	$1,27\pm0,12^{ef}$	$1,08\pm0,18^{d-g}$	$1,18\pm0,12^{fg}$	+	$13,98\pm1,26^{h}$	$1,13\pm0,20^{b-d}$	$0,94\pm0,16^{b-d}$	$1,08\pm0,07^{e}$	+
CT6	0,5	0,5	$28,76\pm1,20^{fg}$	$1,49\pm0,11^{c-f}$	$1,43\pm0,09^{b-e}$	$1,51\pm0,27^{e-g}$	+	$22,76\pm1,57^{e-g}$	$1,39\pm0,13^{bc}$	$1,33\pm0,13^{a-d}$	$1,31\pm0,17^{de}$	++
CT7	1,0	0,5	$63,62\pm2,58^{bc}$	$1,91\pm0,14^{bc}$	$1,85\pm0,33^{ab}$	$2,66\pm0,14^{bc}$	+++	$58,62\pm2,58^{b}$	$1,61\pm0,29^{a-c}$	$1,72\pm0,40^{ab}$	$2,42\pm0,24^{ab}$	+++
CT8	1,5	0,5	$70,29\pm0,83^{a}$	$2,35\pm0,10^{a}$	$2,34\pm0,12^{a}$	$3,32\pm0,23^{a}$	+++	$65,29\pm0,83^{a}$	$2,15\pm0,29^{a}$	$2,00\pm0,22^{a}$	$2,76\pm0,24^{a}$	+++
CT9	2,0	0,5	$52,28\pm2,46^{d}$	$1,85\pm0,11^{b-d}$	$1,70\pm0,44^{a-d}$	$2,26\pm0,32^{b-d}$	++	$52,28\pm2,46^{c}$	$1,85\pm0,11^{ab}$	$1,70\pm0,44^{ab}$	$2,26\pm0,32^{a-c}$	+++
CT10	0,0	1,0	$23,12\pm1,53^{hi}$	$1,05\pm0,08^{fg}$	$0,77\pm0,15^{e-g}$	$1,22\pm0,32^{fg}$	+	$18,47\pm1,24^{gh}$	$1,11\pm0,25^{b-d}$	$0,64\pm0,21^{cd}$	$1,12\pm0,22^{e}$	+
CT11	0,5	1,0	$33,73\pm2,50^{f}$	$1,38\pm0,24^{d-f}$	$1,63\pm0,01^{a-d}$	$1,64\pm0,15^{d-g}$	+	$28,06\pm2,66^{e}$	$1,05\pm0,20^{cd}$	$1,33\pm0,34^{a-d}$	$1,27\pm0,06^{de}$	+
CT12	1,0	1,0	$41,47\pm2,07^{e}$	$1,77\pm0,14^{b-d}$	$1,67\pm0,39^{a-d}$	$2,18\pm0,08^{b-e}$	++	$36,14\pm2,32^{d}$	$1,54\pm0,26^{a-c}$	$1,45\pm0,45^{a-c}$	$1,85\pm0,26^{b-e}$	++
CT13	1,5	1,0	$66,73\pm1,90^{ab}$	$2,08\pm0,27^{ab}$	$1,81\pm0,36^{a-c}$	$2,79\pm0,33^{ab}$	+++	$59,73\pm2,34^{ab}$	$1,75\pm0,37^{a-c}$	$1,55\pm0,31^{a-c}$	$2,46\pm0,55^{ab}$	+++
CT14	2,0	1,0	$31,90\pm2,37^{f}$	$1,06\pm0,13^{fg}$	$0,69\pm0,11^{fg}$	$1,04\pm0,21^{g}$	+	$25,23\pm2,70^{ef}$	$1,39\pm0,25^{bc}$	$0,63\pm0,16^{cd}$	$1,24\pm0,30^{de}$	+

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

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

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

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

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

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

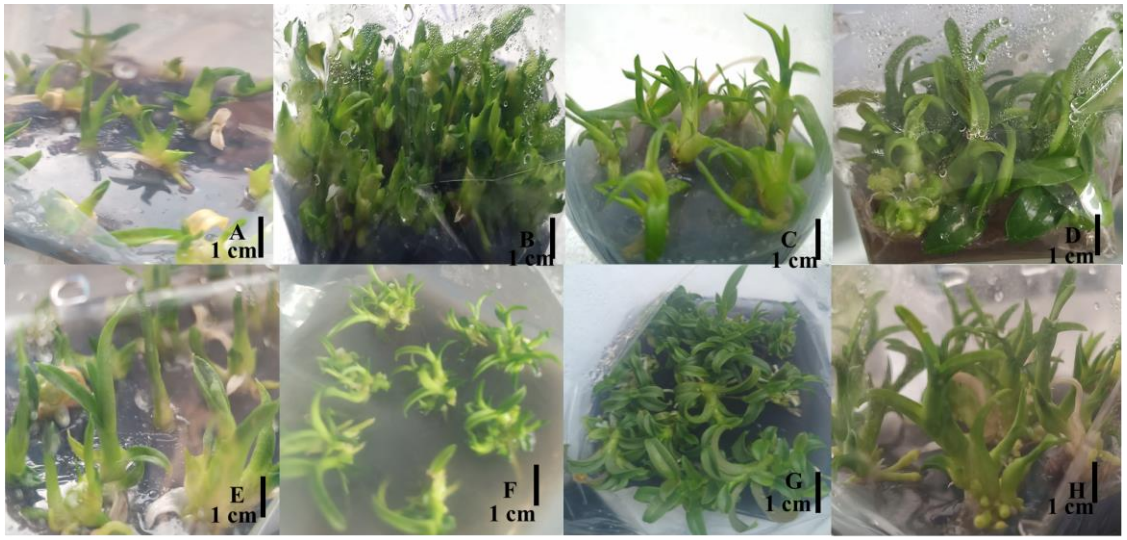
Khả năng nhân chồi của chồi xử lý colchicine khi cấy trên môi trường không sử dụng chất kích thích sinh trưởng là tương đối thấp, với hệ số nhân chồi 2,14 lần; với 4,07 lá/chồi, chồi cao 2,87 cm; đường kích thân chồi là 0,21 cm, chồi tương đối thấp, màu xanh vàng, ít lá, lá mảnh và nhỏ (ĐC). Trên môi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

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

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

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

Chú thích: Các chữ (a, b, c…) khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p<0,05, Duncan's test. +: Chồi thấp, nhỏ yếu, màu xanh vàng, ít lá, lá mảnh, nhỏ.; ++: Chồi cao trung bình, cây nhỏ yếu, có màu xanh nhạt, lá mảnh, nhỏ.; +++: Chồi cao, khoẻ, có màu xanh, lá dày.; ++++: Chồi cao, to khoẻ, có màu xanh đậm, lá nhiều và dày.



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

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

3.2.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ của chồi xử lý hoá chất

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

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy

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

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

+: rễ ít, nhỏ, ngắn, có màu trắng, cây xanh hơi vàng, nhỏ, lá mảnh.

++: số lượng rễ trung bình, ngắn, nhỏ, rễ có màu trắng, cây lá xanh, lá dày.

+++: rễ nhiều, dài nhưng nhỏ yếu, có màu trắng xanh, cây lá xanh, lá dày.

++++: rễ nhiều, dài to mập, rễ có màu trắng xanh, cây lá xanh đậm, lá dày, dài.

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

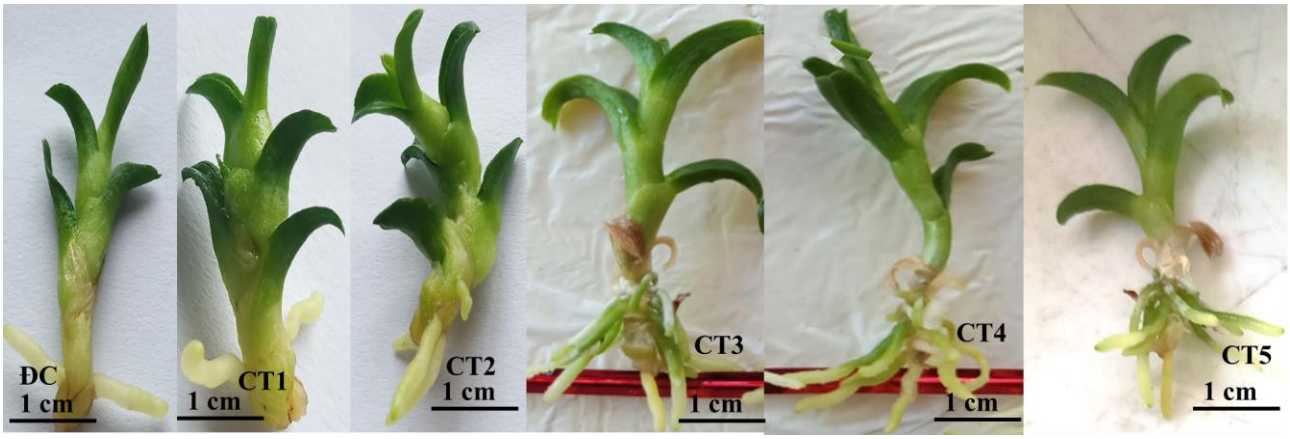
Hình 3.17.1 Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy.

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

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

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,c…) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p<0,05, Duncan's test. +: rễ ít, nhỏ, ngắn, có màu trắng, cây xanh hơi vàng, nhỏ, lá mảnh. ++: số lượng rễ trung bình, ngắn, nhỏ, rễ có màu trắng, cây lá xanh, lá dày. +++: rễ nhiều, dài nhưng nhỏ yếu, có màu trắng xanh, cây lá xanh, lá dày. ++++: rễ nhiều, dài to mập, rễ có màu trắng xanh, cây lá xanh đậm, lá dày, dài.

Khả năng ra rễ của chồi được xử lý bằng DMS ở môi trường không có bổ sung kích thích sinh trưởng NAA có tỷ lệ ra rễ đạt 73,63 % có số rễ đạt 2,20 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 1,05 cm, chiều cao của cây hoàn chỉnh 2,25 cm và có 4,07 lá/cây (ĐC), rễ nhỏ, ngắn, có màu trắng hơi xanh, cây màu xanh hơi vàng, thân nhỏ, lá mảnh. Khả năng ra rễ đạt hiệu quả tốt nhất là CT4 với môi trường dinh dưỡng được bổ sung là 0,7 mg/L NAA, kết quả tỷ lệ ra rễ, số rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, số lá cây tương ứng là 100 %; 4,67 rễ/chồi; 3,73 cm; 4,47 cm; 5,60 lá cây, rễ có đặc điểm to mập, có màu trắng xanh, có nhiều tơ lông bao quanh, thân chồi xanh tốt. Bổ sung hàm lượng NAA ít hơn hay nhiều hơn 0,7 mg/L đều có hiệu quả không tốt bằng (Bảng 3.13).



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

Nghiên cứu của Srivastava và cộng sự (2018) trên lan *Aerides crispa* Lindl., tác giả dùng colchicine, EMS và tia gama xử lý đột biến, chồi tạo ra nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung 8,88 µM BA và 2,45 µM IBA, sau 120 ngày đã ghi nhận khả năng ra rễ của lan này là 100% chồi có rễ và chiều dài rễ từ 0,5 – 2,3 cm [179]. Khả năng ra rễ của chồi đột biến cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Aziz và cộng sự (2019) trên chồi lan *Phalaenopsis amabilis* được xử lý colchicine và nuôi cấy trên môi trường có bổ sung TDZ và BA với nồng độ 0 - 1 mg/L, sau 8 tuần nuôi cấy số rễ mỗi chồi có được từ 2 – 10 rễ/chồi, và tất cả các chồi thí nghiệm đều có rễ [55]. Theo công bố của Lê Thiên Vinh và cộng sự (2022), khả năng ra rễ của chồi lan *D. anosmum* đột biến tự nhiên là rất tốt trên môi trường có bổ sung 1 mg/L IBA hoặc 1 mg/L NAA với tỷ lệ ra rể đạt 97,08-99,06 %, số rễ là từ 7,73-8,53 rễ/chồi [47].

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

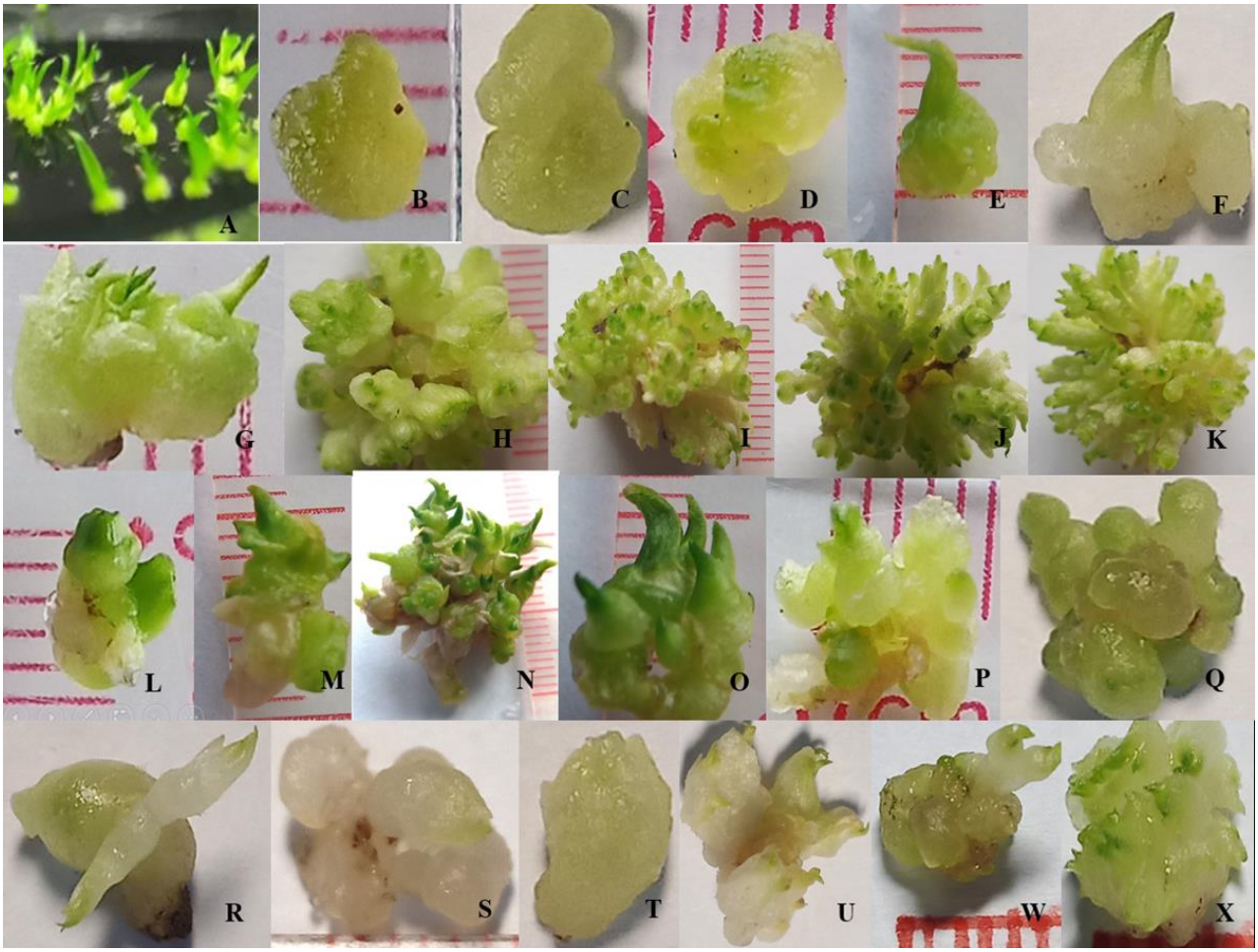
3.3. Đánh giá đặc điểm hình thái và di truyền của các dòng lan đột biến

Từ kết quả thí nghiệm tạo dòng đột biến, đã lựa chọn ra một số dòng triển vọng để đánh giá sâu hơn về những biến đổi hình thái, đa dạng di truyền. Nghiên cứu lựa chọn ra 34 dòng trong đó có 1 dòng tạo ra từ mô sẹo không xử lý hoá chất (đối chứng), 27 dòng tạo ra từ protocorm hoặc mô sẹo có xử lý hoá chất đột biến và 6 dòng tạo ra từ gieo hạt *in-vitro* không xử lý hoá chất đột biến (Phụ lục 16). Thu lấy mẫu protocorm, mô sẹo, thân, lá, rễ của những dòng lan đột biến để quan sát đặc điểm, hình thái bên ngoài (hình dạng, màu sắc, kích thước),

đặc điểm tế bào. Các dòng được ký hiệu trình ở phụ lục 16.

3.3.1. Đặc điểm hình thái của cây đột biến

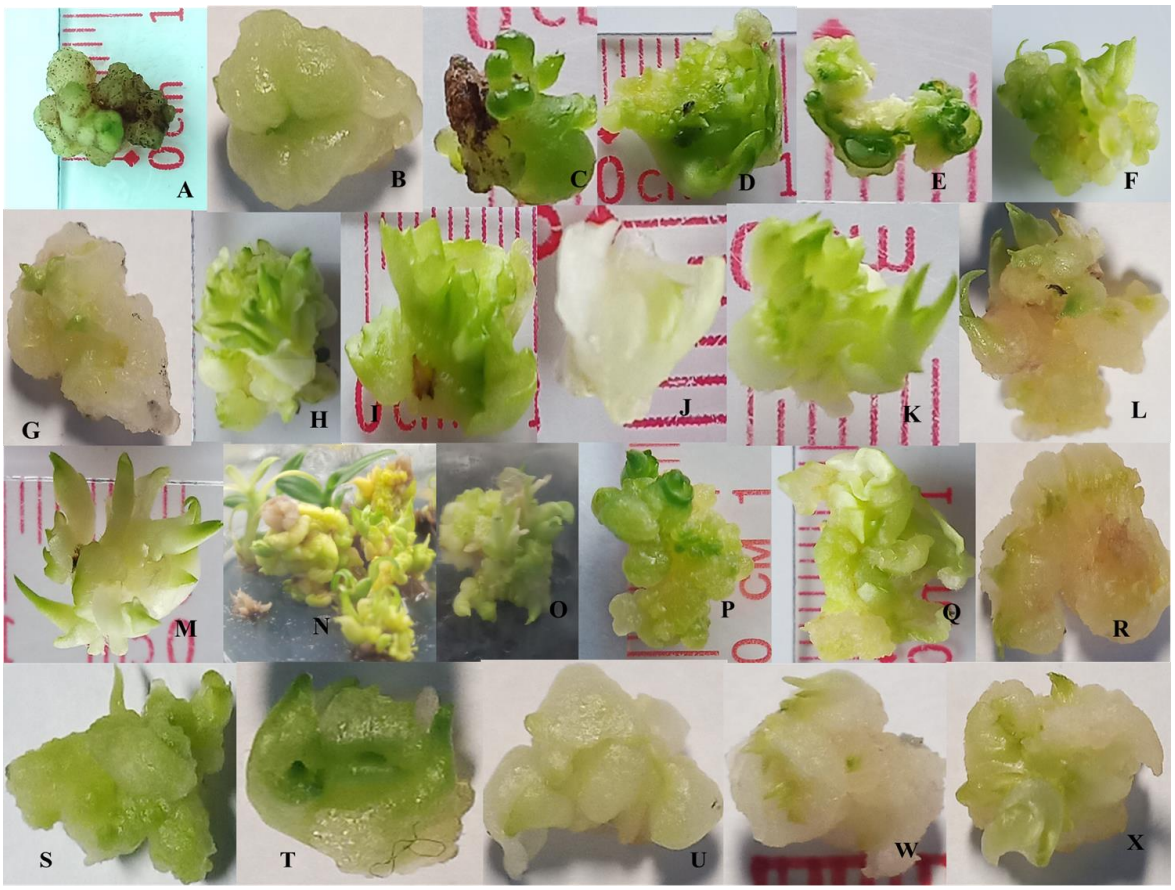
Các mẫu được xử lý colchicine và DMS có xuất hiện những biến dị hình thái từ giai đoạn đầu tiên (mô sẹo, protocorm) sau 6-8 tuần nuôi cấy. Mẫu biến dị này lựa chọn và làm nguyên liệu nhân giống. Các đặc điểm biến dị khác với cây đối chứng về thân, lá, rễ và hoa được mô tả lại, đây là một trong những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



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

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

Đối với protocorm có những hình thái biến dị xuất hiện như thay vì có màu xanh như đối chứng thì xuất hiện một số protocorm có màu trắng, vàng tuy nhiên hình thái này bị chết sau 8 tuần nuôi cấy. Kích thước protocorm được xử lý bằng colchicine lớn hơn so với protocorm xử lý bằng DMS và đối chứng. Hình dạng cũng thay đổi nhiều, không còn giữ hình dạng bầu tròn như protocorm đối chứng, lá mầm bị xoắn, sần xù. Quá trình tăng sinh tạo ra các thể giống PLBs không đồng đều, phát triển toả tròn ra xung quanh, hình thành nên khối hình dạng không ổn định (Bảng 3.14, Hình 3.18).



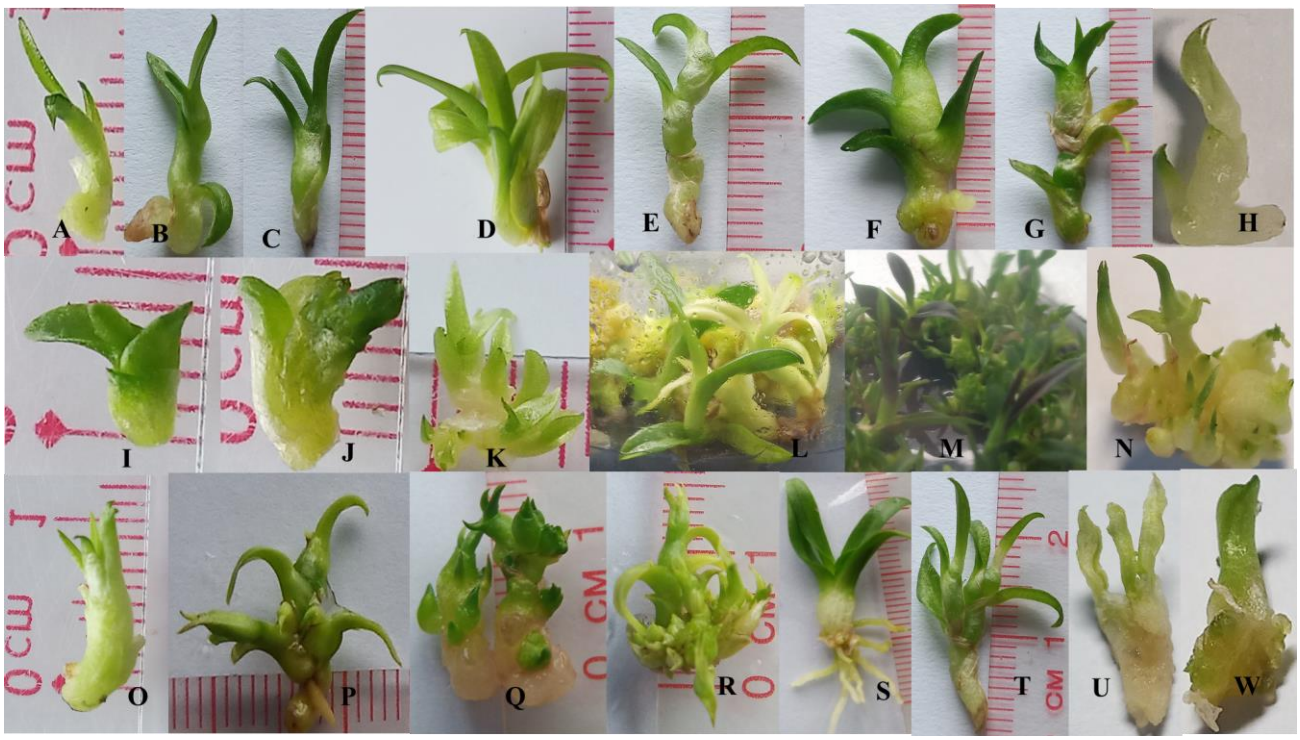
Hình 3.19. Một số hình dạng bất thường của mô sẹo xử lý hoá chất. ***A***. *Không xử lý hoá chất;* ***B***. *Xử lý colchicine 50 ppm trong 2 giờ;* ***C.*** *Xử lý colchicine 50 ppm trong 4 giờ;* ***D.*** *Xử lý colchicine 50 ppm trong 6 giờ;* ***E***. *Xử lý colchicine 100 ppm trong 2 giờ;* ***F.*** *Xử lý colchicine*

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

Tương tự như protocorm thì mô sẹo sau khi được xử lý bằng colchicine và DMS sau thời gian nuôi cấy 3- 4 tuần cũng xuất hiện các hình thái khác với đối chứng như thay đổi về màu sắc, có màu trắng, vàng, nâu những mô sẹo này cũng bắt đầu chết ở tuần thứ 4-5, các đặc điểm biến đổi biểu hiện rỏ nét ở tuần thứ 8 trở đi sau khi xử lý hoá chất. Quá trình sinh trưởng ở một số mô sẹo có xuất hiện các phiến mỏng, màu trắng hơi xanh bao bên ngoài, các phiến này uốn lượn và gấp khúc, và nó không có khả năng phát triển thành chồi, sẽ úa vàng, chết sau đó 1-2 tuần. Những mô sẹo này phát triển có lá mầm to và dày hơn so với đối chứng, có màu xanh lá đậm (Bảng 3.14, hình 3.19).

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

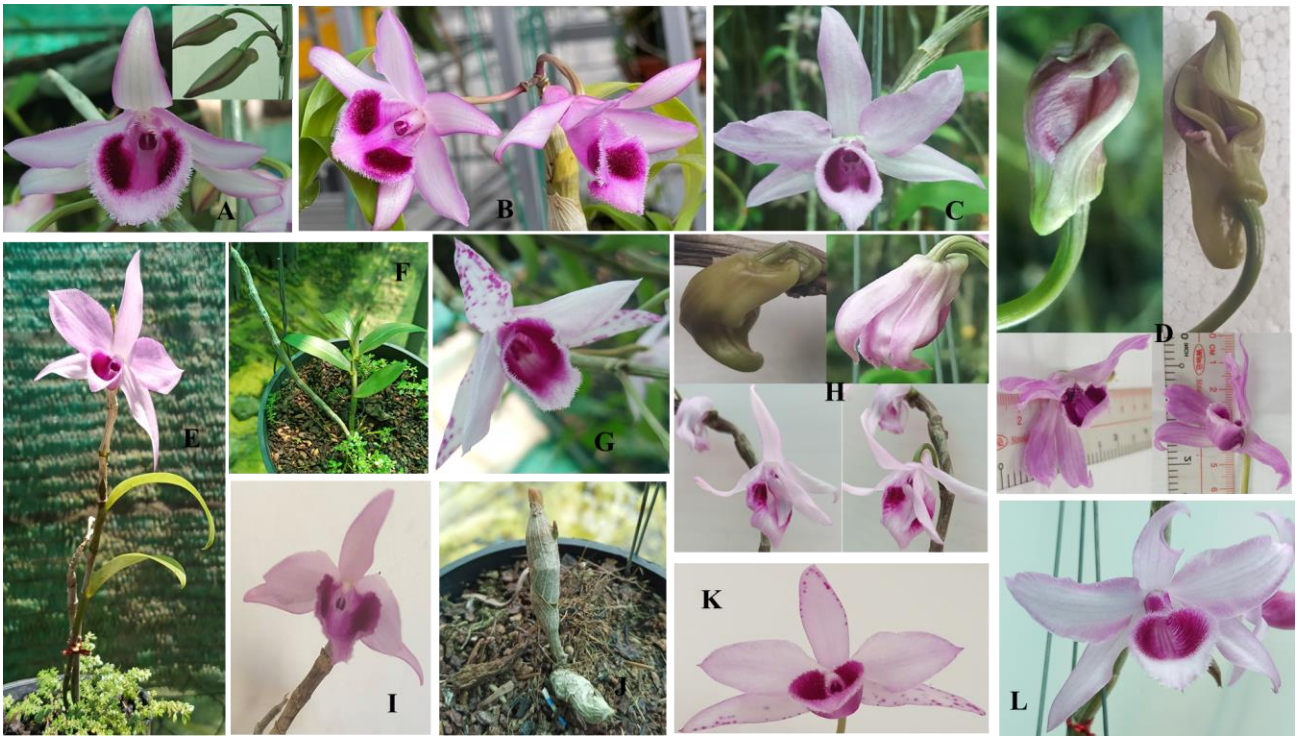
Số lượng chồi biến dị tạo ra tương đối lớn, tuy nhiên để phát triển thành cây hoàn chỉnh lại chiếm số lượng thấp. Những chồi "bạch tạng", chồi có lá ngắn và bề mặt xù xì bị chết sau khi cấy sang môi trường nhân nhanh hoặc ra rễ, một số chồi khác lại phát triển chậm sau tuần thứ 8 nuôi cấy, lá chồi bắt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



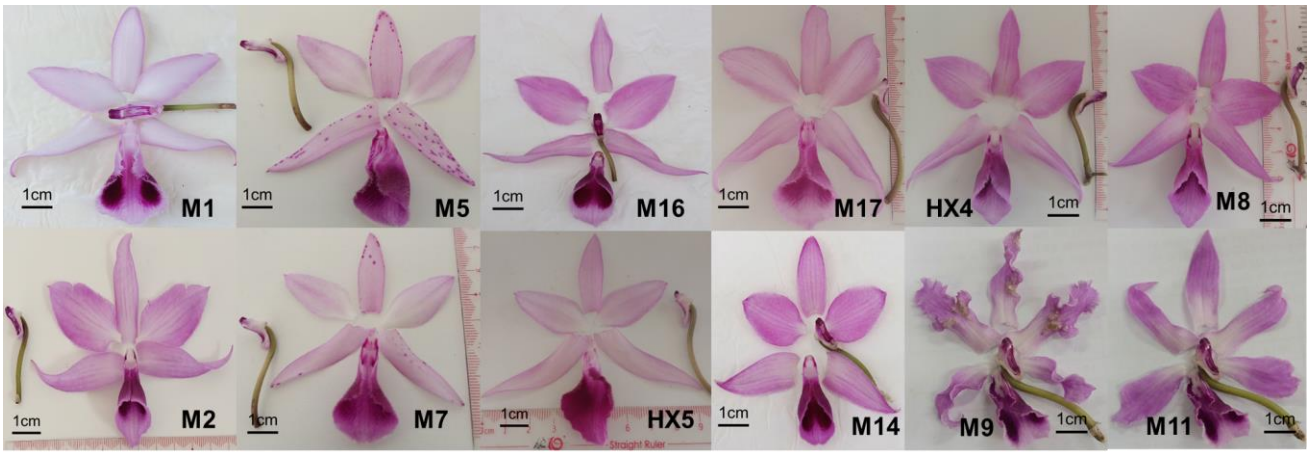
Hình 3.20. Hình thái chồi tái sinh từ mô sẹo và protocorm xử lý hoá chất.***A.*** *Chồi không xử lý hoá chất;* ***B.*** *Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 50 ppm trong 2 giờ;* ***C.*** *Chồi từ protocorm xử lý DMS 50 ppm trong 2 giờ;* ***D.*** *Chồi từ mô sẹo xử lý cochicine 50 ppm trong 4 giờ;* ***E.***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

Bảng 3.14. Một số đặc điểm hình thái của mẫu lan Giả hạc tím Huế đối chứng không xử lý hoá chất và mẫu được xử lý hoá chất (colchicine, DMS)

Mẫu xử lý	Đặc điểm	Giai đoạn/bộ phận						Ghi chú
		Protocorm/ mô sẹo	**Chồi**	**Lá**	**Thân**	**Rễ**	**Hoa**	
Đối chứng	*Hình dạng*	Protocorm có dạng tròn. Mô sẹo co dạng khối, hơi tròn,bề mặt hơi phăng đều, bên trong đặc và mộng nước.	Lên thẳng, thuôn dài	Hình mũi mát nhọn, thuôn dài	Dạng trụ tròn, các đốt đều nhau.	Dạng trụ tròn,có lớp lông trắng phủ bên ngoài.	khuôn hoa hình sao, đều, cân đối, hương thơm dịu	Hình dạng ổn định, sự sai khác ở các mẫu rất ít.
	Màu sắc	Protocorm có màu xanh lá. Mô sẹo Màu xanh lá nhạt có hơi vàng, phần mới hình thành có máu xanh trắng.	Có màu xanh lá, phần gốc hơi trắng	Có màu xanh	Có màu xanh lá	Màu xanh, gần phần đầu rễ có màu xanh nhạc hoặc trắng	Màu tím hồng, tím nhạt, cánh có viền tím.	Ít có sự thay đổi.
	Kích thước	Protocorm: Đồng đều, đường kính 1-1,5 mm. Mô sẹo: 0,5-1 cm	Nhỏ, cao 1-2 cm, đường kính 0,2-0,4 cm	Lá dài 1-1,5cm, rộng 0,2-0,3 cm	Cao 4-5 cm, đường kính từ 0,3-0,4 cm, và có 4-5 đốt	Có đường kính 0,3-1.5 mm, dài 2-4 cm	Đường kính hoa 8-11cm	Hoa quan sát ở cây 3-4 năm tuổi
Colchicine	*Hình dạng*	Không ổn định, dạng khối,dạng tấm, bề mặt sần xù. Bên trong đặc một số trường hợp là xốp, có khoang trống.	Có nhiều hình dạng: hơi dẹp, tròn bị soắn.	Không ổn định, nhiều biến đổi dạng soắn, lá dày, bề mặt bóng, một số có sẻ thuỳ ở chóp lá	Dạng trụ tròn, đốt thưa, nhưng không đều nhau, một số ít có đốt ngắn và phình to.	To, đầu rễ bóng, mọng nước, có lớp lông phủ bên ngoài, rễ xuất hiện sớm.	Khuôn hoa hình sao, cân đối. cánh hoa thuôn dài và nhọn, hương thơm hơi nồng gắt.	Có sự biến đổi nhiều và không ổn định.
	Màu sắc	Có nhiều dạng màu sắc như xanh lá, hơi vàng, trắng, vàng, nâu	Màu xanh dậm hoặc nhạt, có chồi màu trắng hoặc màu tím, một số có màu hơi vàng	Xanh đậm hoặc nhạt, và có cả màu trắng màu tím. Một số có màu hơi vàng.	Có màu xanh lá, một số trường hợp có màu trắng xanh hoặc màu hơi tím	Màu xanh hơi trắng.	Có nhiều biến đổi như màu tím hồng, hồng hơi trắng, viền tím cánh hoa rộng hơn và màu nhạt hơn, hoặc không còn. một số hoa có đốm tím đậm trên cánh.	Mô sẹo/ protocorm có màu trắng, vàng hoặc nâu đều bị chết sau khi cấy chuyền, chồi có màu này cũng vậy.
	Kích thước	Không đồng đều, 0,5-1,5 cm	Thường lớn, cao từ 1-3cm, đường kính 0,3-0,6 cm	Dài 1,5-2cm, rộng 0,3-0,5 cm	Cao 4-6 cm, đường kính 0,3-0,6 cm và có 4-5 đốt	Dài 3-5 cm. đường kính 1-1,5 mm.	Đường kính mặt hoa 9-13 cm	Các mẫu có sự biến động lớn.
DMS	*Hình dạng*	Không ổn định, dạng khối,dạng tấm, bề mặt sần xù. Bên trong đặc, mọng nước, một số có phiến mỏng bao quanh.	Thường ngắn, có dạng tròn hoặc hơi dẹp, một số bị soắn cuộn.	Bề mặt sần xù, lá dày, đầu lá hơi bo tròn, một số lá cuộn tròn dạng ống.	Dạng trụ tròn, thân thường ngắn, nhiều đốt, phình to, thân có nhiều mầm phát triển chồi.	To, đầu rễ bóng, bề mặt hơi khô, có lớp lông trắng phủ bên ngoài	Cơ bản hoa vẫn hình sao nhưng không đều, một số trường hợp hoa bị biến dạng, cánh soắn hoặc cuộn lại, hương thơm dịu.	Có sự biến đổi nhiều và không ổn định.
	Màu sắc	Có màu xanh nhạt, hoặc màu xanh hơi vàng hoặc nâu.	Có màu xanh đậm hoặc màu hơi ngã vàng.	Màu xanh đậm hoặc hơi ngã vàng	Màu xanh đậm hoặc hơi ngã vàng	Màu xanh hơi trắng hoặc vàng nhạt	Mà tím hồng, hoặc hồng nhạt	Thay đổi nhiều về độ đậm nhạc của màu sắc.
	Kích thước	Không đồng đều, 0,5-1 cm	cao 1-2 cm, đường kính 0,3-0,5 cm	Dài 1-1,5cm, rộng 0,3-0,5cm	Cao 3-5 cm đường kính 0,3-0,6 cm	Dài 3-4cm. đường kính 1-1,5 mm.	Đường kính hoa 8-9 cm	Tương đối ổn định.



Hình 3.21. Hình thái biến dị mặt hoa của một số dòng đột biến. ***A****. Hoa cây đối chứng;* ***B.*** *Hoa nhỏ, cánh hoa dày của dòng M14;* ***C.*** *Hoa có cánh hoa thuôn dài của dòng HX4;* ***D.*** *Hoa bị biến dạng của dòng M11;* ***E****. Hoa có kích thước lớn của dòng M2;* ***F****. Cây không ra hoa, có lên mầm gốc;* ***G****. Hoa có đốm tím trên cánh hoa của dòng M5;* ***H****. Hoa bị biến dạng dòng M9;* ***I.*** *Hoa có kích thước lớn của dòng M8;* ***J.*** *Cây không ra hoa, có chồi phát triển;* ***K.*** *Hoa có đốm tím trên cánh hoa của dòng M7;* ***L.*** *Hoa có cánh hoa thuôn dài của dòng M17.*



Hình 3.22. Hình thái mặt hoa được dàn trải trên mặt phẳng của một số dòng lan đột biến (M1 là hoa đối chứng)

Ngoài các đặc điểm hình thái cơ quan sinh dưỡng biến đổi khác với cây đối chứng. Một điểm khác biệt rất quan trọng cũng xuất hiện đó là những thay đổi về màu sắc, hình dạng và kích thước của hoa. Trong 28 dòng đột biến được lựa chọn nhân giống và trồng thử nghiệm ở vườn sau thời gian 3 năm đã có 11 dòng cho ra hoa, với mặt hoa có đặc điểm khác với hoa của cây ban đầu. Có 2 dòng M9, M11 có hoa xuất hiện cánh hoa bị biến dạng, làm cho cánh hoa bị uốn xoắn cong lại, sắc tím của hoa nhạt, mắt hoa không phân biệt rõ. Dòng M17, M8, M2 ra hoa có kích thước to nhưng màu sắc nhạt hơn so với hoa cây đối chứng, viền tím ở cánh hoa cũng không còn xuất hiện. Hoa của dòng M5, M7 có màu hoa bị biến đổi, viền tím ở cánh hoa không còn xuất hiện, cánh hoa còn xuất hiện những đốm nhỏ màu tím, mắt hoa cũng không thấy rõ. Có 2 dòng HX4, HX5 hoa có cánh hoa trở nên thuôn, dài hơn và không còn căng bóng như hoa cây đối chứng. Hoa của dòng M14 có kích thước nhỏ, nhưng cánh hoa trở nên dày, giòn, bẻ rất dễ gãy. Ngoài ra còn có hoa của dòng M16 cánh hoa mỏng, màu hoa nhạt, viền tím cánh hoa không còn, vùng màu mắt hoa cũng không phân biệt rõ ở hai bên, màu mắt hoá lại đậm hơn (Bảng 3.14, hình 3.21; 3.22).

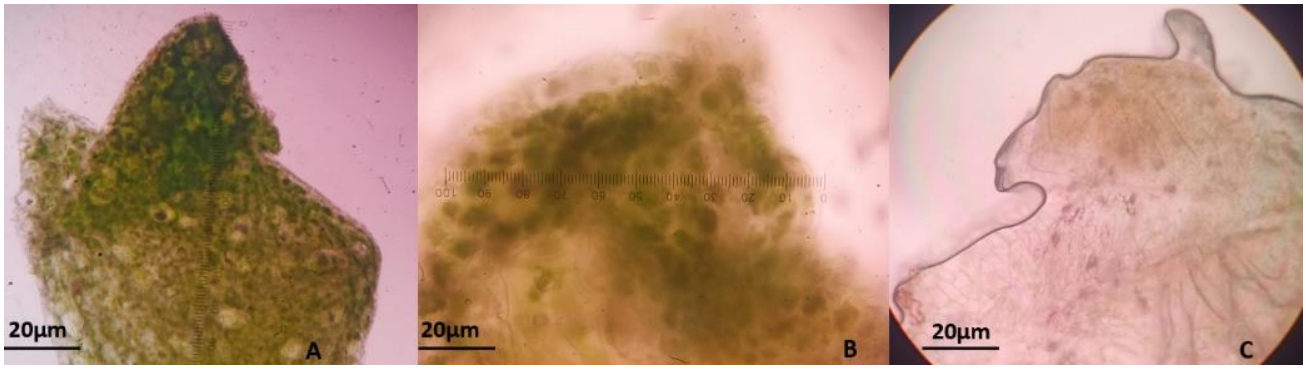
Nghiên cứu của Zhang và Gao (2020), về tạo cây tứ bội *in-vitro* từ protocorm ở loài *D. offcinale,* có kết luận các đặc điểm kiểu hình của cây con lưỡng bội và tứ bội có sự khác biệt. Cây tứ bội thể hiện sự khác biệt ở một số đặc điểm kiểu hình như chiều cao cây con, chiều dài lá và chiều dài rễ là lớn hơn so với cây con lưỡng bội. Các đặc điểm đường kính thân, đường kính rễ, kích thước hoa ở cây tứ bội lớn hơn nhiều so với cây lưỡng bội. Tuy nhiên, số lá, chiều rộng lá, số đốt thân, chiều dài đốt, số rễ, kích thước lá, chiều dài trụ hoa là tương tự nhau giữa hai thể [202]. Một nghiên cứu khác của Srivastava và cộng sự (2018), tạo đột biến *in-vitro* lan *Aerides crispa* Lindl bằng colchicine, EMS và bức xạ gamma, kết quả nghiên cứu tạo ra các dòng biến dị về hình dạng lá, màu sắc, sọc trắng, độ dày, chiều dài, rộng cũng như chiều dài và độ dày của rễ [179].

3.3.2. Đặc điểm giải phẫu cây đột biến

3.3.2.1. Đặc điểm giải phẫu biểu mô lá, thân và rễ

Thực hiện làm tiêu bản quan sát tế bào đỉnh sinh trưởng, thân non, đầu rễ và biểu mô lá của các mẫu thí nghiệm. Đỉnh sinh trưởng ở các mẫu đối chứng, xử lý colchicine và xử lý DMS

về hình thái có sự biến đổi khác nhau, đỉnh sinh trưởng xử lý colchicine có tế bào kích thước lớn, sắp xếp rời rạc, không theo hệ thống. Đối với đỉnh sinh trưởng xử lý DMS có hình dạng không ổn định, tế bào có xu hướng kéo dài. Mẫu đối chứng có màu xanh đậm, tế bào xếp chặt chẽ, hình dạng tròn và ổn định hơn, ít có sự thay đổi (Hình 3.23). Kết quả này cho thấy colchicine và DMS đã có tác động đến cấu trúc mô, tế bào dẫn đến các thay đổi về hình dạng, trật tự sắp xếp và kích thước tế bào.



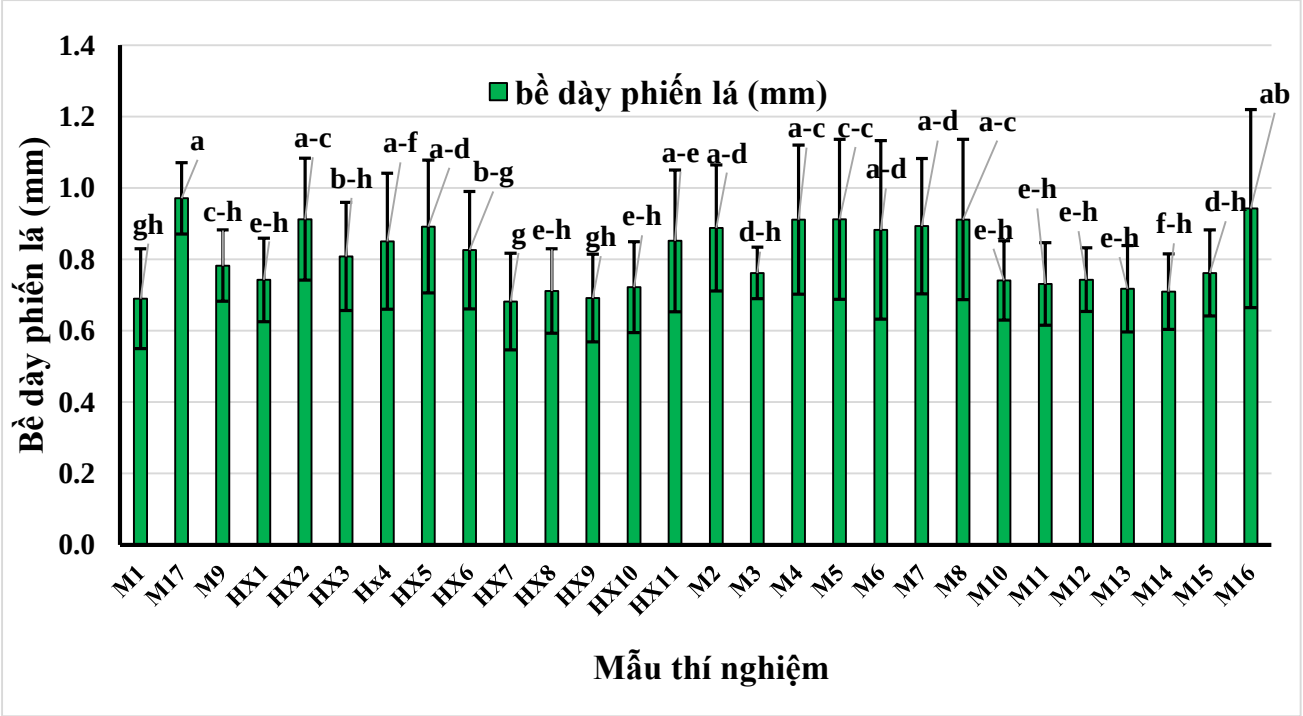
Hình 3.23. Đỉnh sinh trưởng của lan Giả hạc tím Huế được quan sát dưới kính hiển vi.
A. *Mẫu đối chứng không xử lý hoá chất;* ***B.*** *mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17);* ***C*** *Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9).*

Quan sát mặt cắt ngang phiến lá của các mẫu thí nghiệm nhận thấy phiến lá của cây đột biến bằng colchicine và DMS là dày hơn so với cây không được xử lý, đặc biệt ở mẫu lá xử lý colchicine có tế bào lớn, lớp tế bào ngoài cùng của lá rất dày và lá có nhiều mạch dẫn, chiều dày của phiến lá của những mẫu xử lý bằng colchicine dao động trong khoảng 0,81 mm đến 0,97 mm, đạt cao nhất là ở mẫu M17 (0,97 mm) (Bảng P12-3.11 phụ lục 12 , hình 3.24B, 3.25).

Ở mẫu lá của cây xử lý DMS không thấy rõ mạch dẫn, lá có màu xanh đậm, các tế bào có xu hướng kéo dài, điều này khác với mẫu không xử lý và mẫu xử lý bằng colchicine. Chiều dày phiến lá mẫu xử lý bằng DMS đạt từ 0,68 mm đến 0,78 mm, cao nhất là ở mẫu M9 (0,78 mm) (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.24C, 3.25). So với lá của cây đối chứng các lớp tế bào đều nhau, tế bào biểu bì hình dạng như nhau, dạng hình tròn, phiến lá mỏng dần về hai bên mép, chiều dày của phiến lá đạt là 0,69 mm, lượng diệp lục phân bố đều hai bên mặt lá (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.24A, 3.25).

Hình 3.24. Mặt cắt ngang của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi.

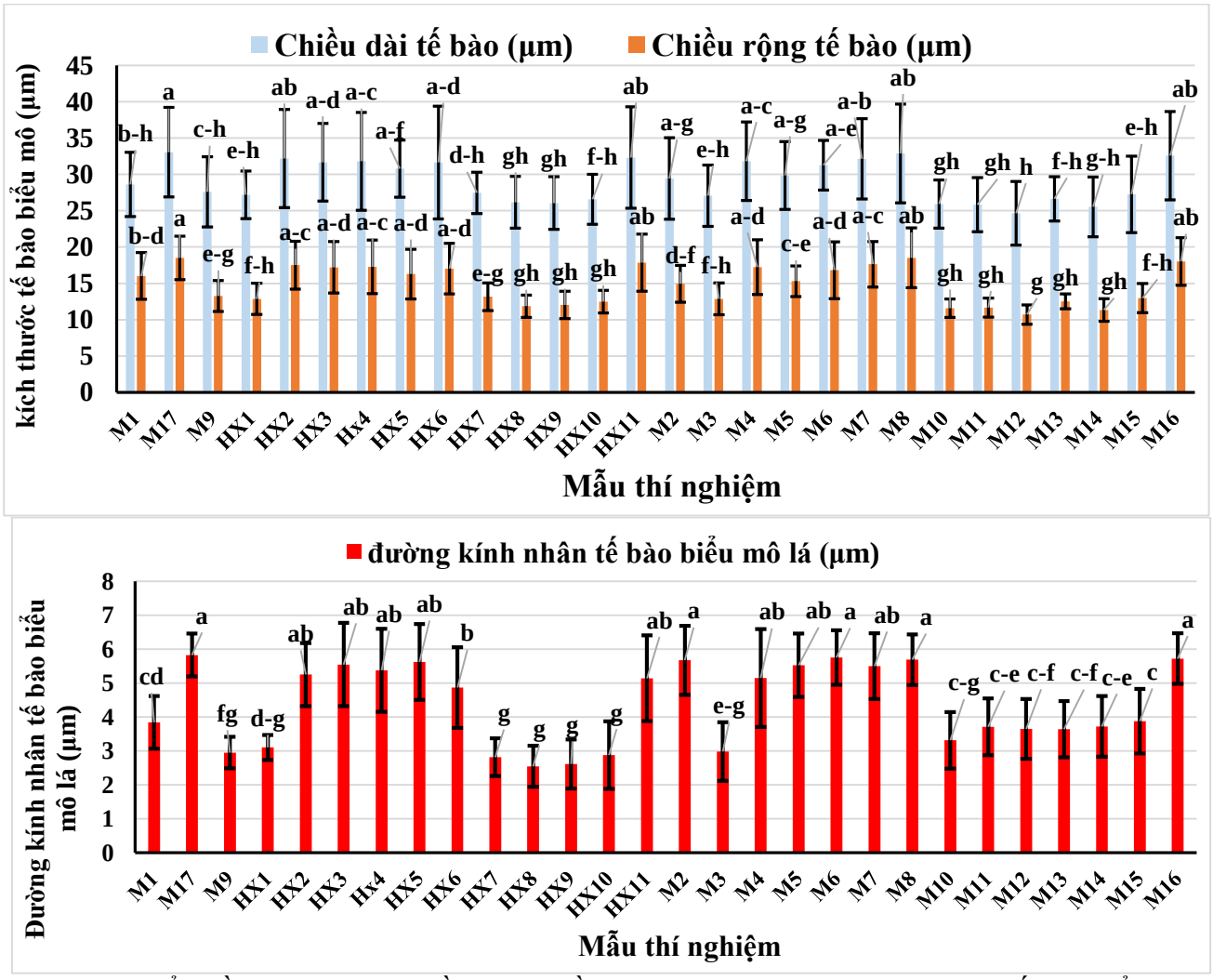
A: *Lá đối chứng không xử lý hoá chất;* ***B:*** *mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17) ;* ***C:*** *Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9).*



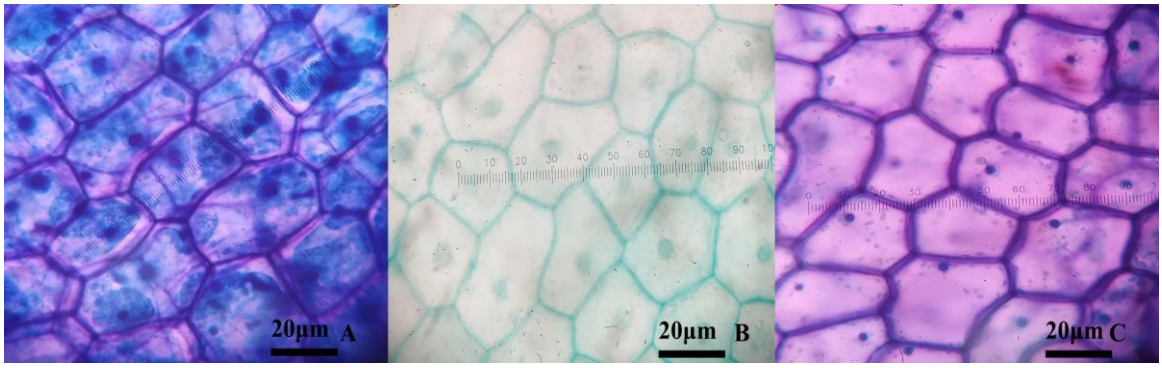
Hình 3.25: Biểu đồ bề dày của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi. *Các chữ cái (a, b, c…) khác nhau trên cột cùng màu chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với (p<0,05, Duncan's test).*

Các tế bào biểu mô lá quan sát từ mẫu xử lý bằng colchicine có kích thước lớn với chiều dài từ 29,44 - 33,06 µm; chiều rộng các tế bào là từ 14,94 - 18,49 µm, thành tế bào dày, nhân tế bào lớn đường kính nhân từ 4,87 - 5,83 µm; tế bào sắp xếp không trật tự, hình dạng tế bào có sự biến đổi không ổn

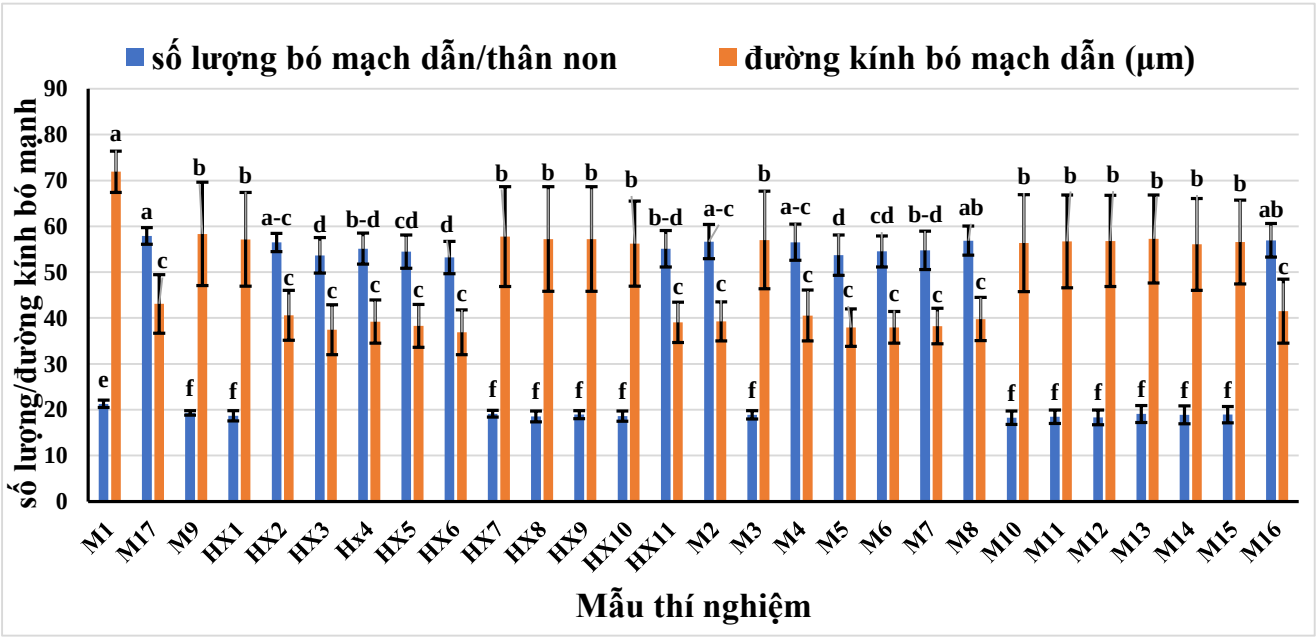
định (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.26; 3.27B) điều này khác với các tế bào mẫu đối chứng có kích thước tế bào trung bình có chiều dài 28,62 µm, chiều rộng 16,02 µm, đường kính nhân 3,84 µm (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.26; 3.27A). Mẫu được xử lý bằng DMS, các tế bào có sự thay đổi lớn về hình dạng và trật tự sắp xếp, kích thước tế bào không thay đổi nhiều so với đối chứng, chiều dài tế bào từ 24,64 - 27,60 µm, chiều rộng tế bào từ 10,71 - 13,27 µm, tế bào có thành tế bào dày, đường kính nhân từ 2,55 - 3,88 µm (Bảng P12-3.11 phụ lục 12, hình 3.26; 3.27C). Kết quả cho thấy Colchicine và DMS đã tác động làm thay cấu trúc, hình dạng, kích thước tế bào biểu mô lá, từ đó dẫn đến những thay đổi về hình thái lá lan Giả hạc tím Huế.



Hình 3.26. Biểu đồ kích thước (chiều dài, chiều rộng) và đường kính nhân của tế bào biểu mô lá. *Các chữ cái (a, b, c…) khác nhau trên cột cùng màu chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với (p<0,05, Duncan's test).*



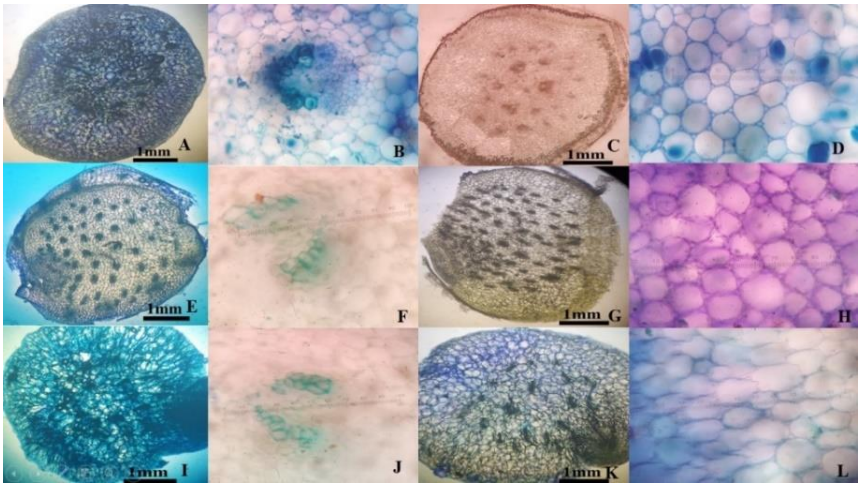
Hình 3.27. Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế.
(***A.*** *Tế bào lá đối chứng không xử lý hoá chất;* ***B.*** *mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17) ;* ***C.*** *Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9).)*



Hình 3.28. Biểu đồ số lượng bó mạnh và đường kính bó mạnh dẫn trong thân non của lan Giả hạc tím Huế. *Các chữ cái (a,b,c…) khác nhau trên cột cùng màu chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với (p<0,05, Duncan's test)*

Hình 3.29 giải phẫu phần thân non cho thấy rõ sự khác biệt giữa cây đột biến và cây đối chứng. Số lượng bó mạnh trong cấu trúc thân non của cây đối chứng trung bình là 21,27 bó mạch/thân, dao động trong khoảng 20-22 bó mạch, sắp xếp thành nhiều vòng tròn từ ngoài vào trong đồng tâm, bó mạch tròn và kích thước tương đồng nhau, có đường kính 71,89 µm. Các tế bào xung quanh có hình tròn sắp xếp trật tự, kích thước tương đồng nhau (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.28, 3.29A, B, C, D). Mẫu chồi xử lý colchicine, có số lượng bó mạch rất

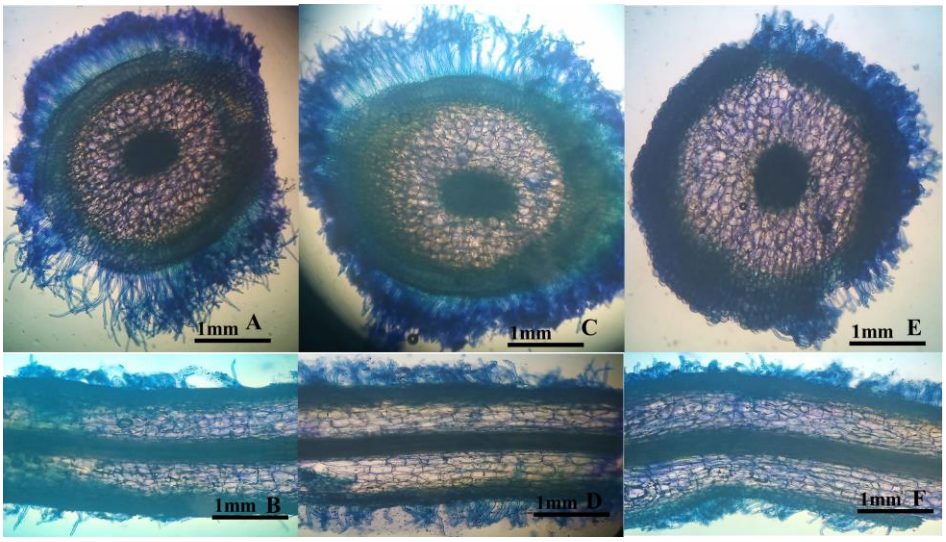
nhiều, đạt từ 53,20 – 57,87 bó mạch, kích thước bó mạch nhỏ, dẹp, đường kính bó mạch dao động từ 36,87 – 43,08 µm. Ngoài ra, các bó mạch sắp xếp không theo trật tự, thường thay đổi, có xu hướng phân bố đều trong thân, và các tế bào xung quanh có kích thước lớn, tế bào không đồng đều nhau (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.28, 3.29E, F, G, H). Số lượng bó mạch trong thân ở chồi xử lý bằng DMS dao động từ 18,27-19,33 bó mạch, các bó mạch sắp xếp thưa, không đều nhau, bó mạch dẹp, đường kính từ 56,06- 58,35 µm, tế bào mô xung quanh có xu hướng thay đổi hình dạng nhiều, không đồng đều, lớp vỏ ngoài thân mỏng hơn so với đối chứng (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.28, 3.29I, J, K, L).



Hình 3.29. Hình thái giải phẫu mặt cắt ngang của thân chồi lan Giả hạc tím Huế.

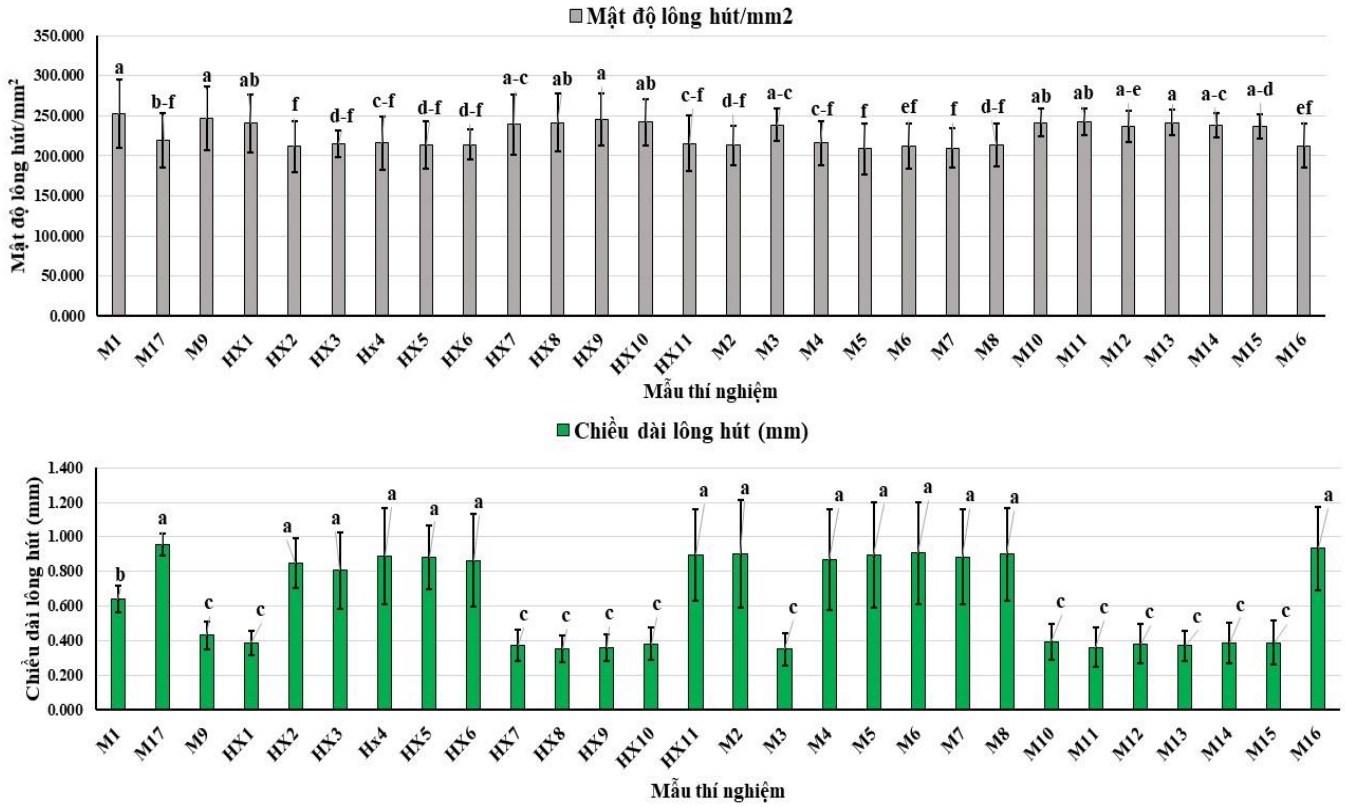
A, B, C, D: *mẫu thân chồi đối chứng ;* ***E, F, G, H:*** *mẫu xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ (M17);* ***I, J, K, L.*** *Mẫu xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ (M9);* ***A, E, I, C, G, K:*** *mặt cắt ngang;* ***B, F, J:*** *bó mạch dẫn;* ***D, H, L:*** *Tế bào xung quanh mạnh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

Quan sát hình thái giải phẫu của rễ ở các mẫu cây thí nghiệm (đối chứng, mẫu xử lý colchicine và xử lý DMS) cũng thể hiện sự sai khác. Tuy nhiên mức đội sai khác ở rễ không nhiều, điểm sai khác chủ yếu tập trung vào hình thái và số lượng lông hút. Rễ cây đối chứng lông hút phân bố đều, số lượng đạt 252,47 lông hút/mm^2 ở miền lông hút và có chiều dài 0,64 mm (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.30A, B; 3.31). Rễ cây được xử lý bằng colchicine có kích thước to, dài, chiều dài lông hút đạt trong khoảng 0,81 – 0,96 mm, tuy nhiên mật độ lông hút từ 209,93 – 219,13 lông hút/mm^2 (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.30C, D, 3.31). Cây xử lý DMS rễ có kích thước to, lớp tế bào bao bên ngoài dày, lông hút nhỏ, lại mật độ lông hút từ 237,33 – 247,13 lông hút/mm^2, nhưng chiều dài lông hút đạt từ 0,35 – 0,43 mm ngắn hơn rất nhiều so với đối chứng (0,64 mm) (Bảng P12-3.12 phụ lục 12, hình 3.30E, F; 3.31).



Hình 3.30. Hình giải phẫu rễ lan Giả hạc tím Huế.

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



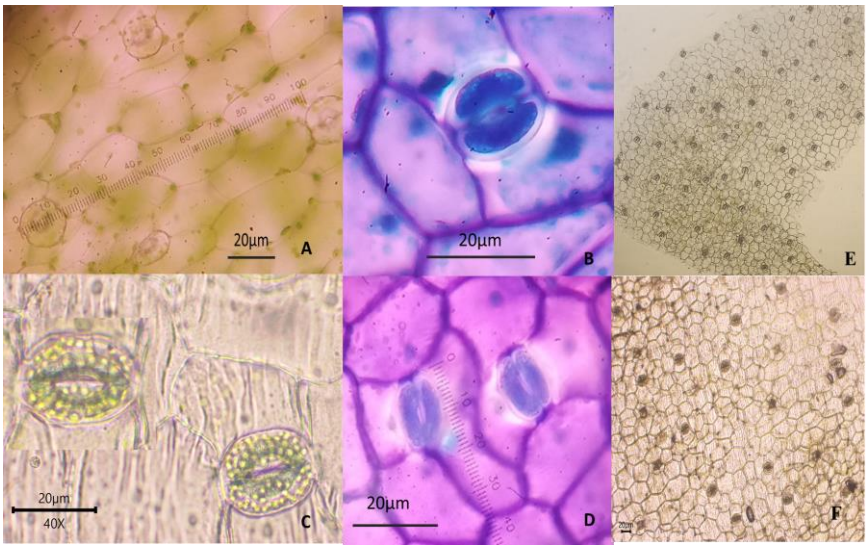
Hình 3.31: Biểu đồ thể hiện mật độ và chiều dài lông hút của rễ lan Giả hạc tím Huế.

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

3.3.2.2. Đặc điểm tế bào khí khổng

Các mẫu quan sát được thu vào thời điểm 8-10 giờ sáng, sự thay đổi đặc điểm của khí

khổng được coi là một trong những dấu hiệu thường gặp ở thể đa bội. Theo kết quả quan sát tế bào khí khổng của các mẫu cây được xử lý colchicine có hình dạng bầu dục, phân bố rải rác, số lượng ít, hình dạng không đồng đều, tế bào có kích thước lớn, chiều dài khí khổng đạt từ 27,57 – 29,47 µm, chiều rộng đạt từ 23,03 – 24,79 µm, kết quả này lớn hơn so với khí khổng cây lưỡng bội đối chứng (dài 15,79 µm ; rộng 13,33 µm). Tuy nhiên mật độ khí khổng của cây xử lý colchicine chỉ từ 157,02 – 196,73 khí khổng/mm^2 trong khi cây đối chứng đạt 235,80 khí khổng/ mm^2. Diện tích khí khổng ở cây xử lý colchicine dao động ở khoảng 506,58 – 594,28 µm^2, kết quả này cao hơn nhiều so với cây đối chứng là 168,66 µm^2 (Bảng 3.15, hình 3.32). Một điểm khác biệt nữa là khi ở trạng thái mở khe hở của khí khổng cây lưỡng bội to, tròn đều; ngược lại đối với tế bào khí khổng của cây đa bội khe hở tạo ra hẹp và nhỏ, đều này có thể do thành tế bào của tế bào hạt đậu mỏng hơn so với thành tế bào ở cây lưỡng bội. Đối với cây xử lý DMS đặc điểm của khí khổng được quan sát cho thấy số lượng nhiều, kích thước tế bào nhỏ, hình dạng không ổn định, khe hở khí khổng khi mở hẹp so với khí khổng cấy đối chứng. Những chỉ tiêu như chiều dài (13,32 – 14,84 µm), chiều rộng (10,83 – 12,52 µm), diện tích (115,06 - 158,82 µm^2), mật độ (212,73 – 230,87 tế bào/mm^2) của khí khổng cây xử lý DMS là không có sự khác biệt quá lớn so với cây đối chứng về mặt thống kê là giống nhau (Bảng 3.15, hình 3.32).



Hình 3.32. Hình thái khí khổng của lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy chồi.
A, B: *Khí khổng ở lá cây đối chứng (40x);* ***C:*** *Khí khổng ở lá cây xử lý colchicine (40x);* ***D:*** *Khí khổng ở lá cây xử lý DMS (40x);* ***E:*** *Số lượng khi khổng ở lá đối chứng (10x);* ***F:*** *Khí khổng ở lá có xử lý colchicine (10x).*

Kết quả phân tích tế bào khí khổng của cây xử lý colchicine có phần tương đồng với nghiên cứu của Taratima và cộng sự (2023) về tạo đa bội trên lan *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw bằng colchicine, phân tích tế bào trên mẫu lá đa bội (4n) cho thấy tế bào biểu bì, khí khổng

có kích thước lớn hơn ở mẫu đối chứng 2n, tuy nhiên mật độ khí khổng thấp hơn rất nhiều so với cây lưỡng bội, kích thước và số lượng tế bào khí khổng có mối tương quan nghịch [183]. Các dòng đột biến tạo trong nghiên cứu của Srivastava và cộng sự (2018), ở loài lan *Aerides crispa* Lindl. bằng tác nhân colchicine, EMS và bức xạ gamma cũng cho thấy sự thay đổi tăng lên hoặc giảm đi về kích thước, mật độ của khí khổng so với đối chứng tuỳ vào cường độ của tác nhân và thời gian xử đột biến [179].

Việc đánh giá bội thể được thực hiện bằng cách sử dụng các đặc điểm khí khổng rất thuận tiện và nhanh chóng, đồng thời nó cho phép các nhà tạo giống sàng lọc trước các thể đa bội tạm ở giai đoạn đầu. Tuy nhiên, phương pháp này dễ bị cản trở bởi các thể hỗn bội hoặc thể khảm [190].

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

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

25	M12	DMS	13,32±0,71^{b}	10,83±0,43^{b}	115,06±9,58^{b}	225,20±8,49^{a}
26	M13	DMS	14,05±0,86^{b}	11,72±0,62^{b}	134,72±15,33^{b}	223,33±7,24^{ab}
27	M14	DMS	13,72±0,76^{b}	11,47±0,47^{b}	126,75±11,82^{b}	226,93±5,06^{a}
28	M15	DMS	14,26±0,67^{b}	11,77±0,55^{b}	134,52±12,16^{b}	220,47±6,30^{a-c}

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

3.3.2.3. Hàm lượng diệp lục và carotenoid

Ở thực vật các sắc tố quang hợp được tổ chức thành những phức hệ quang hợp gắn trên màng thylakoid trong lục lạp của tế bào, gồm có phân tử chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb) và các carotenoid. Khi xử lý đột biến, các hoá chất đã làm biến đổi cấu trúc và làm thay đổi hàm lượng các chất trong tế bào, trong đó có chất diệp lục và carotenoid. Kết quả kiểm tra hàm hượng diệp lục và carotenoid được thực hiện trên 28 mẫu lan trong đó có 27 mẫu lan Giả hạc tím Huế xử lý đột biến và 1 mẫu đối chứng không xử lý hoá chất (M1), mẫu thu vào thời gian 8-10 giờ sáng được trình bày ở bảng 3.16.

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

Công bố của Cao Phi Bằng (2018) về những biến đổi sinh lý, hoá sinh của lan *D. anosmum* Lindl. trong quá trình luyện *ex-vitro* cho thấy hàm lượng diệp lục của cây con được trồng ở vườn sau 56 ngày là đạt giá trị cao nhất với Chla 0,733 mg/g, Chlb 0,480 mg/g, chl tổng số đạt 1,217 mg/g, hàm lượng carotenoid đạt 0,125 mg/g và tỷ lệ Chla/Chlb là 1,55 [3]. Một nghiên cứu khác của Đào Quốc Hưng và cộng sự (2021) về quy trình vi nhân giống lan Giả hạc Di Linh TaLy (*D. anosmum)* cho thấy hàm lượng Chla cao nhất là 0,652 mg/g, Chlb 0,341 mg/g, Chl tổng số 0,994 mg/g và hàm lượng carotenoid là 0,313 ở giai đoạn 6 tuần nuôi chồi với ánh sáng xanh và đỏ [19], những kết quả này khá tương đồng với kết quả của luận án.

Theo Mustika và Semiarti (2021) về nuôi cấy *in-vitro* cây lan *D. lineale* Rolfe để nhân giống, tác giả đã phân tích hàm lượng diệp lục trong lá và đạt giá trị cao nhất là 1,58 mg/g, cụ thể hàm lượng Chla là 1,11 mg/g và Chlb là 0,47 mg/g, trong khi hàm lượng diệp lục trong rễ cao nhất là 0,34 mg/g [140]. Trong công bố của Sekhi và cộng sự (2022) trên cây dâu tây *(fragaria ananassa)* được làm biến đổi bằng DMS thì kết quả phân tích hàm hượng Chla, Chlb và Chl tổng số có giảm đi so với cây đối chứng và khác nhau giữa các dòng biến dị [169].

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

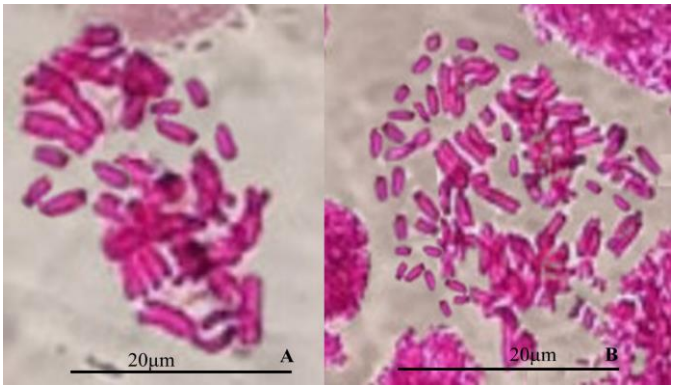
TT	Mẫu	Hoá chất xử lý	Chlorophyll a (mg/g)	Chlorophyll b (mg/g)	Chlorophyll tổng (mg/g)	Carotenoid (mg/g)	Chla/Chlb
1	M1	-	0,770±0,015^{b}	0,416±0,004^{b}	1,186±0,012^{b}	0,193±0,001^{d}	1,853±0,001^{e}
2	HX2	Colchicine	0,183±0,002^{p}	0,091±0,007^{s}	0,274±0,013^{j}	0,072±0,005^{m}	2,011±0,018^{c}
3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

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

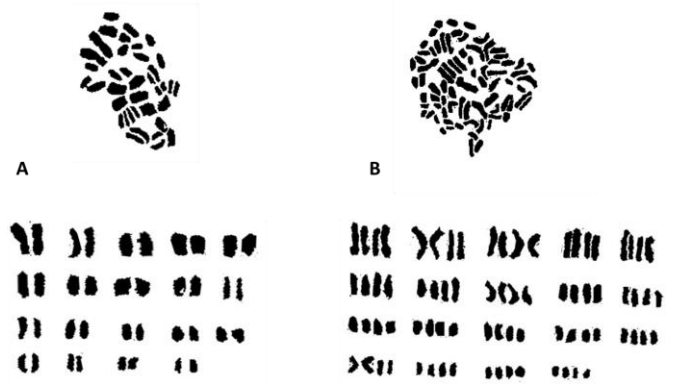
3.3.2.4. Đặc điểm bộ nhiễm sắc thể

Đếm số lượng NST là phương pháp xác định mức độ đa bội đáng tin cậy và rõ ràng nhất, đây cũng là phương pháp khẳng định lại các đặc điểm tế bào (tế bào biểu bì, khí khổng) đã quan sát được [190], trong nghiên cứu này, số lượng NST trong các đầu rễ của cây con biến dị được đếm để xác định dạng đột biến đa bội. Kết quả quan sát cho thấy các thể tứ bội và tạp bội đã hình thành dưới tác động của colchicine, tuy nhiên, tỷ lệ cảm ứng đa bội của cây con phụ thuộc nhiều vào nồng độ và thời gian xử lý.

Qua quan sát hình ảnh NST dưới kính hiển vi đã đếm được số lượng NST ở mẫu rễ cấy đối chứng không xử lý hoá chất đột biến là 2n=2x=38, số lượng NST ở mẫu rễ cây được xử lý colchicine đã quan sát và đếm được số lượng NST là 4n=4x= 76 (Hình 3.33).



Hình 3.33. Bộ nhiễm sắc thể lan Giả hạc tím Huế quan sát dưới kính hiển vi (100x). ***A**: Bộ NST cây đối chứng 2n=38; **B:** Bộ NST cây xử lý bằng colchicine, tứ bội 4n=76 (M17).*



Hình 3.34. Hình thái NST và sơ đồ karyotype của lan Giả hạc tím Huế. ***A**: Cây lưỡng bội 2n= 38. **B**: cây xử lý colchicine (tứ bội 4n=76) dòng M17.*

Phân tích karyotype được thực hiện trên các NST trên 2 mẫu cây lan Giả hạc tím Huế là cây đối chứng không xử lý hoá chất đột biến (lưỡng bội 2n = 38), cây xử lý colchicine (tứ bội 4n = 76). Các NST được đo, ghép lại thành đôi để tạo ra sơ đồ karyotype (Hình 3.34) của NST ở kì giữa của phân chia tế bào.

Chi *Dendrobium*, hầu hết các loài đều có 2n = 38 nhiễm sắc thể, ở một số loài như *D. leonis* và *D. dixanthum* có 2n = 40 [189], và 8 loài thuộc nhóm *Lautoria* có 2n = 36. Ở *Dendrobium*, các thể đa bội được liên kết với một số loài và giống lai. Ở *Phalaenopsis*, hầu hết các loài đều có 2n = 38 nhiễm sắc thể, ngoại trừ nhóm *Aphyllae* có 2n = 34 và 36 nhiễm sắc thể. Tuy nhiên, đã quan sát thấy sự khác biệt đáng kể về kích thước của nhiễm sắc thể và bộ gen của các loài và giống lai từ chi này [135]. Yang Liu và cộng sự (2023), cũng đã có kết quả tương tự khi phân tích NST của *D. officinale*, cây lưỡng bội có bộ NST 2n = 2x = 38 và cây tứ bội tạo ra bằng cách xử lý colchicine là 4n= 4x =76, [122].

Tuy nhiên, phương pháp đếm số lượng nhiễm sắc thể trong kì giữa cũng có những hạn chế do nhiễm sắc thể có thể bị chồng lên nhau, do đó gây khó khăn cho việc đếm. Vì vậy, việc xác định số lượng nhiễm sắc thể hiệu quả của thực vật là vô cùng khó khăn [190]. Kết quả nghiên cứu hiện tại còn cần được xác nhận thêm qua các phân tích phân tử hoặc trồng thử nghiệm qua các thế hệ. Xác định các biến thể nhiễm sắc thể là rất quan trọng cho việc phân tích tiến hóa, nghiên cứu và nhân giống các giống cây trồng mới. Các thông số karyotype là một trong những chỉ số quan trọng để phân loại và xác định thực vật, từ đó cho phép nghiên cứu sự đa dạng di truyền của chúng về mặt tế bào học [200].

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

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

DNA tổng số sau khi tách chiết được điện di trên agarose gel 1%. Kết quả điện di cho thấy 34 mẫu DNA tổng số thu được mặt dù có bị đứt gãy nhưng vẫn có band vạch kích thước lớn (trên 10kb), vạch sáng rõ và có $OD_{260/280}$ trong khoảng 1.8–2.0. Do vậy, DNA tổng số tách chiết từ 34 mẫu lan có nồng độ và chất lượng đảm bảo để làm nguyên liệu cho những thí nghiệm tiếp theo (Hình P20-3.6, phụ lục 20).

Kết quả sàng lọc 63 mồi RAPD trên 2 mẫu chọn ngẫu nhiên cho thấy có 10 mồi RAPD cho hệ số các band DNA hình thành cao nhất (Hình 3.35, bảng 3.17). Kết quả này được chúng tôi lựa chọn để đánh giá đa dạng di truyền của 34 mẫu lan trong quần thể nghiên cứu.

Kết quả khuếch đại PCR-RAPD của 34 mẫu lan Giả hạc với 10 mồi RAPD cho tỷ lệ band DNA đa hình cao trong kết quả sàng lọc mồi được chúng tôi trình bày ở bảng 3.17. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu lan Giả hạc cho tỷ lệ khuếch đại PCR thành công đạt 100%. Tổng số 10 mồi RAPD sử dụng trong nghiên cứu đã tạo ra 70 band DNA/34 mẫu lan Giả hạc, trung bình đạt 7 band DNA/mỗi mồi, kích thước các band DNA dao động từ 350 – 1600 bp. Tổng số band DNA đa hình thu được là 53 band, chiếm 75,71 % trên tổng số band DNA hình thành. Các mồi RAPD khác nhau thì số band DNA đa hình thu được cũng khác nhau, dao động từ 3 đến 9 band DNA, tương ứng với tỷ lệ band DNA đa hình dao động trong mỗi mồi RAPD là 50 đến 100%. Hai mồi RAPD có ký hiệu P6 và P9 cho tỷ lệ band DNA đa hình lớn nhất, đạt 100 %, và mồi OPA-03 cho tỷ lệ band DNA đa hình thấp nhất, đạt 50 % (Bảng 3.17). Theo nghiên cứu của Basavaraj và cộng sự (2020) cho rằng do đặc điểm trình tự bộ gene của lan có nhiều vùng lặp lại cho phép nhiều vị trí bắt cặp mồi ngẫu nhiên nên số lượng band DNA hình thành trên mỗi mồi thường dao động từ 5 đến 9 băng [59]. Kết quả này tương đương với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi khi thực hiện trên loài lan Giả hạc tím Huế. Mặt khác, theo nghiên cứu của Nei và cộng sự (1978) cho thấy rằng, để các mẫu trong quần thể nghiên cứu có sự phân nhóm cao khi sử dụng chỉ thị phân tử RAPD nhằm xây dựng cây phả hệ thì cần số lượng các band DNA khuếch đại càng lớn và số band DNA đa hình tối thiểu phải đạt 50 băng [144]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 10 mồi RAPD và thu được 53 band DNA đa hình/70 band DNA hình thành của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế. Với kết quả này, chúng tôi tiếp tục tiến hành xây dựng cây phả hệ cho 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế và phân tích đa dạng di truyền của chúng.

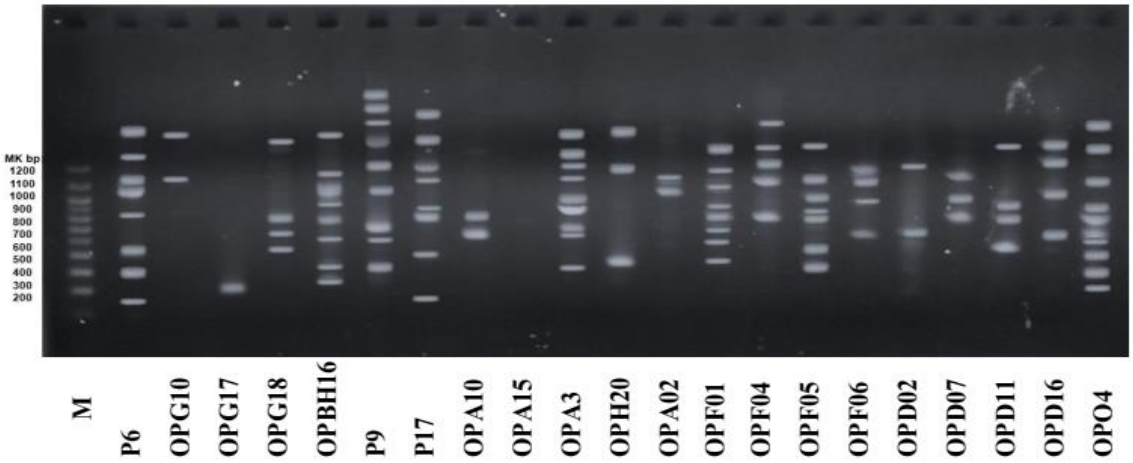
Bảng 3.17. Kết quả khuếch đại PCR dựa trên mỗi mồi RAPD của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế

TT	Mồi	Tỷ lệ cá thể khuếch đại PCR thành công (%)	Số band DNA hình thành/mồi	Số band DNA đa hình	Kích thước của band DNA (bp)	Tỷ lệ band DNA đa hình (%)
1	P6	100	8	8	650-1600	100,00
2	P9	100	9	9	450-1200	100,00
3	P16	100	5	4	450-800	80,00
4	P17	100	9	6	350-1450	66,67
5	P18	100	6	4	400-1100	66,67
6	OPA-03	100	6	3	750-1250	50,00
7	OPF-01	100	7	6	600-1050	85,71

8	OPF-05	100	5	3	600-900	60,00
9	OPO-04	100	9	6	500-1100	66,67
10	OPBH-16	100	6	4	500-800	66,67
Tổng số band DNA		**-**	**70**	**53**	**-**	**-**
Số band DNA trung bình/mỗi mồi		**100**	**7**	**5,3**	**-**	**75,71**

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

Thông và cộng sự (2010) và Sherpa và cộng sự (2022), sử dụng tác nhân đột biến vật lý bằng tia gamma trên loài lan *Dendrobium* sp. và loài lan *Dendrobium* 'Emma White', sau đó kiểm tra sự sai khác di truyền bằng chỉ thị phân tử RAPD. Kết quả thu được tỷ lệ số lượng band DNA đa hình cũng cho thấy khác nhau, tương ứng 88,89 % (*Dendrobium* 'Emma White') [172] và 19,7 % (*Dendrobium* sp.) [39]. Tỷ lệ các band DNA đa hình thu được có sự khác nhau lớn và nằm trong tỷ lệ các band DNA đa hình chúng tôi thu được khi xử lý bằng tác nhân hoá học. Trong khi đó, Khosravi và cộng sự (2009), đã tiến hành xử lý đột biến trên loài lan *Dendrobium* Serdang Beauty trên mô sẹo bằng tác nhân hoá học Colchicine. Kết quả thu được tỷ lệ các band DNA đa hình thấp hơn (tương ứng 45,08%) [109] so với nghiên cứu của chúng tôi thu được là 75,71 %.



Hình 3.35. Kết quả sàng lọc mồi PCR-RAPD trên mẫu lan được xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 8 giờ có ký hiệu mẫu là M5. M: Khối lượng thang chuẩn DNA (200-1200 bp, Biobase)

Phân tích sự đa dạng của các mẫu lan Giả hạc tím Huế trong quần thể, chỉ số i_0 cho thấy có sự đa dạng trong các mẫu được nghiên cứu, tuy nhiên mức độ đa dạng không cao, hệ số đa dạng trong từng mồi ngẫu nhiên dao động từ khoảng 0,082 đến 0,541, trung bình cho các mồi

đạt 0,300. Trong 10 mồi được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR-RAPD cho 34 mẫu lan này, kết quả mồi P9 thể hiện sự đa dạng cao nhất với giá trị i_0 đạt trung bình 0,541, tiếp đến là mồi P6 (i_0= 0,505). Mồi thể hiện sự đa dạng thấp nhất là OPBH-16 với giá trị i_0=0,082 (Bảng 3.18).

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

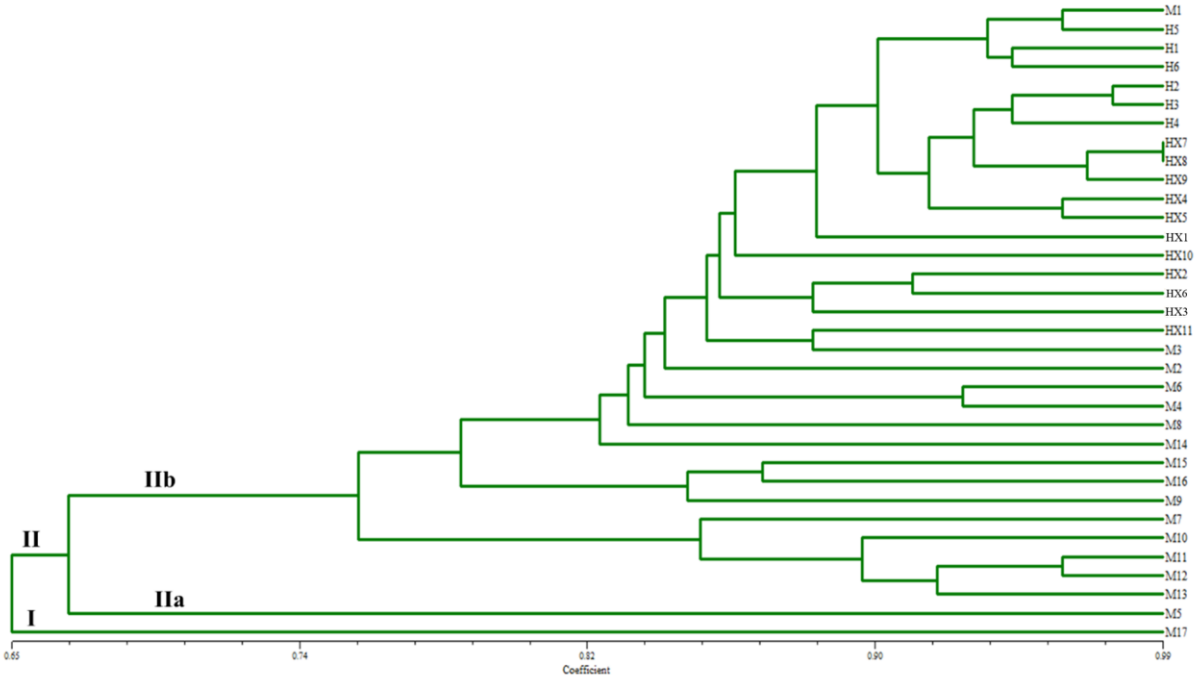
TT	Mồi	Cỡ mẫu	na*	ne*	h*	i_0*
1	P6	34	2,000	1,521	0,328	0,505
2	P9	34	2,000	1,628	0,364	0,541
3	P16	34	1,800	1,352	0,226	0,358
4	P17	34	1,667	1,335	0,211	0,327
5	P18	34	1,667	1,266	0,173	0,274
6	OPA-03	34	1,500	1,075	0,063	0,120
7	OPF-01	34	1,857	1,242	0,174	0,292
8	OPF-05	34	1,600	1,062	0,056	0,116
9	OPO-04	34	1,444	1,201	0,132	0,206
10	OPBH-16	34	1,500	1,041	0,037	0,082
11	**Trung bình/mỗi mồi**	**34**	**1,714**	**1,296**	**0,189**	**0,300**
12	**±SD**		**0,455**	**0,305**	**0,170**	**0,244**

***Ghi chú**: na* = số lượng allele được quan sát; ne* = số lượng allele có hiệu quả [Kimura and Crow (1964)]; h* = Đa dạng gen Nei's (1973); i_0* = Chỉ số đa dạng di truyền Shannon [Lewontin (1972)]; SD: độ lệch chuẩn*

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

Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Khosravi và cộng sự (2009) với hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu xử lý hoá chất với mẫu đối chứng dao động từ 0,6 – 0,94 [109]. Trong 34 mẫu phân tích có hệ số tương đồng cao nhất là 0,986 ở cặp mẫu HX7 và HX8, cặp mẫu M2 và M5 có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,580 (Phụ lục 17). Kết quả hệ số tương quan này được dùng làm cơ sở dữ liệu để xây dựng một sơ đồ hình cây nhằm phân nhóm di truyền cho 34 mẫu được phân tích. Sơ đồ này xếp nhóm dựa trên thuật toán UPGMA, theo phương pháp SAHN (Hình 3.36)

Cây phân nhóm cho thấy, 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế sử dụng trong nghiên cứu phân thành hai nhóm chính ở mức độ tương đồng di truyền 65%. Nhóm I chỉ có 1 mẫu lan có ký hiệu M17 trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đây là mẫu lan có tiềm năng cao trong việc lựa chọn để làm giống. Nhóm II gồm 33 mẫu lan còn lại và phân thành 2 nhóm phụ (IIa, IIb) ở mức độ tương đồng di truyền 66,8%. Nhóm phụ thứ nhất (IIa) chỉ có 1 mẫu lan Giả hạc tím Huế có ký hiệu M5 và trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đây là mẫu lan có tiềm năng cao trong việc lựa chọn để làm giống; nhóm phụ thứ hai (IIb) bao gồm 32 mẫu lan Giả hạc còn lại (hình 3.36).



Hình 3.36. Cây phân nhóm di truyền 34 dòng lan Giả hạc tím Huế.

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

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

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

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

3.4 Hoàn thiện quy trình tái sinh *in-vitro* một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến có triển vọng

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

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

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

Bảng 3.19. Khả năng tái sinh mô sẹo hoặc chồi của một số dòng đột biến sau 12 tuần

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

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

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

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

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

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

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

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

Khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của các mẫu HX3, M5, M17 đều có kết quả cao hơn đối chứng M1 trong đó tốt nhất là khả năng tái sinh của mẫu M17 với tỷ lệ tái sinh chồi 94,67 %, số chồi 4,76 chồi/mẫu, chiều dài chồi 3,52 cm, và chồi có số là 4,72 lá/chồi, kết quả này ở M1 là 80,67 %, 3,12 chồi/mẫu, 2,15 cm, 3,16 lá/chồi. Các mẫu còn lại đều có tỷ lệ tái sinh chồi từ mô sẹo trên 70%. Như vậy với kết quả tái sinh chồi từ mô sẹo của các mẫu đột biến cho kết quả cao và chất lượng chồi tốt, chồi to khoẻ, lá màu xanh đậm (Bảng 3.20).

3.4.3. Nhân nhanh chồi của các dòng đột biến

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím Huế là rất tốt, đều đạt tỷ lệ ra rễ 100% ở tất cả các mẫu thử nghiệm, tuy nhiên mẫu mang lại hiệu quả tốt nhất là M17 với số rễ đạt 6,31 rễ/chồi, rễ có chiều dài 5,84 cm, chiều cao cây đạt 7,01 cm và số lá đạt 6,63 lá/cây. Các mẫu thử nghiệm

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

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

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

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

+: rễ nhiều, dài nhưng nhỏ yếu, có màu trắng xanh, cây lá xanh, lá dày.

++: rễ nhiều, dài to mập, rễ có màu trắng xanh, cây lá xanh đậm, lá dày, dài.

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

Từ kết quả đã có của nội dung 3.5, chúng tôi xây dựng nên một quy trình tái sinh của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến gồm có 5 bước (Hình 3.37; quy trình 1, phụ lục 18):

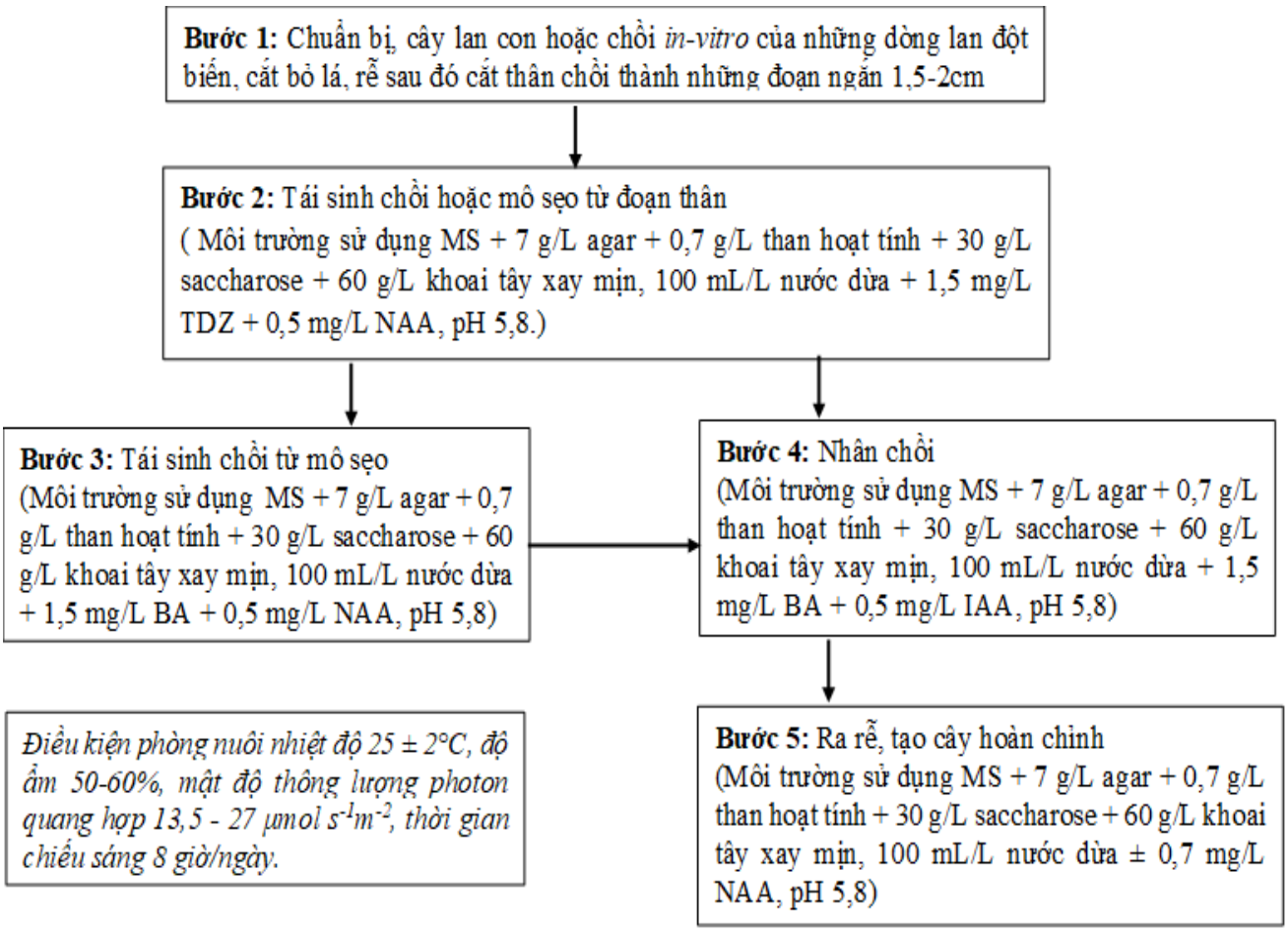
Bước 1: Chuẩn bị, chọn cây lan con hoặc chồi *in-vitro* của những dòng lan đột biến

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

Bước 3: Tái sinh chồi từ mô sẹo

Bước 4: Nhân chồi

Bước 5: Ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh



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

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

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

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

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

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

sống đạt 94,8% của lan *D. thyrsiflorum* Rchb. f. ex Andre được trồng trên giá thể bảng dương xỉ và có phủ rêu [150]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2021) về cây lan *D. anosmum* Lindl. thì có tỷ lệ sống thấp hơn từ 40 - 86,67% trồng trên giá thể đơn hoặc giá thể hỗn hợp rêu, xơ dừa và than củi [11]. Nguyên nhân có thể là do sự khác biệt về thời tiết, chế độ chăm sóc, độ ẩm và dinh dưỡng của giá thể [132].

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

Tỷ lệ sống sót cao nhất của *D. anosmum* Lindl trong nghiên cứu của chúng tôi được trồng trong hỗn hợp giá thể xơ dừa và than trấu (1:1) là 97,83% sau 12 tuần, kết quả này khá tương đồng với kết quả công bố của Lê Thiên Vinh và cộng sự (2022), với tỷ lệ sống đạt 93,5% của lan *D. anosmum* Lindl. ở Quảng Trị được trồng trên cùng loại giá thể [47]. Hơn nữa, lan Giả hạc tím Huế và *D. thyrsiflorum* Rchb.f. Ex Andre trồng trên bảng dương xỉ có phủ rêu cũng cho kết quả rất tốt có tỷ lệ sống lần lượt là 95,6% và 94,8%. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy lan Giả hạc tím Huế phát triển tốt trên 2 loại giá thể là hỗn hợp xơ dừa, trấu hun (1:1) và bảng dương xỉ có phủ rêu, cần chú ý các giá thể đều phải đảm bảo sạch nấm bệnh, duy trì được độ thông thoáng và độ ẩm, đó là điều cần thiết để cho cây con *in-vitro* trồng thành công trong điều kiện vườn ươm.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

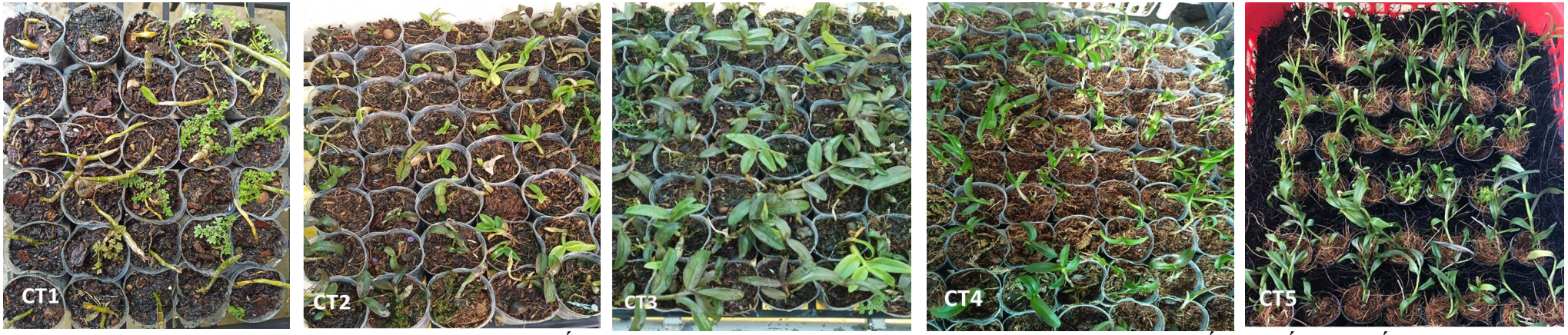
Kết quả nghiên cứu đã cho thấy khi không được che nắng cây lan con đột biến có tỷ lệ sống thấp nhất chỉ đạt 10,00 %, cây lan không có dấu hiệu sinh trưởng cụ thể lá đều héo vàng và khô, không có lá mới xuất hiện, rễ không sinh ra thêm ngược lại còn bị chết rễ, số rễ chỉ còn 2,47 rễ, ở công thức này nhận thấy cây và giá thể trồng bị nhiễm nấm bệnh là thấp nhất chỉ 6,67 % (CT1, hình 3.39.).

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

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

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



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

Khi tỷ lệ che nắng tăng lên dẫn đến tỷ lệ sống của cây con cải thiện, có hiệu quả cao nhất khi tỷ lệ che nắng 50 %, cụ thể tỷ lệ sống đạt 56,67 %, chiều cao cây đạt 8,80 cm, đường kính thân cây có được là 1,05 cm, số lá đạt được 11,53 lá trong đó có 6,80 lá mới được sinh ra, chiều dài lá đạt 4,83 cm, chiều rộng lá là 1,51 cm, số rễ cây có được là 7,73 rễ, rễ dài trung bình 6,31 cm, tỷ lệ cây và giá thể bị nhiễm nấm bệnh tăng lên ở mức 20,00 % (CT3, hình 3.39.). Khi tỷ lệ che nắng lên 75 % (CT4, hình 3.39.), 100 % (CT5, hình 3.39.), các chỉ tiêu đánh giá lại giảm xuống cụ thể tỷ lệ sống của cây theo thứ tự là 43,33 %, 36,67 %, tỷ lệ nhiễm bệnh lại tăng cao 33,33 % và 63,33 %, chiều cao cây đạt 10,54 cm và 11,20 cm, đường kính thân đạt 0,74 cm và 0,57 cm, số lá đạt 9,33 lá và 8,93 trong đó số lá mới có được là 4,60 lá và 4,02 lá, chiều dài lá đạt 5,33 cm và 6,36 cm, chiều rộng của lá đạt 0,93 cm và 0,69 cm, số rễ của cây đạt 6,03 rễ và 5,83 rễ, và rễ có chiều dài trung bình là 5,54 cm và 5,78 cm. Kết quả cho thấy cây lan con giai đoạn vườn ươm rất nhạy cảm với ánh nắng và nó phù hợp nhất ở mức che sáng 50 %.

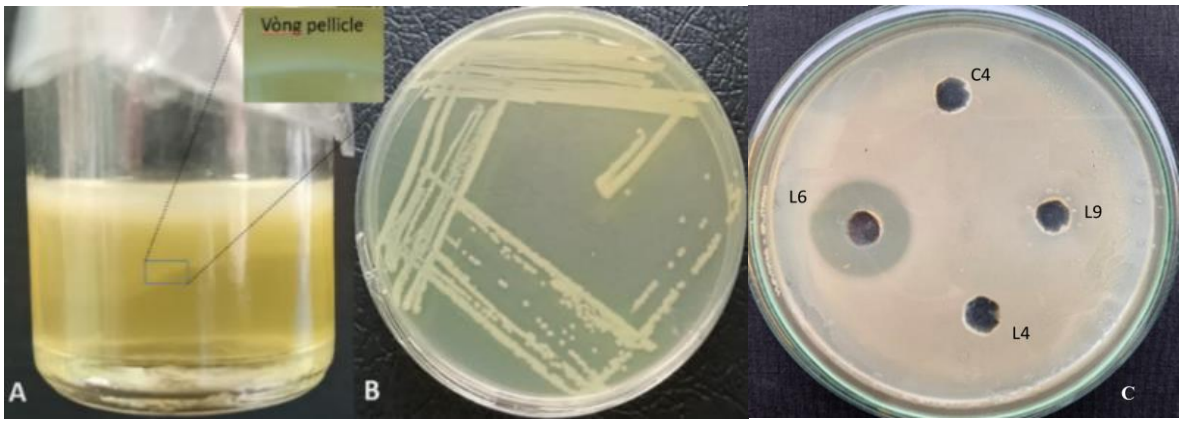
3.5.4 Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến

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

Kết quả phân lập vi sinh vật nội sinh từ các bộ phận khác nhau của cây lan rừng đã thu được 30 chủng vi khuẩn nội sinh. Phần lớn các chủng phân lập được có hình thái khuẩn lạc là màu trắng (73,4 %) một số ít (26,6 %) là màu sắc khác(vàng, vàng nhạt, hồng hoặc cam). Ngoài ra, đặc điểm bề mặt khuẩn lạc có trơn nhầy, khô ráp, hoặc bóng nhẵn. Mép của khuẩn lạc qua quan sát thấy thường tròn đều hoặc lượn sóng. (Bảng P12-3.13 phụ lục 12). Các mô tả về đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh tương tự trong các nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh và Đỗ Minh Thu [31]; Nguyễn Thị Thúy Duy và cộng sự [38].

Kiểm tra hoạt tính của 30 chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập cụ thể có được 18 chủng có khả năng phân giải lân, đây là hoạt tính hòa tan tri-calcium phosphas (TCP) có trong môi trường Pikovaskya, 16 chủng có khả năng cố định đạm, có 15 chủng có khả năng sinh IAA, có được 18 chủng có khả năng sinh NH_3, và có 1 chủng (L6) có khả năng đối kháng, ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh thối nhũn, vòng sáng kháng khuẩn hình thành với đường kính đạt 2,12 cm (Hình 3.40), (Bảng P12-3.13 phụ lục 12).

Nghiên cứu đã chọn lựa được 3 chủng có các hoạt tính hoá sinh mạnh nhất để định danh xác định loài đó là L4, L6 và C4. Xác định loài qua việc giải trình tự gen mã hóa vùng 16S rRNA, kết quả 3 chủng L4, L6 và C4 thứ tự được xác định là vi khuẩn *Burkholderia* ps., vi khuẩn *Bacillus cereus* và vi khuẩn *Pseudomonas boreopolis* (Hình P14-3.4 phụ lục 14). Kết quả có sự tương đồng với với một số công bố trước đây về đặc điểm của những chủng vi sinh này như đặc tính hoá sinh của chi vi khuẩn *Pseudomonas* [151]. Những đặc điểm về hoạt tính hoá sinh của chủng *Bacillus cereus* cũng tương đồng với nghiên cứu của Akhtar Nosheen và cộng sự [49]. Đặc biệt chủng này có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối nhũn điều này đã ghi nhận bởi nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Mai và cộng sự (2020) về khả năng đối kháng của chi *Bacillus* đối với vi khuẩn gây bệnh thối nhũn [30]. Các hoạt tính của *Burkholderia* sp. trong nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của Hau-Hsuan Hwang và cộng sự [99].



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

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

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

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

1:100, 1:500 (chế phẩm kí hiệu CP2, CP3, CP4). Hỗn hợp lên men trong thời gian 3 tháng được chiết dịch sử dụng, liều lượng sử dụng là 10 ml/L nước, phun 2 lần/tuần, ở các thí nghiệm. Kết quả thử nghiệm được thể hiện qua bảng 3.26, hình 3.41.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* là rất cao, trên 90% ở tất cả các thí nghiệm. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh thể hiện rõ ở tỷ lệ cây nhiễm nấm bệnh, với công thức sử dụng chế phẩm luôn có tỷ lệ nhiễm nấm bệnh thấp hơn so với đối chứng. Ở công thức CP2 tỷ lệ nhiễm nấm bệnh giảm xuống còn 7,56% so với 21,56% đối chứng (CP1). Ngoài ra, các chỉ tiêu sinh trưởng đều có kết quả tốt khi sử dụng chế phẩm (Bảng 3.26). Hiệu quả sử dụng chế phẩm ở CP3 và CP4 tương đối tốt, cao hơn đối chứng tuy nhiên không hiệu quả bằng công thức CP2 (Bảng 3.26, hình 3.41). Như vậy, với kết quả thí nghiệm đã cho thấy chế phẩm vi sinh từ vi sinh vật nội sinh có hiệu quả rất tốt đối với sự sinh trưởng phát triển và khả năng đề kháng bệnh của cây lan con *in-vitro* ở giai đoạn vườn ươm.

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy không có sự khác biệt lớn giữa các chế phẩm CP2, CP5, CP6, điểm khác biệt lớn nhất ở tỷ lệ nhiễm bệnh của cây lan con, kết quả cụ thể theo thứ tự là 7,56%, 14,67% và 11,56%, kết quả này chứng tỏ ba loại chế phẩm vi sinh CP2, CP5, CP6 đem lại hiệu quả rất tốt tương đương nhau cho lan Giả hạc tím Huế (Bảng 3.26, hình 3.41). Như vậy kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm vi sinh từ vi sinh vật nội sinh do nhóm nghiên cứu tạo ra có hiệu quả rất tốt và tương đương với những sản phẩm hiện có trên thị trường.

Kết quả này cũng có sự tương đồng với những nghiên cứu trước đây như nghiên cứu của Nguyễn Văn Hồng và cộng sự (2022) [17], De Medeiros và cộng sự (2023) [130] sử dụng chế phẩm vi sinh đều cho kết quả tác dụng tốt đến sinh trưởng và sinh khối của lan trong điều kiện nhà kính. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Diễm và cộng sự (2021), trên lan *D. anosmum* 'Di Linh', kết quả cho thấy sử dụng chế phẩm vi sinh không những hỗ trợ cho *D. anosmum* 'Di Linh' sinh trưởng, phát triển, tăng sinh khối tốt, có hiệu quả tương đương với phân hoá học, chế phẩm vi sinh còn giúp cây khoẻ hơn, giảm được sâu bệnh [7]. Như vậy có thể thấy chế phẩm vi sinh có tác động tốt đến sinh trưởng của lan *D. anosmum và* có thể được ứng dụng rộng rãi cho nhiều loài lan khác.

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

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

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

-CP1. Đối chứng, không sử dụng chế phẩm vi sinh.

-CP2. Sử dụng chế phẩm vi sinh với tỷ lệ vi sinh vật nội sinh và chất nền phụ gia 1/50.

-CP3. Sử dụng chế phẩm vi sinh với tỷ lệ vi sinh vật nội sinh và chất nền phụ gia 1/100

-CP4. Sử dụng chế phẩm vi sinh với tỷ lệ vi sinh vật nội sinh và chất nền phụ gia 1/500

-CP5: Dùng chế phẩm GE

-CP6: Dùng chế phẩm bán trên thị trường

3.5.4.3. Ảnh hưởng của chế phẩm dinh dưỡng chứa vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng của các dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến (HX3, HX10, M5, M13, M14, M17)

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

Tỷ lệ cây bị nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm từ 7,11 – 8,89 %. Các dòng đột biến sinh trưởng tốt hơn khi có sử dụng chế phẩm, Trong 6 dòng đột biến, M17 có phản ứng tốt nhất với chế phẩm (tỷ lệ sống 67,56 %, chiều cao cây 14,16 cm) chứng ỏ đây là dòng có tiềm năng. Các dòng đột biến còn lại khi có sử dụng chế phẩm để chăm sóc cũng hiệu quả tương đối tốt có tỷ lệ sống từ 43,78 – 61,11 %; chiều cao cây dao động từ 10,51 – 13,25 cm (Bảng 3.27). Kết quả đã cho thấy chế phẩm chứa vi sinh vật nội sinh được tạo ra trong nghiên cứu có tác động tốt đến khả năng sinh trưởng và kháng bệnh của các dòng đột biến được lựa chọn. Điều này góp phần giảm sử dụng phân hóa học, thuốc bảo vệ thực vật, đồng thời nâng cao tỷ lệ sống của cây lan đột biến.

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

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

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

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

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

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

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

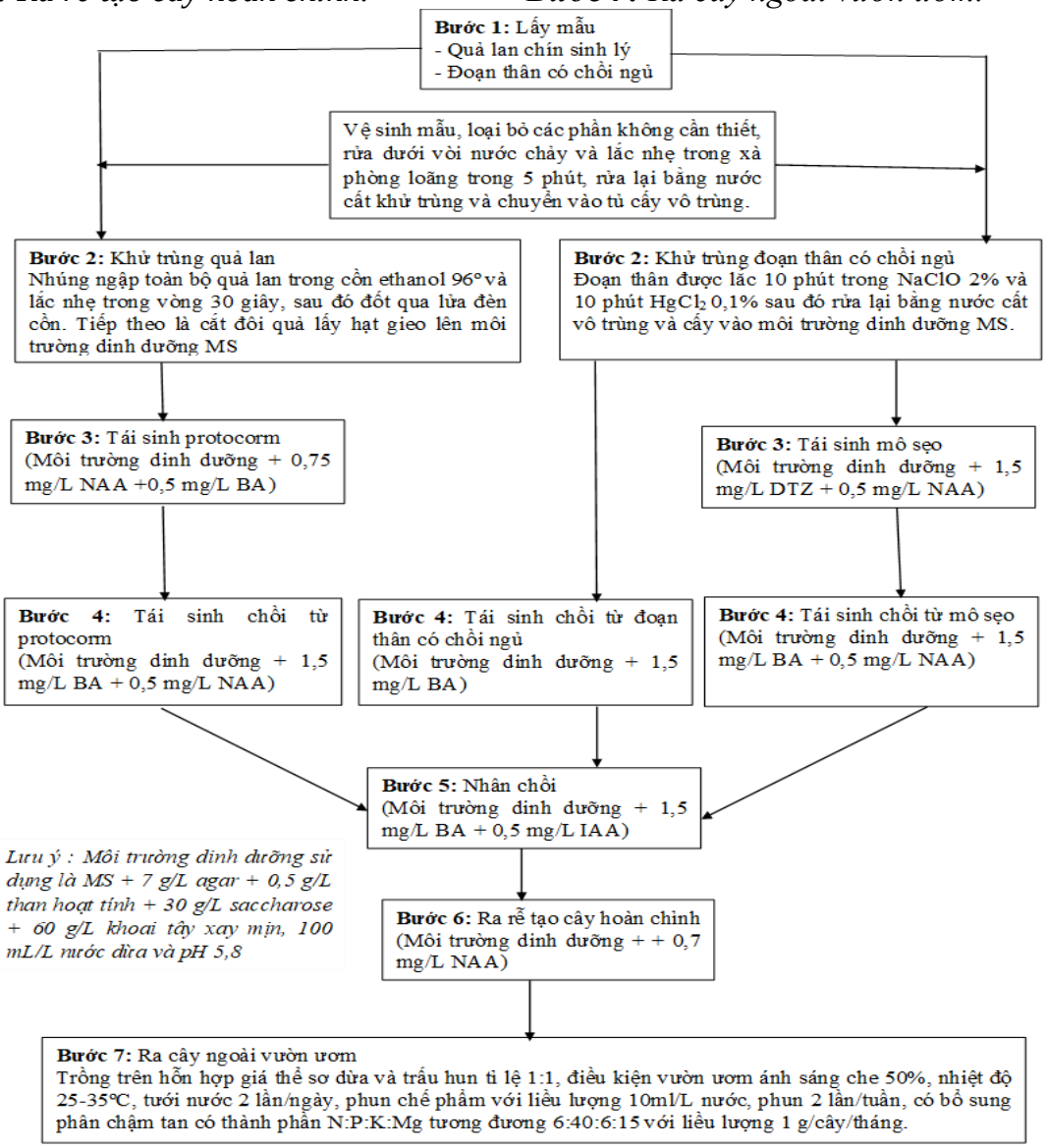
Bước 3: *Tái sinh mô sẹo hoặc protocorm tạo vật liệu khởi đầu.*

Bước 4: *Tái sinh chồi.*

Bước 5: *Nhân chồi.*

Bước 6: *Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.*

Bước 7: *Ra cây ngoài vườn ươm.*



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

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1. Nghiên cứu xác định mẫu lan Giả hạc tím thu được ở Huế thuộc loài *Denrobium anosmum* Lindl dựa vào đặc điểm hình thái và phân tử, làm nguyên liệu nuôi cấy thành công *in-vitro* lan này từ hạt và chồi ngủ, tạo ra vật liệu khởi đầu (protocorm và mô sẹo) cho các thí nghiệm tiếp theo. Đồng thời, nghiên cứu xác định được các điều kiện phù hợp để nhân giống *in-vitro* cho lan Giả hạc tím Huế.

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

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

4. Nghiên cứu xây dựng thành công quy trình chăm sóc lan con *in-vitro* phù hợp cho giai đoạn vườn ươm, tìm được điều kiện tối ưu để cây lan con *in-vitro* thích nghi và phát triển tại vườn. Ứng dụng được chế phẩm vi sinh vật nội sinh trong chăm sóc cây lan con tại vườn, giảm bớt việc sử dụng các loại phân hoá học và thuốc bảo vệ thực vật.

Đề nghị

- Cần tiếp tục khảo nghiệm các dòng đột biến trong điều kện sản xuất (vườn ươm, vườn cảnh).

- Cần có những nghiên cứu sâu hơn về phân tử, đặc biệt là xác định được những thay đổi về mặt di truyền là từ gen nào; hoặc xác định các dòng đa bội (chẵn hoặc lẽ) và đặc điểm của chúng.

- Cần đánh giá giá trị kinh tế, thẩm mỹ và tiềm năng ứng dụng thực tế của lan Giả hạc tím Huế và các dòng đột biến của nó.

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

1. **Nguyen Huu Tho,** Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, Pham Thanh, Hoang Khanh Linh, Nguyen Thi Kim Cuc (2023). ***Conservation of Dendrobium anosmum 'tim Hue' by in vitro propagation*.** Tạp chí Journal Propagation of Ornamental Plants, Tập 23, số 2, 39-48.

2. **Nguyễn Hữu Thọ,** Nguyễn Thị Oanh, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024). ***Ảnh hưởng của một số yếu tố đến nhân giống lan Giả hạc tím Huế* (*Dendrobium anosmum* Lindl.) *bằng phương pháp nuôi cấy in-vitro*.** Hội thảo Khoa học quốc tế về "Nghiên cứu đa dạng sinh học và tiềm năng dược liệu thuộc họ Orchidaceae (Họ Lan), Theaceae (Họ trà) và Zingiberaceae (Họ Gừng) ở Việt Nam". Nhà xuất bản Đại học Huế, 62-68.

3. **Nguyen Huu Tho,** Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, Nguyen Thi Kim Cuc (2024). ***Dendrobium anosmum* Lindl. 'Tim Hue' and the method of vegetative propagation from the axillary node shoots of the stem (keikis).** Hội nghị khoa học Quốc gia lần thứ 6 về Nghiên cứu và giảng dạy sinh học ở Việt Nam, 908-915.

4. **Nguyễn Hữu Thọ,** Nguyễn Thị Oanh, Lã Thị Thu Hằng, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024**). *Nghiên cứu ảnh hưởng của Dimethyl sulphate (DMS) đến tạo biến dị lan Giả hạc tím Huế* (*Dendrobium anosmum* Lindl).** Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, 467-473.

5. **Nguyễn Hữu Thọ,** Trương Thị Bích Phượng, Hồ Thị Xuân Tuý, 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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

[1] Nguyễn Tiến Bân, Trần Đình Lý, Nguyễn Tập, Vũ Văn Dũng, Nguyễn Nghĩa Thìn, Nguyễn Văn Tiến, Nguyễn Khắc Khôi, "Phần II: Thực vật," in *sách đỏ Việt Nam.*, Nguyễn Tiến Bân, Trần Đình Lý, Eds., Hà Nội, Việt Nam: Nhà xuất bản khoa học tự nhiên và Công nghệ, 2007, p. 115.

[2] Nguyễn Tiến Bân, *Danh lục các loài Thực vật Việt Nam (Tập III)*. Hà Nội: Nhà xuất bản Nông nghiệp., 2005.

[3] Cao Phi Bằng, "Những biến đổi sinh lý, hoá sinh của cây Phong lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) trong quá trình luyện ex vitro," *Phát triển khoa học và công nghệ*, vol. 2, no. 3, pp. 59–67, 2018.

[4] Trần Văn Bảo, *Kỹ thuật nuôi trồng phong lan*. Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam: Nhà xuất bản trẻ, 1999.

[5] Hoàng Việt Cường, Mai Thị Hoàng Anh, Tử Quang Tân, Chu Hoàng Mậu, "phân tích vùng gene lục lạp, rbcL, phân lập từ cây lan tai cáo (Hoya parasitica (Roxb.) Wall. ex Wight)," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, vol. 228, no. 01, pp. 474–481, 2023.

[6]. Đ.Ph.Pêtrôp, *Di truyền học và cơ sở chọn giống*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà xuất bản Nông nghiệp., 1984.

[7] Nguyễn Thị Diễm, Nguyễn Thị Oanh, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Hữu Thọ, Nguyễn Thị Kim Cúc, "Một số biện pháp kỹ thuật trồng và chăm sóc cây lan giả hạc Di Linh (*Dendrobium anosmum* DL.) từ cây con In vitro," *Tạp chí Khoa học Đại học Huế Khoa học Tự nhiên*, vol. 130, no. 1A, pp. 107–115, 2021, doi: 10.26459/hueunijns.v130i1a.5907.

[8] Lê Thị Ngọc Điệp, Nguyễn Thanh Điềm, Nguyễn Như Hoa, Trần Hoàng Dũng, Vũ Thị Huyền Trang, "Đánh giá đa dạng di truyền của một số loài Lan *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường ĐH Nguyễn Tất Thành*, vol. 3, no. 3, pp. 1–12, 2020, doi: https://doi.org/10.55401/jst.v3i3.113.

[9] Nguyễn Thị Điệp, Huỳnh Thị Kim, "Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống in vitro lan kiếm Phan Trí (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.)," *TNU J. Sci. Technol.*, vol. 8, no. 225, pp. 479–486, 2020.

[10] Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Dương Hoa Xô, "Phân tích sự đa dạng di truyền giữa các giống lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) dựa trên chỉ thị phân tử SSR," *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, pp. 112–117, 2020.

[11] Nguyễn Thị Mỹ Duyên, 'Quy trình nhân giống lan Giả hạc, "Quy trình nhân giống lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*.)," *AGU Int. J. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 73 – 82, 2021.

[12] Nguyễn Văn Giang, Phạm Phương Thu, Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Thanh Mai, "Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên," *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, vol. 60, no. 5, 2018, [Online]. Available: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/480

[13] Đặng Thị Thu Hà, Phạm Thu Hà, "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, vol. 2, no. 7, pp. 101–120, 2020.
[14] Ngọc Hà, "Mỗi héc ta trồng hoa lan mang về cho nhà vườn 1 tỉ đồng," *Kinh tế Sài Gòn online*, 2023, [Online]. Available: https://thesaigontimes.vn/moi-hec-ta-trong-hoa-lan-mang-ve-cho-nha-vuon-1-ti-dong/
[15] Trương Thị Hồng Hải, Hoàng Văn Nam, Dương Thanh Thuỷ, Trần Thị Triêu Hà, Trần Thị Phương Nhung, *Công nghệ sinh học ứng dụng trong cây trồng*. Huế, Việt Nam: Nhà xuất bản Đại học Huế, 2018.
[16] Trương Thị Hồng Hải, Trần Bảo Nga, "Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn giống mướp hương (*Luffa cylindrica* (L.) Roem) bằng chỉ thị RAPD," *Hue Univ. J. Sci. Nat. Sci.*, vol. 127, no. 1C, pp. 43–51, 2018.
[17] Nguyễn Văn Hồng, Nguyễn Thị Tình, Đoàn Tiến Dũng, Vũ Thị Huệ, Nguyễn Thế Hùng, Nguyễn Hữu Thọ, "Ảnh hưởng của chế phẩm sinh học đến sinh trưởng và sinh khối lan Thạch hộc tía trồng trong nhà lưới," *Tập chí khoa học và công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, vol. 7, no. 140, pp. 57–64, 2022.
[18] Trần Hợp, *Phong lan Việt Nam*. Khoa học và kỹ thuật, 1990.
[19] Đào Quốc Hưng, Đỗ Đăng Giáp, Trần Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Kim Khoa, Nguyễn Văn Đệ, Đỗ Đức Thăng, "Nghiên cứu ảnh hưởng của đèn led trong quy trình vi nhân giống lan giả hạc di linh Taly," *Khoa học và công nghệ*, vol. 53B, pp. 48–55, 2021.
[20] Đào Quốc Hưng, Đỗ Đăng Giáp, Trần Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Kim Khoa, Nguyễn Văn Đệ, Đỗ Đức Thăng, "Hiệu quả của đèn phát sáng trong vi sinh sản *Dendrobium anosmum* di linh taly," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* -, vol. 53, no. 5, pp. 1–8, 2021, doi: https://doi.org/10.46242/jstiuh.v53i05.4186.
[21] Trần Công Khánh, *Phương pháp nghiên cứu với kính hiển vi*. Hà Nội, Việt Nam: NXB Y Học, 2005.
[22] Dương Công Kiên, *Nuôi cấy mô thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh., 2002.
[23] Nguyễn Thị Lài, Phạm Hương Sơn, Vũ Mạnh Hải, Tống Xuân Trung, "Nghiên cứu nhân giống lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào," *Vietnam J. Sci. Technol.*, vol. 60, no. 5, 2018.
[24] Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Thanh Xuân, Ngô Thị Bảo Châu, "Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố pleiku,tỉnh Gia lai," *tạp chí khoa học và công nghệ, Trường đại học khoa học Huế, ĐH Huế*, vol. 17, no. 2, pp. 169–179, 2020.
[25] Trần Thị Ngọc Lan, Trần Thị Hoàng Anh, "Sự hình thành mô sẹo phát sinh phôi sinh dưỡng và cây con từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống địa lan lai vàng hoàng hậu (*Cymbidium hybrid* 'fx750')," *Tập chí khoa học Yersin*, vol. 3, pp. 24–33, 2017.
[26] Nguyễn Thị Thu Liên, Hoàng Tấn Quảng, *Chỉ Thị Phân Tử*. Huế, Việt Nam: Nhà xuất bản Đại học Huế, 2015.
[27] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc ở Việt Nam*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà Xuất bản Y học , Hanoi, Vietnam, 2004.
[28] Phan Văn Hoài Luân, Mai Thị Phương Hoa, Đỗ Tiến Vinh, "Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và hợp chất hữu cơ đến quá trình nhân giống in vitro cây Lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.)," *J. Sci. Technol.*, vol. 7, no. 4, 2024.
[29] Lê Đình Lương, *Di truyền học: Những vấn đề nguyên lý và thực tiễn*. Hà Nội, Việt Nam:

Nhà Xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 2019.
[30] Nguyễn Thị Thanh Mai, Trương Thị Chiên, Vũ Xuân Tạo, Phan Xuân Bình Minh, Ngô Thị Hoa, Trần Bảo Trâm, "Nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *Erwinia carotovora* của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* B45 phân lập từ đất trồng đinh lăng," *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, pp. 409–413, 2020.
[31] Nguyễn Thị Minh, Đỗ Minh Thu, "Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất mặn huyện giao thuỷ,tỉnh Nam Định," *Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, pp. 1022–1032, 2017, doi: http://www1.vnua.edu.vn/tapchi/upload/8-2017/4.pdf.
[32] Nguyễn Công Nghiệp, *Trồng hoa lan*. Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam: Nhà xuất bản trẻ, 2004.
[33] Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Thị Hoàng Nhung, Nguyễn Thị Liên, Trần Thị Xuân Mai, Trần Đình Giỏi, "Đa dạng sinh học một số loài Lan rừng thuộc chi *Dendrobium* bằng kỹ thuật RAPD," *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, no. 22a, pp. 186–192, 2012.
[34] Công ty nhà nước MTV Lâm Nghiệp Tiền Phong, "Xây dựng mô hình sản xuất một số loài hoa lan bản địa giá trị cao tại tỉnh Thừa Thiên Huế," in *Dự án*, 2018, p. 25. [Online]. Available: http://lamnghieptienphong.com.vn/upload/file/du-an-lan-nghinh-xuan-gia-hac-hoang-thao-(5).compressed.pdf
[35] Huỳnh Thị Trúc Phương, Hồ Viết Thế, "Nghiên cứu đặc điểm trình tự vùng its trong định danh và xác định mối quan hệ di truyền một số loài lan thuộc chi hoàng thảo (*Dendrobium*)," *tạp chí công nghệ và thực phẩm*, vol. 21(4), pp. 31–38, 2021.
[36] Trương Thị Bích Phượng, Tống Văn Bảo Thanh, Phan Thị Thoả Nguyên, Nguyễn Đức Tuấn, Lâm Thị Ngọc Thuý, Hoàng Thị Kim Hồng, Nguyễn Thị Thu Liên, "Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn lam đến nhân giống in vitro cây lan hoàng thảo giả hạc (*Dendrobium anosmum* lindl.)," *Hue Univ. J. Sci. Nat. Sci.*, vol. 131, no. 1C, pp. 73–82, 2022.
[37] Lê Duy Thành, *Cơ sở di truyền chọn giống thực vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 2001.
[38] D. N. .thi Thuy, Đ. T. T. Hà, Đ. T. Nhứt, and N. H. Hiệp, "Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh trong cây Thù lù cạnh (Physalis angulata L.) có khả năng kháng khuẩn ở khu vực thành phố Cần Thơ," *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol. 55, no. 4, pp. 10–20, 2019, [Online]. Available: doi: 10.22144/ctu.jvn.2019.103
[39] Lâm Văn Thông, Trần Nhân Dũng, Lê Văn Hòa, "Xác định phương thức truyền biến của lan *Dendrobium* sp. sau xử lý biến đột biến in vitro bằng kỹ thuật RAPD.," in *Phát triển nông nghiệp bền vững thích ứng với sự biến đổi khí hậu*, 2010, pp. 209–216.
[40] Bộ công Thương, "Báo cáo xuất nhập khẩu Việt Nam 2018," in *Nhà xuất bản công thương*, Nguyễn Minh Huệ, Ed., Hà Nội: Nhà xuất bản công thương, 2019, p. 224. [Online]. Available: https://trungtamwto.vn/file/18440/Bao cao Xuat nhap khau Viet Nam 2018.pdf
[41] Trần Thị Thuý, Đậu Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thị Loan, Bùi Hồng Ngọc, Trần Hồng Quân, Trần Thị Ngọc Diệp, Trần Đăng Khánh, Khuất Hữu Trung, Vi Lạng Sơn, "Xây dựng bộ chỉ thị phân tử RAPD và ISJ để xác định độ đa hình và số đột biến ở ngô," *Tạp chí Khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, vol. 1, no. 110, pp. 46–50, 2020.
[42] Vì Thị Xuân Thủy, Phạm Hồng Sơn, Trần Thị Mừng, Trần Thị Hồng Xuân, Phạm Hoàng

Đan, và Hà Đăng Chiến, "Nghiên cứu quy tr nh nhân giống in vitro lan phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* lindl.) từ mắt ngủ ở thân," *Tạp chí khoa học và công nghệ*, vol. 26, pp. 48–56, 2022.

[43]. Trần Hợp, *Phong lan Việt Nam*. Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam: Nhà xuất bản Nông nghiệp., 1998.

[44] Nguyễn Quỳnh Trang, Vũ Thị Huế, Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thị Thơ, "Nhân giống in-vito lan phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*)," *Công nghệ sinh học và giống cây trồng*, vol. 3, no. 1, pp. 16–22, 2013.

[45] Nguyễn Văn Việt, "Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy in vitro trong nhân giống lan Hoàng Thảo Vôi (*Dendrobium cretaceum* Lindley)," *Khoa học công nghệ nông nghệ nông nghiệp Việt Nam*, vol. 6, no. 79, pp. 55–61, 2017.

[46] Tri Thức Việt, *Hướng dẫn chọn giống và chăm sóc hoa lan dành cho người mới bắt đầu*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà Xuất Bản Hà Nội, 2021.

[47] Lê Thiên Vinh, Trương Thị Ly Na, Nguyễn Thị Bích Thu, Nguyễn Thị Diễm, Nguyễn Thị Oanh, Nguyễn Thị Kim Cúc, "Nhân giống lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) đột biến bằng phương pháp nuôi cấy in-vitro," *Tạp chí Khoa học Đại học Huế Khoa học Tự nhiên*, vol. 131, pp. 5–15, 2022.

[48] Nguyễn Thị Hải Yến, Nguyễn Thu Hường, "Nghiên cứu nhân giống *in-vitro* lan hoàng thảo phi điệp tím," *TNU J. Sci. Technol.*, vol. 226, no. 10, pp. 39–46, 2021, doi: 10.34238/tnu-jst.4286.

Tài liệu tiếng Anh

[49] N. Akhtar *et al.*, "Role of *Bacillus cereus* in Improving the Growth and Phytoextractability of *Brassica nigra* (L.) K. Koch in Chromium Contaminated Soil.," *Molecules*, vol. 26, no. 6, Mar. 2021, doi: 10.3390/molecules26061569.

[50] F. S. I. Al-Rubaye and F. Alkhashab, "Genotypes diversity and virulence factor screening of *Trichomonas vaginalis* isolated from pregnant women in mosul (north of Iraq)," *Baghdad Sci. J.*, vol. 19, no. 5, pp. 944–950, 2022.

[51] M. K. Alam, M. H. Rashid, M. S. Hossain, M. A. Salam, and M. A. Rouf, "In vitro seed propagation of dendrobium (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media," *Biotechnology*, vol. 1, no. 2–4, pp. 111–115, 2002.

[52] K. D. Ardiyanti and L. Nuraini, "Opportunities and challenges for orchid plant cultivation and development in Indonesia," *Open Sci. Technol.*, vol. 4, no. 1, pp. 19–26, 2024, doi: https://doi.org/10.33292/ost.v4i1.112.

[53] P. Atichart, "Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*.," *Thai J. Agric. Sci.*, vol. 64, no. 1, pp. 59–63, 2013.

[54] B. F. Awotedu, T. O. Omolola, A. O. Akala, O. L. Awotedu, and S. O. Olaoti-Laaro, "Vegetative propagation: A unique technique of improving plants growth," *World News Nat. Sci.*, vol. 35, pp. 83–101, 2021.

[55] S. A. Aziz, A. A. Putri, D. Sukma, and M. Syukur, "Enhanced growth of in vitro plantlets by cytokinin and pre-colchicine application in *Phalaenopsis amabilis* Blume protocorms," in *III International Orchid Symposium 1262*, 2019, pp. 205–212.

[56] K. N. Babu *et al.*, "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques," *Mol. Plant Taxon. Methods Protoc.*, pp. 219–247, 2021.

[57] G. C. Baker, J. J. Smith, and D. A. Cowan, “Review and re-analysis of domain-specific 16S primers.,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 55, no. 3, pp. 541–555, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.009.
[58] K. Balilashaki *et al.*, “Progress and prospect of orchid breeding: An overview,” *Adv. Orchid Biol. Biotechnol. Omi.*, pp. 261–283, 2023.
[59] B. Basavaraj, N. Nagesha, and M. Jadeyegowda, “Molecular characterization of *Dendrobium* orchid species from western Ghat region of Karnataka using RAPD and SSR Markers,” *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 2157–2169, 2020.
[60] D. S. Batista *et al.*, “Light quality in plant tissue culture: does it matter?,” *Vitr. Cell. Dev. Biol.*, vol. 54, pp. 195–215, 2018.
[61] K. S. Belarmino, M. M. Rêgo, R. L. A. Bruno, G. D. A. Medeiros, A. P. Andrade, and E. R. Rêgo, “Genetic diversity in a *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz population assessed by RAPD molecular markers,” *Genet. Mol. Res.*, vol. 16, no. 3, pp. 1–10, 2017.
[62] C. A. Beyl, “Getting started with tissue culture-media preparation, sterile technique, and laboratory equipment,” in *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*, C. A. Beyl, Ed., New York: Routledge, 2018, pp. 21–38. doi: https://doi.org/10.1201/9780203743133.
[63] T. K. Bhowmik and M. M. Rahman, “*In vitro* mass scale propagation and seedlings development of medicinal orchid *Dendrobium transparens* Wall ex Lindl,” *J. Med. Plant Stud.*, vol. 8, no. 3, pp. 141–146, 2020.
[64] B. Bremer *et al.*, “An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III,” *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 161, no. 2, pp. 105–121, 2009, doi: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x.
[65] J. M. Bric, R. M. Bostock, and S. E. Silverstone, “Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 535–538, 1991, [Online]. Available: doi: https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991%0A
[66] S. Bunnag and J. Hongthongkham, “Polyploid induction of *Dendrobium draconis* Rchb. f,” in *XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: Crossing Borders 1087*, 2015, pp. 445–451.
[67] K. Burg, “Molecular Markers for Genetic Diversity,” *Prog. Bot.*, vol. 79, pp. 33–47, 2018.
[68] A. Burzacka-Hinz, M. Narajczyk, M. Dudek, and D. L. Szlachetko, “Micromorphology of Labellum in Selected *Dendrobium* Sw.(Orchidaceae, Dendrobieae),” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 17, pp. 1–27, 2022.
[69] R. Bousba *et al.*, “Genotypic diversity assessment of some durum wheat (Triticum durum) genotypes using RAPD analysis,” *Biodiversitas J. Biol. Divers.*, vol. 21, no. 6, pp. 2696–2701, 2020.
[70] R. Casanova-Sáez, E. Mateo-Bonmatí, and K. Ljung, “Auxin Metabolism in Plants.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 13, no. 3, Mar. 2021, doi: 10.1101/cshperspect.a039867.
[71] J. B. Castro and R. B. Singer, “A literature review of the pollination strategies and breeding systems in Oncidiinae orchids,” *Acta Bot. Brasilica*, vol. 33, pp. 618–643, 2019, doi: DOI: 10.1590/0102-33062019abb0111.

[72] K. Chadipiralla, P. Gayathri, V. Rajani, and P. V. B. Reddy, *Plant tissue culture and crop improvement*. Springer, 2020.
[73] C. Chu, H. Yin, L. Xia, D. Cheng, J. Yan, and L. Zhu, "Discrimination of *Dendrobium officinale* and its common adulterants by combination of normal light and fluorescence microscopy," *Molecules*, vol. 19, no. 3, pp. 3718–3730, 2014.
[74] P. S. Coelho, J. M. Reis, A. L. Pereira, A. Vairinhos, V. Lopes, and J. M. Leitão, "Downy mildew resistance and genetic variability in a wild rocket germplasm collection," *Agron. J.*, vol. 114, no. 6, pp. 3083–3095, 2022.
[75] P. Cuenoud, V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Grayer, and M. W. Chase, "Molecular phylogenetics of *Caryophyllale*s based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences," *Am. J. Bot.*, vol. 89, no. 1, pp. 132–144, 2002.
[76] T. T. Dang *et al.*, "Micropropagation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl," *J. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 127–135, 2018.
[77] D. David, N. A. Rusdi, R. A. Mohd Mokhtar, A. A. Mohd Faik, and J. A. Gansau, "Establishment of in vitro regeneration protocol for Sabah's Jewel orchid, Macodes limii J.J. Wood et lamb," *Horticulturae*, vol. 8, no. 2, pp. 155–165, 2022, doi: https://doi.org/10.3390/horticulturae8020155.
[78] L. C. De, "Morphological diversity in orchids," *Int. J. Bot. Stud.*, vol. 5, pp. 229–238, 2020.
[79] S. Dohling, S. Kumaria, and P. Tandon, "Multiple shoot induction from axillary bud cultures of the medicinal orchid, *Dendrobium longicornu*," *AoB Plants*, p. pls032, 2012, doi: doi:10.1093/aobpla/pls032.
[80] J. Doyle, "DNA protocols for plants," in *Molecular techniques in taxonomy*, Springer, 1991, pp. 283–293.
[81] S. P. Dube, R. Dey, S. Devi, and R. Raghuwanshi, "Seed Quality, Chlorophyll and Carotene Content in Brassica juncea L. Leaves at Two Growth Stages in Response to Rhizospheric Bacteria.," *Curr. Agric. Res. J.*, vol. 12, no. 2, pp. 820–835, 2024.
[82] S. C. M. Dumlao, M. L. K. Lacsento, P. V. L. Marquina, M. M. R. Nacario, and H. A. Pelayo, "The comparative hypoglycemic effect of *Dendrobium anosmum* (Sanggumay) ethanolic extract on glucose powder-induced Gallus galuus domesticus (Chick) embryo," *La Salle Med. Heal. Sci. J.*, pp. 1–12, 2019.
[83] R. Edens-Meier and P. Bernhardt, *Darwin's orchids: then and now*. University of Chicago Press, 2019.
[84] W.-H. Eng and W.-S. Ho, "Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 246, pp. 604–617, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010.
[85] S. Feng, H. Zhao, J. Lu, J. Liu, b o Shen, and H. Wang, "Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme*," *J. Genet.*, vol. 92, no. 2, pp. 205–212, 2013, doi: 10.1007/s12041-013-0246-y.
[86] E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk, "Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors," in *Plant propagation by tissue culture*, Springer, 2008, pp. 175–204.
[87] E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk, "The components of plant tissue culture

media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems," in *Plant Propagation by Tissue Culture*, E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk, Eds., Dordrecht: Springer, 2008, pp. 115–173. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_4.

[88] R. Govaerts, E. Nic Lughadha, N. Black, R. Turner, and A. Paton, "The World Checklist of Vascular Plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity," *Sci. data*, vol. 8, no. 1, pp. 1–215, 2021.

[89] M. S. Harahap, F. Harahap, and S. Edi, "In vitro multification of *Dendrobium* sp. with plant growth regulator," in *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 2020, p. 12041.

[90] S. Hartati, O. Cahyono, and A. N. Hariyadi, "Morphological characterization of natural orchids *Dendrobium* spp.," in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 2021, pp. 1–6. doi: 10.1088/1755-1315/905/1/012139.

[91] S. Hartati and E. S. Muliawati, "Genetic variation of *Coelogyne pandurate, C. rumphii* and their hybrids based on RAPD markers," *Biodiversitas J. Biol. Divers.*, vol. 21, no. 10, 2020.

[92] S. Hartati, Samanhudi, and O. Cahyono, "Morphological characterization of five species of *Dendrobium native* to Indonesia for parent selection," *Biodiversitas J. Biol. Divers.*, vol. 23, no. 5, pp. 2648–2654, 2022.

[93] S. Hartati, Samanhudi, and O. Cahyono, "Chromosome and karyotype analysis of *Dendrobium* spp.," *Int. J. Agric. Technol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1917–1930, 2024.

[94] S. N. Hashim, S. Z. Ghazali, N. J. Sidik, T. Chia-Chay, and A. Saleh, "Surface sterilization method for reducing contamination of *Clinacanthus nutans* nodal explants intended for in-vitro culture," in *E3S Web of Conferences*, S. Guéhot and I. Houlbert, Eds., EDP Sciences - Web of Conferences, 2021, pp. 1–8. doi: 10.1051/e3sconf/202130601004.

[95] H.-W. Heldt and B. Piechulla, *Plant biochemistry*. Elsevier Academic Press, 2021.

[96] V. R. Hinge *et al.*, "Assessment of genetic diversity and volatile content of commercially grown banana (*Musa* spp.) cultivars," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, p. 7979, 2022.

[97] G. R. Hoffmann, "Genetic effects of dimethyl sulfate, diethyl sulfate, and related compounds," *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, vol. 75, no. 1, pp. 63–129, 1980, doi: https://doi.org/10.1016/0165-1110(80)90028-7.

[98] N. P. Huy *et al.*, "In vitro polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 252, pp. 283–290, 2019.

[99] H.-H. Hwang *et al.*, "A Plant Endophytic *Bacterium, Burkholderia seminalis Strain* 869T2, Promotes Plant Growth in Arabidopsis, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables," *Microorganisms*, vol. 9, no. 8, p. 1703, 2021, [Online]. Available: https://doi.org/10.3390/microorganisms9081703

[100] C. M. Iiyama, J. A. Vilcherrez-Atoche, M. A. Germanà, W. A. Vendrame, and J. C. Cardoso, "Breeding of ornamental orchids with focus on Phalaenopsis: Current approaches, tools, and challenges for this century," *Heredity (Edinb).*, vol. 132, no. 4, pp. 163–178, 2024.

[101] P. Jadrná, F. Kobza, and O. Plavcová, "Polyploidization of *Pelargonium× hortorum* LH Bailey in greenhouse conditions," *Hortic. Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 31–37, 2009.

[102] P. R. Joshi, S. Pandey, L. Maharjan, and B. Pant, “Micropropagation and assessment of genetic stability of *Dendrobium transparens* Wall. Ex Lindl. using RAPD and ISSR markers,” *Front. Conserv. Sci.*, vol. 3, p. 1083933, 2023.
[103] Ju S.M., W. L. Zhu, W. L. Wang, Y. Gao, and T. Ma, “Direct regeneration of seedling from stem fragments of *Dendrobium candidum*.,” *J. Gansu Agric. Univ.*, vol. 51(1), pp. 45–48, 2016, doi: (in Chinese with English abstract).
[104] H. Kamemoto, T. D. Amore, and A. R. Kuehnle, *Breeding Dendrobium orchids in Hawaii*. University of Hawaii Press, 1999.
[105] M. Kanellos and P. White, *Growing Orchids at Home: The Beginner’s Guide to Orchid Care*. Royal Botanic Gardens, Kew; Illustrated edition, 2021.
[106] S. Ketsa and I. J. Warrington, “The *Dendrobium* orchid: Botany, horticulture, and utilization,” *Crop Sci.*, vol. 63, no. 4, pp. 1829–1888, 2023.
[107] E. Khare, J. Mishra, and N. K. Arora, “Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, p. 2732, 2018.
[108] M. C. Kharkwal, “History of plant mutation breeding and global impact of mutant varieties,” in *Mutation breeding for sustainable food production and climate resilience*, Springer, 2023, pp. 25–55.
[109] A. R. Khosravi, M. A. Kadir, S. B. Kadzemin, F. Q. Zaman, and A. E. De Silva, “RAPD analysis of colchicine induced variation of the *Dendrobium Serdang* beauty,” *African J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 8, pp. 1455–1465, 2009.
[110] T. T. Kien *et al.*, “In vitro propagation of indigenous phu tho’s 5-petaled white orchid (*Dendrobium anosmum* lindl.),” *J. Sci. Technol. Hung Vuong Univ.*, vol. 25, no. 4, pp. 85–93, 2021.
[111] D. Kim and F. P. Guengerich, “Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 45, no. 1, pp. 27–49, 2005.
[112] I. Kirov, M. Divashuk, K. Van Laere, A. Soloviev, and L. Khrustaleva, “An easy ‘SteamDrop’ method for high quality plant chromosome preparation,” *Mol. Cytogenet.*, vol. 7, pp. 1–10, 2014.
[113] R. Kishor and G. J. Sharma, “The use of the hypervariable P8 region of trn L (UAA) intron for identification of orchid species: Evidence from restriction site polymorphism analysis,” *PLoS One*, vol. 13, no. 5, p. e0196680, 2018.
[114] M. K. Konopiński, “Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon’s formula with unbiased estimator in the population genetics studies,” *PeerJ*, vol. 8, p. e9391, 2020.
[115] A. Kumar, R. Singh, A. Yadav, D. D. Giri, P. K. Singh, and K. D. Pandey, “Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L.,” *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, p. 60, Jun. 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0393-y.
[116] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, “MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549, 2018.
[117] J. M. T. Lakshanthi and T. H. Seran, “Survival rate and growth performance of in vitro raised plantlets of orchid (*Dendrobium* sp.) in different hardening substrates,” *Int. J. Adv. Res. Rev.*, vol. 4, no. 3, pp. 1–9, 2019.

[118] L. T. Le, Q. T. T. Nguyen, T. N. T. Lam, T. D. Nguyen, P. H. Nguyen, and P. B. T. Truong, "A research on in vitro propagation of *Dendrobium adastra*.," in *National Biotechnology Conference.*, T. T. H. Hai, N. D. Huy, L. T. Binh, N. N. Minh, D. H. Xo, T. T. B. Phuong, T. Q. Dung, D. T. B. Thuy, and T. D. Binh, Eds., Hue: Hue University Publishing house, 2020, pp. 897–902. [Online]. Available: http://huib.hueuni.edu.vn/wp-content/uploads/2020/12/897-902.pdf

[119] S. Lengrand, L. Pesenti, C. Bragard, and A. Legrève, "Bacterial endophytome sources, profile and dynamics-a conceptual framework," *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 8, p. 1378436, 2024.

[120] C. Li, N. Dong, Y. Zhao, S. Wu, Z. Liu, and J. Zhai, "A review for the breeding of orchids: current achievements and prospects," *Hortic. Plant J.*, vol. 7, no. 5, pp. 380–392, 2021.

[121] J. Li, G. Gao, B. Li, B. Li, and Q. Lu, "Genetic analysis of *Prunus salicina* L. by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR)," *Genet. Res. (Camb).*, vol. 2022, no. 1, p. 2409324, 2022.

[122] Y. Liu *et al.*, "Polyploid Induction and Karyotype Analysis of *Dendrobium officinale*," *Horticulturae*, vol. 9, no. 3, pp. 329–344, 2023.

[123] D. T. Long, H. T. K. Hong, L. T. T. Tram, N. T. Q. Trang, N. V Hiep, and N. T. T. Tien, "Genetic diversity analysis of lotus species (*Nelumbo nucifera* gaertn.) in Thua Thien Hue based on ITS4-5 genetic region," *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 23&24, pp. 1160–1171, 2019.

[124] T. B. Longchar and C. R. Deb, "Optimization of in vitro propagation protocol of *Dendrobium heterocarpum* Wall. ex. Lindl. and clonal genetic fidelity assessment of the regenerates: An orchid of horticultural and medicinal importance," *South African J. Bot.*, vol. 149, pp. 67–78, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.058.

[125] V. Q. Luan *et al.*, "Diversity in Morphology and Growth Characteristics of *Dendrobium anosmum* Variations in Lam Dong, Vietnam," *Asian J. Plant Sci.*, vol. 21, no. 2, pp. 221–228, 2022, doi: 10.3923/ajps.2022.221.228.

[126] N. L. Ma, S. C. Khoo, J. X. Lee1, C. F. Soon, and N. A. A. Shukor, "Efficient micropropagation of *Dendrobium aurantiacum* from shootexplant," *Plant Sci. Today*, vol. 7, no. 3, pp. 476–482, 2020.

[127] S. Maharjan *et al.*, "In vitro propagation of the endangered orchid *Dendrobium chryseum* Rolfefrom protocorms culture," *Nepal J. Sci. Technol.*, vol. 19, no. 1, pp. 39–47, 2020, doi: 10.3126/njst.v19i1.29737.

[128] D. M. Majeed, M. H. N. Al-Jana, E. N. Ismail, and F. R. Al-Burki, "Evaluation of the Molecular and Phenotypic Performance of Transgenic Rice Genotypes by Using RAPD Technology," in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 2025, p. 12071.

[129] S. Malviya and S. Agrawal, "Calliphorid Species (Diptera: Calliphoridae)," in *Proceedings of the Conference BioSangam 2022: Emerging Trends in Biotechnology (BIOSANGAM 2022)*, Springer Nature, 2023, pp. 247–254.

[130] L. B. De Medeiros *et al.*, "Growth-promoting microorganisms in the development of orchid seedlings of *phalaenopsis*, *cymbidium*, and *dendrobium genera*," *Biosci. J.*, vol. 39, no. e39092, pp. 1981–3163, 2023.

[131] S. Mesfer ALshamrani, F. A. Safhi, D. S. Alshaya, A. A. Ibrahim, H. Mansour, and D. Abd El Moneim, "Genetic diversity using biochemical, physiological, karyological and molecular markers of *Sesamum indicum* L.," *Front. Genet.*, vol. 13, pp. 1–19, 2022, doi: 10.3389/fgene.2022.1035977.
[132] I. Mežaka, D. Kļaviņa, L. Kaļāne, and A. Kronberga, "Large-Scale In Vitro Propagation and Ex Vitro Adaptation of the Endangered Medicinal Plant *Eryngium maritimum* L.," *Horticulturae*, vol. 9, no. 2, pp. 271–292, 2023, doi: 10.3390/horticulturae9020271.
[133] A. S. Mir, M. Maria, S. Muhammad, and S. M. Ali, "Potential of Mutation Breeding to Sustain Food Security," in *Genetic Variation*, R. T. Maia and M. de A. Campos, Eds., icensee IntechOpen, 2020, ch. 1, pp. 1–16. doi: 10.5772/intechopen.94087.
[134] M. A. Mir, S. Mansoor, M. Sugapriya, M. N. Alyemeni, L. Wijaya, and P. Ahmad, "Deciphering genetic diversity analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) using RAPD and ISSR markers," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 28, no. 2, pp. 1308–1317, 2021.
[135] M. Mohammadi, B. Kaviani, and S. Sedaghathoor, "In vivo polyploidy induction of *Phalaenopsis amabilis* in a bubble bioreactor system using colchicine," *Ornam. Hortic.*, vol. 27, pp. 204–212, 2021.
[136] G. G. Mostafa, "Effect of some chemical mutagens on the growth, phytochemical composition and induction of mutations in *Khaya senegalensis*," *Int. J. Plant Breed. Genet.*, vol. 9, no. 2, pp. 57–67, 2015, doi: 10.3923/ijpbg.2015.57.67.
[137] G. G. Mostafa and M. F. A. Alhamd, "Effect of Dimethyl Sulphate on the Growth, Induction of Mutations and Their Identification by Peroxidase Isozyme in Tecoma stans," *Int. J. Plant Breed. Genet.*, vol. 10, no. 2, pp. 91–97, 2016, doi: 10.3923/ijpbg.2016.91.97.
[138] N. Mukkamula, N. Beema, S. Dasari, and B. K. Kumar, "Assessment of genetic diversity in *Maerua oblongifolia* (Forssk.) A. Rich. accessions based on RAPD markers," *Ecol. Genet. Genomics*, vol. 27, p. 100171, 2023.
[139] V. Muniappan, V. Prabakaran, S. Parvathi, and S. Palanivel, "in vitro mutagenic effect of dimethyl sulfate on direct multiple shoot induction and sds-page analysis in groundnut (*arachis hypogaea* l.)," in *10th national level symposium on modern biological sciences*, D. A. Ponnusamy, Ed., New Delhi, India: Shri Nehru Maha Vidyalaya, 2017, pp. 10–15.
[140] N. D. Mustika and E. Semiarti, "In vitro culture of *Dendrobium lineale* Rolfe orchid for plant breeding and propagation," in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 2021, p. 12066.
[141] N. Nadzifah, S. Fauzia, L. Budyghifari, and D. Darmawan, "The Impact of Covid-19 Pandemic on Consumer's Interest in Purchasing Orchids (Orchidaceae)," *KAPITA J. Agribisnis Pembang. Pertan.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2022.
[142] S. K. Naik and U. Bharathi, *Production Technology of Dendrobium Cultivation*, no. July 2016. New Patel Nagar, New Delhi: ICAR Research Complex for Eastern Region, 2012. doi: 10.13140/RG.2.1.1437.8482.
[143] B. Nam *et al.*, "Chemical and biological profiles of *Dendrobium* in two different species, their hybrid, and gamma-irradiated mutant lines of the hybrid based on LC-QToF MS and cytotoxicity analysis," *Plants*, vol. 10, no. 7, pp. 1376–1388, 2021.
[144] M. Nei, "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals," *Genetics*, vol. 89, no. 3, pp. 583–590, 1978.

[145] D. T. Nguyen, O. T. Nguyen, T. T. Ho, T. H. Nguyen, H. T. T. La, and C. K. T. Nguyen, "Effects of hormone and fertilizers on early flower induction of *Dendrobium anosmum* hybrid seedlings under ex vitro condition," *J. Exp. Biol. Agric. Sci.*, vol. 10(5), pp. 1168 – 1179, 2022, [Online]. Available: http://dx.doi.org/10.18006/2022.10(5).1168.1179
[146] H. T. Nguyen *et al.*, "In vitro propagation of the *Dendrobium anosmum* Lindl. collected in Vietnam," *Agronomy*, vol. 12, no. 2, pp. 324–338, 2022, [Online]. Available: https://doi.org/10.3390/agronomy12020324
[147] T. A. Nguyen, T. T. D. Tran, N. G. Quan, V. T. Le, and N. A. Trinh, "Evaluation of genetic diversity of 12 gerbera varieties (*Gerbera* L.) based on morphology and RAPD marker," *Hue Univ. J. Sci. Nat. Sci.*, vol. 134, no. 1S-2, pp. 151–164, 2025.
[148] T. T. Ninh *et al.*, "Genetic diversity of avocado (*'Persea americana'* Mill.) germplasm in Vietnam using RAPD and ISSR molecular markers," *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 856-S6, 2022.
[149] J. D. Nugroho, A. Y. S. Arobaya, and E. A. Tanur, "Propagation of *Dendrobium antennatum* Lindl via seed culture in vitro using simple medium: fertilizer and complex organic based medium," *Hayati J. Biosci.*, vol. 26, no. 3, pp. 133–138, 2019, doi: https://doi.org/10.4308/hjb.26.3.133.
[150] N. T. Oanh, N. T. Diem, N. H. Tho, and N. T. K. Cuc, "Optimal condition for Propagation and Growing of *Dendrobium thyrsiflorum*," *J. Exp. Biol. Agric. Sci.*, vol. 10, no. 3, pp. 524–532, 2022, doi: 10.18006/2022.10(3).524.532.
[151] D. A. de Oliveira *et al.*, "Characterization of *Pseudomonas* bacteria of Piper tuberculatum regarding the production of potentially bio-stimulating compounds for plant growth," *Acta Amaz.*, vol. 51, pp. 10–19, 2021, [Online]. Available: https://doi.org/10.1590/1809-4392202002311
[152] M. N. Pari and M. H. Fotokian, "Evaluation of some characteristics of the fourth generation of common purslane (*Portulaca oleracea* L.) mutated from treatment with dimethyl sulfate.," *Iran. J. Hortic. Sci.*, vol. 53, no. 4, pp. fa881–fa890, 2023.
[153] T. P. Pasternak and D. Steinmacher, "Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*," *Plants*, vol. 13, no. 2, p. 327, 2024.
[154] D. T. K. Pham, B. Van Huynh, and T. Mai, "Genetic relationship analysis of *Dendrobium anosmum* Lindl. var. semialba based on the chloroplast matK and rbcL genes," *J. Agric. Dev.*, vol. 20, no. 3, pp. 41–49, 2021, doi: 10.52997/jad.6.03.2021.
[155] T. T. K. Phuong, P. M. Hac, T. T. Huong, and W. Sasanti, "Investigation of the genetic diversity of jewel orchid in Vietnam using RAPD and ISSR markers," *Biodiversitas J. Biol. Divers.*, vol. 23, no. 9, 2022.
[156] R. J. Porra, "The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b," *Photosynth. Res.*, vol. 73, pp. 149–156, 2002.
[157] Y. Prasetyo, K. Njudang, H. M. P. Wibowo, and A. H. Krisnawan, "Evaluasi Pertumbuhan Suspensi Sel *Dendrobium anosmum* var. gigantea dan Aktivitasnya sebagai Antioksidan," *Media Pharm. Indones.*, vol. 3, no. 2, pp. 70–79, 2020.
[158] A. N. Pyati, "In vitro Regeneration of an Endangered Medicinal Orchid *Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxton through the Development of Protocorm like Bodies," *Plant*

Tissue Cult. Biotechnol., vol. 33, no. 1, pp. 1–8, 2023, doi: hĴps://doi.org/10.3329/ptcb.v33i1.66753.
[159] A. N. Pyati, "In vitro regeneration of plantlets from direct and indirect organogenesis from axenic stem nodal explant culture of a rare orchid *Dendrobium jerdonianum* Wight.," *Indian J. Biotechnol.*, vol. 20, pp. 294–301, 2021.
[160] E. M. Della Rahayu, "Handling and propagation of *Dendrobium* 'Iriana Jokowi'in Bogor Botanic Gardens, Indonesia," *Nusant. Biosci.*, vol. 8, no. 2, pp. 258–263, 2016.
[161] B. S. Revathi and B. Thomas, "In vivo polyploidy induction in *Dendrobium crumenatum* through colchicine treatment," *J. Appl. Hortic.*, vol. 24, no. 3, pp. 317–321, 2022.
[162] F. J. Rohlf, "NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York 2. Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy," 2000, *Freeman: San Francisco, CA, USA*.
[163] D. R. RS, B. R. Nair, and E. A. Siril, "Fingerprinting and genetic variability in drumstick (*Moringa oleifera* Lam.) elite trees using RAPD markers-An underutilized and wild edible future crop," *South African J. Bot.*, vol. 145, pp. 370–377, 2022.
[164] D. W. Russell and J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY, 2001.
[165] G. Russell, "Stomatal guard cell measurements using leaf prints," *CSA J*, vol. 4, pp. 137–139, 2004.
[166] A. I. M. Saad and A. M. Elshahed, "Plant Tissue Culture Media," in *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva and L. M. R. Rinaldi, Eds., Rijeka: IntechOpen, 2012, ch. 2, p. Ch. 2. doi: 10.5772/50569.
[167] K. . Sabastian, L. Hemanta, M. . S. Ariina, M. K. Mathukmi, and P. Devi, "Micropropagation of orchids," *Biol. Conserv.*, vol. 68, no. 1, pp. 379–385, 2021, doi: 10.1016/0006-3207(94)90551-7.
[168] M. Sabzehzari, S. Hoveidamanesh, M. Modarresi, and V. Mohammadi, "Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of *Plantago psyllium*," *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, vol. 139, pp. 131–137, 2019.
[169] Y. S. Sekhi, R. M. Hamad, and S. I. Neamah, "Role of dimethyl sulfate on biochemical characteristics of *fragaria ananassa* duch under salinity stress in vitro," *Iraqi J. Agric. Sci.*, vol. 53, no. 1, pp. 111–121, 2022.
[170] E. Semiarti, A. Purwantoro, and I. Puspita Sari, "Biotechnology approaches on characterization, mass propagation, and breeding of Indonesian orchids *Dendrobium lineale* (Rolfe.) and Vanda tricolor (Lindl.) with its phytochemistry," *Orchid. Phytochem. Biol. Hortic. Fundam. Appl.*, pp. 1–14, 2020.
[171] V. Sharma, R. Salwan, and L. K. T. Al-Ani, *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*. Elsevier, 2020. doi: https://doi.org/10.1016/C2018-0-03869-4.
[172] R. Sherpa, R. Devadas, S. N. Bolbhat, T. D. Nikam, and S. Penna, "Gamma radiation induced in-vitro mutagenesis and isolation of mutants for early flowering and phytomorphological variations in *Dendrobium* 'Emma White,'" *Plants*, vol. 11, no. 22, pp. 3168–3187, 2022, doi: https://doi.org/10.3390/plants11223168.
[173] P. Silpa and T. D. Thomas, "High-frequency shoot regeneration from flower bud derived callus of *Gymnostachyum febrifugum* Benth., an endemic medicinal plant to the Western

Ghats," *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, vol. 147, no. 2, pp. 221–228, 2021.
[174] B. Singer and D. Grunberger, *Molecular biology of mutagens and carcinogens*. Springer Science & Business Media, 1983.
[175] L. Soetopo and D. Hosnia, "In vivo polyploid-induction by colchicine on orchids *Phalaenopsis pulcherrima* (Lindl.) JJ Smith," *Biosci. Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 941–949, 2018.
[176] C. Song *et al.*, "Natural Composition and Biosynthetic Pathways of Alkaloids in Medicinal *Dendrobium* Species.," *Front. Plant Sci.*, vol. 13, p. 850949, 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.850949.
[177] S. Song, Y. Xu, B. Z. Wang, Y. D. Liu, H. Y. Qin, and W. H. Ma, "Different media on the tissue culture of *Dendrobium officinale*," *Chin Agric Sci Bull*, vol. 29, no. 13, pp. 133–139, 2013.
[178] J. C. Sorgato, J. S. Soares, C. R. Damiani, and L. M. Ribeiro, "Effects of light, agar, activated charcoal, and culture medium on the germination and early development of'*Dendrobium*'seedlings," *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 557–564, 2020.
[179] D. Srivastava, M. C. Gayatri, and S. K. Sarangi, "In vitro mutagenesis and characterization of mutants through morphological and genetic analysis in orchid *Aerides crispa* Lindl.," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 56, pp. 385–394, 2018.
[180] D. De Stefano, B. N. S. Costa, J. Downing, E. Fallahi, and A. A. Khoddamzadeh, "In-vitro micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements," *Am. J. Plant Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 380–393, 2022, doi: 10.4236/ajps.2022.133023.
[181] G. Subrahmanyam, A. Kumar, S. P. Sandilya, M. Chutia, and A. N. Yadav, "Diversity, plant growth promoting attributes, and agricultural applications of rhizospheric microbes," *Plant microbiomes Sustain. Agric.*, pp. 1–52, 2020.
[182] W. N. Sudheer, N. Praveen, J. M. Al-Khayri, and S. M. Jain, "Chapter 3 - Role of plant tissue culture medium components," in *Advances in Plant Tissue Culture*, A. Chandra Rai, A. Kumar, A. Modi, and M. B. T.-A. in P. T. C. Singh, Eds., Academic Press, 2022, ch. 3, pp. 51–83. doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00012-6.
[183] W. Taratima, K. N. Rohmah, K. Plaikhuntod, P. Maneerattanarungroj, and A. Trunjaruen, "Optimal protocol for in vitro polyploid induction of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw," *BMC Plant Biol.*, vol. 23, no. 1, p. 295, 2023.
[184] A. A. Tawfik, G. G. Mostafa, and M. S. Gad, "Effect of ethyl methane sulphonate and dimethyl sulphate on some growth characters of *Senna occidentalis*," *Asian J Res Rev Agric*, pp. 23–31, 2021.
[185] J. Thakur, M. D. Dwivedi, N. Singh, P. L. Uniyal, S. Goel, and A. K. Pandey, "Applicability of Start Codon Targeted (SCoT) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers in assessing genetic diversity in *Crepidium acuminatum* (D. Don) Szlach.," *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, vol. 23, p. 100310, 2021.
[186] A. V Tigova, A. I. Soroka, and P. G. Dulnev, "Directions of genetic changes induced by new dimethyl sulfate derivatives in oil flax," *Cytol. Genet.*, vol. 56, no. 1, pp. 37–45, 2022.
[187] K. T. Tran *et al.*, "In vitro propagation of indigenous Phu Tho's 5-petaled white orchid (*Dendrobium anosmum* Lindl.)," *J. Sci. Technol. hung vuong Univ.*, vol. 25, no. 4, pp. 85–

93, 2021.
[188] V. Vasko and V. Kyrychenko, “Variability of valuable economic traits in M1and M2 sunflower generations influenced by dimethyl sulfate and γ-rays,” *žemės ūkio Moksl.*, vol. 23, no. 4, pp. 168–177, 2016.
[189] J. A. Vilcherrez-Atoche, C. M. Iiyama, and J. C. Cardoso, “Polyploidization in orchids: From cellular changes to breeding applications,” *Plants*, vol. 11, no. 4, pp. 469–490, 2022.
[190] F. Wang *et al.*, “In Vitro Induction of Polyploidy by Colchicine in the Protocorm of the Orchid *Dendrobium wardianum* Warner,” *HortScience*, vol. 58, no. 11, pp. 1368–1375, 2023.
[191] S. S. Wang *et al.*, “Analysis of Endophytic Bacterial Diversity From Different *Dendrobium Stems* and Discovery of an Endophyte Produced Dendrobine-Type Sesquiterpenoid Alkaloids,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. January, pp. 1–15, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2021.775665.
[192] Y.-T. Wang, “*Dendrobium anosmum* - Every One Should Have One,” Oct. 1999.
[193] G. J. Wilfret, “Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae),” 1968, *University of Hawaii*.
[194] G. J. Wilfret and H. Kamemoto, “Genome and Karyotype Relationships in the Genus *Dendrobium* (Orchidaceae),” *Cytologia (Tokyo).*, vol. 36, no. 4, pp. 604–613, 1971, doi: 10.1508/cytologia.36.604.
[195] J. G. K. Williams, M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S. V Tingey, “Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers,” in *Methods in enzymology*, vol. 218, Elsevier, 1993, pp. 704–740. doi: https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)18053-F.
[196] J. Wraith, P. Norman, and C. Pickering, “Orchid conservation and research: An analysis of gaps and priorities for globally Red Listed species.,” *Ambio*, vol. 49, no. 10, pp. 1601–1611, Oct. 2020, doi: 10.1007/s13280-019-01306-7.
[197] J. Wyatt, “Grain and Plant Morphology of Cereals and how characters can be used to identify varieties,” in *Plant Morphology*, C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, and J. B. T.-E. of F. G. (Second E. Faubion, Eds., Oxford: Academic Press, 2016, pp. 51–72. doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00009-7.
[198] K. Yazici and M. Ş. ÇEVİK, “Development of DNA markers associated with sunburn resistance in pomegranate *(Punica granatum* L.) using bulk segregant analysis,” *Turkish J. Agric. For.*, vol. 46, no. 6, pp. 955–965, 2022.
[199] S.-C. Yuan *et al.*, “The Global Orchid Market,” in *The Orchid Genome*, F.-C. Chen and S.-W. Chin, Eds., New Delhi, India: Springer, 2021, p. 174. doi: 10.1007/978-3-030-66826-6_1.
[200] J. Zeng, D. Wang, Y. Wu, X. Guo, Y. Zhang, and X. Lu, “Karyotype analysis of Gazania rigens varieties,” *Hortic. plant J.*, vol. 2, no. 5, pp. 279–283, 2016.
[201] D. Zhai, X. Lv, J. Chen, M. Peng, and J. Cai, “Recent Research Progress on Natural Stilbenes in *Dendrobium* Species,” *Molecules*, vol. 27, no. 21, pp. 1–38, 2022.
[202] X. Zhang and J. Gao, “In vitro tetraploid induction from multigenotype protocorms and tetraploid regeneration in *Dendrobium officinale*,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 141, pp. 289–298, 2020.

PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1: GIẤY GIÁM ĐỊNH GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM (*Dendrobium anosmum* Lindl.).....1
PHỤ LỤC 2: THÀNH PHẦN CÁC MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU..2
I. Môi trường nuôi cấy mô 2
II.Môi trường nuôi cấy vi sinh.....4
PHỤ LỤC 3: SƠ ĐỒ HOÁ CÁC NỘI DUNG NGHIÊN CỨU.....5
PHỤ LỤC 4: PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT VÀ ĐIỆN DI KIỂM TRA DNA TỔNG SỐ.....7
I. Phương pháp tách chiết DNA tổng số 7
II.Các bước thực hiện phương pháp kỹ thuật điện di kiểm tra DNA.....8
PHỤ LỤC 5: QUY TRÌNH TẠO GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐỘT BIẾN BẰNG TÁC NHÂN HOÁ HỌC.....9
PHỤ LỤC 6: PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN KÍNH HIỂN VI VÀ CHIẾT XUẤT DIỆP LỤC, CAROTEN 10
I. Phương pháp làm tiêu bản thực vật kính hiển vi tạm thời 10
II. Phương pháp chiết xuất diệp lục và caroten 11
PHỤ LỤC 7: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN PHẢN ỨNG PCR-RAPD.....12
PHỤ LỤC 8: PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH.....14
PHỤ LỤC 9: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT NỘI SINH 15
PHỤ LỤC 10: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN LÀM CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG CÓ CHỨA VI SINH VẬT NỘI SINH. 18
PHỤ LỤC 11: ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ NHẬN DIỆN LOÀI LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ *(Dendrobium anosmum* Lindl.) 19
PHỤ LỤC 12. MỘT SỐ BẢNG DỮ LIỆU ĐƯỢC THU THẬP TRONG NGHIÊN CỨU.....26
PHỤ LỤC 13: TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE 33
I. Trình tự nucleotide của các vùng gene nghiên cứu thu được từ cây lan giả hạc tím Huế.....33
II. Trình tự nucleotide của vùng 16s trên 3 chủng vi khuẩn nội sinh ở cây lan rừng.....35
PHỤ LỤC 14: MỘT SỐ CÂY DI TRUYỀN TRONG NGHIÊN CỨU.....37
PHỤ LỤC 15: SO SÁNH TRÌNH TỰ NU CỦA CÁC VÙNG GEN.....39
PHỤ LỤC 16: KÍ HIỆU CỦA NHỮNG DÒNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐƯỢC LỰA CHỌN LẤY MẪU PHÂN TÍCH 48
PHỤ LỤC 17: BẢNG HỆ SỐ TƯƠNG ĐỒNG 49
PHỤ LỤC 18: XÂY DỰNG QUY TRÌNH 50
Quy trình 1: Quy trình tái sinh của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến 50
Quy trình 2: Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế.....51
PHỤ LỤC 19: CÁC BƯỚC XÁC ĐỊNH MẬT ĐỘ VI KHUẨN (CFU/mL) 53
PHỤ LỤC 20: MỘT SỐ HÌNH ẢNH ĐƯỢC CHỤP LẠI TRONG THỜI GIAN NGHIÊN CỨU.....54
PHỤ LỤC 21. SỐ LIỆU XỬ LÝ THỐNG KÊ……...……..…59
TÀI LIỆU THAM KHẢO PHẦN PHỤ LỤC 91

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

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

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

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

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

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

Các thông tín về mẫu vật:

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

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

Ngày nhận mẫu: 20/02/2025

Kết quả giám định tên khoa học:

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

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

Huế, ngày 27 tháng 02 năm 2025

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THÀNH PHỐ HUẾ
BẢO TÀNG THIÊN NHIÊN DUYÊN HẢI MIỀN TRUNG

Lê Nguyễn Thới Trung

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

I. Môi trường nuôi cấy mô

a) Môi trường MS- Murashige and Skoog Medium

- đa lượng:

+ Ammonium nitrate (NH_4NO_3) : 1650 mg/L

+ Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) : 440 mg/L

+ Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) : 370 mg/L

+ Potassium phosphate (KH_2PO_4) : 170 mg/L

+ Potassium nitrate (KNO_3) : 1,900 mg/L

- Vi lượng:

+ Boric acid (H_3BO_3) : 6,2 mg/L

+ Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$) : 0,025 mg/L

+ Cupric sulphate ($CuSO_4.5H_2O$) : 0,025 mg/L

+ Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$) : 27,8 mg/L

+ Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$) : 22,3 mg/L

+ Potassium iodide (KI) : 0,83 mg/L

+ Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$) : 0,25 mg/L

+ Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$) : 8,6 mg/L

+ $Na_2EDTA.2H_2O$: 37,2 mg/L

- Vitamins và chất hữu cơ

+ i-Inositol : 100 mg/L

+ Niacin : 0,5 mg/L

+ Pyridoxine : HCl 0,5 mg/L

+ Thiamine : HCl 0,1 mg/L

+ Glycine : 2 mg/L

+ Edamin (có hoặc không) : 1 g/L

Môi trường ½ MS là môi trường MS có thành phần đa lượng và vi lượng được giảm đi 1/2.

b) Môi trường Knudson C

- Vi lượng

+ Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$): 25,00 mg/L

+ Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$): 5,68 mg/L

- Đa lượng

+ Calcium nitrate ($Ca(NO_3)_2$) : 241,30 mg/L

+ Kali chloride (KCl): 250,00 mg/L

+ Potassium phosphate (KH_2PO_4): 250,00 mg/L

+ Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) : 122,15 mg/L

+ Ammonium nitrate (NH_4NO_3) 500,00 mg/L

+ Ammonium Sunfate $(NH_4)_2SO_4$: 500,00 mg/L

c) Môi trường Vacin Went

- Vi lượng

+ Ferric Tartrate ($Fe_2(C_4H_4O_6)_3$): 23,13 mg/L

+ Manganese Sulphate Monohydrate ($MnSO_4.H_2O$) : 5,68 mg/L

- Đa lượng

+ Tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) : 200,00 mg/L

+ Potassium phosphate (KH_2PO_4): 250,00 mg/L

+ Potassium nitrate (KNO_3) : 525,00 mg/L

+ Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$): 122,00 mg/L

+ Amoni sulfat ($(NH_4)_2SO_4$): 500,00 mg/L

d) Môi trường Hyponex

- Đa lượng

+ Ammonium nitrate (NH_4NO_3): 1 g/L.

+ Potassium nitrate (KNO_3): 1 g/L.

+ Potassium phosphate (KH_2PO_4): 0,25 g/L.

+ Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$): 0,25 g/L.

+ Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$): 0,25 g/L.

- Vi lượng

+ Manganese(II) sulfate tetrahydrate ($MnSO_4.4H_2O$): 22,3 mg/L.

+ Boric acid (H_3BO_3): 6,2 mg/L.

+ Zinc sulfate ($ZnSO_4.4H_2O$): 8,6 mg/L.

+ Potassium iodide (KI): 0.83 mg/L.

+ Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$): 0,25 mg/L.

+ Cupric sulfate ($CuSO_4.5H_2O$): 0,025 mg/L.

+ Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$): 0,025 mg/L.

II.Môi trường nuôi cấy vi sinh

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

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

Môi trường Pikovskaya (PVK) (dùng để phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải lân khó tan) gồm glucose (10 g), $Ca_3(PO_4)_2$ (5 g), $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 g), KCl (0,2 g), $MgSO_4.7H_2O$ (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.

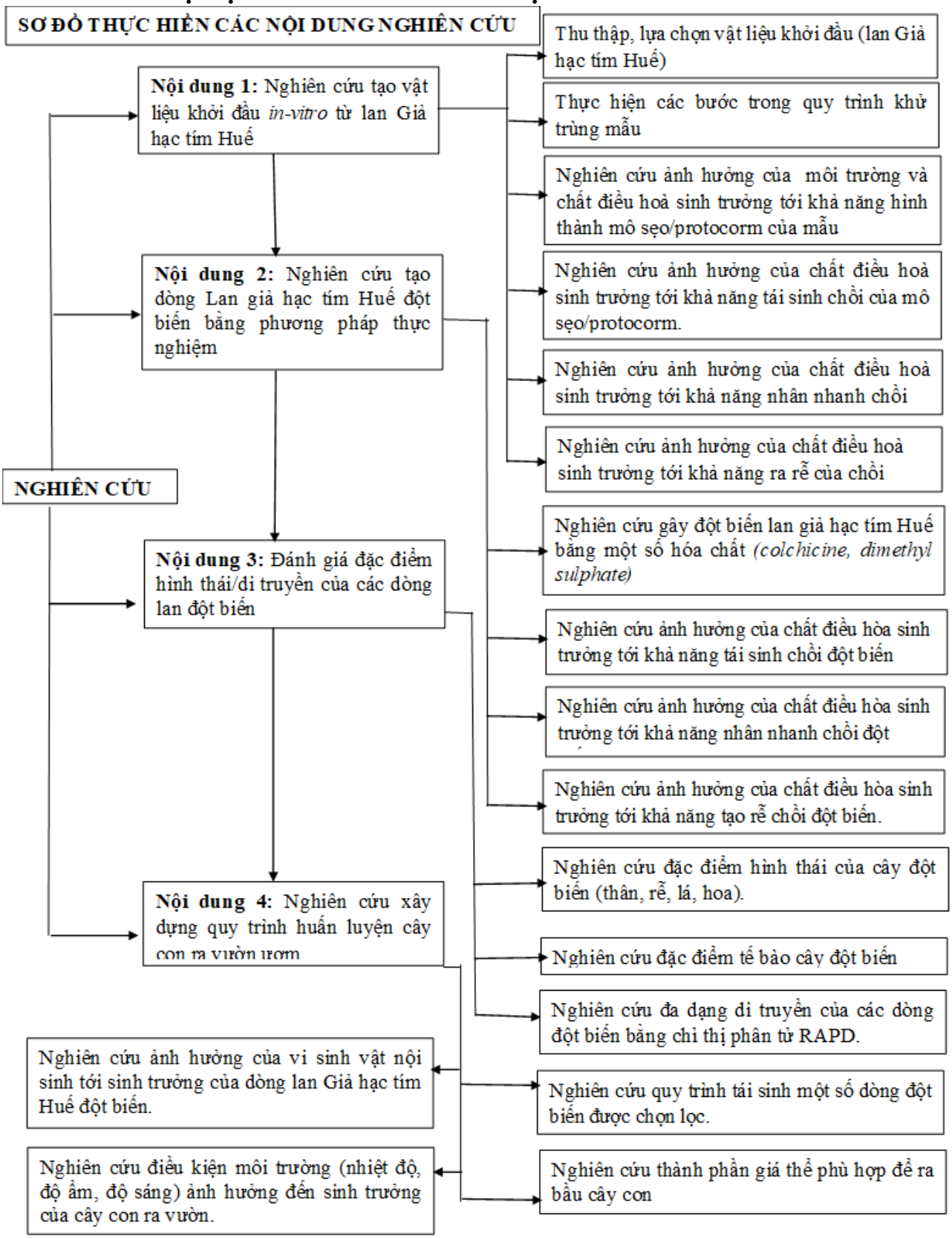
Môi trường NA bán lỏng gồm có nước chiết thịt bò: 200 g/L; Peptone: 5 g/L; cao nấm men: 3 g/L; NaCl: 5 g/L; 4 g/L agar, pH: 7,0.

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; $MgSO_4.7H_2O$: 0,05 g/L; $CaCO_3$: 0,02 g/L; $FeSO_4.7H_2O$: 0,01 g/L; NaCl: 2 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

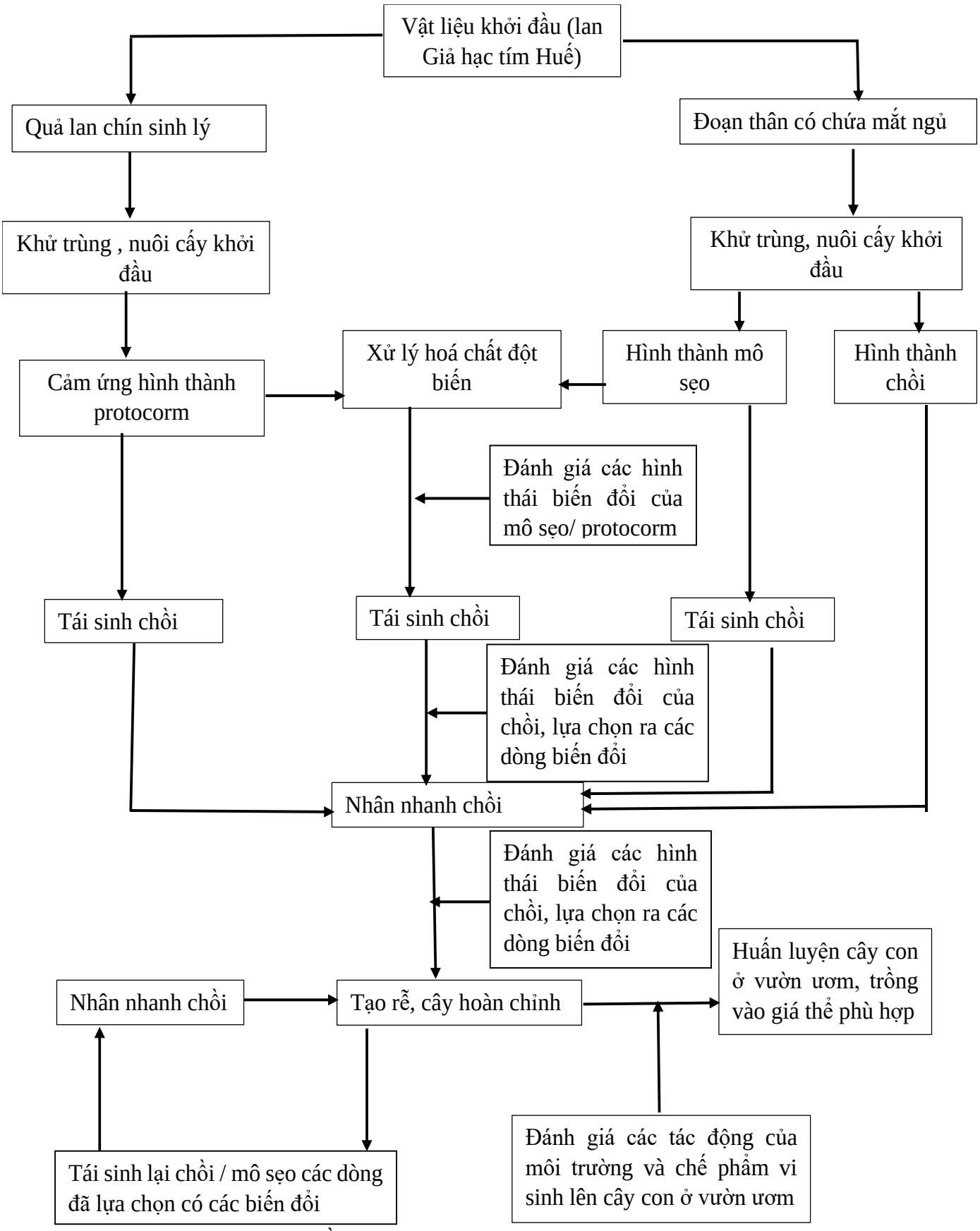
Môi trường International streptomyces project 2 (ISP2) gồm có cao nấm men: 4 g/L; chiết xuất mạch nha: 10 g/L; dextrose (hoặc glucose): 4 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,3.

Môi trường Ashby xác định khả năng cố định đạm của vi sinh vật gồm có Glucose (nguồn carbon): 20 g/L; K_2HPO_4: 0,2 g/L; NaCl: 0,2 g/L; $MgSO_4.7H_2O$: 0,2 g/L; K_2SO_4: 0,1 g/L $CaCO_3$: 5 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

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



Hình P.1. Sơ đồ tóm lược các nội dung nghiên cứu.



Hình P.2. Sơ đồ tóm lược quá trình thực hiện thí nghiệm

PHỤ LỤC 4: PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT VÀ ĐIỆN DI KIỂM TRA DNA TỔNG SỐ

I. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

1.Chuẩn bị:

- Đệm CTAB: 2% cetyl trimethylammonium bromide, 1% polyvinylpyrrolidone, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0), hoặc đệm chiết xuất CTAB.
- Ống eppendorf 1,5 mL, máy ly tâm lạnh (ít nhất 14.000 vòng/phút), bể ổn nhiệt, chày cối.
- Dung dịch RNase A (10 mg/ml trong nước, không chứa DNase).
- Isopropanol, 70% Etanol, đệm TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA).
- Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (tỷ lệ 25:24:1) được lưu trữ trong đệm TE, pH 8.

2.Các bước thực hiện

Bước 1: Mẫu lá/mô lan giả hạc tím Huế được chuẩn bị được chuẩn bị bằng cách cắt nhỏ và nghiền mô đông lạnh bằng cối và chày sau khi làm lạnh trong nitơ lỏng. Mẫu được nghiền ở nhiệt độ phòng, nghiền nhanh thành bột mịn là tốt nhất để chiết xuất DNA.

Bước 2: Lấy 100 mg mẫu đã nghiền cho vào ống eppendorf 1,5 mL, thêm 500 µL đệm CTAB. Trộn đều và lắc kỹ, sau đó ủ ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút, trong thời gian ủ có lắc nhẹ.

Bước 3: Ly tâm hỗn hợp sau khi ủ trong 5 phút ở tốc độ 14.000 vòng/phút ở 4ºC, hút dịch nổi chuyển sang ống eppendorf 1,5 mL mới. Thêm 5 µL dung dịch RNase A và ủ ở 37°C trong 20 phút.

Bước 4: Thêm một lượng phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) bằng thể tích dịch mẫu đang có trong ống eppendorf vào ống. Lắc mạnh trong 5 giây rồi ly tâm mẫu trong 1 phút ở tốc độ 14.000 vòng/phút ở 4ºC để tách các pha.

Bước 5: Chuyển pha dịch nỗi phía trên sang ống eppendorf 1,5 mL mới. Lặp lại quá trình chiết này cho đến khi pha nước phía trên trong suốt.

Bước 6: Chuyển phần nước ở trên sang ống mới. Thêm 0,7 thể tích isopropanol lạnh và ủ ở -20°C trong 15 phút để kết tủa DNA.

Bước 7: Ly tâm dịch mẫu ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4ºC, đổ bỏ phần dịch trong bên trên mà không làm xáo trộn phân kết tủa và sau đó rửa bằng 500 µl etanol 70% lạnh. sau đó Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4ºC loại dịch nổi (lặp lại 2 lần).

Bước 8: Kết tủa sẽ được làm khô ở 37ºC và sau đó hòa tan kết tủa trở lại trong 20 µL đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 8,0). Bảo quản DNA ở nhiệt độ -30ºC cho các thí nghiệm tiếp theo.

II.Các bước thực hiện phương pháp kỹ thuật điện di kiểm tra DNA

Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1%: lấy 0,4 g thạch agarose nguyên chất cho vào cốc đong thủy tinh chịu nhiệt, đổ vào đó 40 mL đệm TAE 1X (40 mM Tris pH 7,6; 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA). Chuyển cốc đong vào lò vi sóng (Microwave) đặt nóng chảy trong 3 phút sao cho agarose tan hoàn toàn, để nguội đến nhiệt độ 50 - 60ºC sau đó bổ sung thêm 4 µL ethidium bromide (0,5 µg/L). Gài lược có nhiều răng vào khay của hệ thống điện di, đổ thạch ngập răng lược khoảng 0,5 cm và để nguội ở nhiệt độ phòng.

Bước 2: Đặt ngập khay có chứa gel agarose trong hộp điện di chứa dung dịch đệm TAE 1X, sau đó rút lượt ra khỏi khay, lúc này gel agarose sẽ tạo các giếng để tra mẫu vào.

Bước 3: Tra mẫu: lấy 5 - 10 µL sản phẩm mỗi loại, trộn với 1 - 2 µL chỉ thị màu (Loading dye 6X) (thường là hỗn hợp xanh Bromophenol và Glycerol) với mẫu và tra riêng biệt vào từng giếng trong thạch.

Bước 4: Tra chỉ thị phân tử: trong một giếng riêng biệt khác cho 5 - 10 µL chỉ thị phân tử (DNA marker), thang chuẩn DNA có kích thước dao động từ 100-1500 bp plus của Fermentas.

Bước 5: Nối hệ thống điện di với nguồn điện, cực âm ở phía đầu của bản thạch, cực dương ở phía cuối, DNA tổng số, và DNA của sản phẩm PCR sẽ chuyển dịch từ cực âm đến cực dương. Chạy điện di ở hiệu thế 100 V trong 15 - 30 phút.

Bước 6: Rửa thạch bằng nước, sau đó soi qua đèn UV, chụp lại hình và đọc kết quả.

PHỤ LỤC 5: QUY TRÌNH TẠO GIỐNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐỘT BIẾN BẰNG TÁC NHÂN HOÁ HỌC

Quy trình tạo giống đột biến bằng phương pháp hoá học kết hợp nuôi cấy *in-vitro*, có các bước cơ bản sau:

Bước 1: Lựa chọn dòng tế bào mẹ: Đây là các dòng tế bào từ protocorm hoặc mô sẹo được tạo ra từ nuôi cấy *in-vitro* hạt hoặc chồi lan. Protocorm hay mô sẹo phải đảm bảo không bị nhiễm bệnh, khoẻ mạnh có kích thước đồng đều ≤ 0,5cm, có khối lượng từ 0,02-0,1 g.

Bước 2: Gây đột biến: Sử dụng các tác nhân hoá học như hoá chất DMS, colchicine để gây đột biến vào tế bào mẹ. Điều này sẽ tạo ra các biến đổi trong gen, NST của tế bào mẹ.

Bước 3: Nuôi cấy *in-vitro* : Tế bào mẹ sau khi đã trải qua đột biến được nuôi cấy in-vitro trong điều kiện lý tưởng để tạo ra các dòng giống mới chứa đột biến mong muốn.

Bước 4: Xác định dòng giống chứa đột biến: Sau khi nuôi cấy, các tế bào con tiếp tục được phân chia để tạo ra các dòng giống mới, phát triển thành chồi, cây con và bắt đầu biểu hiện các hình thái ra bên ngoài. Sử dụng một số chỉ thị hình thái, tế bào, phân tử để xác định dòng giống chứa đột biến.

Bước 5: Lưu giữ và nhân giống: Khi đã xác định được dòng giống chứa đột biến mong muốn, tiếp tục nhân lên và nuôi cấy trong môi trường *in-vitro* để tạo cây hoàn chỉnh.

Bước 6: Thự nghiệm giống đột biến: Các cây giống được tạo ra từ phòng thí nghiệm, mang những biến đổi về hình thái được trồng và theo dõi các chỉ tiêu nghiên cứu tại vườn.

PHỤ LỤC 6: PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN KÍNH HIỂN VI VÀ CHIẾT XUẤT DIỆP LỤC, CAROTEN

I. Phương pháp làm tiêu bản thực vật kính hiển vi tạm thời

1. Chuẩn bị

- Kính hiển vi quang học, dao mổ, kim mũi mác, đĩa đồng hồ, giấy thấm, bản kính, lá kính.
- Nước cất, thuốc nhuộm xanh methylen/fuchsin/ đỏ carmin, acid acetic 10%, Javel, glycerin.
- Mẫu thực vật: thân, lá, rễ của lan giả hạc tím Huế

2. Các bước thực hiện

Bước 1: Dùng dao/kim mũi mác cắt, bóc một lát (ngang/dọc) mỏng của mẫu thực vật (càng mỏng càng dễ quan sát). Mẫu lấy có kích thước khoảng 0,4x0,4 cm.

Vị trí cắt:

+ Rễ: Vùng lông hút
+ Thân: Lóng, không cắt sát và ngay mấu
+ Lá: 1/3 ở phía dưới, nếu phiến rộng quá thì có thể bỏ bớt thịt lá, chỉ chừa lại 1cm phần thịt lá ở 2 bên gân giữa

Bước 2: Nhỏ 1 giọt nước cất lên bản kính, sau đó đặt mẫu đã cắt vào giọt nước. đặt lá kính nghiên 1 góc 45^o từ từ đậy xuống giọt nước có mẫu cần quan sát. Tránh không tạo ra bọt khí khi đậy lá kính.

Bước 3: Thực hiện quan sát. Đặt tiêu bản lên bàn kính hiển vi, điều chỉnh kính hiển vi để quan sát.

3. Các bước nhuộm tế bào thực vật làm tiêu tiêu bản

Để có thể quan sát thấy rỏ hơn thành phần, hình dạng cấu trúc tế bào, chúng tối tiến hành nhuộm tế bào, các bước thực hiện như sau:

1. Ngâm trong dung dịch Javel 15 – 20 phút (cho đến khi mẫu vi phẫu trắng, nếu quá 30 phút mà vi phẫu chưa trắng thì thay nước Javen mới).
2. Rửa sạch 3 – 4 lần bằng nước cất.
3. Ngâm trong dung dịch acid acetic 10% trong 5 phút.
4. Rửa sạch 3 – 4 lần bằng nước cất.
5. Ngâm trong dung dịch xanh methylen 0,5% trong 10 giây.
6. Rửa sạch bằng nước cất.

7. Ngâm trong dung dịch carmine son phèn (đỏ carmine) 1% trong 15 – 20 phút.
8. Rửa sạch và quan sát trong nước hoặc glycerin.

4. Làm tiêu bản quan sát nhiễm sắc thể đầu rễ lan Giả hạc tím Huế

Tiêu bản được thực hiện bằng cách:

Bước 1: Cắt đầu rễ dài 5 mm của những cây lan Giả hạc tím Huế biến dị cho vào các ống eppendorf 1,5 ml có bổ sung 100 µL dung dịch colchicine 0,1%.

Bước 2: Ủ trong dung dịch colchicine 30 phút.

Bước 4: Loại bỏ colchicine và thêm vào ống eppendorf 200 µL sodium acetat 0,5%.

Bước 5: Ủ mẫu trong 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 6: Mẫu được lấy ra và cố định trong dung dịch carnoy trong 4 giờ.

Bước 7: Loại bỏ carnoy và rửa mẫu nhiều lần bằng cồn 70%, nhuộm bằng dung dịch xanh methylen 1% hoặc đỏ carmine ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

Bước 8: Làm tiêu bản mẫu bằng cách cắt đầu rễ 1-2 mm và lên lam kính, đậy lamen lên mẫu và ấn nhẹ để mẫu trải đều ra.

Bước 9: Đưa lên kính hiển vi quan sát ở độ phóng đại vật kính 100x và thị kính là 10x, dùng dầu cho lên tiêu bản để quan sát.

II. Phương pháp chiết xuất diệp lục và caroten

Chiết xuất bằng phương pháp chuẩn của Porra RJ (2002) [10]. Lấy 0,25 gam lá còn tươi cắt nhỏ cho vào cối sứ (bỏ gân lá), thêm 0,2 gam bột $CaCO_3$ để trung hoà dịch acid của tế bào, có thể cho một ít bột thuỷ tinh nghiền. Nghiền các mẩu lá đến khi thành một thể đồng nhất, cho vào ống nghiệm có chứa 10 ml aceton 80% hoặc cồn etylic 90^0 lắc đều, bịt kín và để 5 phút rồi lọc bằng bông trên phễu thuỷ tinh, dung dịch thu được có màu xanh. Tiến hành đo mật độ quang dịch mẫu ở các bước sóng 470 nm, 645 nm và 663 nm bằng máy đo UV-VIS.

PHỤ LỤC 7: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN PHẢN ỨNG PCR-RAPD

Bước 1: Chuẩn bị thiết, dụng cụ, hoá chất cần thiết

- Tube khoảng 200 µl, micropipet 10 µl, 20 µl, máy luân nhiệt (MJ – MiniTM Persanol Thermal Cycle, Bio - Rad)

- Thành phần phản ứng PCR gồm có:

+ DNA mẫu (template) chứa mảnh DNA cần khuếch đại.

+ Mồi RAPD (primer) là các đoạn DNA ngắn (10-15 nu) để xác định điểm bắt đầu và kết thúc vùng cần khuếch đại (*đều được cung cấp bởi hãng Operon Technologies)*

+ DNA-polymerase enzym (Taq polymerase, hãng Bioline) xúc tác cho việc nhân lên của DNA.

+ Nucleotides (dNTP, hãng Thermo Fisher Scientific Inc) là nguyên liệu cho DNA-polymerase tổng hợp DNA mới.

+ Dung dịch đệm (Buffer [Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 2,0 mM $MgCl_2$], hãng ABT Việt Nam) cung cấp môi trường hóa học cho DNA-polymerase.

+ Nước cất

Bước 2: Pha Master Mix cho phản ứng PCR

Phụ thuộc vào số lượng phản ứng thực hiện để pha Master Mix với lượng vừa đủ. Thành phần Master Mix là những thành phần chung cho các phản ứng (Buffe, dNTP, Taq polymerase, nước cất)

Bước 3: Pha hỗn hợp cho mỗi phản ứng PCR

Tổng thể tích cho mỗi phản ứng là 25 µl gồm có:

- Buffe : 2,5 µl	- Taq : 2 µl
- Mồi RAPD : 1 µl	- Template : 1 µl
- dNTP : 2 µl	- Nước cất : 16,5 µl

(Chú ý, các thành phần buffe, dNTP, Taq polymerase, nước cất đã có trong Master Mix nên chỉ cần lấy 23 µl Master Mix cho mỗi phản ứng.)

Bước 3: Cài đặt chương trình cho máy luân nhiệt

Phản ứng PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt (MJ – MiniTM Persanol Thermal Cycle, Bio - Rad) được cài đặt theo chu trình nhiệt như sau: Chương trình gia nhiệt cho phản ứng PCR khởi đầu bằng giai đoạn biến tính DNA ở nhiệt độ 94^0C trong 5 phút, theo sau là 40 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: Biến tính DNA ở 94^0C trong 15 giây, gắn mồi ở 35^0C trong 15 giây, tổng hợp DNA ở 72ºC trong 1 phút 20 giây và kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72ºC trong 10 phút và lưu trữ ở 4ºC.

Bước 4: Thực hiện điện di sản phẩm PCR-RAPD

Sản phẩm PCR-RAPD của các mẫu DNA được chạy điện di trên agarose gel 1,5% ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút với thang chuẩn DNA có kích thước dao động từ 100-1500 bp plus của Thermo Scientific.(Thang đo DNA GeneRuler 1 kb- SM0311, Thermo Scientific)

PHỤ LỤC 8: PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH

Sử dụng mẫu rễ, thân, lá của lan rừng được thu thập về xử lý khử trùng bề mặt. Để loại trừ các vi sinh vật trên bề mặt, mẫu (thân, rễ, lá) sau khi thu thập được xử lý như sau: Loại bỏ các phần bị hỏng, úa vàng, rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy; tiếp tục rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt mẫu thành những đoạn nhỏ 1 - 2 cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm; sau đó khử trùng mẫu bằng cồn 96% trong 3 phút, Sodium hypochloride 1% trong 5 phút, hydrogen peroxide 3% (H_2O_2) trong 5 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để tẩy rửa các loại hóa chất còn thừa. Để kiểm tra khả năng các vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, lấy 200 µL nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần cuối cấy trãi 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 trùng, sau đó tất cả mẫu được cho vào một ống 50 mL vô trùng [7].

Dung dịch sau khi nghiền tiến hành pha loãng theo dãy nồng độ 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} sau đó hút 50 µL dung dịch ở các nồng độ pha loãng được chuyển vào trong ống nghiệm có chứa 3 mL môi trường bán lỏng NA, rồi đem ủ ở 30°C trong 48 h, quan sát thấy các ống nghiệm chứa môi trường bán lỏng NA đã cấy dịch trích của mẫu có xuất hiện một lớp màng mỏng (vòng pellicle) cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh [5].

Lấy một ít vi khuẩn từ màng mỏng của các môi trường bán lỏng NA lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường NA, LB, SCA, ISP2 đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Sau vài lần cấy chuyển trên các môi trường đặc, chọn các khuẩn lạc rời và đều nằm trên đường cấy quan sát dưới kính hiển vi. Khi thấy vi khuẩn đã thuần nhất thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở 4°C và được xem như là một dòng.

PHỤ LỤC 9: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT NỘI SINH

- Phân tích hoạt tính hoá sinh

+ Xác định khả năng phân giải lân

Lựa chọn các khuẩn lạc đã phân lập cấy chấm điểm lên môi trường Pikovaskya. Các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường sau 24 đến 72 giờ ủ, tiến hành khảo sát kích thước khuẩn lạc và khả năng hòa tan Phốt pho trên môi trường Pikovaskya đặc thông qua vòng sáng phân giải tạo ra xung quanh khuẩn lạc trên môi trường [3]. Chỉ tiêu theo dõi là đường kính phát triển của khuẩn lạc (mm) và đường kính vòng sáng phân giải (mm).

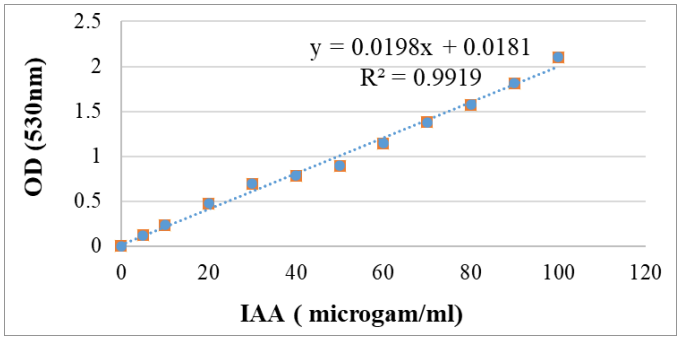
+ Xác định khả năng cố định đạm

Lựa chọn các khuẩn lạc đã phân lập cấy điểm lên môi trường Ashby mannitol agar, ủ ở 30°C trong 72 giờ. Xác định các khuẩn lạc phát triển được trên môi trường Ashby, đo đường kính (mm) khuẩn lạc phát triển [4].

+ Xác định khả năng sinh IAA

Các chủng vi sinh vật đã phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường dịch thể Luria Bertani có bổ sung 0,1% L - Tryptophan trong máy lắc ổn nhiệt ở tốc độ 150 vòng/phút, trong thời gian từ 48-72 giờ, nhiệt độ từ 28°C đến 30°C. Ly tâm không ít hơn 3 mL dung dịch mẫu thử với tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Lấy 2 mL phần dung dịch trên bề mặt (phần nước trong) cho vào ống định mức dung tích 10 mL. Thêm thuốc thử Salkowski đến vạch định mức, trộn đều. Ủ tối trong vòng 25 phút và tiến hành so sánh màu sắc của các chủng vi sinh vật, màu càng đỏ thì hàm lượng IAA tổng hợp được càng cao [6]. Hàm lượng IAA sinh ra được xác định bằng đồ thị đường chuẩn (Hình P1). Đo cường độ màu trên máy quang phổ so màu ở bước sóng 530 nm.

Hình P1. sơ đồ đường chuẩn IAA được xây dựng ở dãy nồng độ iaa từ 0 đến 100 mg/l



+ Xác định khả năng sinh NH_3

Xác định khả năng sinh NH_3 của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập bằng phương pháp định tính của Cappuccino & Sherman. Các dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi trong ống 10 mL nước peptone, nuôi lắc 150 vòng/phút, trong 48-72 giờ ở 28 ± 2°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, màu sắc phụ thuộc vào hàm lượng amoniac sinh ra [8].

- Định loại phân tử chủng vi sinh vật

Trong số những chủng phân lập được, lựa chọn chủng có hoạt tính tốt nhất để định danh vi khuẩn bằng cách giải trình tự gen 16S rRNA. DNA tổng số từ vi khuẩn được tách chiết theo mô tả của Sambrook và Russell.

Các dòng phân lập được xác định bằng giải trình tự một phần của vùng 16S đối với vi khuẩn. Các vùng 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi thuận 27F (5'-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG-3') và mồi ngược 1492R (5'-ACGG (CT) TACCTTGTTACGACTT-3').

Phản ứng PCR được thực hiện 30 chu kỳ với sự biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút. Biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn 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 Viện Công nghệ ADN và Phân tích di truyền GENLAB (Hà Nội). Trình tự thu được sau đó được so sánh và phân tích với trình tự đã được công bố trên cơ sở dữ liệu (NCBI) bằng chương trình BLAST. Cùng với đó trình tự được so sánh bằng CLUSTAL X. Các chủng được dựng cây phân loại xác định họ hàng gần bằng phần mềm Mega 7.

- Xác định khả năng đối kháng của vi sinh vật với vi sinh vật gây bệnh

Các chủng vi sinh vật nội sinh sẽ được dùng để đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên lan.

Thí nghiệm 1: Phân lập vi khuẩn gây bệnh thối nhũn từ các mẫu bệnh thối nhũn trên lan (mẫu bệnh được thu thập trên lan Giả hạc tím Huế, lan Hồ điệp (*Phalaenopsis amabilis) và lan Dendrobium mini* có ở vườn lan Viện công nghệ sinh học, Đại học Huế tại thời điểm nghiên cứu*)* . Chủng vi khuẩn này được lưu giữ để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Thí nghiệm 2: Sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng kháng được vi khuẩn gây bệnh thối nhũn được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Bổ sung 50 µL dịch nuôi cấy mỗi chủng vi khuẩn vào mỗi lỗ trên đĩa thạch LB đã được cấy trải 50 µL dịch vi khuẩn gây bệnh thối nhũn (106 cfu/mL), ủ ở 4ºC trong 2 giờ để dịch nuôi vi khuẩn khuếch tán vào môi trường, sau đó giữ trong tủ ấm 30ºC. Đường kính (mm) vòng kháng khuẩn được xác định sau 24 giờ nuôi cấy. Cách xác định mật độ vi khuẩn (cfu/mL) thực hiện theo mô tả phụ lục 19.

PHỤ LỤC 10: CÁC BƯỚC THỰC HIỆN LÀM CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG CÓ CHỨA VI SINH VẬT NỘI SINH.

Bước 1. Chuẩn bị nguyên liệu cho dung dịch dinh dưỡng

5 kg trùn quế thịt, xay nhuyễn.

1,2 kg mật rỉ đường.

1 kg bột đậu nành xay nhuyễn

0,5 kg vỏ dứa xay nhuyễn

0,5 kg đu đủ xanh xay nhuyễn

0,5 kg chuối chín lột vỏ, bóp nhuyễn

1 gói men vi sinh EMZEO (200g/ gói).

Bước 2. Trộn hỗn hợp

Trộn đều các nguyên liệu trên với nhau. Thêm 2,5 lít nước sạch và khuấy đều hỗn hợp.

Bước 3. Ủ hỗn hợp:

Cho hỗn hợp vào thùng ủ và vặn nắp kín khí, tạo lỗ thoát hơi bằng cách đục lỗ nhỏ trên lắp thùng ủ và dùng bông và băng dính bịt băng lại (băng dính 1 chiều vẫn để thoát khí trong thùng ủ ra ngoài).

Định kỳ sau 7 ngày mở nắp thùng ủ kiểm tra, khuấy đảo đều rồi lại đậy kín ủ, để đảm bảo quá trình lên men diễn ra đều.

Bước 4. Bổ sung vi sinh vật nội sinh

Sau khi ủ được 25 – 30 ngày, bổ sung sinh khối vi sinh vật nội sinh (3 chủng được phân lập trong nghiên cứu) theo tỷ lệ thí nghiệm + 0,2 kg mật rỉ đường + 1 lít nước sạch. Ủ tiếp 15 – 20 ngày sau đó chiết lấy dịch và sử dụng.

Bước 5. Sử dụng chế phẩm:

Sử dụng dịch chiết để tưới cây hoặc làm phân bón lá. Pha loãng dịch chiết này với nước theo tỷ lệ thích hợp và phun lên cây vào lúc trời râm mát.

PHỤ LỤC 11: ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ NHẬN DIỆN LOÀI LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ *(Dendrobium anosmum* Lindl.)

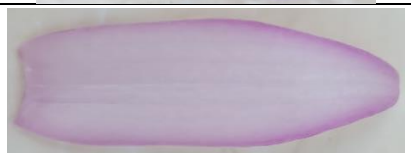
I. Đặc điểm hình thái lan Giả hạc tím Huế *(D. anosmum* Lindl.)

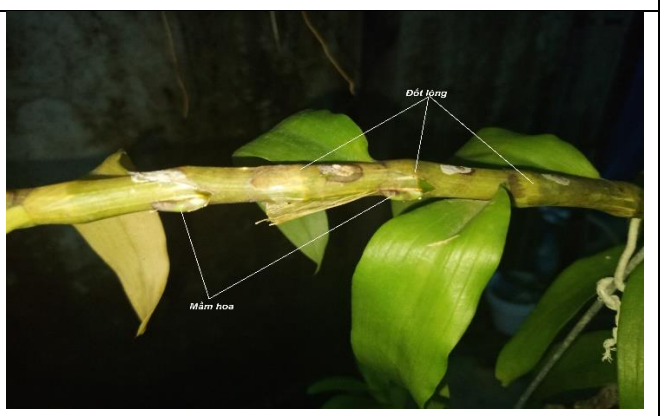
-Nhận diện bằng đặc điểm hình thái:

Nghiên cứu đã thực hiện khảo sát ngẫu nhiên 30 cây lan Giả hạc tím Huế mỗi loại ở hai thời điểm là cây lan từ 2-3 năm tuổi và cây lan trên 3 năm tuổi về một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển, kết quả được thể hiện ở bảng P11-3.1 và P11-3.2

Bảng P11-3.1. Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế *(Dendrobium anosmum* Lindl.) 2-3 năm tuổi.

STT	Đặc điểm	Nội dung ghi nhận	Ghi chú	Hình ảnh
1	**Vị trí thu mẫu**	Nhà vườn ở TP. Huế	Cây lan để lấy mẫu cho nghiên cứu được lấy tại nhà vườn Lan Đô Nguyễn, 18 Thạch Hãn, TP. Huế (5/2021).	
2	**Môi trường sống**	Sống bám trên cây, thường gặp ở độ cao dưới 750 m.	Ghi nhận ở hệ sinh thái tự nhiên.	
3	**Kiểu sinh trưởng**	Phát triển không liên tục (sympodial)	Chồi ngọn phát triện một thời gian ngừng sinh trưởng, thay thế bằng chồi bên hoặc chồi gốc phát triển.	
3	**Hoa**			
	Thời gian ra hoa	Tháng 5-6		
	Thời gian nở hoa	8-12 ngày	Phụ thuộc vào thời tiết.	
	Độ bền của hoa	7-10 ngày	Phụ thuộc vào thời tiết.	
	Vị trí phát hoa	Tại các đốt giả hành	Có thể lên phát hoa hoặc mầm chồi.	
	Dạng phát hoa	Dạng chùm		
	Kích thước hoa	7-11 cm	Đo chiều dài nhất của cánh.	
	Số lượng hoa trên mỗi phát hoa	1-3 hoa	Phổ biến nhất là 2 hoa.	
	Hình dạng tổng thể hoa	Hình sao	Khi hoa đã nở hoàn toàn	

	Màu sắc cánh hoa	Màu tím hồng, có viền tím ở các cánh hoa	Màu rỏ nhất khi hoa đã nở bung các cánh.	
	Hình dạng cánh hoa	Thuôn dài	Hình dạng ổn định khi đã nở bung hết cánh	
	Môi hoa (labellum)	Có vùng màu tím đậm tạo thành mắt hoa, có lông tơ mịn, uốn cong ở giữa, dài 3-4 cm.	Phần gốc hơi cong để ôm lấy trụ hoa.	
	Cánh đài trên	1 cánh, thuôn dài, chóp nhọn hơi bo tròn, dài 3-4 cm, tím hồng nhạc, có những đường gân chạy dọc cánh, rìa nguyên.	Khi nở bung cảnh đài có thể uống cong về phía sau của hoa.	
	Cánh đài dưới	2 cánh, phần gốc lớn, nhỏ dần về chóp, chóp cánh nhọn, có đường gần, cánh hơi uốn về sau, màu tím hồng nhạc, dài 4-5,5 cm, rìa nguyên.		
	Cánh vai	2 cánh, thuôn dài giống mũi mác, màu tím hồng, không có gân, rìa có răng cưa nhẹ, dài 3,5-5 cm.		
	Cựa (spur)	Không có		
	Trụ hoa (column)	Dài 1-1,5 cm, trặt trên trắng hồng, mặt dưới có màu tím hồng, hơi cong xuống, phần dầu có lớp chất nhầy dính màu trắng.		
	Bao phấn (Pollinia)	Có 2 khối, có màu vàng	Mỗi khối có thể chia ra làm 2 phần như nhau.	
	Hương thơm	Có mùi thơm dịu nhẹ	Sáng sớm và chiều tối hương thơm mạnh hơn.	
4	**Lá**			
	Cách mọc	Mọc cách so le nhau		

	Hình dạng lá	Lá không có cuốn lá, phiến lá hình thoi, thuôn dài.		
	Đầu lá	Nhọn		
	Mép lá	Nguyên vẹn, không sẻ thuỳ hay răng cưa		
	Kích thước lá	Dài 8-17 cm, rộng 3-4 cm	Cây lâu năm kích thước lá thường lớn hơn cây mới trồng	
	Màu sắc lá	Có màu xanh lục, mặt trên nhẵn bóng, mặt dưới không bóng hơi ngã vàng. Một số lá cây non có sắc tím.		
	Bẹ lá	Ôm sát thân, sau khi lá rụng thì bẹ lá vẫn ôm sát thân và khô có màu trắng bạc.		
5	**Giả hành**			
	Hình dạng giả hành	Thân trụ tròn, mọng nước. có phân đốt, mỗi đốt mang 1 chồi ngủ hoặc phát hoa.		
	Kích thước giả hành	Dài 50- 110 cm, đường kính 0,5-1,5 cm.	Kích thước phụ thuộc vào thời gian trồng	
	Màu sắc giả hành	Có màu xanh, gần đốt có các tia màu trắng hoặc tím	Màu sắc đậm nhạc khác nhau giữa giả hành non và già	
	Bề mặt giả hành	Trơn nhẵn		
6	**Rễ**			
	Hình dạng rễ	Dạng tròn, rễ có màu trắng xanh		
	Đặc điểm rễ non	Có màu xanh nhạt, đầu rễ bo tròn, mọng nước, nhẵn bóng.		
	Kiểu rễ	Bám dính		
7	**Quả**			
	Loại quả	Quả nang	Khi khô có thể nứt vỏ bung ra ở vị trí các cạnh.	
	Hình dạng	Có hình trụ, phình to ở giữa, thuôn nhỏ 2 đầu, có 5-6 cạnh.		
	Kích thước	Dài 7-8 cm, đường kính 1-1,5 cm.		
	Màu sắc	Có màu xanh nhạt, về già có màu hơi ngã sang tím.		
8	**Đặc điểm khác**	Rụng lá hàng năm	Tháng 10-11 bắt đầu rụng lá	

		Tuổi thọ giả hành ngắn	Sau khi ra hoa hoặc lên chồi sẽ khô dần.	
		Chồi con có thể phát triển thành cây con hoàn chỉnh ngay trên giả hành.		

Bảng P11-3.2. Một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của lan Giả hạc tím Huế ở cây lớn hơn 3 năm tuổi và cây 2-3 năm tuổi.

Đặc điểm	Cây lan > 3 năm tuổi	Cây lan từ 2-3 năm
Chiều cao cây (cm)	102,00 ± 2,78[a]	58,53±2,0[b]
Đường kính cây (cm)	1,16 ± 0,06[a]	0,83±0,0[b]
Chiều dài lóng (cm)	3,67 ± 0,11[a]	2,38±0,07[b]
Số lá	34,47 ± 0,69[a]	24,67±0,54[b]
Chiều dài lá (cm)	16,14 ± 0,58[a]	10,38±0,34[b]
Chiều rộng lớn nhất lá (cm)	3,42 ± 0,09[a]	2,17±0,09[b]
Đường kính hoa (cm)	10,36±0,59	

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau trong cùng một hàng cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

- Đặc điểm Thân (Giả hành): Thân lan Giả hạc tím Huế dạng giả hành bao gồm nhiều đốt nối lại với nhau có dạng hình cung buông xuống với chiều dài thân từ 58,53-102 cm tùy thời gian trồng. Đốt thân nhẵn, mọng nước, bên trong là một khối mô đặc, mỗi đốt thân có chiều dài 2,38-3,67 cm tùy tuổi cây, thân có 4 đến 5 đường sọc màu trắng chạy song song bắt đầu từ gốc, thân có màu xanh nhạt, phần tiếp nối giữa hai đốt thân là nơi sẽ phát sinh mầm hoa hoặc chồi ngủ (Bảng P11-3.1, P11-3.2 phụ lục 11; Hình 2.1B).

- Đặc điểm Lá: Lan Giả hạc tím Huế có lá thuôn dài, có màu xanh nhạt, cổ lá có vằn màu tím đen. Lá già trên bề mặt có gân nổi rõ chạy dọc hai bên phiến lá, lá bánh tẻ gân lá hơi mờ và nhẵn. Lá lan Giả hạc tím Huế không mọng nước và dễ bị gẫy khi gấp lại. Bẹ lá có sắc tố tím đen, thường là các chấm hoặc vệt. Lan Giả hạc tím Huế có tổng số lá/thân, chiều dài và chiều rộng lá có sự khác nhau ở lá già và lá bánh tẻ (Bảng P11-3.2). Đối với lá già, số lá/thân, chiều dài và chiều rộng lá thu được đạt giá trị trung bình lần lượt là 34,47 (lá/thân),

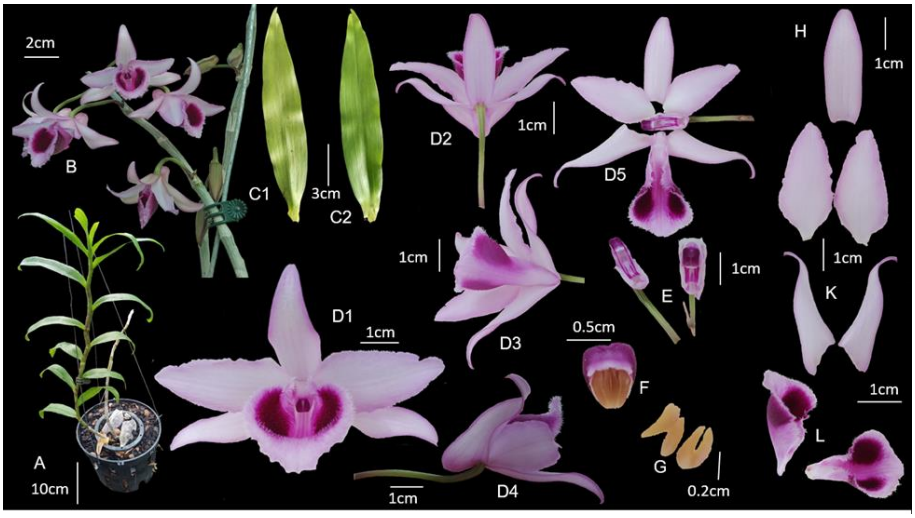
16,14 cm (chiều dài lá) và 3,42 cm (chiều rộng lá). Trong khi đó các giá trị này thu được ở lá bánh tẻ lần lượt là 24,67 (lá/thân), 10,38 cm (chiều dài lá) và 2,17 cm (chiều rộng lá) (Bảng P11-3.1, P11-3.2 phụ lục 11) (Hình 3.1 C1, C2).

- Rễ: Rễ được hình thành từ gốc thân giả hành, rễ phát triển liên tục và có thể phân nhánh. Rễ non có màu xanh lá nhạt, có lớp lông mịn, phần chóp rễ sáng bóng, càng về gần gốc rễ có màu sẫm hơn, giòn dễ gãy.

- Đặc điểm Hoa: Lan Giả hạc tím Huế có đường kính hoa trung bình 10,36 cm (Bảng 3.1). Hoa được hình thành bởi 5 cánh tạo nên cấu trúc hoa cân đối bao gồm: một cánh đài trên, hai cánh đài dưới và hai cánh vai. Cánh đài trên có hình mũi mác thuôn dài với đỉnh nhọn hơi bo tròn, bên trong có gân mờ thể hiện cân đối hai bên và chạy dọc theo cánh hoa, khi hoa nở cánh đài trên thường uốn cong về phía sau và có màu trắng phớt hồng (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1H). Cánh đài dưới có hình thuôn dài với đỉnh nhọn, bên trong có gân chạy dọc cánh hoa nhưng không rõ nét, khi hoa nở cánh đài dưới thường uốn cong về phía sau và có màu tím phớt hồng. Cánh đài dưới có kích thước lớn hơn cánh đài trên (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1K). Cánh vai có hình mũi mác thuôn dài hơi bầu và có đỉnh nhọn, không có gân, khi nở cánh vai thường uống cong về phía sau với màu tím phớt hồng và xuất hiện các đường sọc có màu tím mờ dần từ gốc lên đỉnh. Kích thước cánh vai lớn hơn cánh đài trên và dưới (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1I).

Hoa có môi hoa hình bầu hơi tròn với cánh môi uốn cong ở giữa lên hai bên ôm lấy trụ hoa, môi hoa có lông tơ mịn màu tím trắng và ngã về màu tím khi ở gần mắt hoa đây là đặc điểm đặc trưng chỉ có ở loài *Dendrobium anosmum* [11]. Hai mắt hoa có màu tím đậm với thể hiện qua các đường gân hoa. Họng thuỳ sạch, không lem màu với màu tím trắng phớt hồng đặc trưng. Họng thuỳ có 3-4 đường vân sọc màu tím hồng chạy dọc theo họng và mờ dần từ gốc lên (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1 D5, L). Hoa có trụ hoa nằm sau mũi hoa và có màu tím trắng chứa nhụy hoa. Mũi hoa có màu tím hồng mang nhị và nhụy hoa (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 3.1 E, F). Hoa có mùi thơm đặc trưng.

- Quả: Quả lan Giả hạc tím Huế thuộc loại quả nang, nở ra theo 3-6 đường nứt dọc, có dạng hình trụ thon dài nhỏ hai đầu, phình ra ở giữa, có 5-6 cạnh. Khi chín, quả mở ra và mảnh vỏ còn dính lại với nhau ở phía đỉnh và phía gốc (Bảng P11-3.1 phụ lục 11; Hình 2.1A).



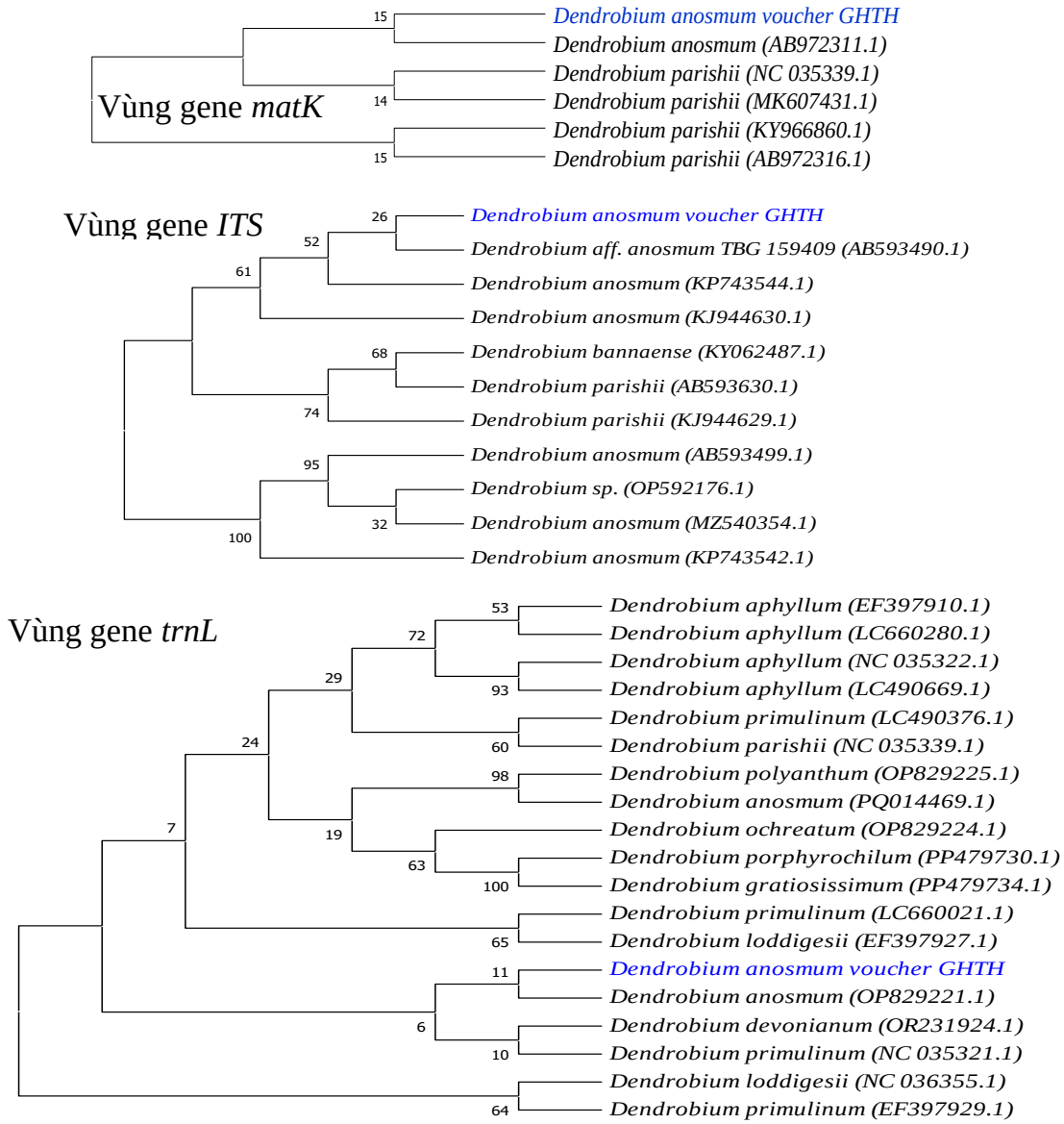
Hình P11-3.1. Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.) (Nguyễn Hữu Thọ, 2022).

(A. Cây lan Giả hạc tím Huế; B. Vị trí cụm hoa trên thân; C1,2. Mặt trên và dưới của lá; D1,2,3,4,5. Mặt hoa nhìn theo các hướng (D1. mặt trước, D2. mặt trên, D3. mặt dưới, D4. mặt bên, D5. hoa được dàn trải trên mặt phẳng); E. Trụ hoa (chứa nhuỵ hoa); F. Nắp bao phấn (mũi hoa); G. Bao phấn (Pollinia); H.Cánh đài trên, I. Hai cánh vai; K. Hai cánh đài dưới, L. Cánh môi.)

II. Nhận diện bằng chỉ thị phân tử

Kết quả phân tích BLAST trên NCBI trong nghiên cứu này cho thấy trình tự nucleotide vùng gen *rbcL* thu được từ loài lan Giả hạc tím Huế có mức độ tương đồng 100% với trình tự nucleotide của các loài thuộc chi *Dendrobium.* Một số nghiên cứu báo cáo rằng, vùng gen *rbcL* có thể sử dụng làm mã vạch cho phép nhận diện ở mức độ chi [1]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, khi so sánh với 100 dữ liệu gen rbcL thuộc các loài khác nhau của chi *Dendrobium* trên GenBank đã cho thấy vùng gen rbcL có tính bảo thủ cao, không thể sử dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt được ở mức độ loài. Trong khi đó đối với vùng gen *matK* thể hiện được sự sai khác lớn hơn giữa các loài thuộc chi *Dendrobium* khi phân tích BLAST trên NCBI, trong 100 trình tự hiện diện trên Genbank thì có 5 trình tự công bố thuộc hai loài *D. parishii* (NC_035339.1; MK607431.1; KY966860.1 và AB972316.1) và loài *D. anosmum* (AB972311.1) độ tương đồng đạt 100%. Căn cứ trên cây phân loại (Hình P13-3.1 phụ lục 13) cho thấy loài lan Giả hạc tím Huế nằm cùng nhánh với loài lan có tên khoa học *D. anosmum* (AB972311.1). Nhiều nghiên cứu trước đây khi sử dụng cặp mồi 390F/1326R

để nhân bản vùng gen *matK* trong định danh loài cũng đã khuyến cáo sử dụng vùng gen này làm mã vạch trong phân loại thực vật. Điều này thể hiện trong nghiên cứu của Pham và cộng sự (2021) trên 12 mẫu của loài *D. anosmum* Lindl. var. Semi alba thu được từ nhiều địa phương ở Việt Nam, cặp mồi này được đánh giá là hiệu quả cao trong định danh loài *D. anosmum* Lindl. var. Semi alba [9]; Lê Thị Ngọc Điệp và cộng sự (2020) sử dụng cặp mồi này nhằm xác định 30 mẫu thuộc chi *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam. Kết quả nhận diện được 10/16 loài thuộc chi *Dendrobium* [2].



Hình P11-3.2. Cây phân nhóm dựa trên vùng gen *ITS, trnL, matK* của của mẫu lan Giả hạc tím Huế (GHTH) nghiên cứu so với trình tự vùng gen tương ứng của các mẫu được công bố trên ngân hàng gen Mỹ (Genbank).

Tương tự vùng gen *matK*, vùng gen *trnL* cho thấy có sự sai khác lớn hơn giữa các loài thuộc chi *Dendrobium* khi phân tích BLAST trên NCBI (Phụ lục 14), trong 100 trình tự hiện diện trên Genbank thì có 2 trình tự công bố thuộc hai loài *D. devonianum* (OR231924.1) và *D. anosmum* voucher UGDA.0073096 (OP829221.1). Tuy nhiên, kết quả cây phân loại (Hình P13-3.1 phụ lục 13) cho thấy loài lan Giả hạc tím Huế nằm cùng nhánh với loài *D. anosmum* (OP829221.1). Kết quả xác định tên khoa học cho loài lan Giả hạc tím Huế càng thể hiện rõ khi sử dụng cặp mồi *ITS4 /ITS5* nhân bản vùng gen *ITS* thuộc hệ gen nhân. Kết quả BLAST trên NCBI cho thấy có hai trình tự vùng gen tương ứng thuộc loài *D. anosmum* (KP743544.1) và *D. aff. anosmum* TBG 159409 (AB593490.1) cho kết quả tương đồng đạt 100% (Phụ lục 14). Cây phân loại di truyền (Hình P13-3.1 phụ lục 13) cho thấy loài lan này nằm cùng nhánh với loài *D. anosmum* với hai mã số công bố nêu trên. Theo nghiên cứu của Lê Thị Ngọc Điệp và cộng sự (2020) cho thấy vùng gen *ITS* có khả năng nhận điện loài cao nhất với 16/16 loài thuộc chi *Dendrobium* với 30 mẫu lan thu ở khu vực phía Nam Việt Nam [2]. Kết quả phân tích 4 vùng gen khẳng định mẫu lan Giả hạc tím Huế thuộc loại *D. anosmum.* Chúng tôi kí hiệu mẫu chuẩn này là *D. anosmum* voucher GHTH.

PHỤ LỤC 12. MỘT SỐ BẢNG DỮ LIỆU ĐƯỢC THU THẬP TRONG NGHIÊN CỨU

Bảng P12-3.1. Ảnh hưởng của khử trùng và chiếu sáng đến nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần nuôi cấy

CT	Thời gian chiếu sáng (giờ)	Thời gian nảy mầm của hạt (ngày)	Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%)	Tỷ lệ hình thành protocorm (%)	Tỷ lệ hạt chết (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)
1	0	69,53±0,95^{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±0,9^{a}	20,36±0,96^{a}	4,00±1,09^{a}
4	12	42,67±0,79^{a}	45,24±0,45^{b}	43,78±0,57^{b}	22,58±0,89^{a}	4,36±0,85^{a}

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê (p < 0,05)

Bảng P12-3.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần theo dõi

Công thức	Thời gian nảy mầm của hạt (ngày)	Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%)	Tỷ lệ hình thành protocorm (%)	Tỷ lệ hạt chết (%)
CT1	41,33±0,96^{a}	64,76±0,96^{a}	60,89±0,91^{a}	20,36±0,96^{a}
CT2	54,00±0,70^{b}	50,42±1,19^{b}	44,73±1,62^{b}	45,63±1,61^{b}
CT3	57,53±0,48^{c}	47,44±1,11^{b}	36,87±1,44^{c}	42,07±1,49^{b}
CT4	42,87±0,65^{a}	63,08±1,68^{a}	59,62±1,79^{a}	22,71±0,67^{a}
CT5	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).

Bảng P12-3.3. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	chất điều hoà sinh trưởng (mg/L)		Thời gian nảy mầm của hạt (ngày)	Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%)	Tỷ lệ hình thành protocorm (%)	Tỷ lệ hạt chết (%)
	NAA	BA				
CT1	0,0	0,0	41,33±0,96^{g}	64,76±0,96^{h}	60,89±0,91^{g}	20,36±0,96^{e}
CT2	0,0	0,25	36,60±0,49^{ef}	73,53±0,51^{g}	70,81±0,87^{f}	19,33±0,74^{e}
CT3	0,25	0,25	37,47±0,70^{f}	75,39±0,77^{f}	72,91±0,45^{ef}	18,60±0,77^{e}
CT4	0,5	0,25	35,33±0,62^{de}	81,63±0,63^{d}	76,20±0,40^{d}	14,68±0,67^{cd}
CT5	0,75	0,25	28,27±0,92^{b}	87,64±0,64^{b}	82,04±0,61^{b}	10,49±0,54^{b}
CT6	1,0	0,25	31,33±0,69^{c}	81,40±0,69^{d}	77,41±0,44^{cd}	13,13±0,52^{c}

CT7	0,0	0,5	34,13±0,52^{d}	75,84±0,57^{f}	71,26±0,84^{ef}	18,83±0,70^{e}
CT8	0,25	0,5	33,67±0,80^{d}	78,76±0,81^{e}	73,35±0,53^{e}	13,79±0,36^{c}
CT9	0,5	0,5	33,93±0,63^{d}	77,09±0,55^{ef}	73,20±0,54^{e}	15,80±0,83^{d}
CT10	0,75	0,5	23,27±0,27^{a}	93,46±0,47^{a}	88,75±0,55^{a}	4,43±0,37^{a}
CT11	1,0	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)

Bảng P12-3.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Điều hoà sinh trưởng (mg/L)		Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
	BA	NAA				
CT1	0,0	0,0	65,33±2,26^{g}	1,03±0,11^{h}	0,55±0,03^{g}	1,44±0,23^{de}
CT2	0,5	0,0	72,67±2,45^{f}	1,36±0,06^{e-g}	1,29±0,15^{cd}	1,74±0,17^{c-e}
CT3	1,0	0,0	75,33±1,70^{ef}	1,56±0,11^{c-e}	1,49±0,09^{bc}	1,89±0,14^{b-d}
CT4	1,5	0,0	76,67±2,36^{d-f}	1,62±0,10^{cd}	1,53±0,09^{b}	2,16±0,28^{a-c}
CT5	2	0,0	73,33±1,83^{ef}	1,52±0,09^{d-f}	1,29±0,15^{cd}	1,72±0,13^{c-e}
CT6	0,0	0,5	74,00±1,94^{ef}	1,22±0,05^{e-g}	0,75±0,04^{fg}	1,64±0,21^{c-e}
CT7	0,5	0,5	79,33±1,94^{de}	1,52±0,06^{d-f}	1,26±0,03^{cd}	2,12±0,10^{bc}
CT8	1,0	0,5	85,33±1,70^{bc}	1,78±0,03^{c}	1,57±0,05^{b}	2,38±0,20^{ab}
CT9	1,5	0,5	96,00±1,25^{a}	2,76±0,04^{a}	1,83±0,03^{a}	2,76±0,32^{a}
CT10	2	0,5	88,00±2,71^{b}	1,54±0,03^{c-f}	1,45±0,00^{bc}	2,22±0,24^{a-c}
CT11	0,0	1,0	72,00±1,70^{f}	1,01±0,06^{h}	0,82±0,02^{f}	1,36±0,12^{de}
CT12	0,5	1,0	76,00±1,25^{d-f}	1,31±0,10^{fg}	1,10±0,06^{de}	1,72±0,12^{c-e}
CT13	1,0	1,0	82,00±1,70^{cd}	1,59±0,05^{c-e}	1,26±0,09^{cd}	1,86±0,14^{b-e}
CT14	1,5	1,0	90,67±2,21^{ab}	2,03±0,11^{b}	1,58±0,04^{b}	2,48±0,25^{ab}
CT15	2,0	1,0	73,33±1,83^{ef}	1,23±0,05^{gh}	0,90±0,05^{ef}	1,24±0,10^{e}

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

Bảng P12-3.5. Ảnh hưởng của chất khử trùng và thời gian khử trùng đến hiệu quả vào mẫu từ đoạn thân của lan Giả hạc tím Huế sau 1 tuần.

Công thức	Thời gian khử trùng (phút			Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
	NaClO 2%	H_2O_2 3%	$HgCl_2$ 0,1%			
CT1	10	-	-	0,00 ± 0,1^{e}	100,00 ± 0,1^{f}	0,00 ± 0,0^{a}
CT2	10	10	-	0,00 ± 0,0^{e}	88,89 ± 2,6^{e}	11,11 ± 2,6^{b}
CT3	10	15	-	11,11 ± 2,0^{d}	66,67 ± 2,0^{d}	22,22 ± 1,0^{c}
CT4	10	20	-	33,33 ± 2,0^{b}	44,44 ± 2,2^{c}	22,22 ± 0,6^{c}
CT5	10	-	5	22,22 ± 2,6^{c}	66,67 ± 2,4^{d}	22,22 ± 0,9^{c}

CT6	10	-	10	66,67 ± 1,5[a]	11,11 ± 1,1[b]	22,22 ± 0,9[c]
CT7	10		15	31,33 ± 1,9[b]	4,67 ± 0,9[a]	64,08 ± 1,6[d]

Ghi chú: -: Không có tham gia; Các chữ cái giống nhau trong cùng một cột cho biết không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê (p < 0,05, Duncan's test)

Bảng P12-3.6. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng hình thành mô sẹo từ đoạn thân của lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần nuôi cấy

Môi trường	Thời gian hình thành mô sẹo (ngày)	Tỷ lệ sống của mẫu (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)	Kích thước mô sẹo (cm)
CT1	69,60±1,59[a]	66,33±3,00[a]	17,67±1,22[a]	0,65±0,03[a]
CT2	89,70±1,04[c]	55,67±1,22[b]	7,67±1,12[bc]	0,32±0,02[c]
CT3	94,50±0,50[d]	45,67±1,41[c]	6,33±0,92[c]	0,29±0,01[c]
CT4	75,80±0,55[b]	71,00±1,86[a]	14,67±1,13[a]	0,67±0,01[a]
CT5	88,20±0,49[c]	50,67±1,20[bc]	10,33±0,92[b]	0,42±0,01[b]

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

Bảng P12-3.7. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng hình thành mô sẹo của mẫu lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Kích thích sinh trưởng (mg/L)			Thời gian hình thành mô sẹo (ngày)	Tỷ lệ sống của mẫu (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)	Kích thước mô sẹo (chiều dài cm)
	BA	TDZ	NAA				
CT1	0,0	0,0	0,0	69,60±1,59[h]	66,33±3,00[f]	17,67±1,22[h]	0,65±0,03[cd]
CT2	0,5	0,0	0,5	61,00±0,92[g]	71,67±1,67[de]	26,00±1,30[g]	0,69±0,02[cd]
CT3	1,0	0,0	0,5	35,10±0,74[b]	83,67±1,36[ab]	57,33±1,85[b]	0,94±0,01[a]
CT4	1,5	0,0	0,5	41,10±0,53[c]	76,67±1,11[cd]	50,00±1,32[d]	0,72±0,01[cd]
CT5	2,0	0,0	0,5	56,30±0,47[f]	69,67±1,36[ef]	34,67±1,13[f]	0,64±0,00[e]
CT6	0,0	0,5	0,5	51,80±0,55[e]	76,33±1,36[cd]	32,67±1,09[f]	0,71±0,01[cd]
CT7	0,0	1,0	0,5	42,90±0,67[c]	80,67±1,30[bc]	53,33±0,86[c]	0,82±0,01[b]
CT8	0,0	1,5	0,5	32,70±0,56[a]	86,67±1,57[a]	64,33±1,22[a]	0,97±0,08[a]
CT9	0,0	2,0	0,5	47,20±0,68[d]	75,33±1,33[d]	45,33±1,02[e]	0,74±0,01[bc]

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

Bảng P12-3.8. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.

Công thức	Điều hoà sinh trưởng (mg/L)		Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
	BA	NAA				

CT1	0,0	0,0	14,67±1,82^{k}	0,76±0,16^{j}	0,51±0,05^{h}	1,34±0,21^{c}
CT2	0,5	0,0	24,00±1,25^{ij}	1,54±0,20^{d-g}	0,73±0,05^{g}	1,72±0,31^{bc}
CT3	1,0	0,0	29,33±1,94^{g-i}	1,74±0,09^{c-e}	1,10±0,11^{de}	1,74±0,22^{bc}
CT4	1,5	0,0	55,33±1,70^{c}	2,01±0,11^{bc}	1,52±0,06^{b}	2,15±0,34^{b}
CT5	2,0	0,0	42,67±1,94^{e}	1,62±0,05^{d-f}	1,28±0,09^{cd}	1,71±0,18^{bc}
CT6	0,0	0,5	21,33±3,59^{j}	1,05±0,12^{i}	0,67±0,06^{gh}	1,46±0,23^{bc}
CT7	0,5	0,5	32,67±2,21^{fg}	1,36±0,08^{f-h}	0,85±0,05^{fg}	1,72±0,21^{bc}
CT8	1,0	0,5	47,33±2,21^{de}	1,46±0,06^{e-g}	1,23±0,07^{cd}	2,12±0,20^{b}
CT9	1,5	0,5	78,67±3,09^{a}	2,58±0,06^{a}	1,71±0,03^{a}	2,92±0,31^{a}
CT10	2,0	0,5	50,67±1,25^{cd}	2,00±0,07^{bc}	1,56±0,08^{ab}	2,17±0,34^{b}
CT11	0,0	1,0	26,00±1,25^{h-j}	1,11±0,04^{hi}	0,81±0,03^{fg}	1,51±0,20^{bc}
CT12	0,5	1,0	36,67±1,05^{f}	1,32±0,04^{f-i}	1,17±0,05^{d}	1,37±0,13^{c}
CT13	1,0	1,0	45,33±2,71^{de}	1,80±0,06^{cd}	1,37±0,06^{bc}	1,43±0,04^{bc}
CT14	1,5	1,0	64,67±1,70^{b}	2,14±0,08^{b}	1,49±0,02^{b}	1,22±0,11^{c}
CT15	2,0	1,0	32,00±2,71^{f-h}	1,25±0,05^{g-i}	0,95±0,05^{ef}	1,13±0,05^{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)

Bảng P12-3.9. Ảnh hưởng BA đến khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ BA (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá của chồi
CT1	0,0	12,67 ± 1,1^{e}	0,67 ± 0,1^{e}	0,56 ± 0,1^{c}	1,89±0,21^{c}
CT2	0,5	33,33 ± 1,4^{d}	1,00 ± 0,1^{d}	0,77 ± 0,1^{bc}	2,34±0,28^{bc}
CT3	1,0	44,44 ± 1,3^{c}	1,33 ± 0,1^{c}	1,00 ± 0,1^{b}	2,65±0,31^{ab}
CT4	1,5	88,89 ± 2,1^{a}	2,33 ± 0,1^{a}	1,57 ± 0,2^{a}	3,24±0,21^{a}
CT5	2,0	55,56 ± 1,8^{b}	1,67 ± 0,1^{b}	1,07 ± 0,1^{b}	2,21±0,22^{bc}

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

Bảng P12-3.10. Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập từ rễ lan.

Hàm lượng IAA (µg/ml)	Số chủng	Tỷ lệ chủng có khả năng sinh IAA (%)
0	15	50,00
1 - 10	4	13,33
11 - 20	5	16,67
21 - 30	2	6,67
>30	4	13,33
Tổng số	**30**	**100**

Bảng P12-3.11. Kích thước, đường kính nhân tế bào biểu mô lá và chiều dày của phiến lá.

TT	Mẫu thí nghiệm	Hoá chất xử lý	Kích thước tế bào biểu mô		Đường kính nhân tế bào biểu mô lá (µm)	Bề dày phiến lá (mm)
			Chiều dài (µm)	Chiều rộng (µm)		
1	M1	-	28,62±1,14^{b-h}	16,02±0,83^{b-d}	3,84±0,20^{cd}	0,69±0,04^{gh}
2	HX2	Colchicine	32,20±1,75^{ab}	17,51±0,85^{a-c}	5,25±0,24^{ab}	0,91±0,04^{a-c}
3	HX3	Colchicine	31,67±1,38^{a-d}	17,20±0,91^{a-d}	5,55±0,32^{ab}	0,81±0,04^{b-h}
4	HX4	Colchicine	31,82±1,74^{a-c}	17,29±0,95^{a-c}	5,38±0,32^{ab}	0,85±0,05^{a-f}
5	HX5	Colchicine	30,80±1,01^{a-f}	16,28±0,88^{a-d}	5,63±0,29^{ab}	0,89±0,05^{a-d}
6	HX6	Colchicine	31,64±2,00^{a-d}	17,03±0,90^{a-d}	4,87±0,31^{b}	0,83±0,04^{b-g}
7	HX11	Colchicine	32,33±1,80^{ab}	17,86±1,02^{ab}	5,14±0,33^{ab}	0,85±0,05^{a-e}
8	M2	Colchicine	29,44±1,45^{a-g}	14,94±0,66^{d-f}	5,68±0,26^{a}	0,89±0,05^{a-d}
9	M4	Colchicine	31,83±1,40^{a-c}	17,23±0,97^{a-d}	5,15±0,37^{ab}	0,91±0,05^{a-c}
10	M5	Colchicine	29,86±1,21^{a-g}	15,29±0,55^{c-e}	5,53±0,24^{ab}	0,91±0,06^{a-c}
11	M6	Colchicine	31,27±0,88^{a-e}	16,81±1,01^{a-d}	5,76±0,21^{a}	0,88±0,06^{a-d}
12	M7	Colchicine	32,15±1,43^{ab}	17,63±0,81^{a-c}	5,50±0,25^{ab}	0,89±0,05^{a-d}
13	M8	Colchicine	32,87±1,76^{ab}	18,32±1,04^{ab}	5,69±0,19^{a}	0,91±0,06^{a-c}
14	M16	Colchicine	32,59±1,57^{ab}	18,01±0,85^{ab}	5,72±0,19^{a}	0,94±0,07^{ab}
15	M17	Colchicine	33,06±1,59^{a}	18,49±0,77^{a}	5,83±0,16^{a}	0,97±0,03^{a}
16	HX1	DMS	27,20±0,85^{e-h}	12,87±0,55^{f-h}	3,11±0,10^{d-g}	0,74±0,03^{e-h}
17	HX7	DMS	27,47±0,73^{d-h}	13,16±0,49^{e-g}	2,82±0,14^{g}	0,68±0,03^{g}
18	HX8	DMS	26,18±0,92^{gh}	11,85±0,40^{gh}	2,55±0,16^{g}	0,71±0,03^{e-h}
19	HX9	DMS	26,05±0,94^{gh}	12,01±0,49^{gh}	2,61±0,19^{g}	0,69±0,03^{gh}
20	HX10	DMS	26,59±0,89^{f-h}	12,46±0,40^{gh}	2,88±0,26^{g}	0,72±0,03^{e-h}
21	M3	DMS	27,06±1,09^{e-h}	12,86±0,57^{f-h}	2,98±0,22^{e-g}	0,76±0,02^{d-h}
22	M9	DMS	27,60±1,25^{c-h}	13,27±0,55^{e-g}	2,95±0,12^{fg}	0,78±0,03^{c-h}
23	M10	DMS	25,92±0,86^{gh}	11,57±0,33^{gh}	3,32±0,22^{c-g}	0,74±0,03^{e-h}
24	M11	DMS	25,85±0,97^{gh}	11,67±0,34^{gh}	3,72±0,22^{c-e}	0,73±0,03^{e-h}
25	M12	DMS	24,64±1,13^{h}	10,71±0,34^{g}	3,65±0,23^{c-f}	0,74±0,02^{e-h}
26	M13	DMS	26,64±0,79^{f-h}	12,53±0,26^{gh}	3,64±0,21^{c-f}	0,72±0,03^{e-h}
27	M14	DMS	25,55±1,06^{gh}	11,34±0,40^{gh}	3,72±0,23^{c-e}	0,71±0,03^{f-h}
28	M15	DMS	27,25±1,36^{e-h}	12,98±0,52^{f-h}	3,88±0,25^{c}	0,76±0,03^{d-h}

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

Bảng P12-3.12. Đặc điểm bó mạch trong thân non và lông hút của rễ lan Giả hạc tím Huế

TT	Mẫu Thí nghiệm	Hoá chất xử lý	Bó mạch dẫn trong thân non		Lông hút của rễ	
			Số lượng (bó mạch/thân)	Đường kính (µm)	Mật độ/mm^2	Chiều dài (mm)
1	M1	-	21,27±0,21^{e}	71,89±1,17^{a}	252,47±10,90^{a}	0,64±0,02^{b}
2	HX2	Colchicine	56,47±0,52^{a-c}	40,61±1,41^{c}	211,67±8,09^{f}	0,85±0,04^{a}
3	HX3	Colchicine	53,67±1,01^{d}	37,46±1,41^{c}	214,87±4,20^{d-f}	0,81±0,06^{a}
4	HX4	Colchicine	55,13±0,87^{b-d}	39,21±1,22^{c}	216,07±8,52^{c-f}	0,89±0,07^{a}
5	HX5	Colchicine	54,47±0,94^{cd}	38,29±1,21^{c}	213,47±7,56^{d-f}	0,88±0,05^{a}
6	HX6	Colchicine	53,20±0,91^{d}	36,87±1,26^{c}	214,27±4,89^{d-f}	0,86±0,07^{a}
7	HX11	Colchicine	55,13±1,03^{b-d}	39,05±1,13^{c}	215,53±8,95^{c-f}	0,90±0,07^{a}
8	M2	Colchicine	56,67±0,96^{a-c}	39,26±1,10^{c}	213,07±6,38^{d-f}	0,90±0,08^{a}
9	M4	Colchicine	56,53±1,02^{a-c}	40,53±1,43^{c}	216,07±7,01^{c-f}	0,87±0,08^{a}
10	M5	Colchicine	53,73±1,14^{d}	37,92±1,05^{c}	209,00±8,16^{f}	0,90±0,08^{a}
11	M6	Colchicine	54,53±0,87^{cd}	37,97±0,90^{c}	212,47±7,31^{ef}	0,91±0,08^{a}
12	M7	Colchicine	54,73±1,08^{b-d}	38,24±1,00^{c}	209,93±6,28^{f}	0,88±0,07^{a}
13	M8	Colchicine	56,87±0,82^{ab}	39,79±1,21^{c}	213,93±6,86^{d-f}	0,90±0,07^{a}
14	M16	Colchicine	56,93±0,95^{ab}	41,47±1,80^{c}	212,47±7,09^{ef}	0,93±0,06^{a}
15	M17	Colchicine	57,87±0,47^{a}	43,08±1,65^{c}	219,13±8,71^{b-f}	0,96±0,02^{a}
16	HX1	DMS	18,67±0,29^{f}	57,15±2,64^{b}	240,47±9,45^{ab}	0,39±0,02^{c}
17	HX7	DMS	19,13±0,19^{f}	57,75±2,82^{b}	239,13±9,77^{a-c}	0,37±0,02^{c}
18	HX8	DMS	18,53±0,31^{f}	57,22±2,94^{b}	241,87±9,20^{ab}	0,35±0,02^{c}
19	HX9	DMS	18,93±0,23^{f}	57,21±2,94^{b}	245,27±8,32^{a}	0,36±0,02^{c}
20	HX10	DMS	18,60±0,29^{f}	56,22±2,40^{b}	242,07±7,49^{ab}	0,38±0,02^{c}
21	M3	DMS	18,87±0,24^{f}	57,02±2,74^{b}	238,87±5,15^{a-c}	0,35±0,02^{c}
22	M9	DMS	19,33±0,13^{f}	58,35±2,91^{b}	247,13±10,16^{a}	0,43±0,02^{c}
23	M10	DMS	18,27±0,38^{f}	56,35±2,73^{b}	241,53±4,52^{ab}	0,39±0,03^{c}
24	M11	DMS	18,47±0,38^{f}	56,70±2,61^{b}	242,47±4,29^{ab}	0,36±0,03^{c}
25	M12	DMS	18,33±0,41^{f}	56,80±2,57^{b}	236,60±5,10^{a-e}	0,38±0,03^{c}
26	M13	DMS	19,07±0,48^{f}	57,24±2,48^{b}	241,33±4,07^{ab}	0,37±0,02^{c}
27	M14	DMS	18,87±0,51^{f}	56,06±2,58^{b}	238,87±3,94^{a-c}	0,39±0,03^{c}
28	M15	DMS	18,93±0,46^{f}	56,57±2,36^{b}	237,33±3,86^{a-d}	0,39±0,03^{c}

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

Bảng P12-3.13. Một số đặc điểm khuẩn lạc và đặc tính hoá sinh của các chủng vi khuẩn phân lập sau 72 giờ nuôi cấy.

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc tính hoá sinh					
				Phân giải lân					
	Màu sắc	Mép	Bề mặt	Ø vòng sáng phân giải và khuẩn lạc (mm)	Ø khuẩn lạc (mm)	Ø vòng sáng phân giải lân (mm)	Sinh NH_3	Ø khuẩn lạc trên MT Ashby (mm)	Hàm lượng IAA sinh ra (µg/ml)
L1	Vàng	Lượn sóng	Trơn bóng	15	11	4	+	2	0,00
L2	Trắng đục	Lượn sóng	Trơn bóng	13	10	3	-	-	0,00
L3	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	16	8	8	+	11	0,00
L4	**Trắng sữa**	**Tròn đều**	**Khô ráp**	**20**	**5**	**15**	**+++**	**16**	**34,10**
L5	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	14	7	7	+	6	0,00
L6	**Trắng trong**	**Tròn đều**	**Trơn nhầy**	**19**	**6**	**13**	**+++**	**16**	**38,44**
L7	Vàng nhạt	Tròn đều	Trơn nhầy	16	5	11	+++	-	11,68
L8	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	17	8	9	++	7	0,00
L9	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	17	6	11	+	10	13,19
C1	Trắng trong	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	0,00
C2	Vàng	Lượn sóng	Trơn nhầy	4	4	0	+	5	6,58
C3	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	7	5	2	+	9	26,83
C4	**Trắng trong**	**Tròn đều**	**Trơn nhầy**	**21**	**6**	**15**	**+++**	**15**	**41,47**
C5	Trắng đục	Lượn sóng	Khô ráp	10	10	0	-	-	16,22
C6	Trắng trong	Lượn sóng	Trơn nhầy	6	6	0	++	-	0,00
C7	Vàng nhạt	Tròn đều	Trơn nhầy	3	3	0	-	-	11,73
C8	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	7	7	0	-	6	7,33
C9	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	16	10	6	+	-	36,98
C10	Vàng nhạt	Tròn đều	Khô ráp	2	2	0	+	8	0,00
C11	Vàng	Tròn đều	Trơn nhầy	15	6	9	+++	4	0,00
C12	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	6	6	0	-	-	7,13
C13	Trắng sữa	Lượn sóng	Trơn bóng	4	4	0	-	4	0,00
C14	Trắng sữa	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	17,48
C15	Trắng sữa	Lượn sóng	Trơn nhầy	8	4	4	-	6	0,00
C16	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	10	6	4	+	6	4,61
C17	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	4	4	0	-	-	0,00
N1	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	5	2	3	-	3	22,89
N2	Trắng trong	Tròn đều	Trơn nhầy	5	3	2	+	8	0,00
X1	Cam	Lượn sóng	Trơn nhầy	5	5	0	-	2	0,00
X2	Trắng hồng	Lượn sóng	Trơn bóng	18	7	11	+++	13	0,00

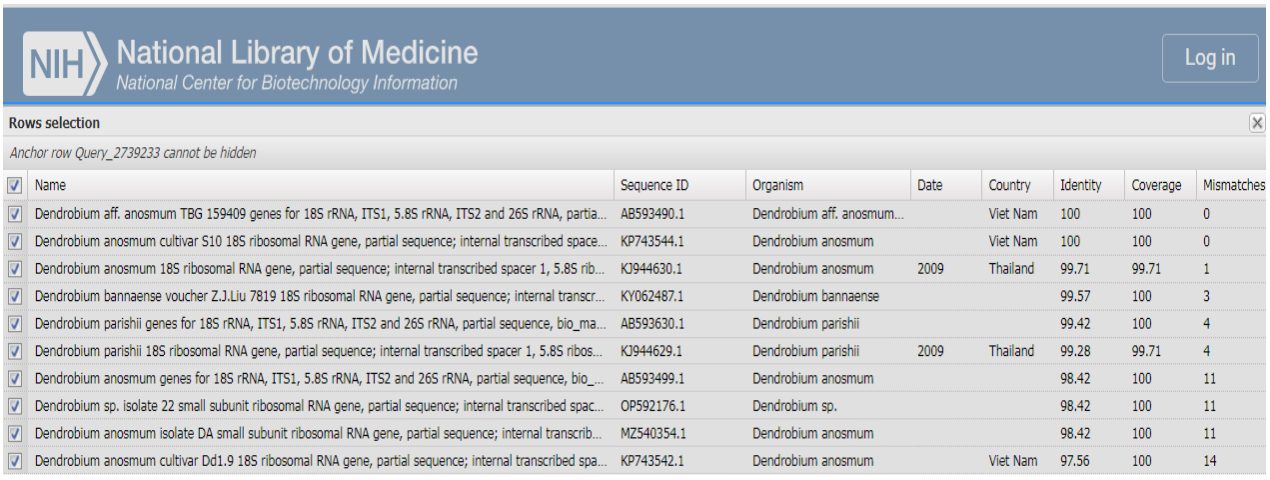
Chú thích: +: có hoạt tính; ++: hoạt tính tốt; +++: hoạt tính rất tốt
-: không có hoạt tính; Ø: đường kính

PHỤ LỤC 13: TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE

I. Trình tự nucleotide của các vùng gene nghiên cứu thu được từ cây lan giả hạc tím Huế

1. Trình tự nucleotide vùng gen ITS4-5

CATCCTGGGGTCGCATTCAAAGCGCCATCCATGGATCAGCGCATGATTTGGGATCACCTCA
ATGGTGTGATCATCTCTTAGGCATGCACGACACAATAGCATAGGCCTCATTTAAATCCACC
CCTTATTGTTCGCAGCCAACAAGACGATGATCCGCTCTTCAGCCCGCCGCGCCGAGGGGCA
CGACGAGCCACCATGCACATCCGAGCCCTCGCCAGCACATCCATCGATGGGTGGCTAGGCA
CGAAGCGACAAAATGCCTGACGCCCAGGCGGACGTGCCCTTGGCCGATTGGCCTCGGGCGC
AACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCGCGGGATTCTGCAATTCGCACCATATATCGCATT
TCGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCATTGCCGAGAGTCGTGTCAATCC
ATATGGCATGCAACAGCAACCCATTCCACAAATCCATTTAAGGGCTTGTGCTACGATATTT
CCTTGGCGCGACGCTGCGCCGATTTGGGGGTTCATCCATCCTTCATCACGTCCACACCCCG
AAGAGGGGATGAGGCGAAGATTGGGATGAATTTTATCTCGGAAGCTATAGCCACCGATTAT
TTTGACGGGTTCTCAAGATCACTCAATGTATTTTAATCTCGACAATGATCCTTCCGCAGGT
TCACCTACGGAAACCTTGTTACGA



NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information
Log in

Rows selection

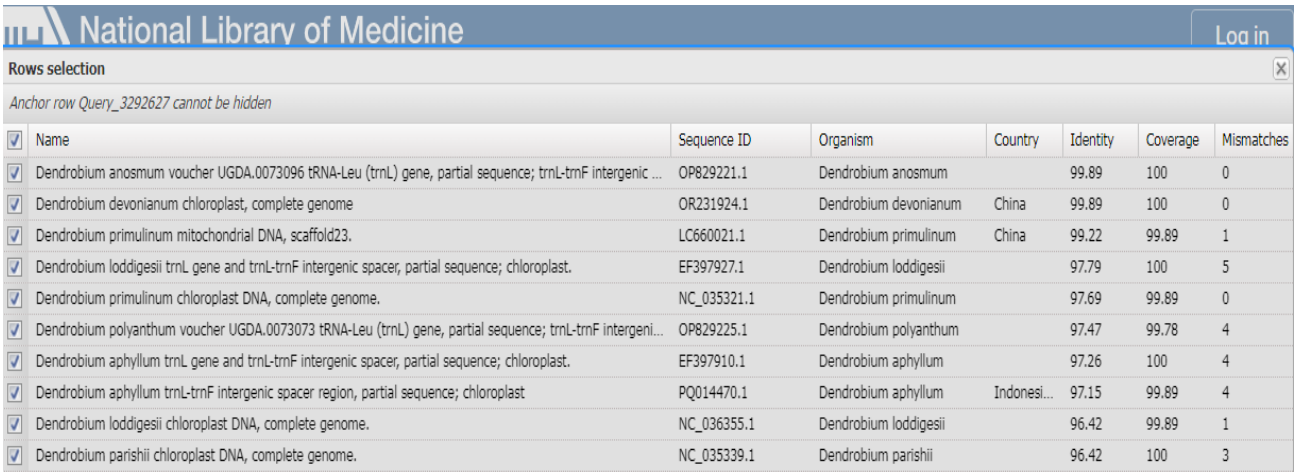
Anchor row Query_2739233 cannot be hidden

Name	Sequence ID	Organism	Date	Country	Identity	Coverage	Mismatches
Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partia...	AB593490.1	Dendrobium aff. anosmum...		Viet Nam	100	100	0
Dendrobium anosmum cultivar S10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	KP743544.1	Dendrobium anosmum		Viet Nam	100	100	0
Dendrobium anosmum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rib...	KJ944630.1	Dendrobium anosmum	2009	Thailand	99.71	99.71	1
Dendrobium bannaense voucher Z.J.Liu 7819 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...	KY062487.1	Dendrobium bannaense			99.57	100	3
Dendrobium parishii genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partial sequence, bio_ma...	AB593630.1	Dendrobium parishii			99.42	100	4
Dendrobium parishii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	KJ944629.1	Dendrobium parishii	2009	Thailand	99.28	99.71	4
Dendrobium anosmum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partial sequence, bio_...	AB593499.1	Dendrobium anosmum			98.42	100	11
Dendrobium sp. isolate 22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	OP592176.1	Dendrobium sp.			98.42	100	11
Dendrobium anosmum isolate DA small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	MZ540354.1	Dendrobium anosmum			98.42	100	11
Dendrobium anosmum cultivar Dd1.9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	KP743542.1	Dendrobium anosmum		Viet Nam	97.56	100	14

2. Trình tự vùng gen trnL

TTCAGAGAAACCCTGGAACTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTTTTTTTGAGAGAA
AAAATGATGGAAAATGAGAATAAAAAGGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
ACGAATGAAATTGACTACGTTACGTTAGTAGCTAAAAACCTTCTATCGAAATGACAGAAAG
GATAACCTTATATGCGCCTAATACGTACGTATACATACTGACATAGCAAACGATTAATCAC
AACCCAAATCTGATATTGAATTCTATTCTGTATCTCTCTATATGAAAAATATGAAAATAGA
AATATTCTATATAGAATATATATTCTATTATCTTAAGAATTAGATTAAGAATCTATATATT
TCTTCATTCTATTATTCTAATTATTCTAGAATCTAATAATTCTATGATTTTCTATATTCTT
TCTTTCTTATTTATATTACTCTTAATATGAGTAATAGTATGAGATAAGGACCTATAGAAAC
CCTCTATTAATTAGAATCATAGAGATCAAAAAATCTATGAAAAATTGAAGAGTTATTGTGA
ATCAATTCCAATTGAAGTTGAAAAAAGAATCGAATTCGAATATTCAGTGATAAAATGATTC
ATTCCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAGATTAATCGGACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCAT

TTTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAATAGGAAAATCCGTCGAATTTTT
AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAGCCCATTTTACTTCCTCGCTCT
TTATTTATCCTCATCCTCTTTCTTTTTTTTTTTCATCAGTGGCTCAGTTTAAACAAAATGA
AATATTTTCTCATTTCATTCACTCTGTTCTTTCACAA


National Library of Medicine

Log in

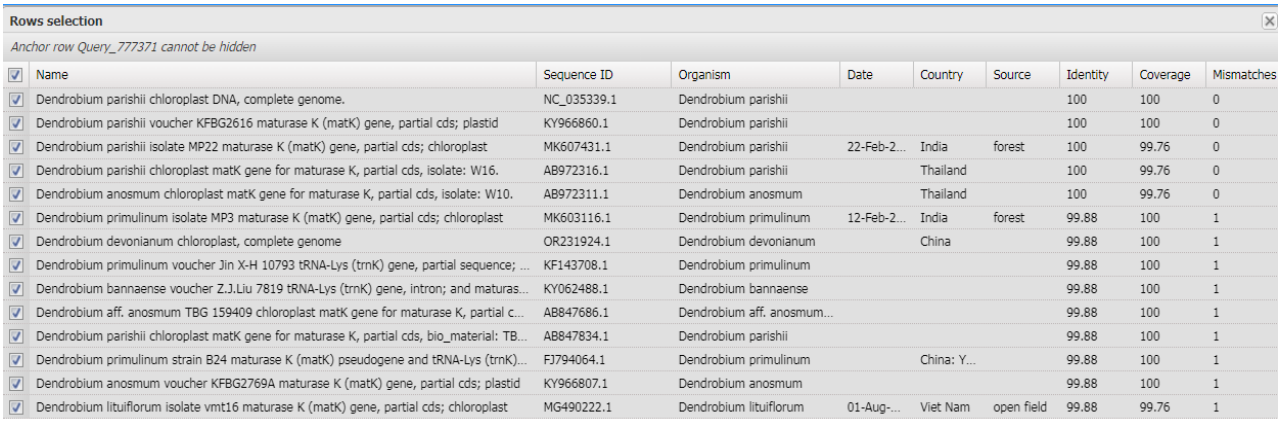
Rows selection

Anchor row Query_3292627 cannot be hidden

Name	Sequence ID	Organism	Country	Identity	Coverage	Mismatches
Dendrobium anosmum voucher UGDA.0073096 tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic ...	OP829221.1	Dendrobium anosmum		99.89	100	0
Dendrobium devonianum chloroplast, complete genome	OR231924.1	Dendrobium devonianum	China	99.89	100	0
Dendrobium primulinum mitochondrial DNA, scaffold23.	LC660021.1	Dendrobium primulinum	China	99.22	99.89	1
Dendrobium loddigesii trnL gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequence; chloroplast.	EF397927.1	Dendrobium loddigesii		97.79	100	5
Dendrobium primulinum chloroplast DNA, complete genome.	NC_035321.1	Dendrobium primulinum		97.69	99.89	0
Dendrobium polyanthum voucher UGDA.0073073 tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergeni...	OP829225.1	Dendrobium polyanthum		97.47	99.78	4
Dendrobium aphyllum trnL gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequence; chloroplast.	EF397910.1	Dendrobium aphyllum		97.26	100	4
Dendrobium aphyllum trnL-trnF intergenic spacer region, partial sequence; chloroplast	PQ014470.1	Dendrobium aphyllum	Indonesi...	97.15	99.89	4
Dendrobium loddigesii chloroplast DNA, complete genome.	NC_036355.1	Dendrobium loddigesii		96.42	99.89	1
Dendrobium parishii chloroplast DNA, complete genome.	NC_035339.1	Dendrobium parishii		96.42	100	3

3. Trình tự vùng gen matK

TATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAAATCTT
GGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCCTTCTTTGCATTTATTGCGATTGTTT
TTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCTTTACTTCAAAGAAATCCATTTACGTATTTT
CAAAAAGAAAGAAAAGATTCTTTTGTTTCCTACATAATTCTTATGTATATGAATGCGAATA
TCTATTCCTGTTTCTTCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTT
CTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAATATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATTCTT
TTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAAGGATACTTTCATACATTATGTTCGATATCAAGGAAA
AGCAATTCTGGCTTCAAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAAAAATGGGAATTTCATCTTGTG
AATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAAGCAAT
TACCCAACTATTCCTTCTCTTTTCTGGGGTTCTTTTCAAGTGTACTGAAAAATCCTTTGGT
AGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATACTCTATCTAAGAAATTAGAT
ACCATAGCCCCAGTTATTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCTCAATTTTGTACTGTAT
TGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATGTGGACTGATTTATCGGATTCTGATATTCTTGATCG
ATTTTGTCGGATATGCAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATCCTCAAAGAAAC


Rows selection

Anchor row Query_777371 cannot be hidden

Name	Sequence ID	Organism	Date	Country	Source	Identity	Coverage	Mismatches
Dendrobium parishii chloroplast DNA, complete genome.	NC_035339.1	Dendrobium parishii				100	100	0
Dendrobium parishii voucher KFBG2616 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid	KY966860.1	Dendrobium parishii				100	100	0
Dendrobium parishii isolate MP22 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	MK607431.1	Dendrobium parishii	22-Feb-2...	India	forest	100	99.76	0
Dendrobium parishii chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, isolate: W16.	AB972316.1	Dendrobium parishii		Thailand		100	99.76	0
Dendrobium anosmum chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, isolate: W10.	AB972311.1	Dendrobium anosmum		Thailand		100	99.76	0
Dendrobium primulinum isolate MP3 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	MK603116.1	Dendrobium primulinum	12-Feb-2...	India	forest	99.88	100	1
Dendrobium devonianum chloroplast, complete genome	OR231924.1	Dendrobium devonianum		China		99.88	100	1
Dendrobium primulinum voucher Jin X-H 10793 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; ...	KF143708.1	Dendrobium primulinum				99.88	100	1
Dendrobium bannaense voucher Z.J.Liu 7819 tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturas...	KY062488.1	Dendrobium bannaense				99.88	100	1
Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 chloroplast matK gene for maturase K, partial c...	AB847686.1	Dendrobium aff. anosmum...				99.88	100	1
Dendrobium parishii chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, bio_material: TB...	AB847834.1	Dendrobium parishii				99.88	100	1
Dendrobium primulinum strain B24 maturase K (matK) pseudogene and tRNA-Lys (trnK)...	FJ794064.1	Dendrobium primulinum		China: Y...		99.88	100	1
Dendrobium anosmum voucher KFBG2769A maturase K (matK) gene, partial cds; plastid	KY966807.1	Dendrobium anosmum				99.88	100	1
Dendrobium lituiflorum isolate vmt16 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	MG490222.1	Dendrobium lituiflorum	01-Aug-...	Viet Nam	open field	99.88	99.76	1

4. Trình tự vùng gen rbcL

AAGCTGGTGTTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAAGATAC
TGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTTCCGCCTGAAGAAGCGGGG
GCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTGGACTGATGGACTTA
CCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAA
TCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAAC
ATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCTGG
AAGATCTGCGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCA
AGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCA
AAATTGGGATTATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGCGGTGGAC
TTGGATTTTAC

II. Trình tự nucleotide của vùng 16s trên 3 chủng vi khuẩn nội sinh ở cây lan rừng

1. Chủng L6

CACAAATGCGCGGAGACTGATCATGCAGTCGAGCGGAGTGTGAATGCGGAGCTTGCTCTTA
TGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG
CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG
GTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGA
CACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCGTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGTGATGCATG
GATTGTCGGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGATTAAGGTCCCGGCAACGAGCGCAACC
CCTTTGATCGTAGTTGCCATTCAATAGTCGGTCACTCTAAGCTGACTTGCGGTTGACAACC
TGTAAGGAACGATGGAGATGA

2. Chủng L4

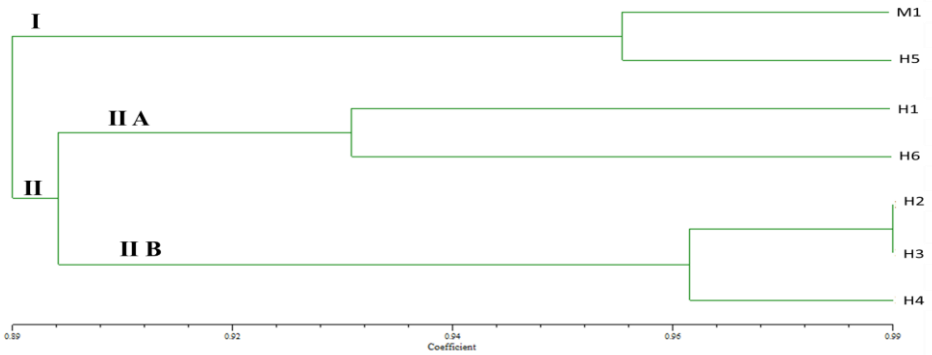
TCCCCAGTGGAGGCGCAGACTGCCATGCAGTCGAACGGCAGTCACCGCGGTGCTTGCACCT
GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCC
CGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCC
TCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG

CGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTG
GCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG
CAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGA
CTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCAC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAA
CTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGG
GGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAT
GATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATC
CTGCTGAAGAAGCGGGAGTGCTCGAAAGAAGAACCGGCGCACAGTGCTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGGTGGAAGAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCGTGTTCGTA
GTGCTACGCAGAGCCACTCTAGAGACTGGCGTTGACAAATCGCAGAATGGTGGGGAATGAC
GGTCAAGTTCCCTCAATG

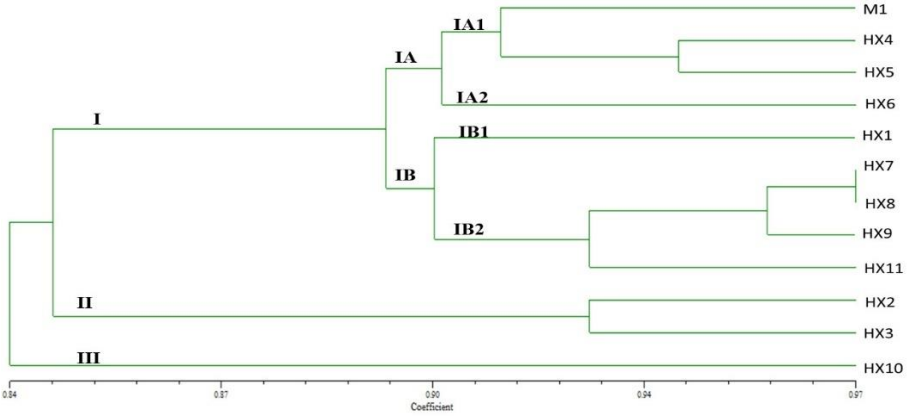
3. Chủng C4

GCTAACTTTGGATCGCAGACTGCACATGCAGTCGAACGGCAGCACCGGAGAGCTTGCTCTC
TGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTGTCGTGGGGGATAA
CGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACG
GGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAG
TTGGCGGGGTAAAGGCCCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC
ACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA
ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGC
CCTTTTGTTGGGAAAGAAAAGCAATCGGTTAATACCCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGA
ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGATTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGG
CTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATT
CCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACC
TGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAACTTGGCACGCAGTATCGAA
GCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCTGGTCTTGACATCCACGGAACTTTCCAGAGATGGGATTGGTTGCCTTCGGAACCCGTG
AGACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTTGTCGTGAGATTGTTGGGTTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCATCCTTGTCCGTAGTTGCCAGCACGGTATGGTGGAC
TCTAAGGAACGCAGTGACAACCGGAGGAAGGGTGGGGGAT

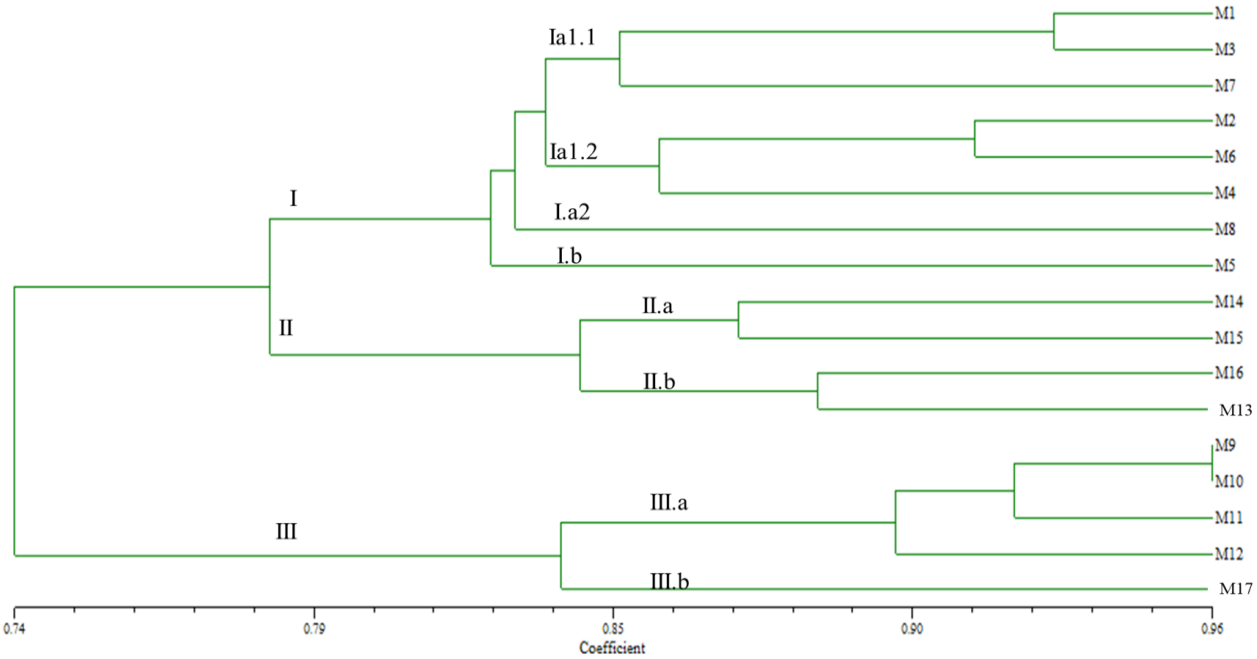
PHỤ LỤC 14: MỘT SỐ CÂY DI TRUYỀN TRONG NGHIÊN CỨU



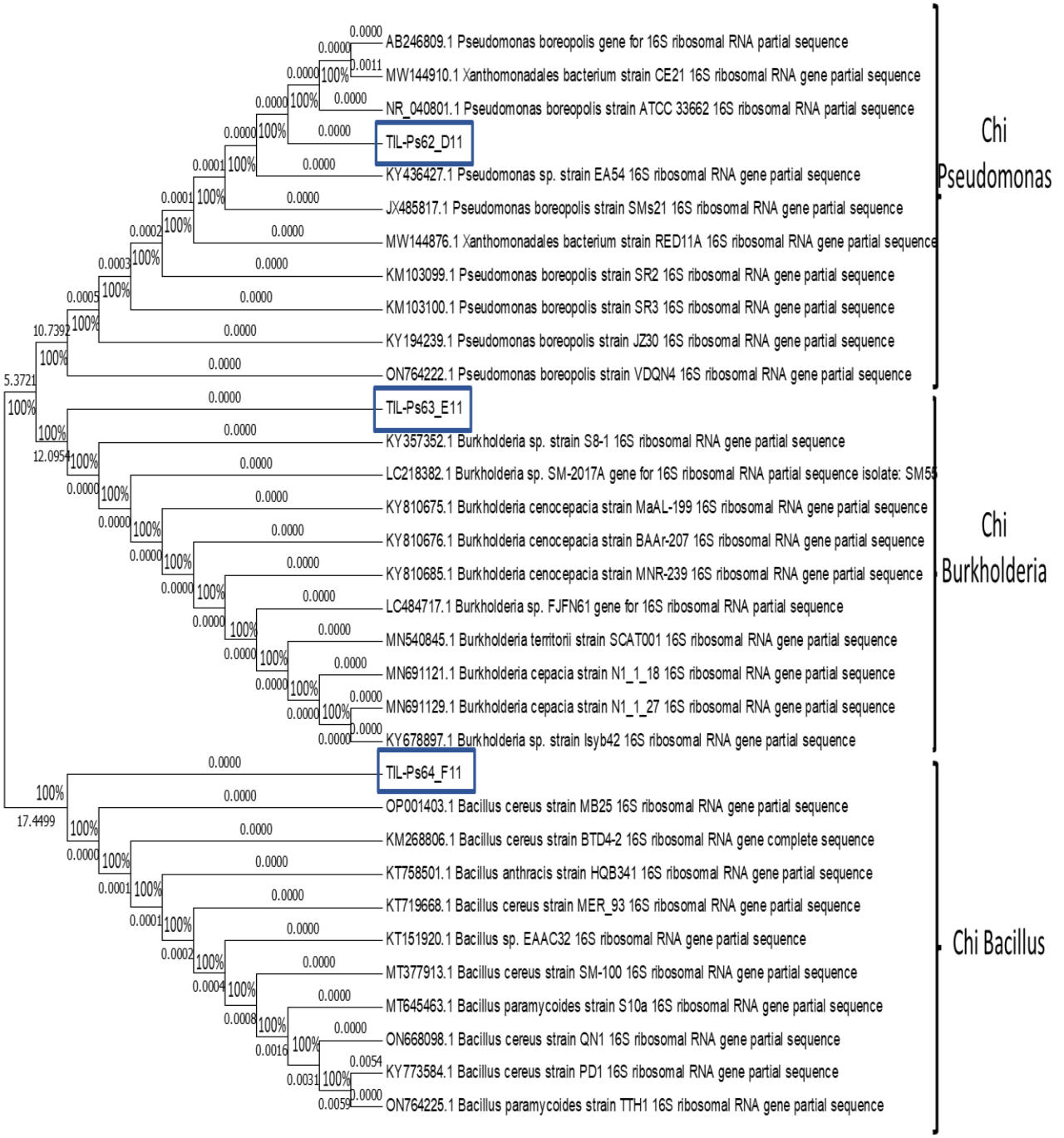
Hình P14-3.1. Cây phân nhóm di truyền 7 mẫu lan Giả hạc tím Huế



Hình P14-3.2. Cây phân nhóm di truyền 12 mẫu lan Giả hạc tím Huế tạo ra từ hạt có xử lý hoá chất đột biến.



Hình P14-3.3. Sơ đồ cây phân nhóm thể hiện mối tương quan di truyền giữa 17 mẫu lan Giả hạc tím Huế tạo ra từ mô sẹo có xử lý đột biến được phân tích theo phương pháp UPGMA.



Hình P14-3.4: Cây phân loại của các chủng thuộc chi *Burkholderia.;* chi *Bacillus.; chi Pseudomonas và 3* chủng thuộc 3 chi này theo thứ tự L4 được kí hiệu TIL-Ps63_E11; L6 được kí hiệu TIL-Ps64_F11; Chủng C4 được kí hiệu TIL-Ps62_D11

PHỤ LỤC 15: SO SÁNH TRÌNH TỰ NU CỦA CÁC VÙNG GEN

1. Vùng gen ITS4-5

```
1        10        20        30        40        50
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CATCCTGGGGTCGCATTCAAAGCGCCATCCATGGATCAGCGCATGATTTG Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
..............................G..................... Dendrobium bannaense (KY062487.1)
..............................G..................... Dendrobium parishii (AB593630.1)
..............................G..................... Dendrobium parishii (KJ944629.1)
...........................G.....A.................. Dendrobium anosmum (AB593499.1)
...........................G.....A.................. Dendrobium sp. (OP592176.1)
...........................G.....A.................. Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
..T.....A...A.........C.........A.A.................. Dendrobium anosmum (KP743542.1)

          60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGATCACCTCAATGGTGTGATCATCTCTTAGGCATGCACGACACAATAGC Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
..........A....................................... Dendrobium bannaense (KY062487.1)
..........A....................................... Dendrobium parishii (AB593630.1)
..........A....................................... Dendrobium parishii (KJ944629.1)
..........A.....G................................. Dendrobium anosmum (AB593499.1)
..........A.....G................................. Dendrobium sp. (OP592176.1)
..........A.....G................................. Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
..........A.....G................................. Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        110       120       130       140       150
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATAGGCCTCATTTAAATCCACCCCTTATTGTTCGCAGCCAACAAGACGAT Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
.................................................. Dendrobium bannaense (KY062487.1)
.................................................. Dendrobium parishii (AB593630.1)
.................................................. Dendrobium parishii (KJ944629.1)
..........................................G....... Dendrobium anosmum (AB593499.1)
..........................................G....... Dendrobium sp. (OP592176.1)
..........................................G....... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GATCCGCTCTTCAGCCCGCCGCGCCGAGGGGCACGACGAGCCACCATGCA Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
.................................................. Dendrobium bannaense (KY062487.1)
.................................................. Dendrobium parishii (AB593630.1)
.................................................. Dendrobium parishii (KJ944629.1)
..C............................................... Dendrobium anosmum (AB593499.1
..C............................................... Dendrobium sp. (OP592176.1)
..C............................................... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
..C............................................... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        210       220       230       240       250
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CATCCGAGCCCTCGCCAGCACATCCATCGATGGGTGGCTAGGCACGAAGC Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
.................................................. Dendrobium bannaense (KY062487.1)
............A..................................... Dendrobium parishii (AB593630.1)
.................................................. Dendrobium parishii (KJ944629.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (AB593499.1)
.................................................. Dendrobium sp. (OP592176.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        260       270       280       290       300
```

```
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GACAAAATGCCTGACGCCCAGGCGGACGTGCCCTTGGCCGATTGGCCTCG Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
.................................................. Dendrobium bannaense (KY062487.1)
.................................................. Dendrobium parishii (AB593630.1)
.................................................. Dendrobium parishii (KJ944629.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (AB593499.1)
.................................................. Dendrobium sp. (OP592176.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        310       320       330       340       350
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCGCGGGATTCTGCAATTCG Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
.................................................. Dendrobium bannaense (KY062487.1)
.................................................. Dendrobium parishii (AB593630.1)
.................................................. Dendrobium parishii (KJ944629.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (AB593499.1)
.................................................. Dendrobium sp. (OP592176.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        360       370       380       390       400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CACCATATATCGCATTTCGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGAT Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
.................................................. Dendrobium bannaense (KY062487.1)
.................................................. Dendrobium parishii (AB593630.1)
.................................................. Dendrobium parishii (KJ944629.1)
.....C............................................ Dendrobium anosmum (AB593499.1)
.....C............................................ Dendrobium sp. (OP592176.1)
.....C............................................ Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
.....C............................................ Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        410       420       430       440       450
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCCATTGCCGAGAGTCGTGTCAATCCATATGGCATGCAACAGCAACCCA Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
..................................T............... Dendrobium bannaense (KY062487.1)
..................................T............... Dendrobium parishii (AB593630.1)
..................................T............... Dendrobium parishii (KJ944629.1)
.........................A........................ Dendrobium anosmum (AB593499.1)
.........................A........................ Dendrobium sp. (OP592176.1)
.........................A........................ Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
.........................A........................ Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        460       470       480       490       500
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTCCACAAATCCATTTAAGGGCTTGTGCTACGATATTTCCTTGGCGCGAC Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
.................................................. Dendrobium bannaense (KY062487.1)
.................................................. Dendrobium parishii (AB593630.1)
.................................................. Dendrobium parishii (KJ944629.1)
.........................T........................ Dendrobium anosmum (AB593499.1)
.........................T........................ Dendrobium sp. (OP592176.1)
.........................T........................ Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
.........................T......................T Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        510       520       530       540       550
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCTGCGCCGATTTGGGGGTTCATCCATCCTTCATCACGTCCACACCCCGA Dendrobium anosmum voucher GHTH
.................................................. Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.................................................. Dendrobium anosmum (KP743544.1)
```

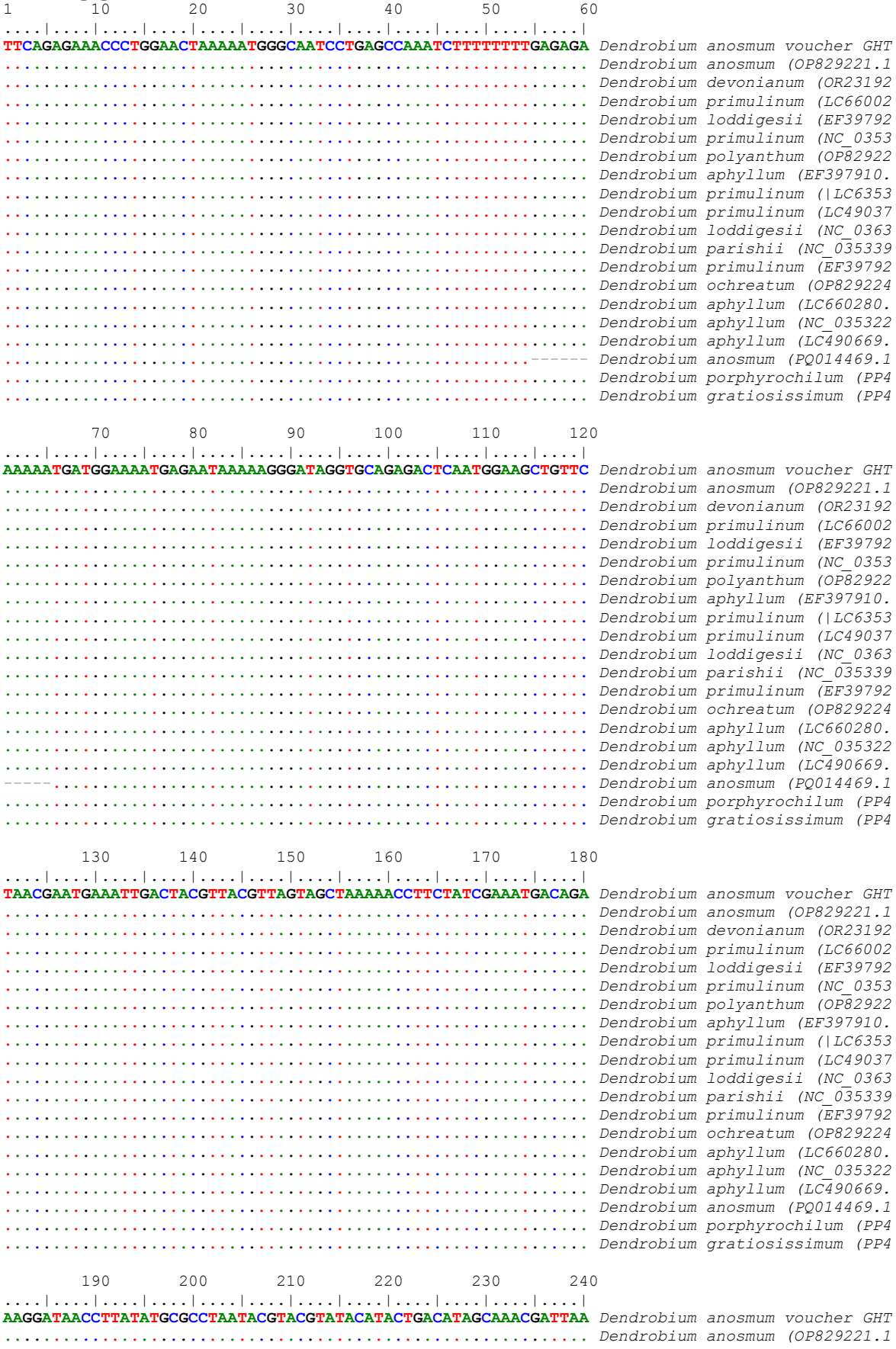
```
..................................................... Dendrobium anosmum (KJ944630.1)
..................................................... Dendrobium bannaense (KY062487.1)
..................................................... Dendrobium parishii (AB593630.1)
..................................................... Dendrobium parishii (KJ944629.1)
..................................................... Dendrobium anosmum (AB593499.1
..................................................... Dendrobium sp. (OP592176.1)
..................................................... Dendrobium anosmum (MZ540354.1)
..................................................... Dendrobium anosmum (KP743542.1)

        560       570       580       590       600
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGAGGGGATGAGGCGAAGATTGGGATGAATTTTATCTCGGAAGCTATAGC Dendrobium anosmum voucher GHTH
..................................................... Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
..................................................... Dendrobium anosmum (KP743544.1
..................................................... Dendrobium anosmum (KJ944630.1
..................................................... Dendrobium bannaense (KY062487
..................................................... Dendrobium parishii (AB593630.
..................................................... Dendrobium parishii (KJ944629.
.............A....................................... Dendrobium anosmum (AB593499.1
.............A....................................... Dendrobium sp. (OP592176.1)
.............A....................................... Dendrobium anosmum (MZ540354.1
.............A....................................... Dendrobium anosmum (KP743542.1

        610       620       630       640       650
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CACCGATTATTTTGACGGGTTCTCAAGATCACTCAATGTATTTTAATCTC Dendrobium anosmum voucher GHTH
..................................................... Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
..................................................... Dendrobium anosmum (KP743544.1
..................................................... Dendrobium anosmum (KJ944630.1
..................................................... Dendrobium bannaense (KY062487
..................................................... Dendrobium parishii (AB593630.
..................................................... Dendrobium parishii (KJ944629.
....A................................................ Dendrobium anosmum (AB593499.1
....A................................................ Dendrobium sp. (OP592176.1)
....A................................................ Dendrobium anosmum (MZ540354.1
..................................................... Dendrobium anosmum (KP743542.1

        660       670       680       690
....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GACAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGA       Dendrobium anosmum voucher GHTH
.....................................               Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 (AB593490.1)
.....................................               Dendrobium anosmum (KP743544.1
.............................C.........--             Dendrobium anosmum (KJ944630.1
.....................................               Dendrobium bannaense (KY062487
.....................................               Dendrobium parishii (AB593630.
.............................C.........--             Dendrobium parishii (KJ944629.
.....................................               Dendrobium anosmum (AB593499.1
.....................................               Dendrobium sp. (OP592176.1)
.....................................               Dendrobium anosmum (MZ540354.1
.....................................               Dendrobium anosmum (KP743542.1
```

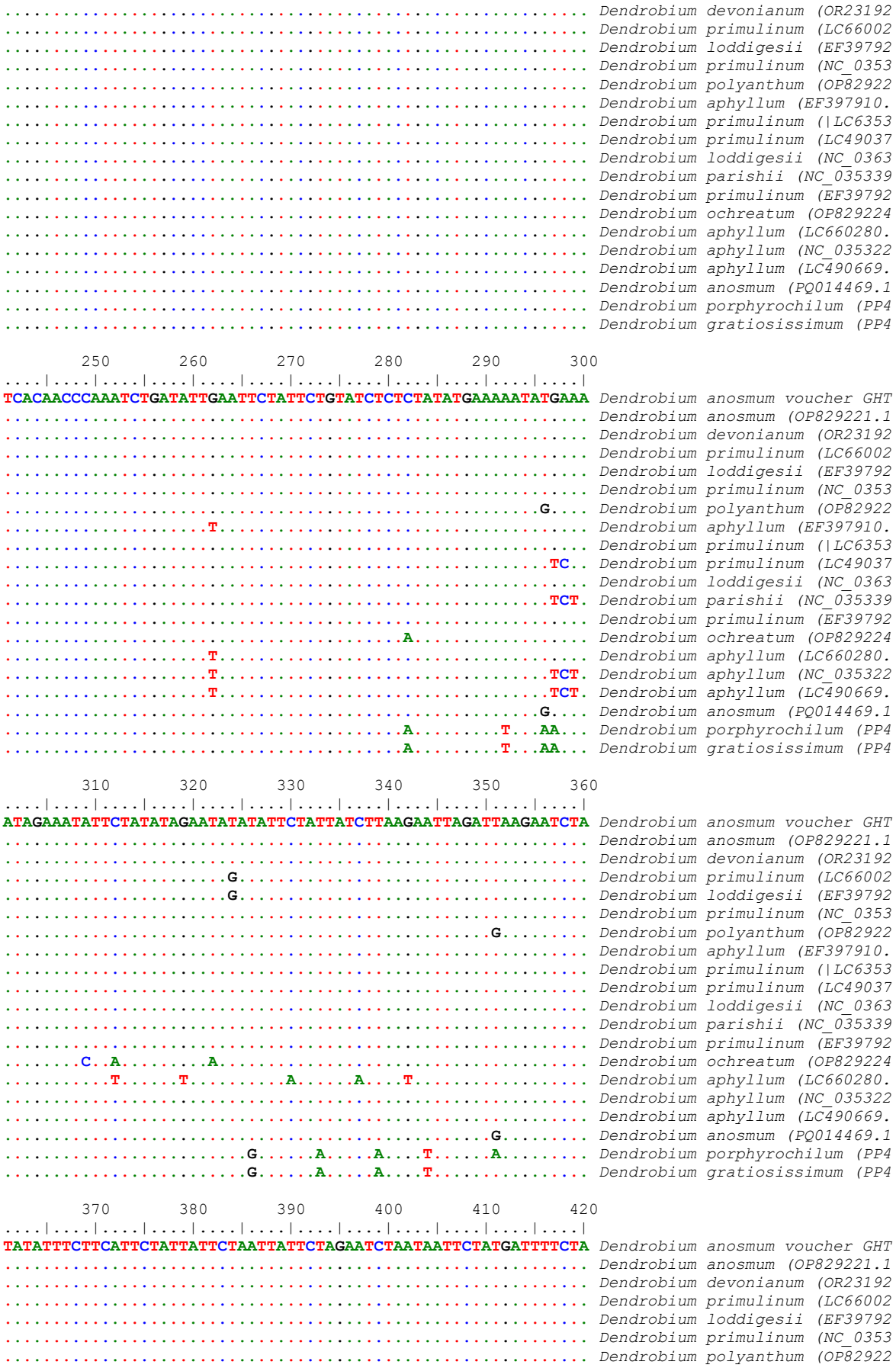
2. Vùng gen matK

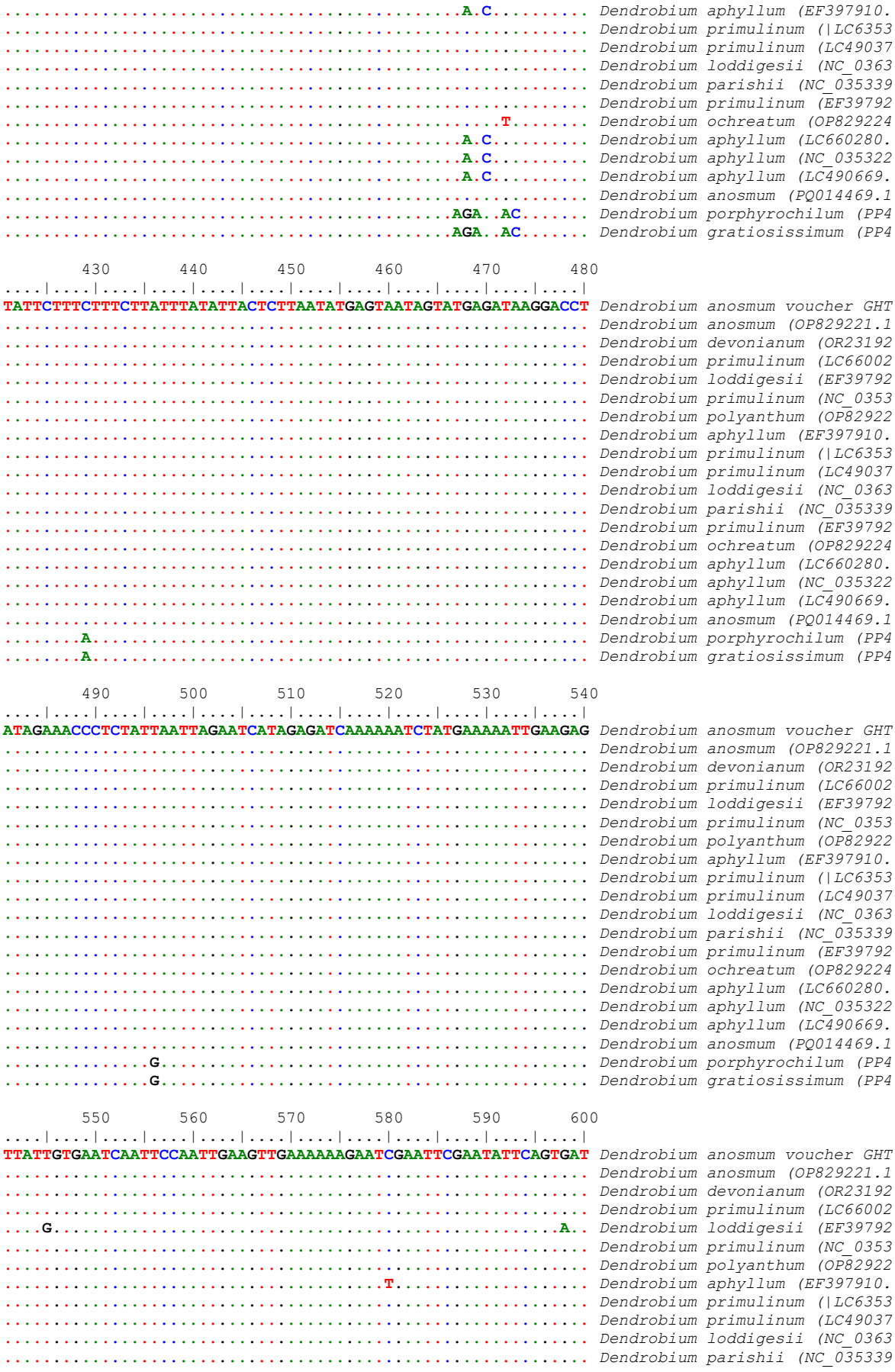
```
1         10        20        30        40        50        60
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAAATCT Dendrobium anosmum voucher GHT
..................................................... Dendrobium parishii (NC_035339
..................................................... Dendrobium parishii (KY966860.
..................................................... Dendrobium parishii (AB972316.
..................................................... Dendrobium anosmum (AB972311.1
..................................................... Dendrobium devonianum (OR23192
--................................................... Dendrobium parishii (MK607431.

         70        80        90       100       110       120
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCCTTCTTTGCATTTATTGCGATTGT Dendrobium anosmum voucher GHT
..................................................... Dendrobium parishii (NC_035339
..................................................... Dendrobium parishii (KY966860.
..................................................... Dendrobium parishii (AB972316.
..................................................... Dendrobium anosmum (AB972311.1
..................................................... Dendrobium devonianum (OR23192
..................................................... Dendrobium parishii (MK607431.

        130       140       150       160       170       180
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
```

```
TTTTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCTTTACTTCAAAGAAATCCATTTACGTAT Dendrobium anosmum voucher GHT
.............................................................. Dendrobium parishii (NC_035339
.............................................................. Dendrobium parishii (KY966860.
.............................................................. Dendrobium parishii (AB972316.
.............................................................. Dendrobium anosmum (AB972311.1
.............................................................. Dendrobium devonianum (OR23192
.............................................................. Dendrobium parishii (MK607431.

        190       200       210       220       230       240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTCAAAAAGAAAGAAAAGATTCTTTTGTTTCCTACATAATTCTTATGTATATGAATGCG Dendrobium anosmum voucher GHT
.............................................................. Dendrobium parishii (NC_035339
.............................................................. Dendrobium parishii (KY966860.
.............................................................. Dendrobium parishii (AB972316.
.............................................................. Dendrobium anosmum (AB972311.1
.............................................................. Dendrobium devonianum (OR23192
.............................................................. Dendrobium parishii (MK607431.

        250       260       270       280       290       300
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AATATCTATTCCTGTTTCTTCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAG Dendrobium anosmum voucher GHT
.............................................................. Dendrobium parishii (NC_035339
.............................................................. Dendrobium parishii (KY966860.
.............................................................. Dendrobium parishii (AB972316.
.............................................................. Dendrobium anosmum (AB972311.1
.............................................................. Dendrobium devonianum (OR23192
.............................................................. Dendrobium parishii (MK607431.

        310       320       330       340       350       360
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAATATCTTATAGTCGTGTGTTGTA Dendrobium anosmum voucher GHT
.............................................................. Dendrobium parishii (NC_035339
.............................................................. Dendrobium parishii (KY966860.
.............................................................. Dendrobium parishii (AB972316.
.............................................................. Dendrobium anosmum (AB972311.1
.............................................................. Dendrobium devonianum (OR23192
.............................................................. Dendrobium parishii (MK607431.

        370       380       390       400       410       420
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATTCTTTTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAAGGATACTTTCATACATTATGTTCGATATC Dendrobium anosmum voucher GHT
.............................................................. Dendrobium parishii (NC_035339
.............................................................. Dendrobium parishii (KY966860.
.............................................................. Dendrobium parishii (AB972316.
.............................................................. Dendrobium anosmum (AB972311.1
.............................................................. Dendrobium devonianum (OR23192
.............................................................. Dendrobium parishii (MK607431.

        430       440       450       460       470       480
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGGAAAAGCAATTCTGGCTTCAAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAAAAATGGGAATTTC Dendrobium anosmum voucher GHT
.............................................................. Dendrobium parishii (NC_035339
.............................................................. Dendrobium parishii (KY966860.
.............................................................. Dendrobium parishii (AB972316.
.............................................................. Dendrobium anosmum (AB972311.1
.............................................................. Dendrobium devonianum (OR23192
.............................................................. Dendrobium parishii (MK607431.

        490       500       510
....|....|....|....|....|....|...
ATCTTGTGAATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGG Dendrobium anosmum voucher GHT
..................................... Dendrobium parishii (NC_035339
..................................... Dendrobium parishii (KY966860.
..................................... Dendrobium parishii (AB972316.
..................................... Dendrobium anosmum (AB972311.1
..................................... Dendrobium devonianum (OR23192
..................................... Dendrobium parishii (MK607431.
```

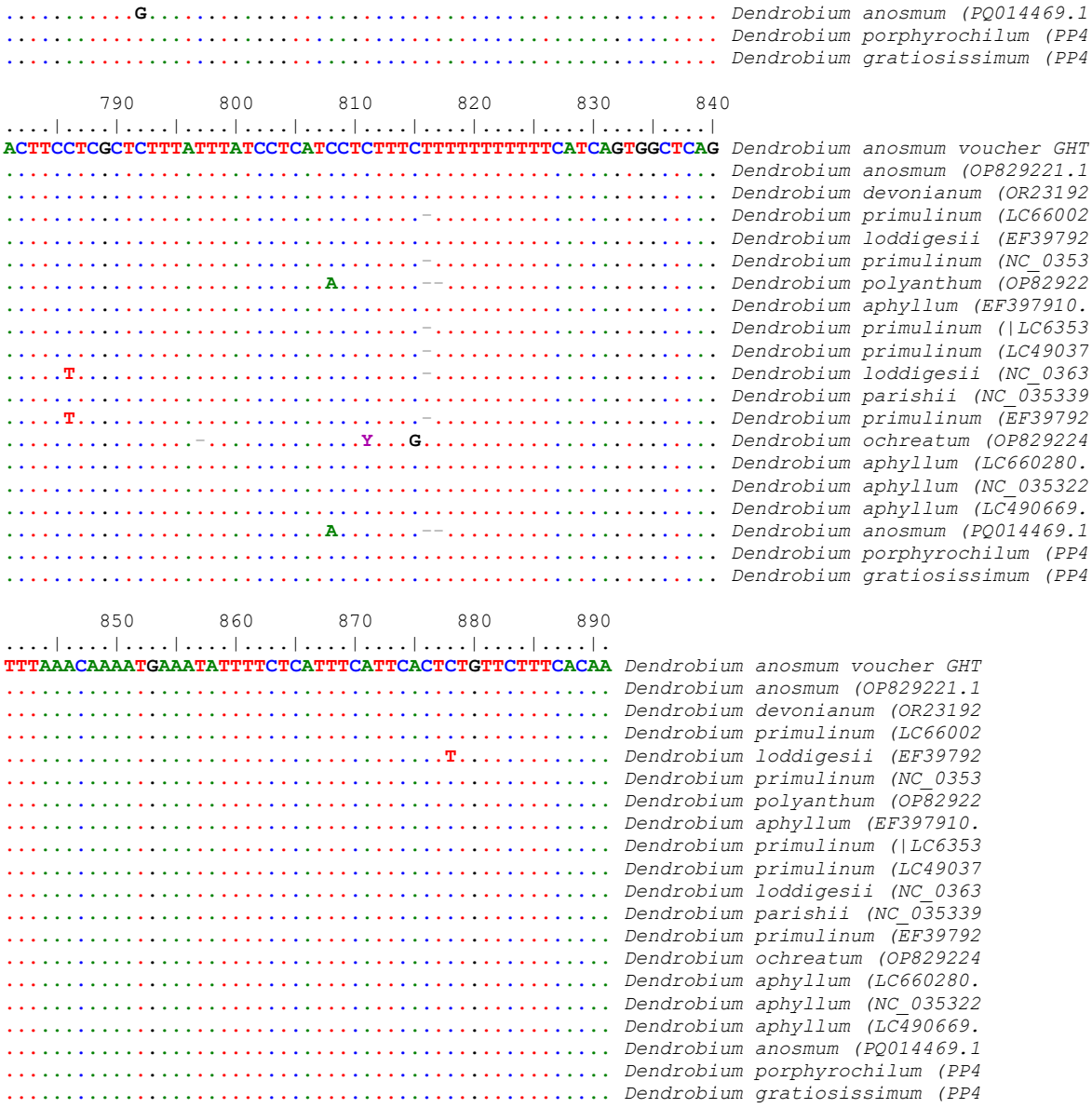
3. Vùng gen trnL




Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
250 260 270 280 290 300
TCACAACCCAAATCTGATATTGAATTCTATTCTGTATCTCTCTATATGAAAAATATGAAA Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
310 320 330 340 350 360
ATAGAAATATTCTATATAGAATATATATTCTATTATCTTAAGAATTAGATTAAGAATCTA Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
370 380 390 400 410 420
TATATTTCTTCATTCTATTATTCTAATTATTCTAGAATCTAATAATTCTATGATTTTCTA Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922


Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
430 440 450 460 470 480
TATTCTTTCTTTCTTATTTATATTACTCTTAATATGAGTAATAGTATGAGATAAGGACCT Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
490 500 510 520 530 540
ATAGAAACCCTCTATTAATTAGAATCATAGAGATCAAAAAATCTATGAAAAATTGAAGAG Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
550 560 570 580 590 600
TTATTGTGAATCAATTCCAATTGAAGTTGAAAAAAGAATCGAATTCGAATATTCAGTGAT Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339

```
.....................................................A.............. Dendrobium primulinum (EF39792
.......................................................................... Dendrobium ochreatum (OP829224
.....................................T.................................. Dendrobium aphyllum (LC660280.
.....................................T.................................. Dendrobium aphyllum (NC_035322
.....................................T.................................. Dendrobium aphyllum (LC490669.
.......................................................................... Dendrobium anosmum (PQ014469.1
.......................C.................................................. Dendrobium porphyrochilum (PP4
.......................C.................................................. Dendrobium gratiosissimum (PP4

        610       620       630       640       650       660
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAAATGATTCATTCCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAGATTAATCGGACGAGAATAAAGA Dendrobium anosmum voucher GHT
.......................................................................... Dendrobium anosmum (OP829221.1
.......................................................................... Dendrobium devonianum (OR23192
.......................................................................... Dendrobium primulinum (LC66002
.......................................................................... Dendrobium loddigesii (EF39792
.......................................................................... Dendrobium primulinum (NC_0353
.......................................................................... Dendrobium polyanthum (OP82922
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (EF397910.
.......................................................................... Dendrobium primulinum (|LC6353
.......................................................................... Dendrobium primulinum (LC49037
.......................................................................... Dendrobium loddigesii (NC_0363
.......................................................................... Dendrobium parishii (NC_035339
.......................................................................... Dendrobium primulinum (EF39792
..R....................................................................... Dendrobium ochreatum (OP829224
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (LC660280.
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (NC_035322
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (LC490669.
.......................................................................... Dendrobium anosmum (PQ014469.1
.......................................................................... Dendrobium porphyrochilum (PP4
.......................................................................... Dendrobium gratiosissimum (PP4

        670       680       690       700       710       720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAGAGTCCCATTTTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAATAGGAAAATC Dendrobium anosmum voucher GHT
.......................................................................... Dendrobium anosmum (OP829221.1
.......................................................................... Dendrobium devonianum (OR23192
.......................................................................... Dendrobium primulinum (LC66002
.......................................................................... Dendrobium loddigesii (EF39792
.......................................................................... Dendrobium primulinum (NC_0353
.......................................................................... Dendrobium polyanthum (OP82922
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (EF397910.
.......................................................................... Dendrobium primulinum (|LC6353
.......................................................................... Dendrobium primulinum (LC49037
.......................................................................... Dendrobium loddigesii (NC_0363
.......................................................................... Dendrobium parishii (NC_035339
.......................................................................... Dendrobium primulinum (EF39792
.......................................................................... Dendrobium ochreatum (OP829224
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (LC660280.
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (NC_035322
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (LC490669.
.......................................................................... Dendrobium anosmum (PQ014469.1
.......................................................................... Dendrobium porphyrochilum (PP4
.......................................................................... Dendrobium gratiosissimum (PP4

        730       740       750       760       770       780
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CGTCGAATTTTTAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAGCCCATTTT Dendrobium anosmum voucher GHT
.......................................................................... Dendrobium anosmum (OP829221.1
.......................................................................... Dendrobium devonianum (OR23192
.......................................................................... Dendrobium primulinum (LC66002
...........C.............................................................. Dendrobium loddigesii (EF39792
.......................................................................... Dendrobium primulinum (NC_0353
..........G............................................................... Dendrobium polyanthum (OP82922
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (EF397910.
.......................................................................... Dendrobium primulinum (|LC6353
.......................................................................... Dendrobium primulinum (LC49037
.......................................................................... Dendrobium loddigesii (NC_0363
.......................................................................... Dendrobium parishii (NC_035339
.......................................................................... Dendrobium primulinum (EF39792
.......................................................................... Dendrobium ochreatum (OP829224
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (LC660280.
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (NC_035322
.......................................................................... Dendrobium aphyllum (LC490669.
```


Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
790 800 810 820 830 840
ACTTCCTCGCTCTTTATTTATCCTCATCCTCTTTCTTTTTTTTTTTCATCAGTGGCTCAG Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4
850 860 870 880 890
TTTAAACAAAAATGAAATATTTTCTCATTTCATTCACTCTGTTCTTTCACAA Dendrobium anosmum voucher GHT
Dendrobium anosmum (OP829221.1
Dendrobium devonianum (OR23192
Dendrobium primulinum (LC66002
Dendrobium loddigesii (EF39792
Dendrobium primulinum (NC_0353
Dendrobium polyanthum (OP82922
Dendrobium aphyllum (EF397910.
Dendrobium primulinum (|LC6353
Dendrobium primulinum (LC49037
Dendrobium loddigesii (NC_0363
Dendrobium parishii (NC_035339
Dendrobium primulinum (EF39792
Dendrobium ochreatum (OP829224
Dendrobium aphyllum (LC660280.
Dendrobium aphyllum (NC_035322
Dendrobium aphyllum (LC490669.
Dendrobium anosmum (PQ014469.1
Dendrobium porphyrochilum (PP4
Dendrobium gratiosissimum (PP4

PHỤ LỤC 16: KÍ HIỆU CỦA NHỮNG DÒNG LAN GIẢ HẠC TÍM HUẾ ĐƯỢC LỰA CHỌN LẤY MẪU PHÂN TÍCH

TT	Kí hiệu dòng	Dòng lan được tạo ra
1	**HX1**	Protocorm xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong thời gian 8 giờ.
2	**HX2**	Protocorm xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 6 giờ.
3	**HX3**	Protocorm xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong thời gian 6 giờ.
4	**HX4**	Protocorm xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong thời gian 2 giờ.
5	**HX5**	Protocorm xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 4 giờ.
6	**HX6**	Protocorm xử lý colchicine nồng độ 200 ppm, trong thời gian 8 giờ.
7	**HX7**	Protocorm xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong thời gian 2 giờ.
8	**HX8**	Protocorm xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong thời gian 2 giờ.
9	**HX9**	Protocorm xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 6 giờ.
10	**HX10**	Protocorm xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 4 giờ.
11	**HX11**	Protocorm xử lý colchicine nồng độ 50 ppm trong thời gian 10 giờ.
12	**M1**	Mẫu lan Giả hạc tím Huế không xử lý hoá chất (đối chứng).
13	**M2**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 400 ppm trong thời gian 6 giờ.
14	**M3**	Mô sẹo xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 2 giờ.
15	**M4**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 4 giờ.
16	**M5**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 8 giờ.
17	**M6**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 8 giờ.
18	**M7**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 400 ppm, trong thời gian 2 giờ.
19	**M8**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 200 ppm trong thời gian 6 giờ.
20	**M9**	Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong thời gian 4 giờ.
21	**M10**	Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 200 ppm trong thời gian 6 giờ.
22	**M11**	Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 100 ppm, trong thời gian 8 giờ.
23	**M12**	Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ.
24	**M13**	Mô sẹo xử lý DMS nồng độ 200 ppm, trong thời gian 4 giờ.
25	**M14**	Mô sẹo xử lý DMS với nồng độ 400 ppm, trong thời gian 2 giờ.
26	**M15**	Mô sẹo xử lý DMS với nồng độ 100 ppm, trong thời gian 4 giờ.
27	**M16**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 50 ppm trong thời gian 10 giờ.
28	**M17**	Mô sẹo xử lý colchicine nồng độ 100 ppm trong thời gian 10 giờ.
29	**H1**	Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến
30	**H2**	Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến
31	**H3**	Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến
32	**H4**	Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến
33	**H5**	Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến
34	**H6**	Mẫu cây gieo hạt không xử lý hoá chất đột biến

PHỤ LỤC 17: BẢNG HỆ SỐ TƯƠNG ĐỒNG

Bảng hệ số tương đồng của 34 mẫu lan Giả hạc tím Huế thí nghiệm

Mẫu	M1	HX2	M2	HX1	M6	HX3	M15	M4	M7	M10	M11	M13	M14	M12	M16	HX11	H2	H5	H1	HX10	HX4	HX7	HX9	HX5	M5	HX8	H3	H4	H9	M9	HX6	M8	M5	M17
M1	1,000																																	
HX2	0,855	1,000																																
M2	0,870	0,870	1,000																															
HX1	0,812	0,899	0,768	1,000																														
M6	0,826	0,826	0,811	0,841	1,000																													
HX3	0,826	0,913	0,841	0,870	0,855	1,000																												
M15	0,768	0,768	0,783	0,725	0,768	0,739	1,000																											
M4	0,812	0,870	0,855	0,797	0,928	0,870	0,812	1,000																										
M7	0,687	0,696	0,652	0,739	0,725	0,638	0,725	0,681	1,000																									
M10	0,725	0,812	0,710	0,768	0,696	0,725	0,667	0,681	0,826	1,000																								
M11	0,739	0,797	0,754	0,783	0,768	0,768	0,739	0,725	0,870	0,899	1,000																							
M13	0,754	0,754	0,739	0,768	0,754	0,725	0,725	0,710	0,884	0,884	0,928	1,000																						
M14	0,855	0,855	0,841	0,812	0,826	0,826	0,797	0,841	0,725	0,754	0,768	0,754	1,000																					
M12	0,783	0,812	0,768	0,768	0,783	0,783	0,754	0,768	0,826	0,913	0,957	0,913	0,783	1,000																				
M16	0,812	0,841	0,826	0,768	0,812	0,812	0,870	0,884	0,768	0,739	0,783	0,768	0,841	0,826	1,000																			
HX11	0,841	0,841	0,826	0,797	0,783	0,812	0,870	0,826	0,681	0,710	0,754	0,739	0,812	0,797	0,884	1,000																		
H2	0,913	0,913	0,899	0,812	0,855	0,884	0,797	0,870	0,696	0,754	0,797	0,783	0,826	0,841	0,899	0,870	1,000																	
H5	0,957	0,870	0,884	0,826	0,841	0,870	0,754	0,826	0,681	0,739	0,754	0,768	0,841	0,797	0,826	0,797	0,928	1,000																
H1	0,913	0,884	0,841	0,841	0,797	0,855	0,768	0,812	0,696	0,754	0,768	0,783	0,826	0,812	0,841	0,812	0,913	0,957	1,000															
HX10	0,855	0,855	0,812	0,812	0,768	0,797	0,855	0,812	0,725	0,725	0,797	0,754	0,826	0,783	0,812	0,841	0,855	0,841	0,855	1,000														
HX4	0,899	0,928	0,855	0,855	0,841	0,870	0,783	0,855	0,739	0,797	0,841	0,797	0,841	0,855	0,884	0,855	0,957	0,913	0,928	0,899	1,000													
HX7	0,884	0,884	0,841	0,870	0,913	0,884	0,797	0,841	0,725	0,754	0,826	0,812	0,826	0,841	0,841	0,870	0,942	0,899	0,884	0,855	0,928	1,000												
HX9	0,913	0,855	0,841	0,870	0,884	0,855	0,797	0,812	0,725	0,754	0,826	0,812	0,797	0,841	0,841	0,841	0,942	0,928	0,913	0,855	0,928	0,971	1,000											
HX5	0,913	0,884	0,812	0,870	0,826	0,826	0,826	0,812	0,725	0,783	0,826	0,783	0,826	0,841	0,841	0,870	0,913	0,899	0,913	0,913	0,957	0,913	0,942	1,000										
M5	0,841	0,870	0,797	0,855	0,812	0,841	0,754	0,797	0,710	0,710	0,783	0,739	0,812	0,768	0,826	0,884	0,870	0,826	0,870	0,841	0,913	0,899	0,870	0,870	1,000									
HX8	0,870	0,870	0,826	0,855	0,899	0,870	0,783	0,826	0,710	0,739	0,812	0,797	0,812	0,826	0,826	0,855	0,928	0,884	0,899	0,841	0,913	0,986	0,957	0,899	0,913	1,000								
H3	0,884	0,913	0,870	0,812	0,855	0,884	0,826	0,870	0,696	0,725	0,768	0,754	0,826	0,812	0,870	0,870	0,971	0,899	0,884	0,884	0,928	0,942	0,913	0,884	0,870	0,928	1,000							
H4	0,913	0,884	0,870	0,812	0,855	0,855	0,768	0,841	0,667	0,725	0,768	0,754	0,826	0,812	0,841	0,870	0,942	0,899	0,884	0,855	0,928	0,942	0,913	0,884	0,899	0,928	0,942	1,000						
H9	0,913	0,884	0,841	0,841	0,855	0,855	0,768	0,841	0,667	0,725	0,739	0,754	0,826	0,783	0,812	0,812	0,913	0,957	0,942	0,855	0,899	0,913	0,913	0,884	0,841	0,899	0,913	0,913	1,000					
M9	0,696	0,725	0,710	0,681	0,725	0,725	0,870	0,768	0,681	0,652	0,696	0,681	0,725	0,739	0,826	0,797	0,754	0,681	0,696	0,782	0,739	0,754	0,725	0,754	0,681	0,739	0,783	0,754	0,696	1,000				
HX6	0,841	0,870	0,826	0,797	0,812	0,841	0,812	0,826	0,739	0,768	0,783	0,768	0,783	0,826	0,855	0,855	0,928	0,855	0,870	0,841	0,913	0,899	0,899	0,899	0,826	0,884	0,928	0,870	0,841	0,768	1,000			
M8	0,899	0,783	0,797	0,797	0,841	0,812	0,696	0,768	0,652	0,681	0,725	0,739	0,754	0,739	0,739	0,768	0,841	0,913	0,870	0,754	0,826	0,870	0,899	0,841	0,797	0,855	0,812	0,841	0,899	0,623	0,797	1,000		
M5	0,663	0,623	0,580	0,638	0,681	0,594	0,710	0,638	0,696	0,667	0,739	0,725	0,652	0,696	0,667	0,638	0,652	0,638	0,681	0,681	0,696	0,681	0,710	0,739	0,696	0,696	0,623	0,652	0,652	0,638	0,638	0,696	1,000	
M17	0,661	0,623	0,609	0,696	0,710	0,652	0,623	0,638	0,725	0,638	0,652	0,667	0,623	0,638	0,638	0,609	0,623	0,696	0,652	0,594	0,638	0,681	0,681	0,652	0,638	0,667	0,623	0,681	0,681	0,638	0,609	0,696	0,652	1,000

PHỤ LỤC 18: XÂY DỰNG QUY TRÌNH

Quy trình 1: Quy trình tái sinh của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến

Bước 1: Chuẩn bị, lựa chọn cây lan con hoặc chồi *in-vitro* của những dòng lan đột biến đủ tiêu chuẩn (khoẻ mạnh, xanh tốt, cao 3-4 cm, có 4-5 lá), cắt bỏ lá, rễ sau đó cắt thân chồi thành những đoạn ngắn 1,5-2cm. Mỗi đoạn thân phải chứa ít nhất 1 chồi ngủ.

Phòng nuôi có nhiệt độ được cài đặt 25 ± 2°C, độ ẩm phải được phân bố đều trong toàn phòng nuôi, độ ẩm được điều chỉnh từ 50-60%. Sử dụng bóng đèn huỳnh quang chiếu sáng với mật độ thông lượng photon quang hợp trong khoảng 13,5 - 27 μmol $s^{-1}m^{-2}$, thời gian chiếu sáng được điều chỉnh 8 giờ/ ngày.

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

Những đoạn thân ngắn được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA, pH 5,8.

Bước 3: Tái sinh chồi từ mô sẹo

Mô sẹo khoẻ mạnh không nhiễm nấm bệnh được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA, pH 5,8 nhằm kích thích mô sẹo tạo chồi.

Bước 4: Nhân chồi

Những chồi tái sinh khoẻ mạnh, cao 2-3 cm và có 2-3 lá không nhiễm nấm bệnh được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA, pH 5,8 để kích thích chồi nhân nhanh.

Bước 5: Ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh

Những chồi khoẻ mạnh, cao 3-4 cm và có 4-5 lá không nhiễm nấm bệnh được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,7 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng là 0,7 mg/L NAA, pH 5,8 để nuôi cấy ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh.

Quy trình 2: Quy trình nhân giống và huấn luyện cây con *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế

Bước 1: *Lấy mẫu.* Mẫu lan Giả hạc tím Huế được thu thập, nuôi dưỡng. Thu thập quả đã chín sinh lý và đoạn thân có chồi ngủ, mẫu thu thập cần khoẻ mạnh, sạch bệnh.

Bước 2: *Khử trùng mẫu*. Những đoạn thân hoặc quả thu về được vệ sinh loại bỏ các phần không cần thiết, rửa dưới vòi nước chảy và lắc nhẹ trong xà phòng pha loãng trong 5 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất khử trùng và chuyển vào tủ cấy vô trùng.

Đối với mẫu là quả lan sẽ được nhúng ngập toàn bộ quả trong cồn ethanol 96º và lắc nhẹ trong vòng 30 giây, sau đó quả được lấy ra và đốt qua bằng ngọn lửa đèn cồn. Tiếp theo là cắt đôi quả lấy hạt gieo lên môi trường dinh dưỡng MS. Đối với mẫu là đoạn thân sẽ được khử trùng bằng cách lắc 10 phút trong NaClO 2% và 10 phút $HgCl_2$ 0,1% sau đó mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng và cấy vào môi trường dinh dưỡng MS.

Bước 3: *Tái sinh mô sẹo hoặc protocorm tạo vật liệu khởi đầu.* Mẫu sạch, không bị nhiễm nấm khuẩn, còn sống được cấy chuyển sang môi trường tái sinh chồi/mô sẹo/protocorm.

Nếu mẫu là hạt lan được cấy vào Môi trường MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 + 0,75 mg/L NAA +0,5 mg/L BA để kích thích hạt phát triển thành protocorm.

Nếu mẫu là đoạn thân được cấy vào môi trường MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 + 1,5 mg/L DTZ + 0,5 mg/L NAA nhằm kích thích đoạn thân tạo mô sẹo.

Bước 4: *Tái sinh chồi.* Chồi có thể được tái sinh từ đoạn thân chứa chồi ngủ, hoặc từ mô sẹo hoặc từ protocorm bằng cách nuôi cấy vào môi trường dinh dưỡng có bổ sung hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng phù hợp, cụ thể là:

Tái sinh chồi từ đoạn thân môi trường dinh dưỡng được sử dụng là MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 + 1,5 mg/L BA.

Tái sinh chồi từ mô sẹo/protocorm môi trường dinh dưỡng được sử dụng là MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA.

Bước 5: *Nhân chồi.* Chồi tạo ra từ quá trình tái sinh chồi được lựa chọn những chồi to khoẻ, xanh tốt, không nhiễm nấm khuẩn cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA để kích thích chồi nhân nhanh.

Bước 6: *Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.* Chọn chồi xanh tốt, khoẻ mạnh, không nhiễm nấm khuẩn, cao 4-5 cm, có 3-4 lá cấy vào môi trường dinh dưỡng MS + 7 g/L agar + 0,5 g/L than hoạt tính + 30 g/L saccharose + 60 g/L khoai tây xay mịn, 100 mL/L nước dừa và pH 5,8 + 0,7 mg/L NAA nhằm kích thích ra rễ của chồi.

Bước 7: *Ra cây ngoài vườn ươm.* Những bì cây lan con Giả hạc tím Huế *in-vitro* phát triển đạt chuẩn có đầy đủ rễ lá, xanh tốt, khoẻ mạnh ko bị nhiễm nấm khuẩn được đưa xuống vườn ươm chăm sóc từ 2-3 tuần sau đó ra cây trồng trên hỗn hợp giá thể sơ dừa và trấu hun tỉ lệ 1:1, điều kiện vườn ươm được kiểm soát ánh sáng che 50%, nhiệt độ 25-35ºC. Cây được chăm sóc tưới nước 2 lần/ngày, phun chế phẩm với liều lượng 10ml/L nước, phun 2 lần/tuần đồng thời có bổ sung thêm phân chậm tan có thành phần N:P:K:Mg tương đương 6:40:6:15 với liều lượng 1 g/cây/tháng.

PHỤ LỤC 19: CÁC BƯỚC XÁC ĐỊNH MẬT ĐỘ VI KHUẨN (CFU/mL)

Bước 1: Pha loãng mẫu vi khuẩn

Mẫu ban đầu thường có mật độ vi khuẩn rất cao, nên cần pha loãng theo cấp số nhân (10 lần mỗi cấp).

Ví dụ: lấy 1 mL mẫu cho vào 9 mL nước muối sinh lý hoặc môi trường lỏng → pha loãng 10^{-1}; tiếp tục lấy 1 mL từ đó cho vào 9 mL mới → 10^{-2}, v.v.

Bước 2: Cấy mẫu lên đĩa thạch

Dùng pipet lấy một lượng nhỏ (0.1 mL) từ mỗi độ pha loãng và cấy lên đĩa thạch Petri.

Trải đều mẫu trên bề mặt thạch để khuẩn lạc phát triển riêng biệt.

Bước 3: Ủ đĩa thạch

Đặt đĩa vào tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp (37°C) trong 24–48 giờ để vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc.

Bước 4: Đếm số khuẩn lạc

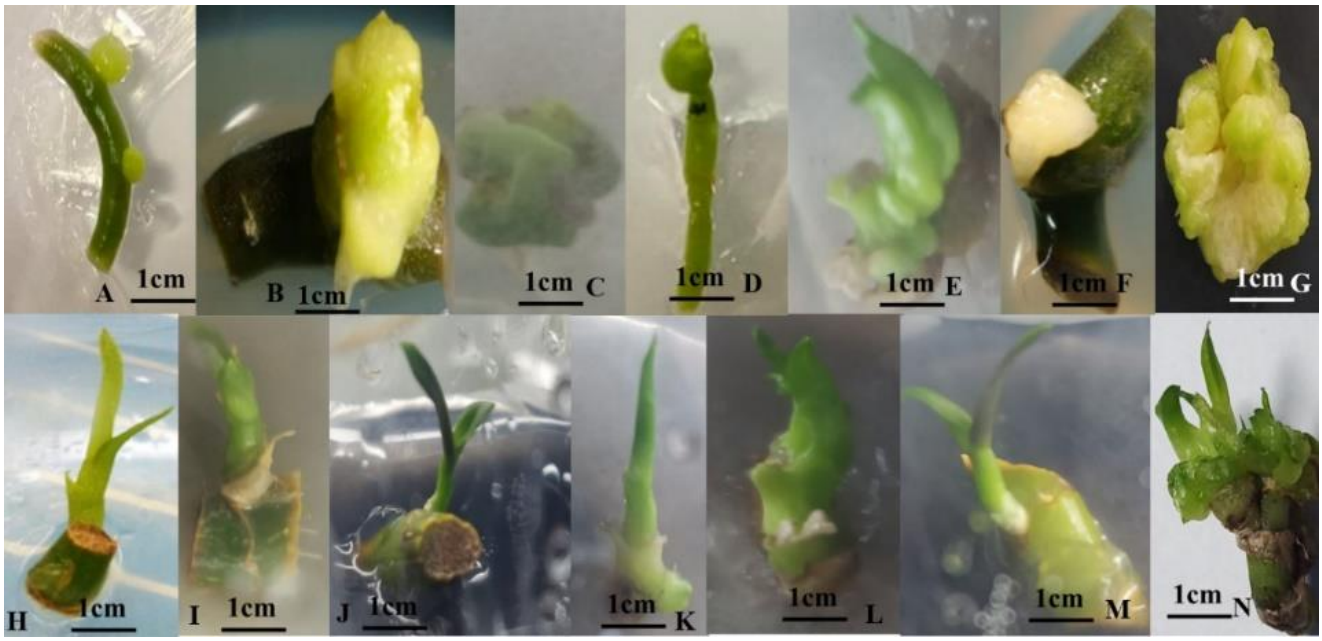
Sau thời gian ủ, đếm số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa. Mỗi khuẩn lạc được xem là một CFU.

Bước 5: Tính toán mật độ vi khuẩn

Áp dụng công thức:

$$CFU/mL\ \frac{số\ khuẩn\ lạc\ đếm\ được}{Thể\ tích\ cấy(ml) \times hệ\ số\ pha\ loãng}$$

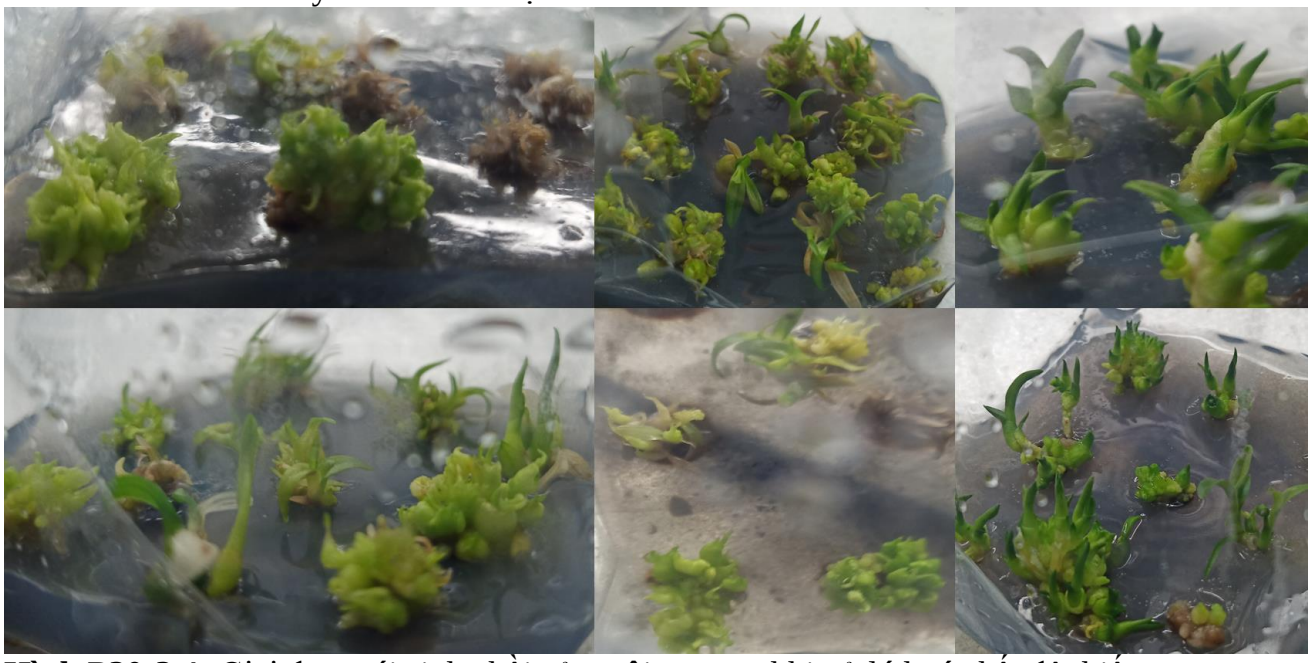
PHỤ LỤC 20: MỘT SỐ HÌNH ẢNH ĐƯỢC CHỤP LẠI TRONG THỜI GIAN NGHIÊN CỨU



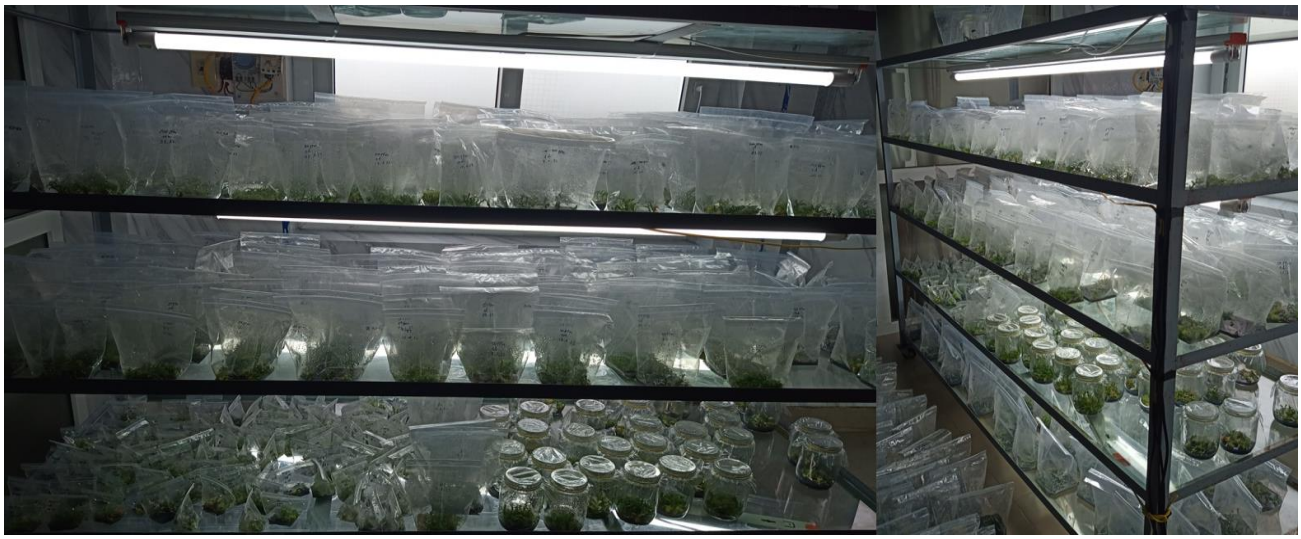
Hình P20-3.1: Khả năng tái sinh chồi/mô sẹo của một số dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến.
(***A, H:*** *Mẫu đối chứng;* ***B, I:*** *Mẫu HX3;* ***C, J:*** *Mẫu HX10;* ***D, K:*** *Mẫu M5;* ***E, L:*** *Mẫu M13;* ***F, M:*** *Mẫu M14;* ***G, N:*** *Mẫu M17)*

Hình P20-3.2: Cây lan Giả hạc tím Huế đầu dòng.

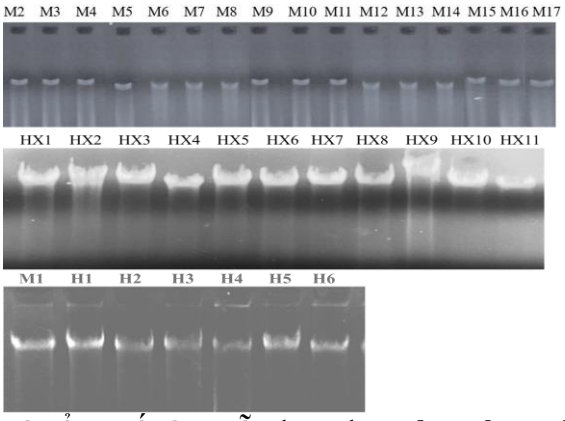
Hình P20-3.3: Ra cây làn con Giả hạc tím Huế *in-vitro* ở vườn ươm



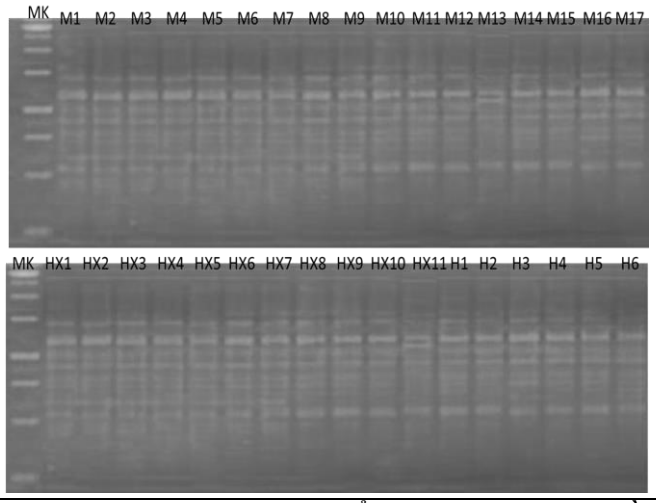
Hình P20-3.4: Giai đoạn tái sinh chồi của môi sẹo sau khi xử lý hoá chất đột biến



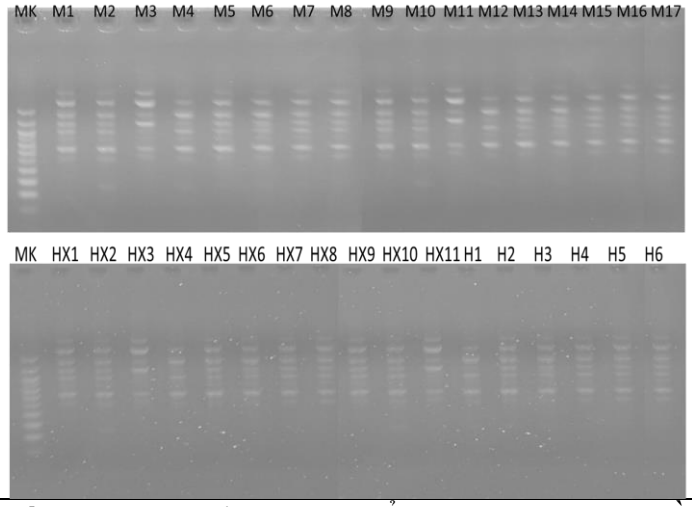
Hình P20-3.5: Phòng nuôi cây thí nghiệm



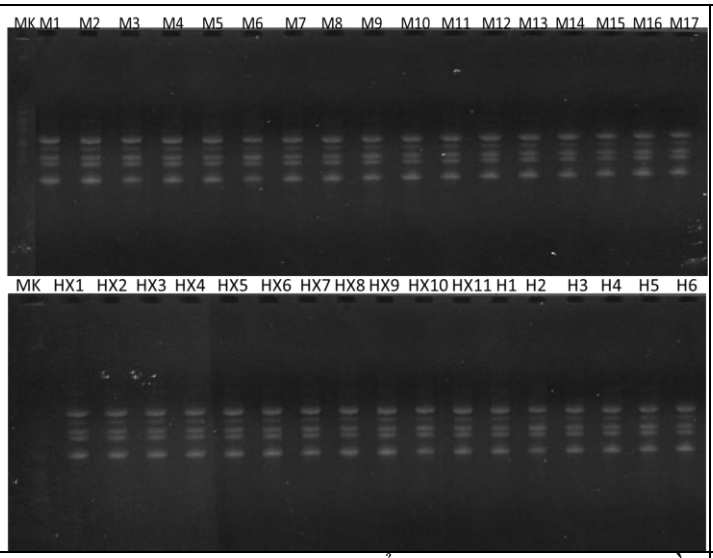
Hình P20-3.6: Điện di DNA tổng số 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích.



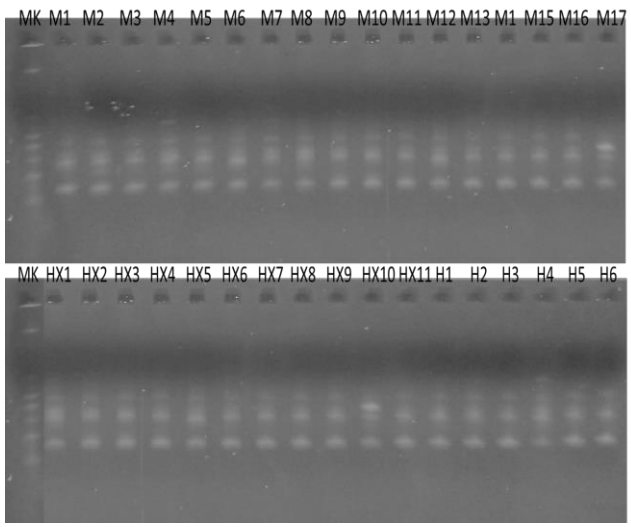
Hình P20-3.7: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi OPO-04 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích.



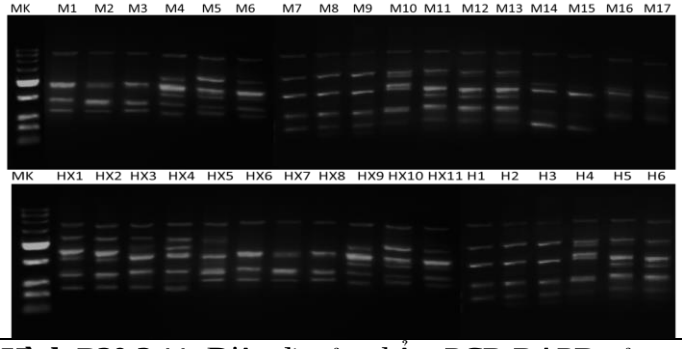
Hình P20-3.8: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi P17 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích.



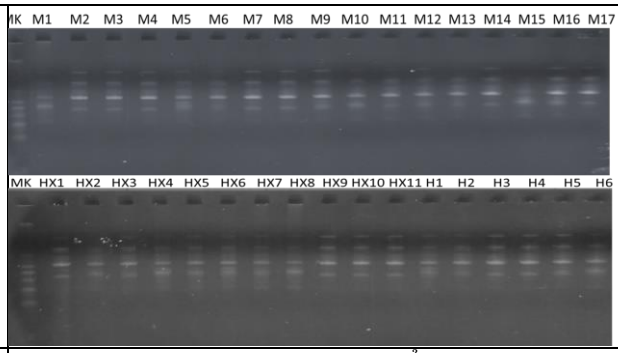
Hình P20-3.9: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi POA-03 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích.



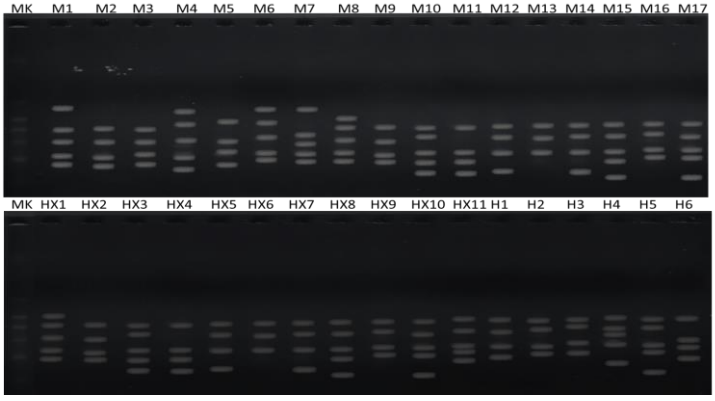
Hình P20-3.10: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi P18 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích.



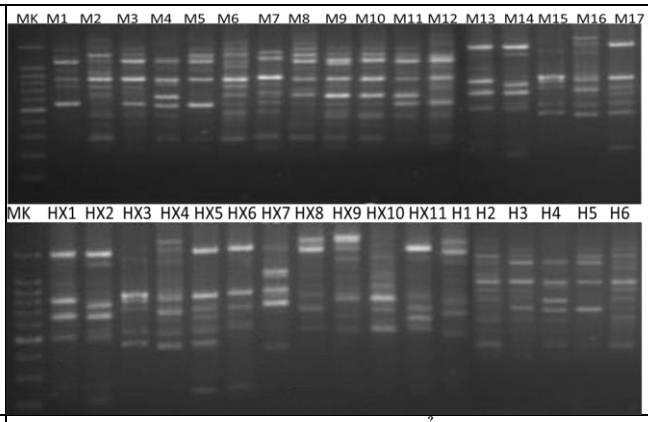
Hình P20-3.11: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi OPF-01 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích.



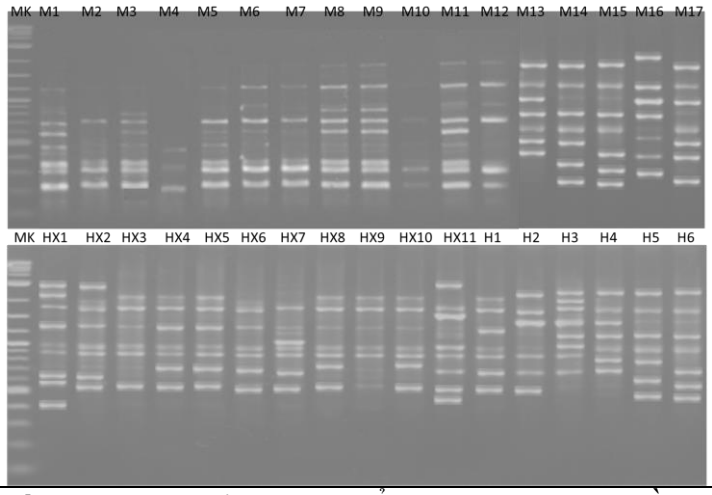
Hình P20-3.12: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi P6 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích



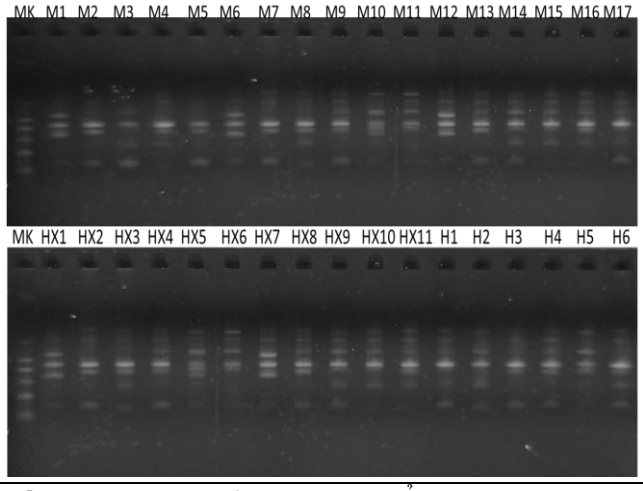
Hình P20-3.13: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi P16 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích



Hình P20-3.13: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi OPF-05 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích



Hình P20-3.13: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi P9 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích



Hình P20-3.13: Điện di sản phẩm PCR-RAPD của mồi OPBH-16 cho 34 mẫu lan được lựa chọn phân tích

PHỤ LỤC 21. SỐ LIỆU XỬ LÝ THỐNG KÊ

Bảng 21.1. Ảnh hưởng của khử trùng và chiếu sáng đến nảy mầm và hình thành protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần nuôi cấy

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
thời gian nảy mầm/tạo protocorm	1	30	69.53	3.681	.951	67.49	71.57	65	77
	2	30	57.07	1.751	.452	56.10	58.04	54	60
	3	30	41.33	3.697	.955	39.29	43.38	35	46
	4	30	42.67	3.063	.791	40.97	44.36	36	46
	Total	120	52.65	12.031	1.553	49.54	55.76	35	77
tỷ lệ hạt nảy mầm	1	30	20.93333	3.692979	.953523	18.88823	22.97844	16.667	30.000
	2	30	46.13333	1.557369	.402111	45.27089	46.99578	44.000	48.667
	3	30	64.75556	3.736280	.964703	62.68647	66.82464	53.333	70.000
	4	30	45.24444	1.761433	.454800	44.26900	46.21989	42.000	48.000
	Total	120	44.26667	15.941607	2.058053	40.14851	48.38482	16.667	70.000
tỷ lệ hạt hạt tạo protocorm	1	30	20.00000	3.075763	.794159	18.29670	21.70330	13.333	26.667
	2	30	41.95556	1.457693	.376375	41.14831	42.76280	40.000	44.667
	3	30	60.88889	3.533663	.912388	58.93201	62.84577	50.000	66.000
	4	30	43.77778	2.220634	.573365	42.54803	45.00752	40.667	48.000
	Total	120	41.65556	14.877018	1.920615	37.81241	45.49870	13.333	66.000
tỷ lệ chết	1	30	76.00000	2.182179	.563436	74.79155	77.20845	71.333	80.000
	2	30	44.40000	3.489667	.901028	42.46749	46.33251	40.000	50.000
	3	30	20.35556	3.710702	.958099	18.30064	22.41047	13.333	26.667
	4	30	22.57778	3.444496	.889365	20.67028	24.48528	16.000	26.667
	Total	120	40.83333	22.783555	2.941344	34.94772	46.71895	13.333	80.000
tỷ lệ nhiễm	1	30	4.88889	4.691544	1.211351	2.29080	7.48698	.000	13.333
	2	30	4.44444	4.114756	1.062425	2.16577	6.72312	.000	13.333
	3	30	4.00000	4.216370	1.088662	1.66505	6.33495	.000	13.333
	4	30	4.35556	3.303357	.852923	2.52622	6.18489	.000	10.000
	Total	120	4.42222	4.018726	.518815	3.38408	5.46037	.000	13.333

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

thời gian nảy mầm/tạo protocorm

	CT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	3	30	41.33		
	4	30	42.67		
	2	30		57.07	
	1	30			69.53
	Sig.		.251	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

tỷ lệ hạt nảy mầm

	CT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	1	30	20.93333		
	4	30		45.24444	
	2	30		46.13333	
	3	30			64.75556
	Sig.		1.000	.401	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

tỷ lệ hạt hạt tạo protocorm

	CT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	1	30	20.00000		
	2	30		41.95556	
	4	30		43.77778	
	3	30			60.88889
	Sig.		1.000	.069	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

tỷ lệ chết

	CT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	3	30	20.35556		
	4	30	22.57778		
	2	30		44.40000	
	1	30			76.00000
	Sig.		.067	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

tỷ lệ nhiễm

	CT	N	Subset for alpha = 0.05
			1
Duncan[a]	3	30	4.00000

	4	30	4.35556
	2	30	4.44444
	1	30	4.88889
	Sig.		.596
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.			

Bảng 21.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 12 tuần theo dõi

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
thời gian nảy mầm/hình thành protocorm	1	30	41.33	3.697	.955	39.29	43.38	35	46
	2	30	54.00	2.699	.697	52.51	55.49	50	58
	3	30	57.53	1.846	.477	56.51	58.56	55	61
	4	30	42.87	2.503	.646	41.48	44.25	38	46
	5	30	63.93	1.907	.492	62.88	64.99	60	67
	Total	150	51.93	9.074	1.048	49.85	54.02	35	67
Tỷ lệ nảy mầm	1	30	64.7556	3.73628	.96470	62.6865	66.8246	53.33	70.00
	2	30	50.4247	4.61737	1.19220	47.8677	52.9817	41.46	57.98
	3	30	47.4447	4.29953	1.11014	45.0637	49.8257	41.56	55.42
	4	30	63.0840	6.52048	1.68358	59.4731	66.6949	50.54	73.45
	5	30	40.2660	4.19989	1.08441	37.9402	42.5918	35.42	47.67
	Total	150	53.1950	10.51703	1.21440	50.7752	55.6147	35.42	73.45
Tỷ lệ hình thành protocorm	1	30	60.8889	3.53366	.91239	58.9320	62.8458	50.00	66.00
	2	30	44.7227	6.25839	1.61591	41.2569	48.1884	32.48	52.67
	3	30	36.8707	5.58437	1.44188	33.7781	39.9632	28.48	45.47
	4	30	59.6180	6.91329	1.78500	55.7895	63.4465	45.84	70.54
	5	30	29.2920	4.39036	1.13359	26.8607	31.7233	21.48	35.78
	Total	150	46.2784	13.58747	1.56895	43.1523	49.4046	21.48	70.54
tỷ lệ hạt chết	1	30	20.3556	3.71070	.95810	18.3006	22.4105	13.33	26.67
	2	30	45.6327	6.24132	1.61150	42.1763	49.0890	33.54	55.32
	3	30	42.0727	5.77470	1.49102	38.8747	45.2706	33.54	51.65
	4	30	22.7113	2.59629	.67036	21.2736	24.1491	18.76	26.76
	5	30	52.6507	7.29629	1.88390	48.6101	56.6912	41.65	63.56
	Total	150	36.6846	13.96580	1.61263	33.4713	39.8978	13.33	63.56

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

thời gian nảy mầm/hình thành protocorm

	CT	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	1	30	41.33			
	4	30	42.87			
	2	30		54.00		
	3	30			57.53	
	5	30				63.93
	Sig.		.113	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

Tỷ lệ nảy mầm

	CT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	5	30	40.2660		
	3	30		47.4447	
	2	30		50.4247	
	4	30			63.0840
	1	30			64.7556
	Sig.		1.000	.092	.341

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

Tỷ lệ hình thành protocorm

	CT	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	5	30	29.2920			
	3	30		36.8707		
	2	30			44.7227	
	4	30				59.6180
	1	30				60.8889
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.527

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

tỷ lệ hạt chết

	CT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	1	30	20.3556		
	4	30	22.7113		
	3	30		42.0727	
	2	30		45.6327	
	5	30			52.6507
	Sig.		.237	.076	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.		a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

Bảng 21.3. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy

Oneway

Descriptives

						95% Confidence Interval for Mean			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
thời gian nảy mầm/ hình thành protocorm	0	30	41.33	3.697	.955	39.29	43.38	35	46
	1	30	36.60	1.882	.486	35.56	37.64	34	40
	2	30	37.47	2.696	.696	35.97	38.96	34	42
	3	30	35.33	2.380	.615	34.02	36.65	30	38
	4	30	28.27	3.555	.918	26.30	30.24	23	34
	5	30	31.33	2.664	.688	29.86	32.81	28	37
	6	30	34.13	2.031	.524	33.01	35.26	30	38
	7	30	33.67	3.086	.797	31.96	35.38	28	38
	8	30	33.93	2.434	.628	32.59	35.28	30	37
	9	30	23.27	1.033	.267	22.69	23.84	21	25
	10	30	29.53	3.583	.925	27.55	31.52	24	35
	Total	330	33.17	5.408	.421	32.34	34.00	21	46
tỷ lệ nảy mầm	0	30	64.7556	3.73628	.96470	62.6865	66.8246	53.33	70.00
	1	30	73.5347	1.97091	.50889	72.4432	74.6261	70.45	75.88
	2	30	75.3920	2.96368	.76522	73.7508	77.0332	70.44	80.43
	3	30	81.6253	2.43709	.62925	80.2757	82.9750	78.45	85.78
	4	30	87.6433	2.46311	.63597	86.2793	89.0074	82.45	91.54
	5	30	81.4020	2.65302	.68501	79.9328	82.8712	76.59	86.54
	6	30	75.8367	2.21451	.57178	74.6103	77.0630	71.34	79.89
	7	30	78.7553	3.12192	.80608	77.0265	80.4842	73.45	84.32
	8	30	77.0900	2.11707	.54663	75.9176	78.2624	73.65	80.76
	9	30	93.4600	1.81177	.46780	92.4567	94.4633	90.43	95.78
	10	30	84.6807	1.89654	.48969	83.6304	85.7309	81.76	88.34
	Total	330	79.4705	7.72650	.60151	78.2828	80.6582	53.33	95.78
tỷ lệ tạo protocorm	0	30	60.8889	3.53366	.91239	58.9320	62.8458	50.00	66.00
	1	30	70.8133	3.37087	.87036	68.9466	72.6801	65.67	78.45
	2	30	72.9133	1.75518	.45319	71.9413	73.8853	70.44	75.67
	3	30	76.2000	1.55311	.40101	75.3399	77.0601	73.58	78.54
	4	30	82.0413	2.35265	.60745	80.7385	83.3442	78.54	85.94
	5	30	77.4127	1.71199	.44203	76.4646	78.3607	74.53	79.68
	6	30	71.2600	3.23692	.83577	69.4675	73.0525	65.67	75.68
	7	30	73.3493	2.05801	.53138	72.2096	74.4890	70.43	76.43
	8	30	73.2033	2.08549	.53847	72.0484	74.3582	70.34	76.56
	9	30	88.7533	2.12427	.54849	87.5769	89.9297	84.32	91.45
	10	30	78.6647	2.16792	.55975	77.4641	79.8652	75.34	82.45
	Total	330	75.0455	7.16972	.55816	73.9434	76.1476	50.00	91.45
tỷ lệ hạt chết	0	30	20.3556	3.71070	.95810	18.3006	22.4105	13.33	26.67
	1	30	19.3300	2.85156	.73627	17.7509	20.9091	15.45	24.56
	2	30	18.5967	2.97501	.76814	16.9492	20.2442	14.23	23.78
	3	30	14.6793	2.59711	.67057	13.2411	16.1176	11.24	19.87
	4	30	10.4933	2.08383	.53804	9.3393	11.6473	7.45	14.65
	5	30	13.1333	2.02896	.52388	12.0097	14.2569	10.43	16.76
	6	30	18.8253	2.71228	.70031	17.3233	20.3273	14.56	22.45
	7	30	13.7907	1.41314	.36487	13.0081	14.5732	11.44	16.32
	8	30	15.7967	3.20494	.82751	14.0218	17.5715	11.34	21.58
	9	30	4.4333	1.42351	.36755	3.6450	5.2216	2.34	6.54
	10	30	13.6053	1.67252	.43184	12.6791	14.5315	10.45	15.87
	Total	330	14.8218	5.06020	.39394	14.0439	15.5996	2.34	26.67

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

thời gian nảy mầm/ hình thành protocorm

			Subset for alpha = 0.05						
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7
Duncan[a]	9	30	23.27						
	4	30		28.27					

	10	30		29.53	29.53				
	5	30			31.33				
	7	30				33.67			
	8	30				33.93			
	6	30				34.13			
	3	30				35.33	35.33		
	1	30					36.60	36.60	
	2	30						37.47	
	0	30							41.33
	Sig.		1.000	.210	.075	.134	.210	.390	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

tỷ lệ nảy mầm

			Subset for alpha = 0.05							
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	0	30	64.7556							
	1	30		73.5347						
	2	30			75.3920					
	6	30			75.8367					
	8	30			77.0900	77.0900				
	7	30				78.7553				
	5	30					81.4020			
	3	30					81.6253			
	10	30						84.6807		
	4	30							87.6433	
	9	30								93.4600
	Sig.		1.000	1.000	.087	.076	.811	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

tỷ lệ tạo protocorm

			Subset for alpha = 0.05							
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	0	30	60.8889							
	1	30		70.8133						
	6	30		71.2600	71.2600					
	2	30			72.9133	72.9133				
	8	30				73.2033				
	7	30				73.3493				
	3	30					76.2000			
	5	30					77.4127	77.4127		
	10	30						78.6647		
	4	30							82.0413	
	9	30								88.7533
	Sig.		1.000	.618	.067	.650	.177	.164	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

tỷ lệ hạt chết

			Subset for alpha = 0.05				
	CT	N	1	2	3	4	5
Duncan[a]	9	30	4.4333				
	4	30		10.4933			
	5	30			13.1333		
	10	30			13.6053		
	7	30			13.7907		
	3	30			14.6793	14.6793	
	8	30				15.7967	
	2	30					18.5967
	6	30					18.8253
	1	30					19.3300
	0	30					20.3556

	Sig.		1.000	1.000	.130	.228	.084
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.							

Số liệu xử lý của số liệu protocorm và mô sẹo xử lý hoá chất.

Bảng 21.4 số liệu thời điểm 4 tuần sau xử lý hoá chất Protocorm bằng DMS

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
tỷ lệ mẫu sống	21.00	90	97.77778	3.849002	2.222222	88.21633	107.33923	93.333	100.000
	111.00	90	87.22222	9.179284	5.299662	64.41962	110.02483	76.667	93.333
	1.00	90	65.55556	8.388705	4.843221	44.71686	86.39425	56.667	73.333
	2.00	90	51.11111	1.924501	1.111111	46.33039	55.89184	50.000	53.333
	3.00	90	17.77778	1.924501	1.111111	12.99705	22.55850	16.667	20.000
	4.00	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	666.00	90	80.55556	9.179284	5.299662	57.75295	103.35816	70.000	86.667
	5.00	90	40.00000	5.773503	3.333333	25.65782	54.34218	33.333	43.333
	6.00	90	18.88889	3.849002	2.222222	9.32744	28.45034	16.667	23.333
	7.00	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	8.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	11.11	90	65.44444	5.058912	2.920764	52.87741	78.01148	60.000	70.000
	9.00	90	18.88889	5.091751	2.939724	6.24028	31.53750	13.333	23.333
	10.00	90	7.77778	3.849002	2.222222	-1.78367	17.33923	3.333	10.000
	11.00	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	12.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	16.16	90	54.77778	10.095837	5.828834	29.69833	79.85723	47.667	66.333
	13.00	90	17.77778	1.924501	1.111111	12.99705	22.55850	16.667	20.000
	14.00	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	15.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	25.34444	8.821711	5.093217	3.43010	47.25879	16.700	34.333
	17.00	90	7.77778	1.924501	1.111111	2.99705	12.55850	6.667	10.000
	18.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	19.00	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	26.83803	30.234996	3.423439	20.02110	33.65497	.000	100.000
tỷ lệ tạo chồi	21.00	90	70.00000	3.333333	1.924501	61.71954	78.28046	66.667	73.333
	111.00	90	43.88889	2.545875	1.469862	37.56458	50.21319	41.667	46.667
	1.00	90	12.22222	3.849002	2.222222	2.66077	21.78367	10.000	16.667
	2.00	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	3.00	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	4.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	666.00	90	34.66667	6.173420	3.564226	19.33104	50.00229	28.333	40.667
	5.00	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	6.00	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	7.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	8.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.11	90	22.36667	6.789944	3.920176	5.49951	39.23382	17.000	30.000
	9.00	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	10.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	12.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.16	90	18.47778	1.555040	.897803	14.61485	22.34071	17.000	20.100
	13.00	90	3.33333	.000000	.000000	3.33333	3.33333	3.333	3.333
	14.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	15.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	12.77778	2.545875	1.469862	6.45347	19.10208	10.000	15.000
	17.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	18.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	19.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000

	Total	2340	9.52821	16.638544	1.883944	5.77679	13.27962	.000	73.333
kích thước mẫu (cm)	21.00	90	.24667	.015275	.008819	.20872	.28461	.230	.260
	111.00	90	.26000	.030000	.017321	.18548	.33452	.230	.290
	1.00	90	.24667	.025166	.014530	.18415	.30918	.220	.270
	2.00	90	.21667	.020817	.012019	.16496	.26838	.200	.240
	3.00	90	.22333	.005774	.003333	.20899	.23768	.220	.230
	4.00	90	.20333	.025166	.014530	.14082	.26585	.180	.230
	666.00	90	.27333	.037859	.021858	.17929	.36738	.230	.300
	5.00	90	.25667	.005774	.003333	.24232	.27101	.250	.260
	6.00	90	.20333	.005774	.003333	.18899	.21768	.200	.210
	7.00	90	.17667	.020817	.012019	.12496	.22838	.160	.200
	8.00	90	.18667	.032146	.018559	.10681	.26652	.150	.210
	11.11	90	.26000	.030000	.017321	.18548	.33452	.230	.290
	9.00	90	.25333	.025166	.014530	.19082	.31585	.230	.280
	10.00	90	.19333	.015275	.008819	.15539	.23128	.180	.210
	11.00	90	.21333	.028868	.016667	.14162	.28504	.180	.230
	12.00	90	.25000	.105357	.060828	-.01172	.51172	.150	.360
	16.16	90	.26000	.030000	.017321	.18548	.33452	.230	.290
	13.00	90	.25667	.015275	.008819	.21872	.29461	.240	.270
	14.00	90	.26000	.010000	.005774	.23516	.28484	.250	.270
	15.00	90	.22000	.060828	.035119	.06890	.37110	.150	.260
	16.00	90	.15000	.000000	.000000	.15000	.15000	.150	.150
	21.21	90	.26000	.030000	.017321	.18548	.33452	.230	.290
	17.00	90	.26000	.036056	.020817	.17043	.34957	.220	.290
	18.00	90	.21167	.056199	.032447	.07206	.35127	.150	.260
	19.00	90	.23000	.020000	.011547	.18032	.27968	.210	.250
	20.00	90	.15000	.000000	.000000	.15000	.15000	.150	.150
	Total	2340	.22776	.044770	.005069	.21766	.23785	.150	.360

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

tỷ lệ mẫu sống

			Subset for alpha = 0.05						
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7
Duncan[a]	16.00	90	.00000						
	20.00	90	.00000						
	15.00	90	2.22222						
	8.00	90	3.33333						
	12.00	90	3.33333						
	18.00	90	3.33333						
	11.00	90	4.44444						
	14.00	90	4.44444						
	7.00	90	5.55556						
	19.00	90	5.55556						
	10.00	90	7.77778						
	17.00	90	7.77778						
	4.00	90	8.88889						
	3.00	90		17.77778					
	13.00	90		17.77778					
	6.00	90		18.88889					
	9.00	90		18.88889					
	21.21	90		25.34444					
	5.00	90			40.00000				
	2.00	90				51.11111			
	16.16	90				54.77778			
	11.11	90					65.44444		
	1.00	90					65.55556		
	666.00	90						80.55556	
	111.00	90						87.22222	
	21.00	90							97.77778
	Sig.		.069	.095	1.000	.361	.978	.100	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

	CT	N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	4.00	90	.00000							
	7.00	90	.00000							
	11.00	90	.00000							
	12.00	90	.00000							
	14.00	90	.00000							
	15.00	90	.00000							
	16.00	90	.00000							
	17.00	90	.00000							
	18.00	90	.00000							
	19.00	90	.00000							
	20.00	90	.00000							
	8.00	90	1.11111	1.11111						
	10.00	90	1.11111	1.11111						
	13.00	90	3.33333	3.33333						
	3.00	90	4.44444	4.44444						
	6.00	90	4.44444	4.44444						
	9.00	90	4.44444	4.44444						
	5.00	90		5.55556	5.55556					
	2.00	90			8.88889	8.88889				
	1.00	90				12.22222				
	21.21	90				12.77778				
	16.16	90					18.47778			
	11.11	90					22.36667			
	666.00	90						34.66667		
	111.00	90							43.88889	
	21.00	90								70.00000
	Sig.		.069	.054	.097	.067	.054	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

kích thước mẫu (cm)

	CT	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan[a]	16.00	90	.15000				
	20.00	90	.15000				
	7.00	90	.17667	.17667			
	8.00	90	.18667	.18667	.18667		
	10.00	90	.19333	.19333	.19333	.19333	
	4.00	90	.20333	.20333	.20333	.20333	
	6.00	90	.20333	.20333	.20333	.20333	
	18.00	90	.21167	.21167	.21167	.21167	.21167
	11.00	90	.21333	.21333	.21333	.21333	.21333
	2.00	90		.21667	.21667	.21667	.21667
	15.00	90		.22000	.22000	.22000	.22000
	3.00	90		.22333	.22333	.22333	.22333
	19.00	90		.23000	.23000	.23000	.23000
	1.00	90			.24667	.24667	.24667
	21.00	90			.24667	.24667	.24667
	12.00	90			.25000	.25000	.25000
	9.00	90			.25333	.25333	.25333
	5.00	90				.25667	.25667
	13.00	90				.25667	.25667
	11.11	90				.26000	.26000
	14.00	90				.26000	.26000
	16.16	90				.26000	.26000
	17.00	90				.26000	.26000
	21.21	90				.26000	.26000
	111.00	90				.26000	.26000
	666.00	90					.27333

	Sig.		.057	.115	.052	.056	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 21.5 số liệu thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất Protocorm bằng DMS

Oneway

Descriptives

						95% Confidence Interval for Mean			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
tỷ lễ mẫu sống	21.00	90	91.11111	8.388705	4.843221	70.27241	111.94981	83.333	100.000
	111.00	90	71.22222	4.947876	2.856658	58.93102	83.51343	67.000	76.667
	1.00	90	51.11111	5.091751	2.939724	38.46250	63.75972	46.667	56.667
	2.00	90	40.00000	3.333333	1.924501	31.71954	48.28046	36.667	43.333
	3.00	90	15.55556	1.924501	1.111111	10.77483	20.33628	13.333	16.667
	4.00	90	6.66667	.000000	.000000	6.66667	6.66667	6.667	6.667
	666.00	90	63.55556	6.336257	3.658239	47.81542	79.29569	57.333	70.000
	5.00	90	33.33333	3.333333	1.924501	25.05287	41.61379	30.000	36.667
	6.00	90	12.22222	3.849002	2.222222	2.66077	21.78367	10.000	16.667
	7.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	8.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	11.11	90	57.77778	8.388705	4.843221	36.93908	78.61648	50.000	66.667
	9.00	90	15.55556	1.924501	1.111111	10.77483	20.33628	13.333	16.667
	10.00	90	5.55556	5.091751	2.939724	-7.09305	18.20417	.000	10.000
	11.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	12.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	16.16	90	48.77778	4.220760	2.436857	38.29283	59.26273	45.000	53.333
	13.00	90	14.44444	1.924501	1.111111	9.66372	19.22517	13.333	16.667
	14.00	90	3.33333	.000000	.000000	3.33333	3.33333	3.333	3.333
	15.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	21.55556	5.003702	2.888889	9.12567	33.98544	16.667	26.667
	17.00	90	6.66667	3.333333	1.924501	-1.61379	14.94713	3.333	10.000
	18.00	90	2.22222	3.849002	2.222222	-7.33923	11.78367	.000	6.667
	19.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	22.24786	26.011288	2.945198	16.38322	28.11250	.000	100.000
tỷ lệ tạo chồi	21.00	90	84.44444	5.091751	2.939724	71.79583	97.09305	80.000	90.000
	111.00	90	48.55556	3.168128	1.829120	40.68549	56.42562	45.333	51.667
	1.00	90	21.11111	1.924501	1.111111	16.33039	25.89184	20.000	23.333
	2.00	90	17.77778	1.924501	1.111111	12.99705	22.55850	16.667	20.000
	3.00	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	4.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	666.00	90	44.55556	3.338884	1.927706	36.26131	52.84980	41.333	48.000
	5.00	90	15.55556	5.091751	2.939724	2.90695	28.20417	10.000	20.000
	6.00	90	6.66667	3.333333	1.924501	-1.61379	14.94713	3.333	10.000
	7.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	8.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.11	90	31.70000	3.756920	2.169059	22.36729	41.03271	27.667	35.100
	9.00	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	10.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	11.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	12.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	16.16	90	23.77778	4.060697	2.344444	13.69045	33.86511	21.433	28.467
	13.00	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	14.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	15.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	15.27778	2.819443	1.627806	8.27389	22.28166	12.533	18.167
	17.00	90	3.33333	.000000	.000000	3.33333	3.33333	3.333	3.333
	18.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	19.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	13.48205	19.688478	2.229281	9.04299	17.92112	.000	90.000
kích thước mẫu (cm)	21.00	90	.56667	.025166	.014530	.50415	.62918	.540	.590

	111.00	90	.45667	.015275	.008819	.41872	.49461	.440	.470
	1.00	90	.42333	.037859	.021858	.32929	.51738	.380	.450
	2.00	90	.37000	.020000	.011547	.32032	.41968	.350	.390
	3.00	90	.39000	.020000	.011547	.34032	.43968	.370	.410
	4.00	90	.39333	.041633	.024037	.28991	.49676	.360	.440
	666.00	90	.38333	.025166	.014530	.32082	.44585	.360	.410
	5.00	90	.37333	.045092	.026034	.26132	.48535	.330	.420
	6.00	90	.38333	.011547	.006667	.35465	.41202	.370	.390
	7.00	90	.33667	.119304	.068880	.04030	.63303	.200	.420
	8.00	90	.28667	.118462	.068394	-.00761	.58094	.150	.360
	11.11	90	.36333	.068069	.039299	.19424	.53243	.310	.440
	9.00	90	.35333	.020817	.012019	.30162	.40504	.330	.370
	10.00	90	.31333	.122202	.070553	.00977	.61690	.180	.420
	11.00	90	.29000	.095394	.055076	.05303	.52697	.180	.350
	12.00	90	.32000	.147309	.085049	-.04594	.68594	.150	.410
	16.16	90	.45000	.045826	.026458	.33616	.56384	.400	.490
	13.00	90	.40000	.026458	.015275	.33428	.46572	.370	.420
	14.00	90	.34667	.005774	.003333	.33232	.36101	.340	.350
	15.00	90	.25333	.089629	.051747	.03068	.47598	.150	.310
	16.00	90	.15000	.000000	.000000	.15000	.15000	.150	.150
	21.21	90	.37667	.061101	.035277	.22488	.52845	.310	.430
	17.00	90	.36667	.047258	.027285	.24927	.48406	.330	.420
	18.00	90	.25667	.110151	.063596	-.01696	.53030	.150	.370
	19.00	90	.32333	.102632	.059255	.06838	.57829	.210	.410
	20.00	90	.15000	.000000	.000000	.15000	.15000	.150	.150
	Total	2340	.34910	.103875	.011762	.32568	.37252	.150	.590
ty le mau bien di	21.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	111.00	90	7.83333	1.589899	.917928	3.88381	11.78286	6.833	9.667
	1.00	90	13.36667	3.855299	2.225858	3.78957	22.94376	10.800	17.800
	2.00	90	11.35556	3.355482	1.937288	3.02008	19.69103	7.800	14.467
	3.00	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	4.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	666.00	90	14.12222	3.447114	1.990192	5.55912	22.68533	10.867	17.733
	5.00	90	10.37778	3.913699	2.259575	.65561	20.09994	6.667	14.467
	6.00	90	4.33333	.940449	.542969	1.99713	6.66954	3.333	5.200
	7.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	8.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.11	90	10.68889	3.033394	1.751331	3.15352	18.22426	7.667	13.733
	9.00	90	6.80000	3.341324	1.929114	-1.50031	15.10031	3.333	10.000
	10.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	11.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	12.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	16.16	90	13.34444	3.874465	2.236924	3.71974	22.96915	10.767	17.800
	13.00	90	6.55556	1.524734	.880306	2.76791	10.34321	4.833	7.733
	14.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	15.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	10.83333	3.135460	1.810259	3.04442	18.62225	7.767	14.033
	17.00	90	3.33333	.000000	.000000	3.33333	3.33333	3.333	3.333
	18.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	19.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	5.07051	5.189172	.587558	3.90054	6.24049	.000	17.800

Homogeneous Subsets

tỷ lệ mầu sống

			Subset for alpha = 0.05										
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Duncan[a]	16.00	90	.00000									
	20.00	90	.00000									
	8.00	90	2.22222									
	15.00	90	2.22222									
	18.00	90	2.22222									
	7.00	90	3.33333									
	11.00	90	3.33333									

	12.00	90	3.33333									
	14.00	90	3.33333									
	19.00	90	3.33333									
	10.00	90	5.55556	5.55556								
	4.00	90	6.66667	6.66667								
	17.00	90	6.66667	6.66667								
	6.00	90		12.22222	12.22222							
	13.00	90			14.44444	14.44444						
	3.00	90			15.55556	15.55556						
	9.00	90			15.55556	15.55556						
	21.21	90				21.55556						
	5.00	90					33.33333					
	2.00	90						40.00000				
	16.16	90							48.77778			
	1.00	90							51.11111			
	11.11	90								57.77778		
	666.00	90								63.55556		
	111.00	90									71.22222	
	21.00	90										91.11111
	Sig.		.100	.070	.366	.053	1.000	1.000	.483	.086	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

			Subset for alpha = 0.05									
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Duncan[a]	15.00	90	.00000									
	16.00	90	.00000									
	18.00	90	.00000									
	20.00	90	.00000									
	7.00	90	1.11111	1.11111								
	8.00	90	1.11111	1.11111								
	11.00	90	1.11111	1.11111								
	19.00	90	1.11111	1.11111								
	4.00	90	2.22222	2.22222	2.22222							
	12.00	90	2.22222	2.22222	2.22222							
	14.00	90	2.22222	2.22222	2.22222							
	10.00	90	3.33333	3.33333	3.33333							
	17.00	90	3.33333	3.33333	3.33333							
	3.00	90		5.55556	5.55556	5.55556						
	6.00	90			6.66667	6.66667						
	9.00	90				8.88889						
	13.00	90				8.88889						
	21.21	90					15.27778					
	5.00	90					15.55556					
	2.00	90					17.77778	17.77778				
	1.00	90						21.11111	21.11111			
	16.16	90							23.77778			
	11.11	90								31.70000		
	666.00	90									44.55556	
	111.00	90									48.55556	
	21.00	90										84.44444
	Sig.		.203	.085	.077	.162	.277	.125	.218	1.000	.067	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

kích thước mẫu (cm)

	CT	N	Subset for alpha = 0.05						
			1	2	3	4	5	6	7
Duncan[a]	16.00	90	.15000						

20.00	90	.15000							
15.00	90	.25333	.25333						
18.00	90	.25667	.25667	.25667					
8.00	90		.28667	.28667	.28667				
11.00	90		.29000	.29000	.29000				
10.00	90		.31333	.31333	.31333	.31333			
12.00	90		.32000	.32000	.32000	.32000	.32000		
19.00	90		.32333	.32333	.32333	.32333	.32333		
7.00	90		.33667	.33667	.33667	.33667	.33667		
14.00	90		.34667	.34667	.34667	.34667	.34667		
9.00	90		.35333	.35333	.35333	.35333	.35333		
11.11	90		.36333	.36333	.36333	.36333	.36333		
17.00	90		.36667	.36667	.36667	.36667	.36667		
2.00	90		.37000	.37000	.37000	.37000	.37000		
5.00	90		.37333	.37333	.37333	.37333	.37333		
21.21	90		.37667	.37667	.37667	.37667	.37667		
6.00	90		.38333	.38333	.38333	.38333	.38333		
666.00	90		.38333	.38333	.38333	.38333	.38333		
3.00	90		.39000	.39000	.39000	.39000	.39000		
4.00	90			.39333	.39333	.39333	.39333		
13.00	90				.40000	.40000	.40000		
1.00	90				.42333	.42333	.42333		
16.16	90					.45000	.45000	.45000	
111.00	90						.45667	.45667	
21.00	90							.56667	
Sig.		.092	.054	.054	.054	.054	.054	.057	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ty le mau bien di

	CT	N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	15.00	90	.00000							
	16.00	90	.00000							
	18.00	90	.00000							
	20.00	90	.00000							
	21.00	90	.00000							
	7.00	90	1.11111	1.11111						
	8.00	90	1.11111	1.11111						
	11.00	90	1.11111	1.11111						
	14.00	90	1.11111	1.11111						
	19.00	90	1.11111	1.11111						
	4.00	90	2.22222	2.22222	2.22222					
	12.00	90	2.22222	2.22222	2.22222					
	10.00	90	3.33333	3.33333	3.33333	3.33333				
	17.00	90	3.33333	3.33333	3.33333	3.33333				
	6.00	90	4.33333	4.33333	4.33333	4.33333	4.33333			
	3.00	90		5.55556	5.55556	5.55556	5.55556			
	13.00	90			6.55556	6.55556	6.55556	6.55556		
	9.00	90				6.80000	6.80000	6.80000		
	111.00	90					7.83333	7.83333	7.83333	
	5.00	90						10.37778	10.37778	10.37778
	11.11	90						10.68889	10.68889	10.68889

	21.21	90						10.83333	10.83333	10.83333
	2.00	90							11.35556	11.35556
	16.16	90								13.34444
	1.00	90								13.36667
	666.00	90								14.12222
	Sig.		.069	.057	.055	.121	.111	.055	.109	.098
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.										
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.										

Bảng 21.6. số liệu thời điểm 4 tuần sau xử lý hoá chất Protocorm bằng colchicine

Oneway

Descriptives

						95% Confidence Interval for Mean			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
kích thước mẫu (cm)	1	90	.3800	.03606	.02082	.2904	.4696	.35	.42
	2	90	.3867	.04509	.02603	.2747	.4987	.34	.43
	3	90	.3733	.05132	.02963	.2459	.5008	.33	.43
	4	90	.2867	.06658	.03844	.1213	.4521	.23	.36
	5	90	.3867	.06658	.03844	.2213	.5521	.31	.43
	6	90	.3467	.01528	.00882	.3087	.3846	.33	.36
	7	90	.3067	.04163	.02404	.2032	.4101	.26	.34
	8	90	.4300	.02000	.01155	.3803	.4797	.41	.45
	9	90	.2767	.02517	.01453	.2142	.3392	.25	.30
	10	90	.2967	.06807	.03930	.1276	.4658	.22	.35
	11	90	.3333	.01528	.00882	.2954	.3713	.32	.35
	12	90	.3767	.02082	.01202	.3250	.4284	.36	.40
	13	90	.4000	.03464	.02000	.3139	.4861	.36	.42
	14	90	.3200	.02000	.01155	.2703	.3697	.30	.34
	15	90	.1500	.00000	.00000	.1500	.1500	.15	.15
	16	90	.3200	.02000	.01155	.2703	.3697	.30	.34
	17	90	.2933	.00577	.00333	.2790	.3077	.29	.30
	18	90	.3033	.02517	.01453	.2408	.3658	.28	.33
	19	90	.3633	.01528	.00882	.3254	.4013	.35	.38
	20	90	.1500	.00000	.00000	.1500	.1500	.15	.15
	21	90	.4233	.00577	.00333	.4090	.4377	.42	.43
	22	90	.3567	.04041	.02333	.2563	.4571	.32	.40
	23	90	.3033	.13868	.08007	-.0412	.6478	.15	.42
	24	90	.2433	.16166	.09333	-.1582	.6449	.15	.43
	25	90	.1500	.00000	.00000	.1500	.1500	.15	.15
	26	90	.2567	.00577	.00333	.2423	.2710	.25	.26
	Total	2340	.3159	.08865	.01004	.2959	.3359	.15	.45
tỷ lệ mẫu sống	1	90	75.5556	10.18350	5.87945	50.2583	100.8528	66.67	86.67
	2	90	70.0000	12.01850	6.93889	40.1444	99.8556	60.00	83.33
	3	90	57.7778	8.38870	4.84322	36.9391	78.6165	50.00	66.67
	4	90	40.0000	10.00000	5.77350	15.1586	64.8414	30.00	50.00
	5	90	11.1111	5.09175	2.93972	-1.5375	23.7597	6.67	16.67
	6	90	67.7778	6.93889	4.00617	50.5406	85.0149	60.00	73.33
	7	90	58.8889	8.38870	4.84322	38.0502	79.7276	50.00	66.67
	8	90	44.4444	8.38870	4.84322	23.6057	65.2831	36.67	53.33
	9	90	14.4444	5.09175	2.93972	1.7958	27.0931	10.00	20.00
	10	90	4.4444	1.92450	1.11111	-.3363	9.2252	3.33	6.67
	11	90	52.2222	3.84900	2.22222	42.6608	61.7837	50.00	56.67
	12	90	44.4444	8.38870	4.84322	23.6057	65.2831	36.67	53.33
	13	90	22.2222	10.71517	6.18640	-4.3957	48.8402	10.00	30.00
	14	90	8.8889	1.92450	1.11111	4.1082	13.6696	6.67	10.00
	15	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	16	90	47.7778	1.92450	1.11111	42.9971	52.5585	46.67	50.00
	17	90	30.0000	5.77350	3.33333	15.6578	44.3422	23.33	33.33
	18	90	20.0000	3.33333	1.92450	11.7195	28.2805	16.67	23.33
	19	90	5.5556	1.92450	1.11111	.7748	10.3363	3.33	6.67
	20	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	21	90	23.3333	6.66667	3.84900	6.7724	39.8943	16.67	30.00
	22	90	14.4444	1.92450	1.11111	9.6637	19.2252	13.33	16.67
	23	90	3.3333	3.33333	1.92450	-4.9471	11.6138	.00	6.67

	24	90	1.1111	1.92450	1.11111	-3.6696	5.8918	.00	3.33
	25	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	26	90	95.5556	3.84900	2.22222	85.9941	105.1170	93.33	100.00
	Total	2340	31.2821	27.87434	3.15615	24.9974	37.5667	.00	100.00
tỷ lệ tạo chồi	1	90	22.2222	5.09175	2.93972	9.5736	34.8708	16.67	26.67
	2	90	13.3333	3.33333	1.92450	5.0529	21.6138	10.00	16.67
	3	90	5.5556	3.84900	2.22222	-4.0059	15.1170	3.33	10.00
	4	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	5	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	6	90	20.0000	3.33333	1.92450	11.7195	28.2805	16.67	23.33
	7	90	11.1111	1.92450	1.11111	6.3304	15.8918	10.00	13.33
	8	90	11.1111	8.38870	4.84322	-9.7276	31.9498	3.33	20.00
	9	90	1.1111	1.92450	1.11111	-3.6696	5.8918	.00	3.33
	10	90	1.1111	1.92450	1.11111	-3.6696	5.8918	.00	3.33
	11	90	18.8889	5.09175	2.93972	6.2403	31.5375	13.33	23.33
	12	90	12.2222	1.92450	1.11111	7.4415	17.0029	10.00	13.33
	13	90	10.0000	5.77350	3.33333	-4.3422	24.3422	3.33	13.33
	14	90	2.2222	1.92450	1.11111	-2.5585	7.0029	.00	3.33
	15	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	16	90	18.8889	1.92450	1.11111	14.1082	23.6696	16.67	20.00
	17	90	13.3333	3.33333	1.92450	5.0529	21.6138	10.00	16.67
	18	90	11.1111	5.09175	2.93972	-1.5375	23.7597	6.67	16.67
	19	90	1.1111	1.92450	1.11111	-3.6696	5.8918	.00	3.33
	20	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	21	90	10.0000	3.33333	1.92450	1.7195	18.2805	6.67	13.33
	22	90	5.5556	1.92450	1.11111	.7748	10.3363	3.33	6.67
	23	90	1.1111	1.92450	1.11111	-3.6696	5.8918	.00	3.33
	24	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	25	90	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	26	90	80.0000	5.77350	3.33333	65.6578	94.3422	73.33	83.33
	Total	2340	10.3846	15.98142	1.80954	6.7814	13.9879	.00	83.33

Homogeneous Subsets

kích thước mẫu (cm)

			Subset for alpha = 0.05							
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	15	90	.1500							
	20	90	.1500							
	25	90	.1500							
	24	90	.2433	.2433						
	26	90		.2567	.2567					
	9	90		.2767	.2767	.2767				
	4	90		.2867	.2867	.2867	.2867			
	17	90		.2933	.2933	.2933	.2933			
	10	90		.2967	.2967	.2967	.2967	.2967		
	23	90		.3033	.3033	.3033	.3033	.3033		
	18	90		.3033	.3033	.3033	.3033	.3033		
	7	90		.3067	.3067	.3067	.3067	.3067		
	14	90		.3200	.3200	.3200	.3200	.3200	.3200	
	16	90		.3200	.3200	.3200	.3200	.3200	.3200	
	11	90		.3333	.3333	.3333	.3333	.3333	.3333	.3333
	6	90		.3467	.3467	.3467	.3467	.3467	.3467	.3467
	22	90			.3567	.3567	.3567	.3567	.3567	.3567
	19	90				.3633	.3633	.3633	.3633	.3633
	3	90				.3733	.3733	.3733	.3733	.3733
	12	90				.3767	.3767	.3767	.3767	.3767
	1	90				.3800	.3800	.3800	.3800	.3800
	2	90					.3867	.3867	.3867	.3867
	5	90					.3867	.3867	.3867	.3867
	13	90						.4000	.4000	.4000
	21	90							.4233	.4233
	8	90								.4300
	Sig.		.053	.051	.059	.054	.063	.054	.051	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ mẫu sống

	CT	N	Subset for alpha = 0.05													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Duncan[a]	15	90	.0000													
	20	90	.0000													
	25	90	.0000													
	24	90	1.1111													
	23	90	3.3333	3.3333												
	10	90	4.4444	4.4444												
	19	90	5.5556	5.5556												
	14	90	8.8889	8.8889	8.8889											
	5	90	11.1111	11.1111	11.1111	11.1111										
	9	90		14.4444	14.4444	14.4444	14.4444									
	22	90		14.4444	14.4444	14.4444	14.4444									
	18	90			20.0000	20.0000	20.0000	20.0000								
	13	90				22.2222	22.2222	22.2222								
	21	90					23.3333	23.3333								
	17	90						30.0000	30.0000							
	4	90							40.0000	40.0000						
	8	90								44.4444	44.4444					
	12	90								44.4444	44.4444					
	16	90								47.7778	47.7778	47.7778				
	11	90									52.2222	52.2222	52.2222			
	3	90										57.7778	57.7778	57.7778		
	7	90											58.8889	58.8889		
	6	90												67.7778	67.7778	
	2	90													70.0000	
	1	90													75.5556	
	26	90														95.5556
	Sig.		.066	.061	.053	.053	.123	.075	.053	.167	.167	.066	.220	.066	.152	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

	CT	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan[a]	4	90	.0000					
	5	90	.0000					
	15	90	.0000					
	20	90	.0000					
	24	90	.0000					
	25	90	.0000					
	9	90	1.1111					
	10	90	1.1111					
	19	90	1.1111					
	23	90	1.1111					
	14	90	2.2222					
	3	90	5.5556	5.5556				
	22	90	5.5556	5.5556				
	13	90		10.0000	10.0000			
	21	90		10.0000	10.0000			
	18	90		11.1111	11.1111			
	7	90		11.1111	11.1111			
	8	90		11.1111	11.1111			
	12	90			12.2222			
	2	90			13.3333	13.3333		
	17	90			13.3333	13.3333		
	11	90				18.8889	18.8889	
	16	90				18.8889	18.8889	
	6	90					20.0000	
	1	90					22.2222	

	26	90						80.0000
	Sig.		.107	.092	.319	.075	.287	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.								
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.								

Bảng 21.7. số liệu thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất Protocorm bằng colchicine

Oneway

Descriptives

						95% Confidence Interval for Mean			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
tỷ lệ mẫu sống	1	90	65.55556	8.388705	4.843221	44.71686	86.39425	56.667	73.333
	2	90	60.00000	10.000000	5.773503	35.15862	84.84138	50.000	70.000
	3	90	55.55556	6.938887	4.006168	38.31841	72.79271	50.000	63.333
	4	90	28.88889	10.715168	6.186405	2.27094	55.50684	16.667	36.667
	5	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	6	90	64.44444	6.938887	4.006168	47.20729	81.68159	56.667	70.000
	7	90	54.44444	6.938887	4.006168	37.20729	71.68159	46.667	60.000
	8	90	37.77778	7.698004	4.444444	18.65488	56.90068	33.333	46.667
	9	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	10	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	11	90	43.33333	6.666667	3.849002	26.77242	59.89425	36.667	50.000
	12	90	34.44444	10.715168	6.186405	7.82649	61.06240	26.667	46.667
	13	90	15.55556	8.388705	4.843221	-5.28314	36.39425	6.667	23.333
	14	90	7.77778	1.924501	1.111111	2.99705	12.55850	6.667	10.000
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	43.33333	6.666667	3.849002	26.77242	59.89425	36.667	50.000
	17	90	25.55556	3.849002	2.222222	15.99411	35.11701	23.333	30.000
	18	90	14.44444	1.924501	1.111111	9.66372	19.22517	13.333	16.667
	19	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	17.77778	5.091751	2.939724	5.12917	30.42639	13.333	23.333
	22	90	13.33333	.000000	.000000	13.33333	13.33333	13.333	13.333
	23	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	24	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	86.66667	5.773503	3.333333	72.32449	101.00884	83.333	93.333
	Total	2340	26.70940	25.473828	2.884343	20.96594	32.45286	.000	93.333
tỷ lệ tạo chồi	1	90	52.22222	1.924501	1.111111	47.44150	57.00295	50.000	53.333
	2	90	43.33333	6.666667	3.849002	26.77242	59.89425	36.667	50.000
	3	90	44.44444	8.388705	4.843221	23.60575	65.28314	36.667	53.333
	4	90	22.22222	11.706282	6.758625	-6.85779	51.30224	10.000	33.333
	5	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	6	90	55.55556	6.938887	4.006168	38.31841	72.79271	50.000	63.333
	7	90	46.66667	8.819171	5.091751	24.75863	68.57470	36.667	53.333
	8	90	30.00000	11.547005	6.666667	1.31565	58.68435	23.333	43.333
	9	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	10	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	11	90	34.44444	6.938887	4.006168	17.20729	51.68159	26.667	40.000
	12	90	25.55556	12.619796	7.286043	-5.79376	56.90487	16.667	40.000
	13	90	7.77778	6.938887	4.006168	-9.45937	25.01493	.000	13.333
	14	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	35.55556	6.938887	4.006168	18.31841	52.79271	30.000	43.333
	17	90	24.44444	5.091751	2.939724	11.79583	37.09305	20.000	30.000
	18	90	13.33333	3.333333	1.924501	5.05287	21.61379	10.000	16.667
	19	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	16.66667	3.333333	1.924501	8.38621	24.94713	13.333	20.000
	22	90	12.22222	1.924501	1.111111	7.44150	17.00295	10.000	13.333
	23	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	24	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	70.00000	3.333333	1.924501	61.71954	78.28046	66.667	73.333
	Total	2340	21.28205	21.090274	2.388003	16.52693	26.03717	.000	73.333

kích thước mẫu (cm)	1	90	.61000	.098489	.056862	.36534	.85466	.530	.720
	2	90	.61000	.045826	.026458	.49616	.72384	.560	.650
	3	90	.64667	.092916	.053645	.41585	.87748	.570	.750
	4	90	.68333	.066583	.038442	.51793	.84874	.640	.760
	5	90	.63333	.072342	.041767	.45363	.81304	.550	.680
	6	90	.59667	.047258	.027285	.47927	.71406	.560	.650
	7	90	.62000	.070000	.040415	.44611	.79389	.540	.670
	8	90	.65000	.080000	.046188	.45127	.84873	.570	.730
	9	90	.63000	.043589	.025166	.52172	.73828	.580	.660
	10	90	.46667	.214554	.123873	-.06631	.99965	.220	.610
	11	90	.59000	.026458	.015275	.52428	.65572	.570	.620
	12	90	.49667	.056862	.032830	.35541	.63792	.450	.560
	13	90	.56333	.025166	.014530	.50082	.62585	.540	.590
	14	90	.62333	.072342	.041767	.44363	.80304	.540	.670
	15	90	.15000	.000000	.000000	.15000	.15000	.150	.150
	16	90	.58333	.025166	.014530	.52082	.64585	.560	.610
	17	90	.57667	.025166	.014530	.51415	.63918	.550	.600
	18	90	.59333	.055076	.031798	.45652	.73015	.530	.630
	19	90	.62000	.050000	.028868	.49579	.74421	.570	.670
	20	90	.15000	.000000	.000000	.15000	.15000	.150	.150
	21	90	.62333	.030551	.017638	.54744	.69922	.590	.650
	22	90	.63000	.043589	.025166	.52172	.73828	.580	.660
	23	90	.49667	.300222	.173333	-.24913	1.24246	.150	.670
	24	90	.32333	.300222	.173333	-.42246	1.06913	.150	.670
	25	90	.15000	.000000	.000000	.15000	.15000	.150	.150
	26	90	.44667	.015275	.008819	.40872	.48461	.430	.460
	Total	2340	.52936	.179851	.020364	.48881	.56991	.150	.760
tỷ lệ mẫu xuất hiện biến dị	1	90	16.22222	3.906310	2.255309	6.51841	25.92603	13.333	20.667
	2	90	18.88889	3.849002	2.222222	9.32744	28.45034	16.667	23.333
	3	90	27.44444	5.590998	3.227964	13.55564	41.33325	21.000	31.000
	4	90	18.55556	9.639809	5.565547	-5.39106	42.50217	10.000	29.000
	5	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	6	90	31.66667	7.264832	4.194352	13.61982	49.71351	23.333	36.667
	7	90	35.55556	8.388705	4.843221	14.71686	56.39425	26.667	43.333
	8	90	23.37778	11.508708	6.644556	-5.21144	51.96699	16.667	36.667
	9	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	10	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	11	90	26.66667	8.819171	5.091751	4.75863	48.57470	16.667	33.333
	12	90	21.11111	13.877773	8.012336	-13.36319	55.58541	10.000	36.667
	13	90	7.77778	6.938887	4.006168	-9.45937	25.01493	.000	13.333
	14	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	30.15556	6.735093	3.888508	13.42466	46.88645	23.333	36.800
	17	90	18.88889	3.849002	2.222222	9.32744	28.45034	16.667	23.333
	18	90	13.33333	3.333333	1.924501	5.05287	21.61379	10.000	16.667
	19	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	12.22222	3.849002	2.222222	2.66077	21.78367	10.000	16.667
	22	90	11.11111	3.849002	2.222222	1.54966	20.67256	6.667	13.333
	23	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	24	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	12.76410	12.298057	1.392481	9.99132	15.53689	.000	43.333

Homogeneous Subsets

tỷ lệ mẫu sống														
			Subset for alpha = 0.05											
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Duncan[a]	15	90	.00000											
	20	90	.00000											
	25	90	.00000											
	24	90	1.11111											
	10	90	2.22222											
	23	90	3.33333	3.33333										

	19	90	4.44444	4.44444	4.44444										
	5	90	5.55556	5.55556	5.55556	5.55556									
	14	90	7.77778	7.77778	7.77778	7.77778	7.77778								
	9	90	8.88889	8.88889	8.88889	8.88889	8.88889								
	22	90		13.33333	13.33333	13.33333	13.33333								
	18	90			14.44444	14.44444	14.44444								
	13	90				15.55556	15.55556								
	21	90					17.77778	17.77778							
	17	90						25.55556	25.55556						
	4	90							28.88889	28.88889					
	12	90							34.44444	34.44444	34.44444				
	8	90								37.77778	37.77778				
	11	90									43.33333				
	16	90									43.33333				
	7	90										54.44444			
	3	90										55.55556	55.55556		
	2	90										60.00000	60.00000		
	6	90										64.44444	64.44444		
	1	90											65.55556		
	26	90													86.66667
	Sig.		.120	.068	.068	.068	.068	.106	.081	.081	.091	.057	.057	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

			Subset for alpha = 0.05												
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Duncan[a]	10	90	.00000												
	15	90	.00000												
	20	90	.00000												
	25	90	.00000												
	5	90	1.11111	1.11111											
	24	90	1.11111	1.11111											
	9	90	3.33333	3.33333	3.33333										
	23	90	3.33333	3.33333	3.33333										
	19	90	4.44444	4.44444	4.44444										
	14	90	5.55556	5.55556	5.55556										
	13	90	7.77778	7.77778	7.77778	7.77778									
	22	90		12.22222	12.22222	12.22222	12.22222								
	18	90			13.33333	13.33333	13.33333								
	21	90				16.66667	16.66667	16.66667							
	4	90					22.22222	22.22222	22.22222						
	17	90						24.44444	24.44444	24.44444					
	12	90						25.55556	25.55556	25.55556	25.55556				
	8	90							30.00000	30.00000	30.00000				
	11	90								34.44444	34.44444	34.44444			
	16	90									35.55556	35.55556			
	2	90										43.33333	43.33333		
	3	90										44.44444	44.44444		
	7	90											46.66667	46.66667	
	1	90											52.22222	52.22222	
	6	90												55.55556	
	26	90													70.00000
	Sig.		.187	.053	.079	.100	.064	.100	.150	.064	.064	.064	.100	.089	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

kích thước mẫu (cm)

			Subset for alpha = 0.05			
	CT	N	1	2	3	4
Duncan[a]	15	90	.15000			
	20	90	.15000			

	25	90	.15000			
	24	90	.32333	.32333		
	26	90		.44667	.44667	
	10	90		.46667	.46667	
	12	90		.49667	.49667	.49667
	23	90		.49667	.49667	.49667
	13	90			.56333	.56333
	17	90			.57667	.57667
	16	90			.58333	.58333
	11	90			.59000	.59000
	18	90			.59333	.59333
	6	90			.59667	.59667
	1	90			.61000	.61000
	2	90			.61000	.61000
	7	90			.62000	.62000
	19	90			.62000	.62000
	14	90			.62333	.62333
	21	90			.62333	.62333
	9	90			.63000	.63000
	22	90			.63000	.63000
	5	90			.63333	.63333
	3	90			.64667	.64667
	8	90			.65000	.65000
	4	90				.68333
	Sig.		.071	.078	.060	.084

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ mẫu xuất hiện biến dị

			Subset for alpha = 0.05								
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	10	90	.00000								
	15	90	.00000								
	20	90	.00000								
	25	90	.00000								
	26	90	.00000								
	5	90	1.11111								
	24	90	1.11111								
	9	90	3.33333	3.33333							
	23	90	3.33333	3.33333							
	19	90	4.44444	4.44444							
	14	90	5.55556	5.55556	5.55556						
	13	90	7.77778	7.77778	7.77778						
	22	90	11.11111	11.11111	11.11111	11.11111					
	21	90		12.22222	12.22222	12.22222					
	18	90		13.33333	13.33333	13.33333	13.33333				
	1	90			16.22222	16.22222	16.22222	16.22222			
	4	90				18.55556	18.55556	18.55556	18.55556		
	2	90				18.88889	18.88889	18.88889	18.88889		
	17	90				18.88889	18.88889	18.88889	18.88889		
	12	90				21.11111	21.11111	21.11111	21.11111	21.11111	
	8	90					23.37778	23.37778	23.37778	23.37778	
	11	90						26.66667	26.66667	26.66667	26.66667
	3	90							27.44444	27.44444	27.44444
	16	90								30.15556	30.15556
	6	90								31.66667	31.66667
	7	90									35.55556
	Sig.		.054	.074	.050	.074	.069	.059	.109	.053	.098

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 21.8. Số liệu thời điểm 4 tuần sau xử lý hoá chất mô sẹo bằng DMS

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
tỷ lễ mẫu sống	1	90	57.77667	5.905002	4.839854	53.04438	62.50895	55.870	59.680
	2	90	52.22333	5.465867	4.011019	43.61364	60.83302	48.610	55.520
	3	90	46.76000	2.978110	1.924712	44.33024	49.18976	45.830	47.780
	4	90	33.33333	2.457078	1.918595	27.22961	39.43705	30.820	35.730
	5	90	8.88667	2.511892	1.109541	7.61506	10.15828	8.430	9.440
	6	90	47.77778	2.585716	1.112864	41.35450	54.20105	45.933	50.733
	7	90	44.44444	1.838870	1.108322	42.36057	46.52831	43.667	45.333
	8	90	34.44111	1.150480	1.114230	31.58316	37.29906	33.333	35.630
	9	90	15.55556	4.091751	1.109724	2.90695	28.20417	10.000	20.000
	10	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	11	90	46.67000	2.890000	1.921192	41.97498	51.36502	44.780	48.560
	12	90	37.77778	3.811366	2.915793	33.27809	42.27746	36.230	39.770
	13	90	18.89111	3.948017	2.944688	14.05197	23.73025	16.760	20.580
	14	90	7.78333	1.409302	1.113661	4.28243	11.28423	6.290	9.090
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	42.22333	1.527668	1.114649	40.91253	43.53413	41.630	42.640
	17	90	25.56333	2.073375	1.106973	22.89692	28.22974	24.370	26.450
	18	90	11.10778	1.279732	1.113854	7.92875	14.28681	9.780	12.333
	19	90	3.33111	2.440001	1.931385	-.24605	6.90827	1.890	4.770
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	14.44222	3.023246	1.105472	6.93206	21.95238	11.000	16.667
	22	90	8.88778	1.512687	1.109600	7.61419	10.16136	8.480	9.463
	23	90	5.56111	1.582698	1.112421	4.11361	7.00861	5.200	6.233
	24	90	1.11000	1.998048	1.106223	-1.36929	3.58929	.160	2.150
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	96.67000	2.917996	1.934706	89.42130	103.91870	94.560	100.000
	Total	2340	25.64513	23.672584	2.680392	20.30779	30.98247	.000	100.000
tỷ lệ tạo chồi	1	90	15.56333	1.838113	1.108885	13.48135	17.64532	14.770	16.440
	2	90	14.43667	2.755343	2.218665	9.33091	19.54242	12.360	16.470
	3	90	6.67333	2.815005	1.9170543	4.64875	8.69792	5.860	7.490
	4	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	5	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	6	90	14.44000	2.026721	1.110128	9.40534	19.47466	13.240	16.780
	7	90	13.33000	2.160517	1.920025	10.44712	16.21288	12.470	14.650
	8	90	7.78000	3.325115	2.218775	6.97237	8.58763	7.540	8.150
	9	90	4.44111	1.708334	1.106897	1.68786	7.19436	3.333	5.550
	10	90	2.21667	1.959184	1.113785	-.16608	4.59941	1.210	3.120
	11	90	22.22000	3.926629	2.922340	17.43399	27.00601	20.650	24.370
	12	90	15.56000	3.000000	2.944701	10.59172	20.52828	13.560	17.560
	13	90	10.00000	2.401583	1.916554	4.03414	15.96586	8.260	12.740
	14	90	2.22333	1.726659	1.119537	.41821	4.02845	1.560	3.000
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	21.11333	2.570104	2.223850	14.72884	27.49783	18.530	23.670
	17	90	10.00000	1.980303	1.919328	5.08065	14.91935	7.800	11.640
	18	90	5.56000	1.420598	1.112013	2.03104	9.08896	4.050	6.870
	19	90	1.11000	1.998048	1.106223	-1.36929	3.58929	.160	2.150
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	8.88556	1.364732	1.107928	5.49537	12.27574	7.667	10.360
	22	90	4.44000	1.585871	1.113353	2.98462	5.89538	3.767	4.833
	23	90	1.11000	1.998048	1.110223	-1.36929	3.58929	.160	2.150
	24	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	85.56333	1.936810	1.118218	80.75203	90.37464	83.580	87.450
	Total	2340	10.25641	16.635568	1.883607	6.50567	14.00715	.000	87.450
kích thước mẫu (cm)	1	90	.65333	.110151	.013596	.37970	.92696	.540	.760
	2	90	.65333	.011547	.016667	.62465	.68202	.640	.660
	3	90	.61333	.023094	.033333	.55596	.67070	.600	.640
	4	90	.55333	.025166	.014530	.49082	.61585	.530	.580
	5	90	.51333	.025166	.014530	.45082	.57585	.490	.540
	6	90	.64667	.083865	.012419	.43833	.85500	.550	.700

7	90	.63667	.101160	.012405	.38537	.88796	.520	.700
8	90	.63333	.032146	.014559	.55348	.71319	.610	.670
9	90	.65333	.116762	.013412	.36328	.94339	.550	.780
10	90	.53000	.026458	.013275	.46428	.59572	.510	.560
11	90	.63333	.015275	.008819	.59539	.67128	.620	.650
12	90	.65899	.043589	.014166	.55172	.76828	.610	.690
13	90	.67333	.015275	.028819	.63539	.71128	.660	.690
14	90	.52667	.005774	.013333	.51232	.54101	.520	.530
15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
16	90	.66000	.050000	.028868	.53579	.78421	.610	.710
17	90	.60000	.026458	.012275	.53428	.66572	.570	.620
18	90	.55333	.085049	.019103	.34206	.76461	.490	.650
19	90	.57000	.055678	.037146	.43169	.70831	.510	.620
20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
21	90	.61667	.015275	.003819	.57872	.65461	.600	.630
22	90	.64000	.020000	.011547	.59032	.68968	.620	.660
23	90	.52333	.030551	.014638	.44744	.59922	.490	.550
24	90	.51000	.070000	.004415	.33611	.68389	.440	.580
25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
26	90	.69333	.045092	.036034	.58132	.80535	.650	.740
Total	2340	.53641	.206731	.023408	.48980	.58302	.000	.780

Homogeneous Subsets

tỷ lệ mẫu sống

			Subset for alpha = 0.05												
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Duncan[a]	15	90	.00000												
	20	90	.00000												
	25	90	.00000												
	24	90	1.11000												
	19	90	3.33111	3.33111											
	10	90	5.55556	5.55556	5.55556										
	23	90	5.56111	5.56111	5.56111										
	14	90		7.78333	7.78333										
	5	90		8.88667	8.88667	8.88667									
	22	90		8.88778	8.88778	8.88778									
	18	90			11.10778	11.10778	11.10778								
	21	90				14.44222	14.44222	14.44222							
	9	90					15.55556	15.55556							
	13	90						18.89111							
	17	90							25.56333						
	4	90								33.33333					
	8	90								34.44111					
	12	90								37.77778	37.77778				
	16	90									42.22333	42.22333			
	7	90										44.44444			
	11	90										46.67000	46.67000		
	3	90										46.76000	46.76000		
	6	90										47.77778	47.77778		
	2	90											52.22333		
	1	90												57.77667	
	26	90													96.67000
	Sig.		.191	.065	.060	.486	1.000	1.000	.488	1.000	.168	.059	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

			Subset for alpha = 0.05									
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Duncan[a]	4	90	.00000									
	5	90	.00000									
	15	90	.00000									
	20	90	.00000									
	24	90	.00000									

	25	90	.00000									
	19	90	1.11000	1.11000								
	23	90	1.11000	1.11000								
	10	90	2.21667	2.21667	2.21667							
	14	90	2.22333	2.22333	2.22333							
	22	90	4.44000	4.44000	4.44000	4.44000						
	9	90	4.44111	4.44111	4.44111	4.44111						
	18	90		5.56000	5.56000	5.56000	5.56000					
	3	90			6.67333	6.67333	6.67333					
	8	90				7.78000	7.78000					
	21	90				8.88556	8.88556	8.88556				
	13	90					10.00000	10.00000	10.00000			
	17	90					10.00000	10.00000	10.00000			
	7	90						13.33000	13.33000	13.33000		
	2	90							14.43667	14.43667		
	6	90							14.44000	14.44000		
	12	90								15.56000		
	1	90								15.56333		
	16	90									21.11333	
	11	90									22.22000	
	26	90										85.56333
	Sig.		.098	.096	.071	.070	.062	.063	.071	.076	.322	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

kích thước mẫu (cm)

			Subset for alpha = 0.05					
	CT	N	1	2	3	4	5	6
Duncan[a]	15	90	.00000					
	20	90	.00000					
	25	90	.00000					
	24	90		.51000				
	5	90		.51333				
	23	90		.52333				
	14	90		.52667				
	10	90		.53000				
	4	90		.55333				
	18	90		.55333				
	19	90		.57000	.57000			
	17	90			.60000	.60000		
	3	90			.61333	.61333	.61333	
	21	90				.61667	.61667	
	8	90				.63222	.63222	
	11	90				.63333	.63333	.63333
	7	90				.63667	.63667	.63667
	22	90				.64000	.64000	.64000
	6	90				.64667	.64667	.64667
	2	90				.65333	.65333	.65333
	9	90				.65333	.65333	.65333
	1	90				.65333	.65333	.65333
	12	90				.65899	.65899	.65899
	16	90					.66000	.66000
	13	90					.67333	.67333
	26	90						.69333
	Sig.		f.078	e.050	d.068	c.057	b.050	a.077

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 21.9. số liệu thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất mô sẹo bằng DMS

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
tỷ lệ mẫu sống	21.00	90	95.55556	5.091751	2.939724	82.90695	108.20417	90.000	100.000
	111.00	90	73.62222	2.294034	1.324461	67.92353	79.32092	72.167	76.267
	1.00	90	54.44444	5.091751	2.939724	41.79583	67.09305	50.000	60.000
	2.00	90	33.33333	6.666667	3.849002	16.77242	49.89425	26.667	40.000
	3.00	90	7.77778	3.849002	2.222222	-1.78367	17.33923	3.333	10.000
	4.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	666.00	90	66.57778	5.109287	2.949848	53.88560	79.26995	60.800	70.500
	5.00	90	24.44444	1.924501	1.111111	19.66372	29.22517	23.333	26.667
	6.00	90	7.77778	1.924501	1.111111	2.99705	12.55850	6.667	10.000
	7.00	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	8.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.11	90	47.74444	1.868253	1.078637	43.10345	52.38544	45.833	49.567
	9.00	90	10.00000	3.333333	1.924501	1.71954	18.28046	6.667	13.333
	10.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	11.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	12.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.16	90	41.43333	1.959875	1.131535	36.56473	46.30193	39.200	42.867
	13.00	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	14.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	15.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	19.62222	1.326789	.766022	16.32629	22.91815	18.533	21.100
	17.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	18.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	19.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	19.19231	27.116643	3.070355	13.07845	25.30617	.000	100.000
tỷ lệ tạo chồi	21.00	90	88.88889	1.924501	1.111111	84.10816	93.66961	86.667	90.000
	111.00	90	53.32222	4.058781	2.343338	43.23965	63.40479	48.833	56.733
	1.00	90	32.22222	5.091751	2.939724	19.57361	44.87083	26.667	36.667
	2.00	90	21.11111	3.849002	2.222222	11.54966	30.67256	16.667	23.333
	3.00	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	4.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	666.00	90	37.48889	3.650013	2.107336	28.42175	46.55602	33.833	41.133
	5.00	90	14.44444	1.924501	1.111111	9.66372	19.22517	13.333	16.667
	6.00	90	3.33333	.000000	.000000	3.33333	3.33333	3.333	3.333
	7.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	8.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.11	90	18.67778	1.269441	.732912	15.52431	21.83125	17.800	20.133
	9.00	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	10.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	12.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.16	90	12.58889	2.335317	1.348296	6.78764	18.39014	10.700	15.200
	13.00	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	14.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	15.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	6.77778	1.466035	.846416	3.13594	10.41961	5.833	8.467
	17.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	18.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	19.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	11.83632	20.621853	2.334965	7.18682	16.48583	.000	90.000
tỷ lệ mẫu bị biến dị	21.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	111.00	90	4.43333	1.083718	.625685	1.74123	7.12544	3.333	5.500
	1.00	90	8.37778	2.061643	1.190290	3.25637	13.49918	6.667	10.667
	2.00	90	12.18889	2.600285	1.501275	5.72942	18.64835	9.567	14.767
	3.00	90	3.71111	.654330	.377778	2.08566	5.33656	3.333	4.467
	4.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	666.00	90	14.93333	3.308071	1.909916	6.71563	23.15104	11.500	18.100
	5.00	90	7.76667	1.083718	.625685	5.07456	10.45877	6.667	8.833
	6.00	90	3.33333	.000000	.000000	3.33333	3.33333	3.333	3.333

	7.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	8.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11.11	90	13.55556	1.883358	1.087357	8.87704	18.23408	11.833	15.567
	9.00	90	3.88889	.822147	.474667	1.84656	5.93122	3.333	4.833
	10.00	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	11.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	12.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.16	90	10.23333	2.333333	1.347151	4.43701	16.02965	8.567	12.900
	13.00	90	2.72222	2.473938	1.428329	-3.42338	8.86783	.000	4.833
	14.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	15.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21.21	90	3.03333	1.244097	.718280	-.05718	6.12384	1.667	4.100
	17.00	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	18.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	19.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	20.00	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	3.60513	4.735080	.536142	2.53753	4.67272	.000	18.100
kích thước mẫu (cm)	21.00	90	.86000	.085440	.049329	.64776	1.07224	.780	.950
	111.00	90	.84667	.065064	.037565	.68504	1.00829	.780	.910
	1.00	90	.74667	.035119	.020276	.65943	.83391	.710	.780
	2.00	90	.79667	.032146	.018559	.71681	.87652	.760	.820
	3.00	90	.71000	.026458	.015275	.64428	.77572	.680	.730
	4.00	90	.52000	.010000	.005774	.49516	.54484	.510	.530
	666.00	90	.66667	.025166	.014530	.60415	.72918	.640	.690
	5.00	90	.65333	.070238	.040552	.47885	.82781	.580	.720
	6.00	90	.61000	.040000	.023094	.51063	.70937	.570	.650
	7.00	90	.56333	.083865	.048419	.35500	.77167	.510	.660
	8.00	90	.53000	.026458	.015275	.46428	.59572	.510	.560
	11.11	90	.68000	.017321	.010000	.63697	.72303	.660	.690
	9.00	90	.68667	.040415	.023333	.58627	.78706	.650	.730
	10.00	90	.53333	.032146	.018559	.45348	.61319	.510	.570
	11.00	90	.52000	.010000	.005774	.49516	.54484	.510	.530
	12.00	90	.51000	.000000	.000000	.51000	.51000	.510	.510
	16.16	90	.61333	.065064	.037565	.45171	.77496	.550	.680
	13.00	90	.62000	.040000	.023094	.52063	.71937	.580	.660
	14.00	90	.51667	.005774	.003333	.50232	.53101	.510	.520
	15.00	90	.51667	.005774	.003333	.50232	.53101	.510	.520
	16.00	90	.51000	.000000	.000000	.51000	.51000	.510	.510
	21.21	90	.56000	.080000	.046188	.36127	.75873	.480	.640
	17.00	90	.54000	.034641	.020000	.45395	.62605	.520	.580
	18.00	90	.51333	.005774	.003333	.49899	.52768	.510	.520
	19.00	90	.51667	.005774	.003333	.50232	.53101	.510	.520
	20.00	90	.51000	.000000	.000000	.51000	.51000	.510	.510
	Total	2340	.60962	.113783	.012883	.58396	.63527	.480	.950

Homogeneous Subsets

tỷ lệ mầu sống

			Subset for alpha = 0.05												
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Duncan[a]	4.00	90	.00000												
	11.00	90	.00000												
	12.00	90	.00000												
	15.00	90	.00000												
	16.00	90	.00000												
	19.00	90	.00000												
	20.00	90	.00000												
	8.00	90	1.11111	1.11111											
	14.00	90	1.11111	1.11111											
	18.00	90	1.11111	1.11111											
	10.00	90	2.22222	2.22222											
	17.00	90	2.22222	2.22222											
	7.00	90	3.33333	3.33333	3.33333										
	13.00	90		5.55556	5.55556	5.55556									
	3.00	90			7.77778	7.77778									
	6.00	90			7.77778	7.77778									

	9.00	90				10.00000										
	21.21	90					19.62222									
	5.00	90						24.44444								
	2.00	90							33.33333							
	16.16	90								41.43333						
	11.11	90									47.74444					
	1.00	90										54.44444				
	666.00	90											66.57778			
	111.00	90												73.62222		
	21.00	90														95.55556
	Sig.		.233	.098	.080	.080	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

			Subset for alpha = 0.05								
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	4.00	90	.00000								
	11.00	90	.00000								
	12.00	90	.00000								
	14.00	90	.00000								
	15.00	90	.00000								
	16.00	90	.00000								
	18.00	90	.00000								
	19.00	90	.00000								
	20.00	90	.00000								
	7.00	90	1.11111	1.11111							
	8.00	90	1.11111	1.11111							
	10.00	90	1.11111	1.11111							
	17.00	90	1.11111	1.11111							
	6.00	90	3.33333	3.33333	3.33333						
	3.00	90		4.44444	4.44444						
	13.00	90		4.44444	4.44444						
	9.00	90			5.55556						
	21.21	90			6.77778						
	16.16	90				12.58889					
	5.00	90				14.44444					
	11.11	90					18.67778				
	2.00	90					21.11111				
	1.00	90						32.22222			
	666.00	90							37.48889		
	111.00	90								53.32222	
	21.00	90									88.88889
	Sig.		.112	.096	.076	.281	.159	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ mẫu bị biến dị

			Subset for alpha = 0.05						
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7
Duncan[a]	4.00	90	.00000						
	11.00	90	.00000						
	12.00	90	.00000						
	14.00	90	.00000						
	15.00	90	.00000						
	16.00	90	.00000						
	18.00	90	.00000						
	19.00	90	.00000						
	20.00	90	.00000						
	21.00	90	.00000						
	7.00	90	1.11111	1.11111					
	8.00	90	1.11111	1.11111					

	17.00	90	1.11111	1.11111					
	10.00	90	2.22222	2.22222	2.22222				
	13.00	90	2.72222	2.72222	2.72222				
	21.21	90		3.03333	3.03333				
	6.00	90		3.33333	3.33333				
	3.00	90		3.71111	3.71111				
	9.00	90		3.88889	3.88889				
	111.00	90			4.43333				
	5.00	90				7.76667			
	1.00	90				8.37778			
	16.16	90				10.23333	10.23333		
	2.00	90					12.18889	12.18889	
	11.11	90						13.55556	13.55556
	666.00	90							14.93333
	Sig.		.068	.054	.120	.058	.111	.263	.259

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

kích thước mẫu (cm)

			Subset for alpha = 0.05							
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	12.00	90	.51000							
	16.00	90	.51000							
	20.00	90	.51000							
	18.00	90	.51333							
	14.00	90	.51667							
	15.00	90	.51667							
	19.00	90	.51667							
	4.00	90	.52000							
	11.00	90	.52000							
	8.00	90	.53000							
	10.00	90	.53333							
	17.00	90	.54000	.54000						
	21.21	90	.56000	.56000	.56000					
	7.00	90	.56333	.56333	.56333					
	6.00	90		.61000	.61000	.61000				
	16.16	90		.61333	.61333	.61333				
	13.00	90			.62000	.62000				
	5.00	90				.65333	.65333			
	666.00	90				.66667	.66667			
	11.11	90				.68000	.68000	.68000		
	9.00	90				.68667	.68667	.68667		
	3.00	90					.71000	.71000		
	1.00	90						.74667	.74667	
	2.00	90							.79667	.79667
	111.00	90								.84667
	21.00	90								.86000
	Sig.		.207	.061	.126	.057	.149	.081	.152	.087

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 21.10. Số liệu thời điểm 4 tuần sau xử lý hoá chất mô sẹo bằng colchicine

Oneway

Descriptives

						95% Confidence Interval for Mean			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
kích thước mẫu (cm)	1	90	.64667	.025166	.014530	.58415	.70918	.620	.670
	2	90	.65333	.032146	.018559	.57348	.73319	.630	.690
	3	90	.61333	.047258	.027285	.49594	.73073	.560	.650
	4	90	.54667	.020817	.012019	.49496	.59838	.530	.570
	5	90	.52000	.010000	.005774	.49516	.54484	.510	.530

	6	90	.64667	.015275	.008819	.60872	.68461	.630	.660
	7	90	.64000	.020000	.011547	.59032	.68968	.620	.660
	8	90	.63000	.020000	.011547	.58032	.67968	.610	.650
	9	90	.65333	.025166	.014530	.59082	.71585	.630	.680
	10	90	.53000	.017321	.010000	.48697	.57303	.520	.550
	11	90	.63333	.015275	.008819	.59539	.67128	.620	.650
	12	90	.65667	.015275	.008819	.61872	.69461	.640	.670
	13	90	.67000	.055678	.032146	.53169	.80831	.620	.730
	14	90	.53000	.010000	.005774	.50516	.55484	.520	.540
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	.66333	.049329	.028480	.54079	.78587	.630	.720
	17	90	.60333	.023094	.013333	.54596	.66070	.590	.630
	18	90	.54667	.028868	.016667	.47496	.61838	.530	.580
	19	90	.56667	.072342	.041767	.38696	.74637	.520	.650
	20	90	.00000	.000000	.000000	.51000	.51000	.510	.510
	21	90	.62333	.005774	.003333	.60899	.63768	.620	.630
	22	90	.63667	.015275	.008819	.59872	.67461	.620	.650
	23	90	.52333	.015275	.008819	.48539	.56128	.510	.540
	24	90	.51000	.000000	.000000	.51000	.51000	.510	.510
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	.69000	.060828	.035119	.53890	.84110	.650	.760
	Total	2340	.59487	.065915	.007463	.58001	.60973	.510	.760
tỷ lễ mẫu sống	1	90	57.77778	8.388705	4.843221	36.93908	78.61648	50.000	66.667
	2	90	52.22222	6.938887	4.006168	34.98507	69.45937	46.667	60.000
	3	90	46.66667	3.333333	1.924501	38.38621	54.94713	43.333	50.000
	4	90	33.33333	3.333333	1.924501	25.05287	41.61379	30.000	36.667
	5	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	6	90	47.77778	1.924501	1.111111	42.99705	52.55850	46.667	50.000
	7	90	44.44444	1.924501	1.111111	39.66372	49.22517	43.333	46.667
	8	90	34.44444	1.924501	1.111111	29.66372	39.22517	33.333	36.667
	9	90	15.55556	1.924501	1.111111	10.77483	20.33628	13.333	16.667
	10	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	11	90	46.66667	3.333333	1.924501	38.38621	54.94713	43.333	50.000
	12	90	37.77778	5.091751	2.939724	25.12917	50.42639	33.333	43.333
	13	90	18.88889	5.091751	2.939724	6.24028	31.53750	13.333	23.333
	14	90	7.77778	1.924501	1.111111	2.99705	12.55850	6.667	10.000
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	42.22222	1.924501	1.111111	37.44150	47.00295	40.000	43.333
	17	90	25.55556	1.924501	1.111111	20.77483	30.33628	23.333	26.667
	18	90	11.11111	1.924501	1.111111	6.33039	15.89184	10.000	13.333
	19	90	3.33333	3.333333	1.924501	-4.94713	11.61379	.000	6.667
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	14.44444	1.924501	1.111111	9.66372	19.22517	13.333	16.667
	22	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	23	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	24	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	96.66667	3.333333	1.924501	88.38621	104.94713	93.333	100.000
	Total	2340	25.64103	23.767195	2.691105	20.28235	30.99970	.000	100.000
tỷ lệ tạo chồi	1	90	15.55556	1.924501	1.111111	10.77483	20.33628	13.333	16.667
	2	90	14.44444	3.849002	2.222222	4.88299	24.00589	10.000	16.667
	3	90	6.66667	3.333333	1.924501	-1.61379	14.94713	3.333	10.000
	4	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	5	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	6	90	14.44444	1.924501	1.111111	9.66372	19.22517	13.333	16.667
	7	90	13.33333	3.333333	1.924501	5.05287	21.61379	10.000	16.667
	8	90	7.77778	3.849002	2.222222	-1.78367	17.33923	3.333	10.000
	9	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	10	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	11	90	22.22222	5.091751	2.939724	9.57361	34.87083	16.667	26.667
	12	90	15.55556	5.091751	2.939724	2.90695	28.20417	10.000	20.000
	13	90	10.00000	3.333333	1.924501	1.71954	18.28046	6.667	13.333
	14	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	21.11111	3.849002	2.222222	11.54966	30.67256	16.667	23.333
	17	90	10.00000	3.333333	1.924501	1.71954	18.28046	6.667	13.333

	18	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	19	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	22	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	23	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	24	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	85.55556	1.924501	1.111111	80.77483	90.33628	83.333	86.667
	Total	2340	10.25641	16.738109	1.895218	6.48255	14.03027	.000	86.667

Homogeneous Subsets

kích thước mẫu (cm)

			Subset for alpha = 0.05					
	CT	N		1	2	3	4	5
Duncan[a]	15	90	.00000					
	20	90	.00000					
	25	90	.00000					
	24	90		.51333				
	5	90		.52000				
	23	90		.52333				
	10	90		.53000				
	14	90		.53000				
	4	90		.54667				
	18	90		.54667				
	19	90		.56667	.56667			
	17	90			.60333	.60333		
	3	90			.61333	.61333	.61333	
	21	90				.62333	.62333	
	8	90				.63000	.63000	
	11	90				.63333	.63333	.63333
	22	90				.63667	.63667	.63667
	7	90				.64000	.64000	.64000
	1	90				.64667	.64667	.64667
	6	90				.64667	.64667	.64667
	2	90				.65333	.65333	.65333
	9	90				.65333	.65333	.65333
	12	90				.65667	.65667	.65667
	16	90					.66333	.66333
	13	90					.67000	.67000
	26	90						.69000
	Sig.			.056	.076	.074	.059	.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ mẫu sống

			Subset for alpha = 0.05												
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Duncan[a]	15	90	.00000												
	20	90	.00000												
	25	90	.00000												
	24	90	1.11111												
	19	90	3.33333	3.33333											
	10	90	5.55556	5.55556	5.55556										
	23	90	5.55556	5.55556	5.55556										
	14	90		7.77778	7.77778										
	5	90		8.88889	8.88889	8.88889									
	22	90		8.88889	8.88889	8.88889									
	18	90			11.11111	11.11111	11.11111								
	21	90				14.44444	14.44444	14.44444							
	9	90					15.55556	15.55556							
	13	90						18.88889							
	17	90							25.55556						

	4	90								33.33333					
	8	90								34.44444					
	12	90								37.77778	37.77778				
	16	90									42.22222	42.22222			
	7	90										44.44444			
	3	90										46.66667	46.66667		
	11	90										46.66667	46.66667		
	6	90										47.77778	47.77778		
	2	90											52.22222		
	1	90												57.77778	
	26	90													96.66667
	Sig		.076	.072	.072	.061	.121	.121	1.000	.121	.102	.067	.061	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

			Subset for alpha = 0.05									
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Duncan[a]	4	90	.00000									
	5	90	.00000									
	15	90	.00000									
	20	90	.00000									
	24	90	.00000									
	25	90	.00000									
	19	90	1.11111	1.11111								
	23	90	1.11111	1.11111								
	10	90	2.22222	2.22222	2.22222							
	14	90	2.22222	2.22222	2.22222							
	9	90	4.44444	4.44444	4.44444	4.44444						
	22	90	4.44444	4.44444	4.44444	4.44444						
	18	90		5.55556	5.55556	5.55556	5.55556					
	3	90			6.66667	6.66667	6.66667					
	8	90				7.77778	7.77778					
	21	90				8.88889	8.88889	8.88889				
	13	90					10.00000	10.00000	10.00000			
	17	90					10.00000	10.00000	10.00000			
	7	90						13.33333	13.33333	13.33333		
	2	90							14.44444	14.44444		
	6	90							14.44444	14.44444		
	1	90								15.55556		
	12	90								15.55556		
	16	90									21.11111	
	11	90									22.22222	
	26	90										85.55556
	Sig.		.091	.079	.075	.075	.075	.064	.070	.368	.609	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 21.11. Số liệu thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất mô sẹo bằng colchicine

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
tỷ lệ mẫu sống	1	90	50.00000	6.666667	3.849002	33.43908	66.56092	43.333	56.667
	2	90	43.33333	6.666667	3.849002	26.77242	59.89425	36.667	50.000
	3	90	37.77778	5.091751	2.939724	25.12917	50.42639	33.333	43.333
	4	90	24.44444	1.924501	1.111111	19.66372	29.22517	23.333	26.667
	5	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	6	90	42.22222	5.091751	2.939724	29.57361	54.87083	36.667	46.667
	7	90	42.22222	1.924501	1.111111	37.44150	47.00295	40.000	43.333
	8	90	20.00000	3.333333	1.924501	11.71954	28.28046	16.667	23.333

	9	90	11.11111	1.924501	1.111111	6.33039	15.89184	10.000	13.333
	10	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	11	90	40.00000	3.333333	1.924501	31.71954	48.28046	36.667	43.333
	12	90	31.11111	3.849002	2.222222	21.54966	40.67256	26.667	33.333
	13	90	15.55556	1.924501	1.111111	10.77483	20.33628	13.333	16.667
	14	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	36.66667	3.333333	1.924501	28.38621	44.94713	33.333	40.000
	17	90	18.88889	3.849002	2.222222	9.32744	28.45034	16.667	23.333
	18	90	6.66667	.000000	.000000	6.66667	6.66667	6.667	6.667
	19	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	11.11111	1.924501	1.111111	6.33039	15.89184	10.000	13.333
	22	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	23	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	24	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	96.66667	3.333333	1.924501	88.38621	104.94713	93.333	100.000
	Total	2340	20.81197	22.900663	2.592989	15.64866	25.97527	.000	100.000
tỷ lệ tạo chồi	1	90	40.00000	8.819171	5.091751	18.09196	61.90804	33.333	50.000
	2	90	31.11111	6.938887	4.006168	13.87396	48.34826	23.333	36.667
	3	90	27.77778	5.091751	2.939724	15.12917	40.42639	23.333	33.333
	4	90	13.33333	3.333333	1.924501	5.05287	21.61379	10.000	16.667
	5	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	6	90	27.77778	1.924501	1.111111	22.99705	32.55850	26.667	30.000
	7	90	22.22222	1.924501	1.111111	17.44150	27.00295	20.000	23.333
	8	90	13.33333	3.333333	1.924501	5.05287	21.61379	10.000	16.667
	9	90	8.88889	1.924501	1.111111	4.10816	13.66961	6.667	10.000
	10	90	1.11111	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	11	90	31.11111	6.938887	4.006168	13.87396	48.34826	23.333	36.667
	12	90	25.55556	3.849002	2.222222	15.99411	35.11701	23.333	30.000
	13	90	13.33333	.000000	.000000	13.33333	13.33333	13.333	13.333
	14	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	26.66667	3.333333	1.924501	18.38621	34.94713	23.333	30.000
	17	90	12.22222	1.924501	1.111111	7.44150	17.00295	10.000	13.333
	18	90	5.55556	1.924501	1.111111	.77483	10.33628	3.333	6.667
	19	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	11.11111	1.924501	1.111111	6.33039	15.89184	10.000	13.333
	22	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	23	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	24	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	94.44444	5.091751	2.939724	81.79583	107.09305	90.000	100.000
	Total	2340	15.98291	20.103333	2.276254	11.45030	20.51551	.000	100.000
tỷ lệ mẫu biến dị	1	90	19.31111	1.350034	.779443	15.95744	22.66478	18.100	20.767
	2	90	23.33333	3.333333	1.924501	15.05287	31.61379	20.000	26.667
	3	90	24.66667	5.033223	2.905933	12.16345	37.16989	20.000	30.000
	4	90	11.33333	1.763834	1.018350	6.95173	15.71494	10.000	13.333
	5	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	6	90	24.93333	3.688872	2.129771	15.76967	34.09700	21.500	28.833
	7	90	18.88889	1.924501	1.111111	14.10816	23.66961	16.667	20.000
	8	90	13.33333	3.333333	1.924501	5.05287	21.61379	10.000	16.667
	9	90	7.77778	1.924501	1.111111	2.99705	12.55850	6.667	10.000
	10	90	1.11111	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	11	90	25.68889	7.254603	4.188447	7.66746	43.71032	18.900	33.333
	12	90	20.97778	3.471524	2.004286	12.35403	29.60152	18.100	24.833
	13	90	12.22222	1.924501	1.111111	7.44150	17.00295	10.000	13.333
	14	90	2.22222	1.924501	1.111111	-2.55850	7.00295	.000	3.333
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	16	90	21.32222	2.819049	1.627579	14.31932	28.32513	18.100	23.333
	17	90	10.76667	.750555	.433333	8.90218	12.63115	10.000	11.500
	18	90	4.82222	1.694872	.978535	.61193	9.03252	3.333	6.667
	19	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000

	21	90	10.11111	.607667	.350837	8.60158	11.62064	9.567	10.767
	22	90	4.44444	1.924501	1.111111	-.33628	9.22517	3.333	6.667
	23	90	1.11111	1.924501	1.111111	-3.66961	5.89184	.000	3.333
	24	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	Total	2340	10.02308	9.571180	1.083723	7.86511	12.18104	.000	33.333
kích thước mẫu (cm)	1	90	.81333	.060277	.034801	.66360	.96307	.750	.870
	2	90	.82000	.026458	.015275	.75428	.88572	.790	.840
	3	90	.81333	.047258	.027285	.69594	.93073	.760	.850
	4	90	.71333	.037859	.021858	.61929	.80738	.670	.740
	5	90	.52000	.010000	.005774	.49516	.54484	.510	.530
	6	90	.88000	.043589	.025166	.77172	.98828	.850	.930
	7	90	.87333	.075719	.043716	.68524	1.06143	.820	.960
	8	90	.76333	.041633	.024037	.65991	.86676	.730	.810
	9	90	.82000	.036056	.020817	.73043	.90957	.780	.850
	10	90	.59667	.107858	.062272	.32873	.86460	.520	.720
	11	90	.90000	.043589	.025166	.79172	1.00828	.850	.930
	12	90	.82333	.056862	.032830	.68208	.96459	.760	.870
	13	90	.80333	.037859	.021858	.70929	.89738	.760	.830
	14	90	.69667	.156312	.090247	.30837	1.08497	.530	.840
	15	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.000000	.000	.000
	16	90	.86333	.066583	.038442	.69793	1.02874	.820	.940
	17	90	.80333	.080829	.046667	.60254	1.00412	.730	.890
	18	90	.68000	.086603	.050000	.46487	.89513	.630	.780
	19	90	.63333	.187705	.108372	.16705	1.09962	.520	.850
	20	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	21	90	.75667	.055076	.031798	.61985	.89348	.720	.820
	22	90	.73667	.015275	.008819	.69872	.77461	.720	.750
	23	90	.55667	.072342	.041767	.37696	.73637	.510	.640
	24	90	.52000	.000000	.000000	.51000	.51000	.510	.510
	25	90	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	26	90	.79000	.060828	.035119	.63890	.94110	.750	.860
	Total	2340	.71923	.142872	.016177	.68702	.75144	.510	.960

Homogeneous Subsets

tỷ lệ mầu sống

			Subset for alpha = 0.05										
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Duncan[a]	15	90	.00000										
	20	90	.00000										
	25	90	.00000										
	10	90	1.11111	1.11111									
	19	90	1.11111	1.11111									
	23	90	1.11111	1.11111									
	24	90	1.11111	1.11111									
	5	90	2.22222	2.22222									
	14	90	2.22222	2.22222									
	22	90	4.44444	4.44444									
	18	90		6.66667	6.66667								
	9	90			11.11111	11.11111							
	21	90			11.11111	11.11111							
	13	90				15.55556	15.55556						
	17	90					18.88889						
	8	90					20.00000	20.00000					
	4	90						24.44444					
	12	90							31.11111				
	16	90								36.66667			
	3	90								37.77778	37.77778		
	11	90								40.00000	40.00000		
	6	90								42.22222	42.22222		
	7	90								42.22222	42.22222		
	2	90									43.33333		
	1	90										50.00000	

	26	90											96.66667
	Sig.		.154	.069	.109	.109	.109	.091	1.000	.058	.058	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ tạo chồi

	CT	N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	5	90	.00000							
	15	90	.00000							
	20	90	.00000							
	24	90	.00000							
	25	90	.00000							
	19	90	1.11111							
	23	90	1.11111							
	10	90	1.11111							
	14	90	2.22222							
	22	90	4.44444	4.44444						
	18	90	5.55556	5.55556	5.55556					
	9	90		8.88889	8.88889	8.88889				
	21	90			11.11111	11.11111				
	17	90				12.22222				
	4	90				13.33333				
	8	90				13.33333				
	13	90				13.33333				
	7	90					22.22222			
	12	90					25.55556	25.55556		
	16	90					26.66667	26.66667		
	3	90					27.77778	27.77778		
	6	90					27.77778	27.77778		
	2	90						31.11111		
	11	90						31.11111		
	1	90							40.00000	
	26	90								94.44444
	Sig.		.107	.146	.069	.178	.086	.092	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tỷ lệ mẫu biến dị

	CT	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan[a]	5	90	.00000					
	15	90	.00000					
	20	90	.00000					
	24	90	.00000					
	25	90	.00000					
	26	90	.00000					
	19	90	1.11111					
	23	90	1.11111					
	10	90	1.11111					
	14	90	2.22222					
	22	90	4.44444	4.44444				
	18	90	4.82222	4.82222				
	9	90		7.77778	7.77778			
	21	90			10.11111	10.11111		
	17	90			10.76667	10.76667		
	4	90			11.33333	11.33333		
	13	90			12.22222	12.22222		
	8	90				13.33333		
	7	90					18.88889	
	1	90					19.31111	
	12	90					20.97778	20.97778

	16	90					21.32222	21.32222
	2	90					23.33333	23.33333
	3	90						24.66667
	6	90						24.93333
	11	90						25.68889
	Sig.		.060	.140	.063	.179	.063	.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

kích thước mẫu (cm)

			Subset for alpha = 0.05									
	CT	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Duncan[a]	15	90	.00000									
	20	90	.00000									
	25	90	.00000									
	24	90		.52333								
	5	90		.52000								
	23	90		.55667	.55667							
	10	90		.59667	.59667	.59667						
	19	90		.63333	.63333	.63333	.63333					
	18	90			.68000	.68000	.68000	.68000				
	14	90				.69667	.69667	.69667	.69667			
	4	90				.71333	.71333	.71333	.71333			
	22	90					.73667	.73667	.73667	.73667		
	21	90					.75667	.75667	.75667	.75667	.75667	
	8	90					.76333	.76333	.76333	.76333	.76333	.76333
	26	90						.79000	.79000	.79000	.79000	.79000
	13	90						.80333	.80333	.80333	.80333	.80333
	17	90						.80333	.80333	.80333	.80333	.80333
	1	90						.81333	.81333	.81333	.81333	.81333
	3	90						.81333	.81333	.81333	.81333	.81333
	2	90							.82000	.82000	.82000	.82000
	9	90							.82000	.82000	.82000	.82000
	12	90							.82333	.82333	.82333	.82333
	16	90								.86333	.86333	.86333
	7	90								.87333	.87333	.87333
	6	90									.88000	.88000
	11	90										.90000
	Sig.			.069	.052	.073	.052	.054	.071	.051	.078	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

TÀI LIỆU THAM KHẢO PHẦN PHỤ LỤC

[1] H. V. .Cường, M. T. H. Anh, T. Q. Tân, and C. H. Mậu, "phân tích vùng gene lục lạp, rbcL, phân lập từ cây lan tai cáo (Hoya parasitica (Roxb.) Wall. ex Wight)," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, vol. 228, no. 01, pp. 474–481, 2023.

[2] L. T. N. .Điệp, N. T. Điềm, N. N. Hoa, T. H. Dũng, and V. T. H. Trang, "Đánh giá đa dạng di truyền của một số loài Lan Dendrobium ở khu vực phía Nam Việt Nam," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường ĐH Nguyễn Tất Thành*, vol. 3, no. 3, pp. 1–12, 2020, doi: https://doi.org/10.55401/jst.v3i3.113.

[3] N. V. .Giang, P. P. Thu, C. Đ. Hà, and N. T. T. Mai, "Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên," *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, vol. 60, no. 5, 2018, [Online]. Available: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/480

[4] P. T. N. .Lan, L. T. T. Xuân, and N. T. B. Châu, "Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố pleiku,tỉnh Gia lai," *tạp chí khoa học và công nghệ, Trường đại học khoa học Huế, ĐH Huế*, vol. 17, no. 2, pp. 169–179, 2020.

[5] N. T. .Minh and Đ. M. Thu, "Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất mặn huyện giao thuỷ,tỉnh Nam Định," *Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, pp. 1022–1032, 2017, doi: http://www1.vnua.edu.vn/tapchi/upload/8-2017/4.pdf.

[6] J. M. Bric, R. M. Bostock, and S. E. Silverstone, "Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 535–538, 1991, [Online]. Available: doi: https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991%0A

[7] A. Kumar, R. Singh, A. Yadav, D. D. Giri, P. K. Singh, and K. D. Pandey, "Isolation and characterization of bacterial endophytes of Curcuma longa L.," *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, p. 60, Jun. 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0393-y.

[8] J. D. Nugroho, A. Y. S. Arobaya, and E. A. Tanur, "Propagation of Dendrobium antennatum Lindl via seed culture in vitro using simple medium: fertilizer and complex organic based medium," *Hayati J. Biosci.*, vol. 26, no. 3, pp. 133–138, 2019, doi: https://doi.org/10.4308/hjb.26.3.133.

[9] D. T. K. Pham, B. Van Huynh, and T. Mai, "Genetic relationship analysis of Dendrobium anosmum Lindl. var. semialba based on the chloroplast matK and rbcL genes," *J. Agric. Dev.*, vol. 20, no. 3, pp. 41–49, 2021, doi: 10.52997/jad.6.03.2021.

[10] R. J. Porra, "The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b," *Photosynth. Res.*, vol. 73, pp. 149–156, 2002.

[11] T. Takamiya *et al.*, "Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse groups, Dendrobium section Dendrobium and allies," *AoB Plants*, vol. 6, p. plu045, 2014, doi: https://doi.org/10.1093/aobpla/plu045.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC HUẾ

Số: 2512 /QĐ-ĐHH

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

Huế, ngày 29 tháng 12 năm 2025

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế
GIÁM ĐỐC ĐẠI HỌC HUẾ

Căn cứ Nghị định số 30/CP ngày 04 tháng 4 năm 1994 của Chính phủ về việc thành lập Đại học Huế;

Căn cứ Thông tư số 10/2020/TT-BGDĐT ngày 14 tháng 5 năm 2020 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của đại học vùng và các cơ sở giáo dục đại học thành viên;

Căn cứ Nghị quyết số 36/NQ-HĐĐH ngày 20 tháng 5 năm 2022 của Hội đồng Đại học Huế về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Huế; Nghị quyết số 50/NQ-HĐĐH ngày 23 tháng 11 năm 2023 của Hội đồng Đại học Huế về việc sửa đổi, bổ sung một số điều của Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Huế và Nghị quyết số 14/NQ-HĐĐH ngày 19 tháng 3 năm 2025 của Hội đồng Đại học Huế về việc sửa đổi một số điều của Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Huế;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04 tháng 4 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1695/QĐ-ĐHH ngày 20 tháng 12 năm 2019 của Giám đốc Đại học Huế về việc ban hành Quy định về tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ tại Đại học Huế;

Căn cứ Quyết định số 553/QĐ-ĐHH ngày 11 tháng 5 năm 2021 của Giám đốc Đại học Huế về việc công nhận nghiên cứu sinh khoá năm 2021 của Đại học Huế;Quyết định số 75/QĐ-VCNSH ngày 10 tháng 6 năm 2021 về việc giao đề tài luận án và cử người hướng dẫn nghiên cứu sinh khoá năm 2021 và Quyết định số 28/QĐ-VCNSH ngày 27 tháng 3 năm 2023 của Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học về việc điều chỉnh người hướng dẫn nghiên cứu sinh khoá năm 2021 của Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế;

Theo đề nghị của Trưởng Ban Đào tạo và Công tác sinh viên.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế với đề tài: "**Nghiên cứu tạo một số dòng lan giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm".**

Của Nghiên cứu sinh: **Nguyễn Hữu Thọ**
Ngành: **Sinh học**
Mã số: **9420101**

(Danh sách thành viên Hội đồng kèm theo Quyết định này)

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án theo đúng Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ của Bộ Giáo dục và Đào tạo và Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ của Đại học Huế.

Điều 3. Chánh Văn phòng Đại học Huế, Trưởng các Ban: Đào tạo và Công tác sinh viên; Tổ chức cán bộ; Kế hoạch, Tài chính và Cơ sở vật chất; Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế và các Ông (Bà) có tên ở Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:
- Như Điều 3;
- Lưu: VT, ĐTCTSV. HLQC.

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

ĐẠI HỌC HUẾ

Bùi Văn Lợi

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC HUẾ

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 2512 /QĐ-ĐHH ngày 29 tháng 12 năm 2025 của Giám đốc Đại học Huế)

Cho luận án của Nghiên cứu sinh: **Nguyễn Hữu Thọ**
Đơn vị đào tạo: **Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế**
Người hướng dẫn:

- TS. Nguyễn Thị Kim Cúc, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế
- PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TT	Họ và tên	Đơn vị công tác	Chức trách trong Hội đồng
1	**GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc**	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	**Chủ tịch**
2	**PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam**	Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh	**Phản biện 1**
3	**PGS.TS. Nguyễn Thị Mộng Điệp**	Trường Đại học Quy Nhơn	**Phản biện 2**
4	**PGS.TS. La Việt Hồng**	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2	**Phản biện 3**
5	**PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Liên**	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	**Thư ký**
6	**PGS.TS. Quách Ngô Diễm Phương**	Trường Đại học Khoa học tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh	**Ủy viên**
7	**PGS.TS. Phạm Bích Ngọc**	Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam	**Ủy viên**

Danh sách gồm 07 thành viên./.

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

BIÊN BẢN KIỂM PHIẾU
(Dùng trong buổi đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế)

Ngày 27 tháng 02 năm 2026, Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29 tháng 12 năm 2025 của Giám đốc Đại học Huế cho nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ, ngành Sinh học đã bầu ra Ban kiểm phiếu với thành phần như sau:

1/ PPT. Trần Ngọc Nam: Trưởng Ban

2/ PGS.TS. Nguyễn Thị Mộng Diệp: Ủy viên

3/ PGS.TS. Lê Việt Hồng: Ủy viên

Ban kiểm phiếu đã tiến hành kiểm phiếu với kết quả như sau:

Số phiếu phát ra:	07	Số phiếu thu vào:	07
Số phiếu hợp lệ:	07	Số phiếu không hợp lệ:	00
Số phiếu tán thành:	07	Số phiếu không tán thành:	00

ỦY VIÊN	**ỦY VIÊN**	**TRƯỞNG BAN**
(ký và ghi họ tên)	*(ký và ghi họ tên)*	*(ký và ghi họ tên)*
Lê Việt Hồng	Nguyễn Thị Mộng Diệp	Trần Ngọc Nam

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

Huế, ngày 27 tháng 2 năm 2026

DANH SÁCH THÀNH VIÊN THAM DỰ
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Cho luận án của nghiên cứu sinh: **Nguyễn Hữu Thọ**

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

Ngành: **Sinh học**

Mã số: 9420101

Đơn vị đào tạo: Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

Hội đồng họp: Ngày 27 tháng 02 năm 2026

STT	Họ và tên	Đơn vị công tác	Chức trách trong Hội đồng	Chữ ký
1.	**GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc**	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Chủ tịch	
2.	**PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam**	Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh	Phản biện 1	
3.	**PGS.TS. Nguyễn Thị Mộng Điệp**	Trường Đại học Quy Nhơn	Phản biện 2	
4.	**PGS.TS. La Việt Hồng**	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2	Phản biện 3	
5.	**PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Liên**	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Thư ký	
6.	**PGS.TS. Quách Ngô Diễm Phương**	Trường Đại học Khoa học tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh	Uỷ viên	
7.	**PGS.TS. Phạm Bích Ngọc**	Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam	Uỷ viên	

Danh sách này có 07 thành viên./.

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

Huế, ngày 27 tháng 2 năm 2026

BIÊN BẢN
HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

1. Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ

Khóa: 2021

Ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

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

2. Thành phần hội đồng: Theo quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29 tháng 12 năm 2025 của Giám đốc Đại học Huế gồm các thành viên sau:

	Họ và tên	**Đơn vị công tác**	**Chức trách trong Hội đồng**
1.	GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam	Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh	Phản biện 1
3.	PGS.TS. Nguyễn Thị Mộng Điệp	Trường Đại học Quy Nhơn	Phản biện 2
4.	PGS.TS. La Việt Hồng	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2	Phản biện 3
5.	PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Liên	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Thư ký

6.	PGS.TS. Quách Ngô Diễm Phương	Trường Đại học Khoa học tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh	Uỷ viên
7.	PGS.TS. Phạm Bích Ngọc	Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam	Uỷ viên

Số thành viên có mặt: 7 / 7 thành viên.

3. Diễn biến chi tiết buổi bảo vệ như sau:

3.1. Khai mạc buổi bảo vệ luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế

- Đại diện Viện CNSH tuyên bố lý do, giới thiệu đại biểu tham dự:

PGS.TS. Võ Viết Minh Nhật, Phó trưởng ban Đào tạo và Công tác sinh viên, Đại học Huế;

PGS.TS. Nguyễn Văn Huế, Phó viện trưởng Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế;

PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng, Đại diện tập thể Giáo viên hướng dẫn;

Các cán bộ giảng viên thuộc Viện CNSH, Đại học Huế;

Gia đình và bạn bè của NCS.

- Giới thiệu: Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29 tháng 12 năm 2025 của Giám đốc Đại học Huế và đọc quyết định thành lập Hội đồng.

- Giới thiệu chủ tịch hội đồng - GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc, điều khiển buổi đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế.

3.2. Chủ tịch Hội đồng thông qua chương trình làm việc

Chủ tịch Hội đồng thông báo danh sách thành viên Hội đồng có mặt 7/7 thành viên, như vậy Hội đồng đủ điều kiện cho buổi bảo vệ làm việc.

Chủ tịch Hội đồng thông qua chương trình làm việc của Hội đồng và toàn bộ thành viên Hội đồng đã đồng ý về chương trình làm việc.

3.3. Hội đồng thông qua điều kiện bảo vệ

Thư ký hội đồng công bố các điều điệu để bảo vệ của nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ như sau:

- Nghiên cứu sinh đã hoàn thành chương trình đào tạo theo đúng quy định tại khoản 2 Điều 5 của Quyết định số 1528/QĐ-ĐHH ngày 8 tháng 10 năm 2021 của Giám đốc Đại học Huế về việc ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ tại Đại học Huế, cụ thể nghiên cứu sinh đã hoàn thành:

STT	Các học phần/ chuyên đề/ tiểu luận tổng quan	Mã số	Số tín chỉ	Điểm TB
02 học phần bắt buộc				
1	Di truyền phân tử và hệ gen	HPTSSH-01	2	9,7
2	Bảo tồn đa dạng sinh học	HPTSSH-02	2	9,2
02 học phần tự chọn				
1	Vi sinh vật học ứng dụng	HPTSSH-08	2	8,8
2	Công nghệ tế bào nâng cao	HPTSSH-10	2	9,0
03 chuyên đề				
1	Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống	CDTSSH-02	2	9,4
2	Chẩn đoán phân tử	CDTSSH-05	2	9,5
3	Ứng dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật	CDTSSH-14	2	9,6
01 tiểu luận tổng quan				
1	Nghiên cứu tạo một số dòng lan giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm		2	9,2

- Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu ở Điều 17 của Quyết định số 1695/QĐ-ĐHH ngày 20 tháng 12 năm 2019 của Giám đốc Đại học Huế về việc ban hành Quy định về tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ tại Đại học Huế.

- Tập thể hướng dẫn đã có văn bản khẳng định chất lượng của luận án và đồng ý cho nghiên cứu sinh được bảo vệ luận án trước hội đồng cấp Đại học Huế.

- Nghiên cứu sinh đã có 5 công trình công bố, trong đó 2 bài đăng trên các tạp chí (với 1 bài thuộc danh mục Scopus Q4) và 3 bài đăng trên kỷ yếu hội thảo. Các nội dung đăng báo trên đúng với các nội dung trong luận án.

3.4. Nghiên cứu sinh trình bày luận án

Nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ trình bày tóm tắt nội dung luận án tiến sĩ trong thời gian 30 phút.

3.5. Các ý kiến đánh giá và góp ý của thành viên Hội đồng

Chi tiết các ý kiến của thành viên hội đồng xem bản nhận xét của các thành viên hội đồng đính kèm biên bản này. Sau đây là những nhận xét cơ bản của các thành viên hội đồng:

- Ý nghĩa khoa học của đề tài luận án:

+ Ý nghĩa khoa học:

Luận án có ý nghĩa khoa học thông qua việc **bổ sung dữ liệu về đặc điểm hình thái**, tế bào học và đa dạng di truyền của các dòng lan Giả hạc tím Huế sau xử lý đột biến, góp phần làm rõ khả năng tạo biến dị nhân tạo trên đối tượng phong lan.

+ Ý nghĩa thực tiễn:

Kết quả nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất giống lan thương mại và góp phần giảm áp lực khai thác lan rừng tự nhiên. Việc hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* và huấn luyện cây con ra vườn ươm, kết hợp ứng dụng vi sinh vật nội sinh nhằm cải thiện sinh trưởng, cho thấy luận án không chỉ tập trung vào tạo biến dị mà còn quan tâm đến khâu chuyển giao công nghệ và khả năng áp dụng ngoài sản xuất. Điều này làm tăng giá trị ứng dụng của nghiên cứu trong bối cảnh ngành hoa lan đang phát triển nhưng còn phụ thuộc lớn vào nguồn giống tự nhiên hoặc nhập nội.

- Sự hợp lý, độ tin cậy và tính hiện đại của các phương pháp nghiên cứu:

Nghiên cứu của Luận án kết hợp các phương pháp thường quy trong các nội dung về phân loại, nuôi cấy mô thực vật, gây đột biến mô, tế bào bằng hoá chất, phân tích hàm lượng các yếu tố nội sinh, phân lập vi sinh vật nội sinh và các phương pháp hiện đại trong các nội dung nghiên cứu về giải trình tự định danh loài, phân tích đa dạng di truyền. Nhìn chung các phương pháp áp dụng trong Luận án là phù hợp với nội dung nghiên cứu. Các thí nghiệm được lặp lại phù hợp, cùng với các mẫu đối chứng đảm bảo độ tin cậy cho các nghiên cứu.

- Đánh giá kết quả đạt được, những đóng góp mới và giá trị của những đóng góp đó:

Từ kết quả nghiên cứu, Luận án đã có những đóng góp quan trọng:

- Hệ thống hoá các đặc điểm hình thái để nhận diện và phân loại giống lan Giả hạc tím Huế.

- Phát triển thành công quy trình gây đột biến bằng hoá chất (colchicine và DMS) và sàng lọc dòng biến dị đối với giống hoa lan Giả hạc tím Huế

- Xây dựng quy trình hoàn chỉnh để nhân giống *in vitro* và chuyển cây ra vườn ươm đối với giống lan Giả hạc tím Huế.

Về khoa học, luận án bổ sung dữ liệu về tạo biến dị nhân tạo trên một dòng lan bản địa chưa được nghiên cứu chuyên sâu, chủ yếu mang ý nghĩa hoàn thiện quy trình trên đối tượng cụ thể.

Về thực tiễn, kết quả có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất giống và giảm áp lực khai thác tự nhiên.

- Những ưu điểm và nhược điểm, thiếu sót, những điểm cần bổ sung và sửa chữa:

Ưu điểm:

- Luận án có bố cục rõ ràng, trình tự logic từ tổng quan, phương pháp đến kết quả và thảo luận. Hệ thống bảng biểu và hình ảnh tương đối đầy đủ, minh họa trực quan cho nội dung nghiên cứu. Thiết kế thí nghiệm có kiểm soát và có xử lý thống kê, thể hiện tính nghiêm túc trong triển khai nghiên cứu.
- Luận án sở hữu tính đột phá khi ứng dụng các tác nhân gây đột biến hóa học để chủ động tạo ra những biến dị mới về hình thái và di truyền trên nền gen quý của lan Giả hạc tím Huế. Thay vì thụ động tìm kiếm trong tự nhiên, luận án đã làm chủ công nghệ để nâng cao giá trị thẩm mỹ và khả năng sinh trưởng của cây, đồng thời xác lập được ngưỡng xử lý tối ưu để thu được tỉ lệ đột biến mong muốn.
- Kết quả công bố của NCS với 5 công trình đều đứng tên đầu cũng đã thể hiện năng lực và nổ lực của NCS trong quá trình thực hiện đề tài luận án.

Nhược điểm: Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng Hội đồng cũng đã nêu ra các thiếu sót trong trình bày luận án của NCS cần được chỉnh sửa trước khi trình bản chính thức để Đại học Huế phê duyệt. Các thiếu sót bao gồm cả về nội dung, hình thức, sự chính xác về cơ sở khoa học, khái niệm cơ bản. Cụ thể một số điểm như sau:

Phần mở đầu và mục tiêu:

- Cần phải khẳng định Luận án là chỉ mới là bước đầu trong việc tạo dòng biến dị của giống lan Giả hạc tím Huế.

- Mục tiêu "tạo vật liệu khởi đầu *in vitro*" nên điều chỉnh theo hướng "xây dựng/hoàn thiện quy trình nhân giống in vitro", vì tạo vật liệu khởi đầu chỉ là một phần của quy trình.
- Cần xác định lại đối tượng nghiên cứu của Luận án, giống lan Giả hạc tím Huế là vật liệu nghiên cứu, không phải là đối tượng nghiên cứu.

Phần tổng quan các vấn đề nghiên cứu:

- Cần chỉnh sửa theo hướng bổ sung bàn luận tập trung vào các tài liệu liên quan đến đề tài luận án.

Phần Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

- Nên xác đinh rõ vật liệu nghiên cứu và đối tượng nghiên cứu: giống lan Giả hạc tím Huế là vật liệu nghiên cứu, không phải là đối tượng nghiên cứu.
- Phương pháp nghiên cứu cần cấu trúc lại theo từng nội dung nghiên cứu.
- Cần thống nhất cách mô tả các thí nghiệm. Chỉnh sửa các thuật ngữ đúng theo văn phong khoa học.

Phần trình bày kết quả

- Cần chỉ dẫn tất cả các hình ảnh minh họa vào trong bài viết.
- Bổ sung hình phẩu thức hoa của 6 dòng đột biến chọn lọc và bảng so sánh khác biệt của các dòng đột biến với dòng ban đầu.
- Cần kiểm tra lại tất cả phần xử lý thông kê ở kết quả nghiên cứu, đưa toàn bộ phần xử lý thống kê vào phụ lục.

Phần kết luận

- Cần viết lại chi tiết hơn.

Tài liệu tham khảo

- Cần rà soát lại các tài liệu trích dẫn từ website tin tức (ví dụ tài liệu số 14, 33, 34) và thay thế bằng nguồn khoa học chính thống nếu có thể.

Về hình thức:

- Thiếu sự nhất quán trong trình bày toàn luận án.
- Còn nhiều lỗi chính tả, thuật ngữ khoa học, in nghiêng/thường, viết tên loài tên hóa chất…cần chỉnh sửa trước khi trình bản chính thức.

- Nhận xét về chất lượng các bài báo khoa học:

- Có 5 bài báo khoa học được Nghiên cứu sinh công bố với vai trò là tác giả chính. Có 2 bài đăng trên tạp chí, một trong số đó thuộc danh mục Scopus Q4, và 3 bài đăng trên các kỷ yếu Hội thảo khoa học.
- Các bài báo không có sự trùng lặp về nội dung, nội dung đăng tải liên quan trực tiếp đến nội dung luận án. Các công trình đã công bố đáp ứng yêu cầu đào tạo tiến sĩ hiện hành.

- Kết luận:

- Luận án đạt yêu cầu, đáp ứng yêu cầu đối với luận án tiến sĩ ngành Sinh học.
- Bản tóm tắt luận án đáp ứng về hình thức, nội dung thể hiện được những kết quả cốt lõi của Luận án.

3.6. Nghiên cứu sinh giải thích các ý kiến của các thành viên Hội đồng:

NCS đã trả lời tất cả các câu hỏi của Hội đồng đặt ra.

Việc trao đổi giữa NCS và các thành viên Hội đồng cũng đã cho thấy hiểu biết của NCS về vấn đề mà mình đang nghiên cứu, những thiếu sót còn tồn tại cần chỉnh sửa.

3.7. Hội đồng họp kín đánh giá kết quả

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu và nhất trí bầu:

PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam : Trưởng ban

PGS.TS. Nguyễn Thị Mộng Điệp: Ủy viên

PGS.TS. La Việt Hồng: Ủy viên

- Ban kiểm phiếu thông qua kết quả trước Hội đồng và đã được toàn thể nhất trí.

(có biên bản kiểm phiếu đính kèm theo biên bản này)

7 phiếu phát ra; 7 phiếu thu vào

7 phiếu hợp lệ

7 phiếu tán thành

- Hội đồng thông qua nghị quyết với các nội dung sau:

+ Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án:

Về ý nghĩa khoa học: Nghiên cứu góp phần bổ sung bộ dữ liệu chuẩn về hình thái học đặc trưng và đặc điểm sinh học của quần thể lan Giả hạc tím Huế, làm cơ sở khoa học để định danh biến thể địa phương và khai thác nguồn gen quý hiếm trong chọn tạo giống lan. Nghiên cứu cũng đã xác lập được các thông số kỹ thuật tối ưu và cơ chế tác động của tác nhân gây đột biến lên sự biến đổi kiểu hình và kiểu gen của lan Giả hạc

tím Huế, góp phần mở rộng phổ biến dị di truyền và làm phong phú thêm lý thuyết về chọn tạo giống hoa lan bằng phương pháp đột biến nhân tạo.

Về mặt thực tiễn: kết quả luận án cung cấp quy trình nhân giống tối ưu, tạo ra các dòng lan đột biến có hình thái độc đáo và đề xuất giải pháp sử dụng vi sinh vật nội sinh giúp canh tác bền vững, mở ra hướng đi mới trong sản xuất hoa lan hàng hóa chất lượng cao.

+ Độ tin cậy của các luận điểm khoa học nêu trong luận án:

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu thường quy và hiện đại, phù hợp với nội dung nghiên cứu. Các thí nghiệm được lặp lại nhiều chu kỳ, dữ liệu thực nghiệm được thu thập trực tiếp và xử lý bằng thống kê toán học chuyên ngành, đảm bảo tính khách quan, minh bạch và có khả năng ứng dụng cao vào thực tiễn sản xuất.

+ Những điểm mới của công trình:

- Đây là nghiên cứu đầu tiên mô tả chi tiết các đặc điểm hình thái và nhận dạng đặc trưng của **dòng lan Giả hạc tím Huế**. Những kết quả này cung cấp cơ sở khoa học quan trọng để bổ sung vào khóa phân loại thực vật cho dòng lan Giả hạc tím Huế (thuộc loài *Dendrobium anosmum* Lindl.) tại thành phố Huế.
- Xây dựng thành công quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên đối tượng lan Giả hạc tím Huế bằng cách sử dụng các hóa chất gây đột biến là colchicine và DMS. Quy trình này được thực hiện tác động trực tiếp lên các vật liệu *in-vitro* như mô sẹo và protocorm. Nghiên cứu đã sử dụng các chỉ thị phân tử (RAPD) để đánh giá và khẳng định được sự đa dạng di truyền của các dòng đột biến được tạo ra.
- Phân lập và tạo ra chế phẩm vi sinh từ các vi sinh vật nội sinh có nguồn gốc từ cây lan rừng. Việc ứng dụng thành công chế phẩm này vào quá trình chăm sóc cây lan con ở giai đoạn vườn ươm không chỉ giúp cây sinh trưởng tốt mà còn góp phần giảm thiểu sử dụng hóa chất, bảo vệ môi trường.
- Hoàn thiện quy trình sản xuất khép kín với dòng lan Giả hạc tím Huế, từ nhân giống *in-vitro*, gây đột biến, tái sinh dòng đột biến cho đến kỹ thuật huấn luyện cây con ra vườn ươm với các thông số tối ưu về giá thể, ánh sáng và độ ẩm.

+ Sự phù hợp của tên đề tài với nội dung và mã số ngành:

- Tên đề tài phản ánh sự phù hợp với nội dung nghiên cứu; có mục tiêu nghiên cứu rõ ràng, phù hợp với ngành Sinh học, mã số: 9420101.

+ Những thiếu sót cần chỉnh sửa:

Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng Hội đồng cũng đã nêu ra các thiếu sót trong trình bày luận án của NCS. Các thiếu sót bao gồm cả về nội dung, hình thức, sự chính xác về cơ sở khoa học, khái niệm cơ bản theo ý kiến đánh giá của các thành viên hội đồng.

+ Đánh giá chung:

Kết quả của đề tài luận án có giá trị khoa học lẫn thực tiễn.

Nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ đạt đủ năng lực và trình độ của một Tiến sĩ.

3.8. Hội đồng công bố kết quả và nghị quyết

- Trưởng ban kiểm phiếu đọc biên bản kiểm phiếu và công bố kết quả đánh giá của Hội đồng.
- Chủ tịch Hội đồng đọc nghị quyết của hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế cho nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ.
- Hội đồng đề nghị Giám đốc Đại học Huế *công nhận* học vị và cấp bằng tiến sĩ chuyên ngành Sinh học cho nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ

Thư ký Hội đồng	**Chủ tịch Hội đồng**
Nguyễn Thị Thu Liên	**Nguyễn Hoàng Lộc**

Xác nhận của đơn vị đào tạo

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
ĐẠI HỌC HUẾ

PGS.TS. Trương Thị Hồng Hải

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

Huế, ngày 27 tháng 2 năm 2026

NGHỊ QUYẾT CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

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

Nghiên cứu sinh: **Nguyễn Hữu Thọ**

- Khóa: **2021**
- Ngành: **Sinh học**
- Mã số: **9420101**

Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế, được thành lập theo quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29 tháng 12 năm 2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp vào lúc 8h00, ngày 27/2/2026 tại Đại học Huế. Sau khi thảo luận, Hội đồng đã thống nhất với quyết nghị về luận án như sau:

1. **Kết luận về ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án**

Về ý nghĩa khoa học: Nghiên cứu góp phần bổ sung bộ dữ liệu chuẩn về hình thái học đặc trưng và đặc điểm sinh học của quần thể lan Giả hạc tím Huế, làm cơ sở khoa học để định danh biến thể địa phương và khai thác nguồn gen quý hiếm trong chọn tạo giống lan. Nghiên cứu cũng đã xác lập được các thông số kỹ thuật tối ưu và cơ chế tác động của tác nhân gây đột biến lên sự biến đổi kiểu hình và kiểu gen của lan Giả hạc tím Huế, góp phần mở rộng phổ biến dị di truyền và làm phong phú thêm lý thuyết về chọn tạo giống hoa lan bằng phương pháp đột biến nhân tạo.

Về mặt thực tiễn: kết quả luận án cung cấp quy trình nhân giống tối ưu, tạo ra các dòng lan đột biến có hình thái độc đáo và đề xuất giải pháp sử dụng vi sinh vật nội sinh giúp canh tác bền vững, mở ra hướng đi mới trong sản xuất hoa lan hàng hóa chất lượng cao.

2. **Kết luận về phương pháp nghiên cứu, mức độ chính xác của dữ liệu sử dụng**

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu thường quy và hiện đại, phù hợp với nội dung nghiên cứu. Các thí nghiệm được lặp lại nhiều chu kỳ, dữ liệu thực nghiệm được thu thập trực tiếp và xử lý bằng thống kê toán học chuyên ngành, đảm bảo tính khách quan, minh bạch và có khả năng ứng dụng cao vào thực tiễn sản xuất.

3. Kết luận về những thành công và đóng góp mới của luận án về lý luận và thực tiễn

Luận án của NCS Nguyễn Hữu Thọ đã đóng góp những điểm mới quan trọng cả về lý thuyết và thực tiễn trong lĩnh vực sinh học và chọn tạo giống hoa lan, cụ thể:

- Đây là nghiên cứu đầu tiên mô tả chi tiết các đặc điểm hình thái và nhận dạng đặc trưng của **dòng lan Giả hạc tím Huế**. Những kết quả này cung cấp cơ sở khoa học quan trọng để bổ sung vào khóa phân loại thực vật cho dòng lan Giả hạc tím Huế (thuộc loài *Dendrobium anosmum* Lindl.) tại thành phố Huế.
- Xây dựng thành công quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên đối tượng lan Giả hạc tím Huế bằng cách sử dụng các hóa chất gây đột biến là colchicine và DMS. Quy trình này được thực hiện tác động trực tiếp lên các vật liệu *in-vitro* như mô sẹo và protocorm. Nghiên cứu đã sử dụng các chỉ thị phân tử (RAPD) để đánh giá và khẳng định được sự đa dạng di truyền của các dòng đột biến được tạo ra.
- Phân lập và tạo ra chế phẩm vi sinh từ các vi sinh vật nội sinh có nguồn gốc từ cây lan rừng. Việc ứng dụng thành công chế phẩm này vào quá trình chăm sóc cây lan con ở giai đoạn vườn ươm không chỉ giúp cây sinh trưởng tốt mà còn góp phần giảm thiểu sử dụng hóa chất, bảo vệ môi trường.
- Hoàn thiện quy trình sản xuất khép kín với dòng lan Giả hạc tím Huế, từ nhân giống *in-vitro*, gây đột biến, tái sinh dòng đột biến cho đến kỹ thuật huấn luyện cây con ra vườn ươm với các thông số tối ưu về giá thể, ánh sáng và độ ẩm.

4. Kết luận về sự phù hợp của tên đề tài với nội dung và mã số ngành:

Tên đề tài luận án phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu. Nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành Sinh học, mã số 9420201.

5. Kết luận về các hạn chế và yêu cầu chỉnh sửa

Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng Hội đồng cũng đã nêu ra các thiếu sót trong trình bày luận án của NCS. Các thiếu sót bao gồm cả về nội dung, hình thức, sự chính xác về cơ sở khoa học, khái niệm cơ bản. Yêu cầu NCS chỉnh sửa trước khi trình bản chính thức để Đại học Huế phê duyệt.

6. Kết luận về việc trả lời câu hỏi, trình độ hiểu biết của nghiên cứu sinh

Qua trao đổi trả lời các câu hỏi của các thành viên trong hội đồng, NCS. Nguyễn Hữu Thọ đã chứng tỏ nắm được đủ sâu về đề tài nghiên cứu của mình.

7. Kết luận chung

- Kết quả bỏ phiếu:

100% tán thành

- Kết luận về giá trị khoa học và thực tiễn của luận án, kết luận về trình độ và năng lực của nghiên cứu sinh:

Kết quả của đề tài luận án có giá trị khoa học lẫn thực tiễn.

Nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ đạt đủ năng lực và trình độ của một Tiến sĩ.

- Kết luận yêu cầu về chỉnh sửa của luận án:

Chỉnh sửa tất cả các lỗi về hình thức và nội dung theo góp ý của Hội đồng.

- Kết luận về việc đề nghị cấp bằng tiến sĩ và nhận học vị tiến sĩ:

Nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ đủ điều kiện nhận học vị Tiến sĩ.

Thống nhất đề nghị Đại học Huế công nhận học vị và cấp bằng Tiến sĩ cho Nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ.

Thư ký Hội đồng	**Chủ tịch Hội đồng**
Nguyễn Thị Thu Liên	**Nguyễn Hoàng Lộc**

Xác nhận của đơn vị đào tạo

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

PGS.TS. Trương Thị Hồng Hải

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Thông tin về người nhận xét:
Họ và tên: Nguyễn Hoàng Lộc
Chức danh: GS Học vị: TS
Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế
Chức trách trong hội đồng: Chủ tịch

Họ tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ
Ngành: Sinh học Mã số: 9420101
Tên đề tài: Nghiên cứu tạo một số dòng lan giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum*) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Luận án được thực hiện nhằm mục đích gia tăng giá trị kinh tế cho lan Giả hạc tím Huế. Tính thời sự của đề tài thể hiện qua việc ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến như nuôi cấy *in-vitro*, sử dụng tác nhân hóa học (colchicine, dimethyl sulfate - DMS) và chỉ thị phân tử (RAPD) để chủ động tạo ra các dòng đột biến mới thay vì phụ thuộc vào tự nhiên. Về mặt khoa học, nghiên cứu góp phần bổ sung dữ liệu hình thái, hoàn thiện quy trình gây đột biến thực nghiệm và xác định các biến đổi di truyền ở mức độ tế bào, phân tử. Về mặt thực tiễn, kết quả luận án cung cấp quy trình nhân giống tối ưu, tạo ra các dòng lan đột biến có hình thái độc đáo và đề xuất giải pháp sử dụng vi sinh vật nội sinh giúp canh tác bền vững, mở ra hướng đi mới trong sản xuất hoa lan hàng hóa chất lượng cao.

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài luận án không trùng lặp với các kết quả nghiên cứu liên quan đã được công bố trước đây ở trong và ngoài nước. Tài liệu tham khảo trong luận án được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ, trung thực, cập nhật và phù hợp với nội dung luận án.

3. Sự phù hợp của đề tài nghiên cứu

Tên đề tài luận án phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu. Nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành Sinh học, mã số 9420201.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu thường quy phù hợp với nội dung và mục tiêu của đề tài, đảm bảo được độ tin cậy cho các số liệu thực nghiệm. Các phương pháp xử lý thống kê hợp lý.

5. Những đóng góp mới của luận án và ý nghĩa khoa học, độ tin cậy

5.1. Đóng góp mới

Luận án của NCS Nguyễn Hữu Thọ đã đóng góp những điểm mới quan trọng cả về lý thuyết và thực tiễn trong lĩnh vực sinh học và chọn tạo giống hoa lan, cụ thể như sau:

- Mô tả chi tiết và nhận diện loài: Đây là nghiên cứu đầu tiên mô tả một cách chi tiết các đặc điểm hình thái và nhận dạng đặc trưng của dòng lan Giả hạc tím Huế. Những kết quả này cung cấp cơ sở khoa học quan trọng để bổ sung vào khóa phân loại thực vật cho loài này tại khu vực TP. Huế.
- Xây dựng quy trình đột biến thực nghiệm: Luận án là công trình đầu tiên xây dựng thành công quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên đối tượng lan Giả hạc tím Huế bằng cách sử dụng các hóa chất gây đột biến là colchicine và DMS. Quy trình này được thực hiện tác động trực tiếp lên các vật liệu *in-vitro* như mô sẹo và protocorm.
- Đánh giá đa dạng di truyền: Nghiên cứu đã sử dụng các chỉ thị phân tử (RAPD) để đánh giá và khẳng định được sự đa dạng di truyền của các dòng đột biến được tạo ra.
- Ứng dụng chế phẩm vi sinh nội sinh: Một điểm mới nổi bật là việc phân lập và tạo ra chế phẩm vi sinh từ các vi sinh vật nội sinh có nguồn gốc từ cây lan rừng. Việc ứng dụng thành công chế phẩm này vào quá trình chăm sóc cây lan con ở giai đoạn vườn ươm không chỉ giúp cây sinh trưởng tốt mà còn góp phần giảm thiểu sử dụng hóa chất, bảo vệ môi trường.
- Hoàn thiện quy trình sản xuất khép kín: Luận án đã hoàn thiện hệ thống quy trình từ nhân giống *in-vitro*, gây đột biến, tái sinh dòng đột biến cho đến kỹ thuật huấn luyện cây con ra vườn ươm với các thông số tối ưu về giá thể, ánh sáng và độ ẩm.

5.2. Ý nghĩa khoa học

- Xác lập bộ dữ liệu chuẩn về hình thái học đặc trưng và đặc điểm sinh học của quần thể lan Giả hạc tím Huế, làm cơ sở khoa học để định danh biến thể địa phương và khai thác nguồn gen quý hiếm trong chọn tạo giống lan.
- Xác lập các thông số kỹ thuật tối ưu và cơ chế tác động của tác nhân gây đột biến lên sự biến đổi kiểu hình và kiểu gen của lan Giả hạc tím Huế, góp phần mở rộng phổ biến dị di truyền và làm phong phú thêm lý thuyết về chọn tạo giống hoa lan bằng phương pháp đột biến nhân tạo.

5.3. Độ tin cậy của luận án

Độ tin cậy của các kết quả nghiên cứu được đảm bảo nhờ hệ thống phương pháp luận chặt chẽ, dựa trên các thí nghiệm lặp lại nhiều chu kỳ, dữ liệu thực nghiệm được thu thập trực tiếp và xử lý bằng thống kê toán học chuyên ngành, đảm bảo tính khách quan, minh bạch và có khả năng ứng dụng cao vào thực tiễn sản xuất.

6. Ưu và khuyết điểm của bản luận án

6.1. Ưu điểm của luận án

Luận án sở hữu tính đột phá khi ứng dụng các tác nhân gây đột biến hóa học để chủ động tạo ra những biến dị mới về hình thái và di truyền trên nền gen quý của lan Giả hạc tím Huế. Thay vì thụ động tìm kiếm trong tự nhiên, luận án đã làm chủ công nghệ để nâng cao giá trị thẩm mỹ và khả năng sinh trưởng của cây, đồng thời xác lập được ngưỡng xử lý tối ưu để thu được tỉ lệ đột biến mong muốn.

6.2. Khuyết điểm và hạn chế của luận án

a/. Thiếu chính xác về khái niệm và cơ sở khoa học

- Luận án có sự nhầm lẫn giữa "bảo tồn nguồn gen" và "đa dạng hóa nguồn gen". Đột biến thực nghiệm là quá trình làm biến đổi cấu trúc di truyền, đi ngược lại nguyên tắc bảo tồn nguyên trạng nguồn gen quý của địa phương.
- Thiếu các tài liệu tham khảo khoa học để khẳng định dòng "Tím Huế" là đặc hữu cũng như thực trạng bị khai thác quá mức như tác giả nêu.
- Việc sử dụng các marker (ITS, *trnL, matK, rbcL*) chỉ phù hợp để nhận diện loài, không có giá trị phân loại dưới cấp loài (subspecies/variety). Tác giả chưa áp dụng các chỉ thị hiệu quả hơn, vd: SSR hoặc phân tích sắc tố anthocyanin, để phân biệt các dòng/giống.

b/. Chưa đồng nhất giữa mục tiêu chọn tạo giống và kết quả thực nghiệm

- Mục tiêu đột biến là tìm kiếm biến dị ưu tú (hoa to, màu sắc đột phá), nhưng kết quả thực tế lại tạo ra các dòng thoái hóa (M14, M16) với hoa nhỏ hơn, màu sắc nhạt nhòa và mất đi viền tím quý giá của cây gốc.
- Các tiêu chí cốt lõi như "hương thơm" và "độ bền" chỉ được mô tả cảm tính, thiếu số liệu đối chứng khoa học về nồng độ hợp chất thơm hoặc thời gian theo dõi hoa tàn thực tế.

c/. Còn hạn chế về tính thực tiễn

- Tác giả mới chỉ giải quyết được bài toán "gây đột biến" trong phòng thí nghiệm mà chưa tiến tới bước "tuyển chọn dòng ưu tú" - mục tiêu quan trọng nhất của chọn giống.
- Việc đầu tư quy trình nhân giống bài bản cho những dòng có hình thái kém hơn cây hoang dã (wild-type) là không cần thiết và không mang lại giá trị thương mại trên thị trường hoa lan.

d/. Phân tích di truyền và tính ổn định của đột biến

- Dù chỉ thị RAPD cho tỷ lệ đa hình cao (75,71%), luận án vẫn chưa giải thích được mối liên hệ giữa các biến đổi gen này với các tính trạng hình thái mong muốn.
- Chưa làm rõ tần suất xuất hiện biến dị có lợi trên tổng mẫu xử lý. Nếu đa số là biến dị có hại, tính khả thi của quy trình sẽ bị đặt dấu hỏi.

- Tác giả chưa có dữ liệu chứng minh các đặc điểm đột biến có duy trì ổn định qua các thế hệ nhân giống tiếp theo (đặc biệt sau nhiều chu kỳ *in vitro*) hay chỉ là những biến dị sinh lý nhất thời do môi trường.

e/. Kết luận còn chung chung cần viết lại chi tiết hơn.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí và giá trị của công trình công bố

Đề tài luận án có 5 công bố: 1 bài báo ở tạp chí quốc tế (Q4), 1 bài ở Hội thảo khoa học, 2 bài ở Hội nghị khoa học toàn quốc và 1 bài ở tạp chí khoa học của Đại học Huế. Các công trình có nội dung phù hợp với luận án.

8. Kết luận chung

Luận án đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ Sinh học. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

Đồng ý cho nghiên cứu sinh bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế

Huế, ngày 10 tháng 2 năm 2026

Người nhận xét

(Ký tên, ghi họ tên)

Nguyễn Hoàng Lộc

Xác nhận của cơ quan

Xác nhận: Ông Nguyễn Hoàng Lộc
cán bộ của trường và chữ ký bên là đúng
Huế, ngày 02 tháng 3 năm 2026
HIỆU TRƯỞNG TRƯỜNG ĐHKH

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC
ĐẠI HỌC HUẾ

PHÓ TRƯỞNG PHÒNG TC&HC
Trương Đình Trọng

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Thị Thu Liên

Học hàm: PGS. Học vị: TS.

Chuyên ngành: Sinh học

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Chức trách trong hội đồng: Thư ký

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ

Chuyên ngành: Sinh học Mã số: 9420101

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

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Lan Giả hạc được nhiều người lựa chọn do có đặc điểm thân lá và mặt hoa đẹp, mùi thơm, đặc biệt là giống lan này còn có những dòng đột biến rất có giá trị về thẩm mỹ, được người chơi săn tìm và sưu tầm. Hiện nay, các đột biến của lan Giả hạc chủ yếu là phát sinh tự nhiên do đó số lượng rất ít, chưa đa dạng, đồng thời mức độ ổn định di truyền của các đột biến này qua các thế hệ cũng chưa được kiểm chứng. Giả hạc tím ngoài đặc trưng như khuôn hoa lớn, cánh sáp có viền, mùi thơm dịu, còn có màu tím đặc trưng của Huế. Do vậy, nghiên cứu tạo dòng đột biến có giá trị từ nguồn giống lan bản địa này, cũng như phục vụ nhu cầu của người sưu tầm lan, và góp phần bảo tồn nguồn gen của giống lan bản địa. Đề tài luận án có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Các nội dung nghiên cứu, đối tượng nghiên cứu không trùng lặp với các công trình, luận án đã công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác. Các nội dung tham khảo

trong luận án từ những công trình đã công bố rất phong phú, được trích dẫn và liệt kê khá rõ ràng, đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài hoàn toàn phù hợp với nội dung luận án, nội dung nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành Sinh học của nghiên cứu sinh.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp sử dụng trong Luận án này được phối hợp các phương pháp thường quy trong các nội dung về phân loại, nuôi cấy mô thực vật, gây đột biến mô, tế bào bằng hoá chất, phân tích hàm lượng các yếu tố nội sinh, phân lập vi sinh vật nội sinh và các phương pháp hiện đại trong các nội dung nghiên cứu về giải trình tự định danh loài, phân tích đa dạng di truyền. Nhìn chung các phương pháp áp dụng trong Luận án là phù hợp với nội dung nghiên cứu. Các thí nghiệm được lặp lại phù hợp, cùng với các mẫu đối chứng đảm bảm độ tin cậy cho các nghiên cứu.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã xây dựng được quy trình nhân giống in vitro và xử lý đột biến hóa học trên lan Giả hạc tím Huế, bước đầu tạo được một số dòng có biến dị hình thái và sai khác di truyền được ghi nhận qua phân tích tế bào và chỉ thị RAPD.

Về khoa học, luận án bổ sung dữ liệu về tạo biến dị nhân tạo trên một dòng lan bản địa chưa được nghiên cứu chuyên sâu, chủ yếu mang ý nghĩa hoàn thiện quy trình trên đối tượng cụ thể.

Về thực tiễn, kết quả có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất giống và giảm áp lực khai thác tự nhiên, tuy nhiên cần theo dõi thêm tính ổn định di truyền qua các thế hệ để khẳng định giá trị chọn giống lâu dài.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc...của luận án

Luận án có bố cục rõ ràng, trình tự logic từ tổng quan, phương pháp đến kết quả và thảo luận. Các bảng biểu và hình ảnh tương đối đầy đủ, rõ ràng, minh họa trực quan cho nội dung nghiên cứu. Thiết kế thí nghiệm có kiểm soát và có xử lý thống kê, thể hiện tính nghiêm túc trong triển khai nghiên cứu.

Tuy nhiên, vẫn còn một số hạn chế cần chỉnh sửa và hoàn thiện:

- Cần xác định dòng và giống là 2 từ với nghĩa khác nhau. Trong bối cảnh của luận án dòng sẽ phù hợp hơn.
- Dựa vào nội dung và kết quả nghiên cứu, nên điều chỉnh kết luận 1 thành: "Xác định mẫu lan Giả hạc tím thu được ở Huế thuộc loài *Dendrobium anosmum* Lindl dựa vào đặc điểm hình thái và phân tử" thay vì " đã thành công trong việc xác định, thu thập đúng mẫu lan Giả hạc tím Huế...". Từ đó cũng nên điều chỉnh phần ý nghĩa khoa học (trang 3) và điểm mới 1 của luận án (trang 4).
- Cần xác định rõ có bao nhiêu cây đầu dòng được đưa vào trong nghiên cứu này?
- Cần chỉnh sửa tất cả lỗi chính tả, câu từ, thuật ngữ, in nghiêng còn nhiều trong Luận án.
- Một số tên bảng còn không đúng nghĩa (bảng 3.14).
- Cần cân nhắc đưa một số hình ảnh từ phụ lục vào nội dung Luận án để diễn đạt rõ lưu loát hơn.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Nghiên cứu sinh đã công bố 05 công trình khoa học liên quan trực tiếp đến nội dung luận án, trong đó có 01 bài báo quốc tế (thuộc danh mục SCOPUS, xếp hạng Q4), 01 bài báo trong Tạp chí Đại học Huế, 01 bài trong kỷ yếu hội thảo quốc tế và 02 công bố trong các hội nghị khoa học chuyên ngành.:

1. Conservation of *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' by in vitro propagation. 2023. Tạp chí Journal Propagation of Ornamental Plants, Tập 23, số 2, 39-48. Tạp chí thuộc danh mục Scopus phân hạng Q4.

2. Nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng. 2024. Tạp chí Đại học Huế, Tập 133, số 1C.

3. 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*. 2024. 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.

4. *Dendrobium anosmum* Lindl. 'Tim Hue' and the method of vegetative propagation from the axillary node shoots of the stem (keikis). 2024. Hội nghị khoa học Quốc gia lần thứ 6 về Nghiên cứu và giảng dạy sinh học ở Việt Nam, 908-915.

5. Nghiên cứu ảnh hưởng của Dimethyl sulphate (DMS) đến tạo biến dị lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum Lindl*). 2024. Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, 467-473.

Các bài báo không có sự trùng lặp về nội dung, nội dung đăng tải liên quan trực tiếp đến nội dung luận án. Các công trình đã công bố đáp ứng yêu cầu đào tạo tiến sĩ hiện hành.

Nội dung các công bố này đều liên quan đến các nội dung chính của luận án. Các công trình đã công bố đáp ứng yêu cầu đào tạo tiến sĩ hiện hành.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

- Luận án đạt yêu cầu, đáp ứng yêu cầu đối với luận án tiến sĩ ngành Sinh học.
- Bản tóm tắt luận án đáp ứng về hình thức, nội dung thể hiện được những kết quả cốt lõi của Luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

(Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế)

Đồng ý để Nghiên cứu sinh bảo vệ Luận án trước Hội đồng đánh giá cấp Đại học Huế.

Xác nhận của cơ quan

Xác nhận: Bà Nguyễn Thị Thu Liên
cán bộ của trường và chữ ký bên là đúng
Huế, ngày 26 tháng 02 năm 2026
HIỆU TRƯỞNG TRƯỜNG ĐHKH

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC
ĐẠI HỌC HUẾ

PHÓ TRƯỞNG PHÒNG TC&HC
Trương Đình Trọng

Huế, ngày 10 tháng 2 năm 2026
Người nhận xét ký tên

Nguyễn Thị Thu Liên

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: Trịnh Ngọc Nam

Học hàm: Phó giáo sư Học vị: Tiến sĩ

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Cơ quan công tác: Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh

Chức trách trong hội đồng: Phản biện 1

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ

Chuyên ngành: Sinh học Mã số: 9420101

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

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Việt Nam nằm trong khu vực phân bố đa dạng của các loài thuộc họ Phong lan. Nhiều loài đã được thu thập từ tự nhiên để trồng, nhân giống và thương mại, bên cạnh những loài hoặc giống nhập nội. So với các quốc gia hoặc vùng lãnh thổ có ngành công nghiệp hoa lan phát triển như Thái Lan, Singapore, Đài Loan, khâu yếu nhất của Việt Nam là khâu tạo giống, chính vì vậy tính đa dạng các giống hoa lan được tạo ra từ các loài bản địa là rất hạn chế. Trong kỹ thuật tạo giống hoa lan hiện nay, phổ biến nhất vẫn là kỹ thuật lai truyền thống, tiếp đến là kỹ thuật gây đột biến và kỹ thuật chuyển gene/chỉnh sửa gene. Nghiên cứu của Luận án tập trung vào việc tạo giống hoa lan mới từ giống hoa lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) bản địa bằng kỹ thuật gây đột biến bằng hoá chất (colchicine và DMS), chính vì vậy, rất quan trọng và cần thiết trong bối cảnh hiện nay. Quá trình đánh giá, sàng lọc Luận án đã chọn lọc được 27 dòng biến dị, trong đó có 6 dòng có tiềm năng làm giống canh tác đóng góp thiết thực vào sự đa dạng các giống hoa lan ở Việt Nam. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng đã bổ sung các đặc điểm hình thái đặc trưng vào khoá phân loại giúp nhận diện chính xác đối với giống lan Giả hạc tím Huế.

Nội dung nghiên cứu của Luận án và các kết quả thu nhận được là nguồn tư liệu quan trọng cho các nghiên cứu về sau trong kỹ thuật gây đột biến tạo dòng biến dị hoa lan, bên cạnh các phương pháp tạo giống bằng lai tạo hoặc chuyển gen.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Các nội dung nghiên cứu, đối tượng nghiên cứu không trùng lặp với các công trình, luận án đã công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác. Các nội dung tham khảo trong luận án từ những công trình đã công bố rất phong phú, được trích dẫn và liệt kê khá rõ ràng, đầy đủ.

Kiểm tra sự trùng lặp nội dung Luận án với các công trình khác bằng phần mềm Turnitin cho thấy mức trùng lặp chỉ 13%, là mức có độ nguyên bản cao.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài có sự phù hợp cao với nội dung nghiên cứu của Luận án. Nội dung Luận án là các nghiên cứu về sinh học thực vật, đảm bảo sự phù hợp về chuyên môn với chuyên ngành và mã số ngành.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Nghiên cứu của Luận án kết hợp các phương pháp thường quy trong các nội dung về phân loại, nuôi cấy mô thực vật, gây đột biến mô, tế bào bằng hoá chất, phân tích hàm lượng các yếu tố nội sinh, phân lập vi sinh vật nội sinh và các phương pháp hiện đại trong các nội dung nghiên cứu về giải trình tự định danh loài, phân tích đa dạng di truyền. Nhìn chung các phương pháp áp dụng trong Luận án là phù hợp với nội dung nghiên cứu. Các thí nghiệm được lặp lại phù hợp, cùng với các mẫu đối chứng đảm bảm độ tin cậy cho các nghiên cứu.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Từ kết quả nghiên cứu, Luận án đã có những đóng góp quan trọng:

- Hệ thống hoá các đặc điểm hình thái để nhận diện và phân loại giống lan Giả hạc tím Huế.
- Phát triển thành công quy trình gây đột biến bằng hoá chất (colchicine và DMS) và sàng lọc dòng biến dị đối với giống hoa lan Giả hạc tím Huế
- Xây dựng quy trình hoàn chỉnh để nhân giống *in vitro* và chuyển cây ra vườn ươm đối với giống lan Giả hạc tím Huế.

Trong những đóng góp kể trên, danh mục các đặc điểm hình thái để nhận diện và phân loại giống lan Giả hạc tím Huế và quy trình gây đột biến bằng hoá chất để tạo dòng lan biến dị là những đóng góp mới của Luận án cho lĩnh vực nghiên cứu.

Các dòng biến dị của lan Giả hạc tím Huế từ Luận án (6 dòng tiềm năng, với 2 dòng tiềm năng nhất là M5 và M17, là dòng biến dị bởi colchicine) có tiềm năng sử dụng cho canh tác, đa dạng hoá các giống lan phục vụ cho nhu cầu thưởng lãm và thương mại.

Những thí nghiệm trong những nội dung nghiên cứu được lặp lại với số mẫu lớn, được nội kiểm chứng, các số liệu thu thập được phân tích thống kê cẩn thận đảm bảm độ tin cậy cho kết quả của Luận án.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc…của luận án

*** Ưu điểm**

- Nội dung nghiên cứu của Luận án phong phú, khối lượng các thí nghiệm được thực hiện rất lớn. Luận án đã hoàn chỉnh quy trình từ tạo vật liệu *in vitro* mô lan Giả hạc tím Huế, đến quy trình gây đột biến bằng hoá chất và sàng lọc các dòng biến dị, quy trình chuyển và thuần hoá cây lan ra vườn ươm, cũng như tuyển chọn và áp dụng một số chủng vi khuẩn nội sinh có vai trò trong sự sinh trưởng của cây lan.
- Kỹ thuật thực nghiệm và phân tích của các nghiên cứu trong Luận án có độ phù hợp cao.
- Kết quả nghiên cứu đáp ứng được với các mục tiêu đặt ra đối với nghiên cứu của Luận án.

- Bài viết đạt độ chuẩn mực cao, đảm bảo văn phong khoa học, ít lỗi trình bày và lỗi chính tả. Nội dung thảo luận phong phú giúp nêu bật được những kết quả mới và các đóng góp về mặt khoa học của Luận án.

*** Nhược điểm**

- Mục tiêu tổng quát của Luận án là tạo được dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến, với những kết quả đạt được, nhìn chung có thể thấy, nghiên cứu đã đạt được mục tiêu đề ra. Tuy nhiên, với một dòng (giống) cây trồng, các đặc tính về các đặc tính sinh học (tính trạng kiểu gene, kiểu hình), tính ổn định của các đặc tính và khả năng di truyền của các đặc tính qua các thế hệ, cũng như tính đồng nhất là rất quan trọng, để xác định đó là một dòng (giống) cây trồng. Luận án đã tạo được thể biến dị của giống lan Giả hạc tím Huế, nhưng có thể thấy đây là biến dị chưa được sàng lọc qua các thế hệ, và là dạng thể khảm ở nguồn mô ban đầu là protocorm, chưa đánh giá được tính ổn định và di truyền của các đặc tính (kiểu gene, kiểu hình). Như vậy, cần phải khẳng định Luận án là chỉ mới là bước đầu trong việc tạo dòng biến dị của giống lan Giả hạc tím Huế.
- Cần xác định lại đối tượng nghiên cứu của Luận án, giống lan Giả hạc tím Huế là vật liệu nghiên cứu, không phải là đối tượng nghiên cứu (trang 3 và trang 35).
- Ở phần Ý nghĩa thực tiễn (trang 3), việc khẳng định dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến có nguồn gene ổn định là chưa có cơ sở, vì chưa qua quá trình đánh giá và kiểm chứng ở các thế hệ tiếp theo từ dòng biến dị thế hệ T_0.
- Ở phần Những điểm mới của luận án (trang 4), việc giới hạn khu vực Tp. Huế là không cần thiết, vì quá hẹp đối với những nội dung này. Bên cạnh đó, việc đánh giá đa dạng di truyền của các dòng la đột biến được tạo ra không phải là điểm mới của Luận án, đây chỉ là công việc thực hiện trong nội dung của Luận án.
- Phần Tổng quan các vấn đề nghiên cứu, ở trang 5, nội dung đề cập về 4 loại giả hành *Dendrobium* cần liệt kê và mô tả cụ thể hơn, thay vì chỉ nêu thông tin lấp lửng như vậy. Nội dung mô tả về đặc điểm lan Giả hạc (trang 6 và 7) nên bổ sung hình ảnh minh hoạ. Phần mô tả về bộ NST của lan Giả hạc (trang 8) cần bổ sung kích thước khi mô tả về kích thước lớn nhỏ.
- Phần Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu, danh mục 63 mồi RAPD sử dụng trong nghiên cứu cần bổ sung nguồn tham khảo bên cạnh đơn vị cung cấp là

hãng Operon Technologies. Cần bổ sung thông tin chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên lan sử dụng trong nghiên cứu.

- Ở phần Kết quả và thảo luận:

+ Hầu hết các hình minh hoạ đều không được dẫn vào nội dung bài viết.

+ Hình 3.2 trang 66, các hình chi tiết C và D là đã là protocorm nên chú thích không nên ghi là hạt lan gieo được 25 ngày và 35 ngày, thay vào đó là "Protocorm hình thành từ hạt này mầm sau 25, 35 ngày".

+ Phần 3.2.1. Gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng colchicine và DMS, trang 80 và 91, sự khác biệt về hình thái, thay đổi kiểu hình giữa dòng biến dị và đối chứng được nêu rất nhiều nhưng lại không có các mô tả sự khác biệt, sự thay đổi này là gì.

+ Bảng 3.5 trang 84 và Bảng 3.6 trang 85, kích thước protocorm với đơn vị là cm là rất lớn, cần kiểm tra lại tính chính xác.

+ Các Hình 3.12 và Hình 3.13 trang 90, trình bày trạng thái mô sẹo sau khi xử lý bằng colchicine và DMS đều không mô tả rõ ràng, cả trong nội dung bài viết. Những nội dung về sự khác biệt hình thái giữa các nghiệm thức thí nghiệm so với đối chứng (trang 87, 91) được đề cập, nhưng không mô tả là khác biệt như thế nào.

+ Kết quả nghiên cứu của Luận án cho thấy, số chồi, số lá, số rễ tạo ra, cũng như chiều cao chồi, cây, chiều dài rễ các dòng biến dị biến bằng colchicine và DMS hầu hết đều cao hơn so với mẫu đối chứng trong nuôi cấy *in vitro*. Nguyên nhân là gì cho những hiện tượng này?

+ Cần có một mô tả (hình ảnh minh hoạ) về giải phẫu hoa của các dòng biến dị bên cạnh hình thái hoa trình bày ở Hình 3.21 trang 108, tương tự như Hình 3.1 trang 60.

- Phần Kết luận trang 143, nội dung "Nghiên cứu đã chọn lọc được 27 dòng lan biến dị, trong đó có 14 dòng từ colchicine và 13 dòng từ DMS" cần viết lại để rõ ràng hơn: 14 dòng từ gây đột biết với colchicine và 13 dòng từ gây đột biết với DMS.

* Một số thuật ngữ, lỗi trình bày cần chỉnh sửa:

- Thuật ngữ "lan rừng" là cách gọi dân gian, thay vào đó, nên dùng từ "tự nhiên" hoặc "hoang dã" trong tiếng Anh là "wild type" trong văn bản khoa học sẽ phù hợp hơn.

- Viết hoa chữ "huế" ở trang 3.
- Chữ "TP HCM" ở trang 10 nên viết đầy đủ Thành phố Hồ Chí Minh.
- Chữ "Glucose" ở trang 11 không cần thiết viết hoa.
- Taq DNA pol ở trang 52 nên viết thành *Taq* DNA pol
- Không nên dùng "chúng tôi" ở trang 60, thay vào đó là Luận án hoặc Nghiên cứu.
- Các thang đo trong một số hình, như Hình 3.17.1 không thống nhất.
- Chữ "cở mẫu" trang 124 sai chính tả.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Có 5 bài báo khoa học được Nghiên cứu sinh công bố với vai trò là tác giả chính. Các bài báo khoa học bao gồm:

1. Conservation of *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' by in vitro propagation. 2023. Tạp chí Journal Propagation of Ornamental Plants, Tập 23, số 2, 39-48. Tạp chí thuộc danh mục Scopus phân hạng Q4.
2. Nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng. 2024. Tạp chí Đại học Huế, Tập 133, số 1C.
3. 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*. 2024. 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.
4. *Dendrobium anosmum* Lindl. 'Tim Hue' and the method of vegetative propagation from the axillary node shoots of the stem (keikis). 2024. Hội nghị khoa học Quốc gia lần thứ 6 về Nghiên cứu và giảng dạy sinh học ở Việt Nam, 908-915.
5. Nghiên cứu ảnh hưởng của Dimethyl sulphate (DMS) đến tạo biến dị lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum Lindl*). 2024. Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, 467-473.

Các bài báo không có sự trùng lặp về nội dung, nội dung đăng tải các kết quả nghiên cứu mới của Luận án. Có 2 bài đăng trên tạp chí, một trong số đó thuộc danh mục Scopus Q4, và 3 bài đăng trên các kỷ yếu Hội thảo khoa học. Nhìn chung, các công bố khoa học của Luận án ở ức trung bình.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

- Luận án đạt yêu cầu, đáp ứng yêu cầu đối với luận án tiến sĩ ngành Sinh học.
- Bản tóm tắt luận án đáp ứng về hình thức, nội dung thể hiện được những kết quả cốt lõi của Luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

(*Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế*)

Đồng ý để Nghiên cứu sinh bảo vệ Luận án trước Hội đồng đánh giá cấp Đại học Huế.

Xác nhận của cơ quan

TL. HIỆU TRƯỞNG
KT. TRƯỞNG PHÒNG
PHÓ PHÒNG TCHC

BỘ CÔNG THƯƠNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHIỆP THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Nguyễn Thị Thu Hà

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 10 tháng 02 năm 2026

Người nhận xét ký tên

PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: NGUYỄN THỊ MỘNG ĐIỆP

Học hàm: PGS Học vị: TSKH

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Cơ quan công tác: TRƯỜNG ĐẠI HỌC QUY NHƠN

Chức trách trong hội đồng: PHẢN BIỆN 2

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ

Chuyên ngành: Sinh học Mã số: 9420101

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

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là loài lan rừng ở Việt Nam được nhiều người lựa chọn do có đặc điểm thân lá và mặt hoa đẹp, mùi thơm, đặc biệt là giống lan này còn có những dòng đột biến rất có giá trị về thẩm mỹ, được người chơi săn tìm và sưu tầm. Giả hạc tím Huế ngoài các đặc điểm chung của lan Giả hạc còn mang những nét đặc trưng riêng như khuôn hoa lớn, cánh sáp có viền, mùi thơm dịu, với màu tím Huế đặc trưng, thời gian nở hoa vào tháng 5-6 nhưng nguồn giống còn hạn chế, chưa có những đột biến điển hình, giá trị kinh tế chưa cao. Đồng thời, lan Giả hạc tím Huế ngoài tự nhiên hiện nay rất khan hiếm do bị khai thác quá mức. Do vậy nghiên cứu việc tạo ra một số dòng lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) đột biến bằng phương pháp nuôi cấy mô là cần thiết để mở rộng sự đa dạng di truyền và cải thiện các đặc điểm sinh học quan trọng ở loài lan cảnh quý giá này là rất cần thiết.

Mặc khác, nuôi cấy mô kết hợp với đột biến cảm ứng cho phép sản xuất nhanh chóng số lượng lớn cây con đồng nhất và tạo điều kiện thuận lợi cho việc chọn lọc các biến thể mới, ổn định với các đặc điểm hình thái và sinh lý mong muốn. Phương pháp này cũng hỗ trợ bảo tồn và nhân giống hàng loạt các dòng ưu tú không bị bệnh

và thích nghi với điều kiện môi trường thay đổi. Do đó, nghiên cứu như vậy là rất cần thiết để đẩy nhanh các chương trình lai tạo, tăng giá trị thương mại và đảm bảo canh tác bền vững loài lan có giá trị kinh tế và thẩm mỹ quan trọng này và góp phần bảo tồn nguồn gen của giống lan bản địa.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

- Kết quả nghiên cứu và kết luận của luận án không trùng lắp với các luận án và công trình đã công bố trong và ngoài nước.

- Luận án đã trích dẫn 142 tài liệu tiếng anh và 46 tài liệu tiếng việt rất rõ ràng, phù hợp với nội dung trích dẫn; Tài liệu tham khảo đa dạng và cập nhật, bao gồm các tài liệu về sách, tạp chí, kỷ yếu hội nghị quốc tế và trong nước.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Luận án "Nghiên cứu tạo một số dòng lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm" phù hợp với mã số chuyên ngành đào tạo "Sinh học" với mã số 9420101. Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu, nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành đào tạo Sinh học.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

NCS đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu thường quy trong nuôi cấy mô tế bào thực vật (*In vitro*) kết hợp với gây phương pháp gây đột biến tạo dòng lan Giả hạc tím Huế bằng hóa chất colchicine và dimethyl sulphate (hóa chất thường được sử dụng để chọn tạo giống thực vật) nên đảm bảo tính khoa học.

Ngoài ra NCS còn sử dụng phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử, đây là phương pháp nghiên cứu hiện đại, thường được các phòng nghiên cứu trên thế giới áp dụng, phù hợp với xu thế hiện nay trên thế giới. Cách bố trí thí nghiệm hợp lý, khoa học; thời gian thu mẫu và lượng mẫu phân tích khá lớn, mang tính đại diện và đảm bảo ý nghĩa thống kê. Vì vậy, kết quả đạt được trong luận án này đáng tin cậy.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất,

kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã mô tả chi tiết các đặc điểm nhận dạng của lan Giả hạc tím Huế, xây dựng quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên lan Giả hạc tím Huế tại TP.Huế, đánh giá được đa dạng di truyền của các dòng lan đột biến được tạo ra, tạo được chế phẩm vi sinh từ một số chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập trên cây lan rừng và ứng dụng chế phẩm này vào việc chăm sóc lại cho cây lan con ở vườn ươm. Đây là những điểm mới của luận án nhằm nỗ lực tạo được dòng lan đột biến Giả hạt tím Huế cũng như cách chăm sóc dòng lan này tốt nhất để đưa ra thị trường. Do đó luận án có giá trị về khoa học thực tiễn và góp phần nâng cao giá trị kinh tế cho nghề trồng hoa cây cảnh.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc...của luận án

Ưu điểm:

- Cấu trúc luận án hợp lý: Tổng số 144 trang gồm 3 chương (không tính danh mục bài báo, TLTK và phụ lục), trong đó phần kết quả và thảo luận chiếm 83 trang, đảm bảo vượt 50%.

- Luận án thể hiện được các ý tưởng nghiên cứu rõ ràng.

- Phương pháp nghiên cứu hiện đại.

- Các kết quả được trình bày khoa học và logic, thể hiện rõ được các nội dung nghiên cứu. NCS đã thảo luận, giải thích và so sánh kết quả với các nghiên cứu trước đây.

- Trích dẫn tài liệu đúng cách, phù hợp, đầy đủ.

Nhược điểm và góp ý cần chỉnh sửa:

- Rà soát lại lỗi chính tả: trang 11, 12, 20, 38...

- Bổ sung hình ảnh khi miêu tả lan Giả hạc ở trang 6, chương 1.

- Trang 14: 'Một nguyên tắc cơ bản trong nuôi cấy mô tế bào là các tế bào làm vật liệu nuôi cấy càng non thì khả năng nuôi cấy thành công càng cao', nên giải thích dựa trên cơ sở khoa học.

- Chương 2, phương pháp nghiên cứu cần cấu trúc lại theo từng nội dung nghiên cứu. Những phương pháp chính được sử dụng để thực hiện nội dung nghiên cứu thì phải đưa vào luận án, phụ lục chỉ là những nội dung đi kèm để bổ sung thêm minh chứng làm rõ hơn các nội dung đã trình bày trong luận án hoặc số liệu thô, kết quả xử lý thống kê, hình ảnh minh họa...

Ví dụ như: Đối với nội dung nghiên cứu: Đánh giá đặc điểm hình thái/di truyền của các dòng lan đột biến, nên trình bày theo trình tự như sau: Tách chiết DNA tổng_Kiểm tra chất lượng DNA_ Thực hiện phản ứng PCR_ Tinh sạch sản phẩm PCR_ Giải trình tự DNA_ Phân tích kết quả và xây dựng cây di truyền.

- Đưa phụ lục 4 và 7 vào chương 2, bổ sung phương pháp giải trình tự DNA, nếu thuê ngoài thì cần ghi rõ địa chỉ công ty, giải trình tự 1 chiều hay hai chiều.

- Bổ sung phương pháp phân tích kết quả và xây dựng cây di truyền.

- Phụ lục 11 phải để ở chương 3 kết quả. Bổ sung thêm cột hình ảnh vào bảng mô tả đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế.

- Bổ sung tất cả các hình là kết quả chạy trên gel agarose kèm chú thích thông tin hình ảnh. *Phần này có thể đưa vào phụ lục.*

- Bổ sung kết quả xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch DNA tổng sau khi tách chiết. *Phần này có thể đưa vào phụ lục.*

- Kiểm tra lại xử lý thống kê các kết quả thể hiện trên hình 3.4, 3.6, 3.24, 3.25, 3.27, 3.30 và bổ sung kết quả xử lý thống kê vào phụ lục.

- Tất cả các hình, biểu đồ cần bổ sung số lần lặp lại thí nghiệm, số lượng cây thí nghiệm/lần cho một công thức vào chú thích hình, biểu đồ.

- Bổ sung hình ảnh hoa của 6 dòng tạo đột biến được chọn để khảo sát (nếu có).

- Sau khi xác định được đa dạng di truyền của các dòng xử lý đột biến thì nên có bảng mô tả so sánh về sự sai khác hình thái và trình tự nucleotic để xác định điểm đột biến so với dòng gốc ban đầu, tối thiểu là phải so sánh được 6 dòng lựa chọn khảo sát từ 27 dòng tạo đột biến.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

NCS đã công bố kết quả nghiên cứu trên 1 tạp chí quốc tế thuộc danh mục Scopus (hạng Q4 theo phân loại của Scimago journal ranking https://www.scimagojr.com/),

1 tạp chí chuyên ngành trong nước (Tạp chí Đại học Huế), 01 bài trong Hội thảo khoa học quốc tế (NXB Đại học Huế) và 02 bài trong Hội thảo khoa học trong nước. Các tạp chí và hội thảo này phù hợp với chuyên ngành và nội dung nghiên cứu trình bày trong luận án.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

Nội dung nghiên cứu của luận án đã đáp ứng các yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một Luận án Tiến sĩ ngành "Sinh học". Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

(Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế)

Đồng ý cho NCS bảo vệ luận án của mình trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế.

Xác nhận của cơ quan

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC QUY NHƠN
KT. HIỆU TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG HÀNH CHÍNH TỔNG HỢP

TS. Ngô Anh Tú

Gia Lai, ngày 09 tháng 02 năm 2026

Người nhận xét ký tên

PGS.TSKH. Nguyễn Thị Mộng Điệp

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: La Việt Hồng

Học hàm: PGS Học vị: TS

Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật

Cơ quan công tác: Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

Chức trách trong hội đồng: phản biện 3

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ

Chuyên ngành: Sinh học Mã số: 9420101

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

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Đề tài "Nghiên cứu tạo một số dòng lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm" được thực hiện trong bối cảnh nguồn gen lan rừng bản địa đang suy giảm nhanh do khai thác tự nhiên quá mức và suy thoái sinh cảnh. *Dendrobium anosmum* là loài lan có giá trị thẩm mỹ và kinh tế cao, phân bố rộng ở Việt Nam nhưng các biến thể mang đặc trưng địa phương, trong đó có dòng Giả hạc tím Huế, chưa được nghiên cứu một cách hệ thống về mặt sinh học, di truyền và công nghệ nhân giống. Việc lựa chọn đối tượng nghiên cứu là một dòng lan mang yếu tố địa phương rõ nét thể hiện hướng tiếp cận gắn nghiên cứu khoa học với bảo tồn và phát triển nguồn gen bản địa, phù hợp với xu thế phát triển bền vững hiện nay.

Luận án cũng đặt ra một vấn đề có tính nền tảng trong chọn giống thực vật cảnh: làm thế nào tạo ra biến dị có kiểm soát trên cơ sở vật liệu *in vitro*, đồng thời đánh giá được mối quan hệ di truyền của các biến dị đó. Gây đột biến bằng tác nhân hóa học như colchicine và dimethyl sulphate đã được áp dụng trong nhiều nhóm cây trồng, song việc triển khai một quy trình tương đối hoàn chỉnh trên đối tượng lan Giả hạc tím Huế, từ khâu tạo vật liệu khởi đầu, xử lý đột biến, tái sinh, đánh giá hình thái - tế bào - phân tử đến huấn luyện cây con ra vườn ươm.

Luận án có ý nghĩa khoa học tốt, thông qua việc bổ sung dữ liệu về đặc điểm hình thái, tế bào học và đa dạng di truyền của các dòng lan Giả hạc tím Huế sau xử lý đột biến, góp phần làm rõ khả năng tạo biến dị nhân tạo trên đối tượng phong lan rừng. Việc đánh giá biến dị ở nhiều cấp độ - từ hình thái, giải phẫu, di truyền khẳng định sự tập trung của tác giả. Đây là hướng nghiên cứu cần thiết trong chọn giống lan, nơi giá trị thương mại phụ thuộc nhiều vào các biến dị hình thái tinh tế nhưng đồng thời đòi hỏi sự ổn định di truyền qua các thế hệ nhân giống.

Kết quả nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất giống lan thương mại và góp phần giảm áp lực khai thác lan rừng tự nhiên. Việc hoàn thiện quy trình nhân giống in vitro và huấn luyện cây con ra vườn ươm, kết hợp ứng dụng vi sinh vật nội sinh nhằm cải thiện sinh trưởng, cho thấy luận án không chỉ tập trung vào tạo biến dị mà còn quan tâm đến khâu chuyển giao công nghệ và khả năng áp dụng ngoài sản xuất. Điều này làm tăng giá trị ứng dụng của nghiên cứu trong bối cảnh ngành hoa lan đang phát triển nhưng còn phụ thuộc lớn vào nguồn giống tự nhiên hoặc nhập nội.

Kết luận, đề tài có tính cần thiết cả về khoa học lẫn thực tiễn, gắn kết giữa bảo tồn nguồn gen địa phương và phát triển công nghệ chọn giống lan bằng phương pháp thực nghiệm.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đối với dòng Giả hạc tím Huế mang tính địa phương đặc thù, chưa ghi nhận công trình nào xây dựng quy trình gây đột biến hóa học kết hợp đánh giá hình thái, tế bào và chỉ thị phân tử một cách hệ thống như trong luận án này.

Điểm khác biệt của luận án không nằm ở bản chất phương pháp gây đột biến - vốn đã được biết đến - mà ở việc triển khai một quy trình tương đối hoàn chỉnh trên đối tượng cụ thể có giá trị địa phương, đồng thời đánh giá biến dị ở nhiều cấp độ tổ chức sinh học.

Về tính trung thực học thuật, các phần tổng quan và trích dẫn tài liệu nhìn chung được trình bày rõ ràng, có hệ thống và tương đối đầy đủ. Tài liệu tham khảo bao gồm nguồn quốc tế và trong nước, phản ánh được nghiên cứu về chi *Dendrobium*, kỹ thuật nuôi cấy mô và gây đột biến thực nghiệm. Số liệu thí nghiệm được trình bày kèm theo

phân tích thống kê, có bảng biểu và hình ảnh minh họa cụ thể, cho thấy sự minh bạch trong công bố kết quả.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài phản ánh đúng trọng tâm khoa học của luận án là tạo dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm. Nội dung triển khai từ tạo vật liệu in vitro, xử lý hóa chất gây đột biến, tái sinh, đến đánh giá hình thái, tế bào và chỉ thị phân tử đều bám sát mục tiêu này. Phần xây dựng quy trình nhân giống và huấn luyện cây con tuy mang tính ứng dụng, nhưng đóng vai trò hỗ trợ hợp lý cho quá trình tạo và đánh giá dòng đột biến.

Về chuyên ngành, luận án thuộc phạm vi Sinh học, đặc biệt ở giao thoa giữa di truyền thực vật, sinh lý học thực vật và công nghệ sinh học. Các nội dung như gây đột biến hóa học, phân tích nhiễm sắc thể, đánh giá đa dạng di truyền và ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đều phù hợp với mã số 9420101. Tổng thể, đề tài có sự tương thích rõ ràng giữa tên gọi, nội dung và chuyên ngành đào tạo.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án sử dụng hệ thống phương pháp tương đối đầy đủ và phù hợp với mục tiêu nghiên cứu, bao gồm nuôi cấy mô in vitro, xử lý đột biến bằng colchicine và dimethyl sulphate, phân tích hình thái - giải phẫu, quan sát nhiễm sắc thể và đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị RAPD. Việc kết hợp nhiều cấp độ đánh giá giúp tăng độ tin cậy trong xác định biến dị thu được sau xử lý hóa chất.

Tuy nhiên, về mức độ hiện đại, RAPD là chỉ thị phân tử có độ lặp lại và độ phân giải hạn chế so với ISSR, SSR hoặc các kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới. Nếu được bổ sung bằng chỉ thị có tính ổn định cao hơn, giá trị chứng minh sự biến đổi di truyền sẽ thuyết phục hơn. Dù vậy, trong điều kiện nghiên cứu thực nghiệm hiện tại, hệ phương pháp được lựa chọn vẫn đảm bảo cơ sở khoa học và phù hợp với chuyên ngành.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã xây dựng được quy trình nhân giống in vitro và xử lý đột biến hóa học trên lan Giả hạc tím Huế, bước đầu tạo được một số dòng có biến dị hình thái và sai khác di truyền được ghi nhận qua phân tích tế bào và chỉ thị RAPD. Việc đánh giá biến dị ở nhiều cấp độ là điểm tích cực, góp phần tăng độ tin cậy của kết quả.

Về khoa học, luận án bổ sung dữ liệu về tạo biến dị nhân tạo trên một dòng lan bản địa chưa được nghiên cứu chuyên sâu, chủ yếu mang ý nghĩa hoàn thiện quy trình trên đối tượng cụ thể. Về thực tiễn, kết quả có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất giống và giảm áp lực khai thác tự nhiên, tuy nhiên cần theo dõi thêm tính ổn định di truyền qua các thế hệ để khẳng định giá trị chọn giống lâu dài.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc…của luận án

Luận án có bố cục rõ ràng, trình tự logic từ tổng quan, phương pháp đến kết quả và thảo luận. Hệ thống bảng biểu và hình ảnh tương đối đầy đủ, minh họa trực quan cho nội dung nghiên cứu. Thiết kế thí nghiệm có kiểm soát và có xử lý thống kê, thể hiện tính nghiêm túc trong triển khai nghiên cứu.

Tuy nhiên, vẫn còn một số hạn chế cần chỉnh sửa và hoàn thiện:

Cấu trúc và lập luận phần Mở đầu: Phần Mở đầu nhìn chung đầy đủ nhưng nên cấu trúc lại theo trình tự logic hơn: (1) Tổng quan họ/chi phong lan (giá trị sinh học - sinh thái - kinh tế); (2) Thu hẹp vào *Dendrobium anosmum* và dòng Giả hạc tím Huế (vị trí phân loại, giá trị, tình trạng khan hiếm); (3) Làm rõ nhu cầu đa dạng hóa nguồn giống, mặt hoa, màu sắc cho ngành hoa Việt Nam; (4) Phương pháp gây đột biến thực nghiệm; Cụm "6 giống phong lan" (trang 1) sửa thành "sáu chi phong lan"; Câu "phục vụ người sưu tầm lan" (trang 2) nên mở rộng theo hướng phục vụ sản xuất quy mô lớn và phát triển ngành hoa cảnh, tránh giới hạn ở nhu cầu chơi lan.

Diễn đạt và thuật ngữ khoa học: Trang 8, dòng 4-5 từ trên xuống: diễn đạt về khối lượng hạt chưa chuẩn xác. Nên thay bằng cách mô tả "khối lượng rất nhỏ (ở mức miligam hoặc thấp hơn), do đó dễ phát tán nhờ gió"; Trang 13, dòng 11-12 từ trên xuống: cần bổ sung điều kiện khi nói về nguy cơ nhiễm bệnh ở quần thể nhân giống sinh dưỡng (xảy ra khi vật liệu ban đầu mang mầm bệnh); Trang 25 (mục RAPD): cần bổ sung rõ đây là kỹ thuật dựa trên nền tảng PCR và nêu ngắn gọn nguyên lý; Trang 61 (nhận diện bằng chỉ thị phân tử): nên diễn đạt lại câu mở đầu theo hướng "để củng cố thêm cơ sở nhận định…". Đồng thời cần tóm tắt kết quả BLAST (tỷ lệ tương đồng, E-value, bootstrap) trong nội dung chính, chỉ đưa bảng chi tiết xuống phụ lục.

Mục tiêu và tiêu đề: Mục tiêu "tạo vật liệu khởi đầu in vitro" nên điều chỉnh theo hướng "xây dựng/hoàn thiện quy trình nhân giống in vitro", vì tạo vật liệu khởi đầu chỉ là một phần của quy trình; Mục 2.3.4 và 3.4 nên chỉnh tiêu đề thành "Hoàn thiện quy trình tái sinh in vitro một số dòng lan đột biến có triển vọng" để thể hiện đúng giá trị khoa học.

Phương pháp và thiết kế thí nghiệm: Không dùng cụm "vào mẫu" "ra cây" (trang 40-41), thay bằng "tạo vật liệu khởi đầu nuôi cấy in vitro"; Chuẩn hóa cách mô tả thiết kế thí nghiệm: nêu rõ bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, số lần nhắc lại và đơn vị thí nghiệm; Các bảng 2.4, 2.5, 2.6… nên bỏ cột "môi trường" nếu chỉ là môi trường nền cố định; Mục gây đột biến (2.3.2.1): cần mô tả rõ tính đồng nhất vật liệu trước xử lý; Bảng 3.1 (trang 62): nếu "không có sự khác biệt thống kê" thì cần rà soát lại việc kết luận 8 giờ chiếu sáng là tối ưu; Bảng 3.9 (trang 94): nên dùng "chồi tái sinh từ mẫu xử lý hóa chất" thay vì "chồi đột biến".

Trình bày kết quả: Cần nêu rõ tổng số dòng đột biến được khảo sát (ví dụ 34 dòng) và liệt kê mã dòng; Khi mô tả đặc điểm hoa cần ghi rõ tuổi cây/thời điểm đánh giá; Các bảng kết quả đã xử lý thống kê nên trình bày trong phần nội dung chính, không chuyển xuống phụ lục; Danh mục bảng/hình cần thống nhất cách viết hoa; Rà soát lỗi chính tả và thuật ngữ tiếng Anh.

Tài liệu tham khảo: Cần rà soát lại các tài liệu trích dẫn từ website tin tức (ví dụ tài liệu số 14, 33, 34) và thay thế bằng nguồn khoa học chính thống nếu có thể.

Các góp ý trên chủ yếu nhằm hoàn thiện cấu trúc, nâng cao tính học thuật và đảm bảo sự nhất quán giữa số liệu - phân tích - kết luận. Không ảnh hưởng đến bản chất khoa học của luận án nhưng cần chỉnh sửa trước khi nộp bản hoàn chỉnh.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Nghiên cứu sinh đã công bố 05 công trình khoa học liên quan trực tiếp đến nội dung luận án, trong đó có 01 bài báo quốc tế đăng trên Journal of Propagation of Ornamental Plants (thuộc danh mục SCOPUS, xếp hạng Q4), 01 bài báo trong Tạp chí Đại học Huế, 01 bài trong kỷ yếu hội thảo quốc tế và 02 công bố trong các hội nghị khoa học chuyên ngành. Các công bố này phản ánh tương đối đầy đủ các nội dung chính của luận án, đặc biệt là xây dựng quy trình nhân giống in vitro, khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và một số kết quả liên quan đến xử lý đột biến thực nghiệm. Việc có bài báo quốc tế thuộc hệ thống SCOPUS cho thấy nghiên cứu sinh có khả năng công bố theo chuẩn mực quốc tế trong lĩnh vực nhân giống và bảo tồn phong lan.

Tóm lại, các công trình đã công bố đáp ứng yêu cầu đào tạo tiến sĩ hiện hành và có sự liên quan chặt chẽ với nội dung luận án.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

Luận án đã triển khai một cách hệ thống các nội dung từ nhận diện, xây dựng quy trình nhân giống in vitro, gây đột biến thực nghiệm bằng colchicine và DMS, đánh giá biến dị ở các cấp độ hình thái - tế bào - nhiễm sắc thể - phân tử RAPD, đến xây dựng quy trình tái sinh và huấn luyện cây con ra vườn ươm. Nghiên cứu đã chọn lọc được 27 dòng biến dị, trong đó xác định được 6 dòng triển vọng có sai khác rõ rệt về hình thái và di truyền; đồng thời ghi nhận trường hợp đa bội (4n=76) khi xử lý colchicine, góp phần khẳng định hiệu quả của phương pháp gây đột biến thực nghiệm.

Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa khoa học trong việc bổ sung dữ liệu nhận dạng và biến dị thực nghiệm trên đối tượng Dendrobium anosmum 'Giả hạc tím Huế', đồng thời có giá trị thực tiễn trong bảo tồn và phát triển nguồn giống lan bản địa. Việc kết hợp chỉ

thị RAPD, phân tích tế bào và đánh giá hình thái thể hiện hướng tiếp cận tương đối toàn diện. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án và đáp ứng yêu cầu về tính chính xác, đầy đủ và nhất quán với công trình gốc.

Trên cơ sở các kết quả đạt được, có thể khẳng định luận án đáp ứng yêu cầu về nội dung khoa học, phương pháp nghiên cứu và số lượng công bố theo quy định đào tạo trình độ tiến sĩ. Nghiên cứu sinh xứng đáng được bảo vệ luận án trước Hội đồng chấm luận án cấp Đại học.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

(*Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế*)

Sau khi nghiên cứu toàn văn luận án, bản tóm tắt luận án và các công trình khoa học đã công bố của nghiên cứu sinh, tôi nhận thấy luận án đáp ứng yêu cầu về nội dung khoa học, phương pháp nghiên cứu, khối lượng và chất lượng công trình theo quy định đào tạo trình độ tiến sĩ chuyên ngành Sinh học. Vì vậy, tôi đồng ý để nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ được bảo vệ luận án trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế.

Phú Thọ, ngày 11 tháng 02 năm 2026

Xác nhận của cơ quan

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM HÀ NỘI 2
VIỆN NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ ỨNG DỤNG - ĐẠI HỌC SƯ PHẠM HÀ NỘI 2

PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Dương Đình Thắng

Người nhận xét ký tên

La Việt Hồng

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: Phạm Bích Ngọc

Học hàm: PGS Học vị: TS

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Cơ quan công tác: Viện Sinh học

Chức trách trong hội đồng: Ủy viên

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ

Chuyên ngành: Sinh học Mã số: 9420101

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

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Lan Giả hạc tím Huế *(Dendrobium anosmum* Lindl.) là là loài lan cho hoa đẹp, có giá trị cảnh quan và kinh tế cao, hiện nay đang chịu đồng thời chịu sức ép suy giảm nguồn gen ngoài tự nhiên do khai thác và suy thoái sinh cảnh. Trong bối cảnh nhu cầu bảo tồn – nhân giống nhanh – tạo giống mới ngày càng cấp thiết, hướng nghiên cứu kết hợp nhân giống in vitro với gây đột biến thực nghiệm để tạo biến dị phục vụ chọn giống là phù hợp, có tính thời sự và khả năng ứng dụng rõ ràng.

Kết quả luận án đã góp phần bổ sung cơ sở phân loại và nhận diện cho *Dendrobium anosmum* (giống địa phương "Giả hạc tím Huế") những đặc điểm đặc trưng để nhận dạng (về hình thái, về vi phẫu và dữ liệu giải trình tự). Hoàn thiện quy trình nhân giống lan Giả hạc tím Huế bằng nuôi cấy *in vitro* và xây dựng quy trình tạo giống lan Giả hạc tím Huế đột biến bằng phương pháp thực nghiệm.

Luận án góp phần tạo nguồn vật liệu 27 dòng đột biến có đặc điểm hình thái khác biệt/ổn định, phục vụ đa dạng hóa sản phẩm và bảo tồn nguồn gen địa phương. Bên cạnh đó, luận án đã góp phần hoàn thiện quy trình huấn luyện cây con sau nuôi cấy (giá thể, ánh sáng, ẩm độ, bổ sung vi sinh), nhằm nâng tỷ lệ sống và rút ngắn thời gian ra vườn sản xuất. Cung cấp nguồn giống đồng đều, ổn định, giữ đặc trưng "tím Huế", phục vụ bảo tồn nguồn gen địa phương và phát triển sản xuất hàng hóa/sinh vật cảnh; sẵn sàng chuyển giao quy trình cho vườn ươm và hộ trồng lan.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài nghiên cứu có hướng tiếp cận phổ biến nghiên cứu nuôi cấy mô, nhân *giống in vitro* và gây đột biến), tuy nhiên luận án thể hiện tính mới gắn với đối tượng "Giả hạc tím Huế", trên cơ sở thí nghiệm hệ thống từ khâu tạo vật liệu, xử lý tác nhân đột biến, sàng lọc – đánh giá đa chỉ thị và lựa chọn dòng triển vọng. Kết luận của luận án cho thấy đã tạo được 27 dòng lan biến dị (14 dòng từ colchicine và 13 dòng từ DMS) và lựa chọn 6 dòng triển vọng có khác biệt rõ về hình thái và di truyền để tiếp tục phát triển.

Các nội dung trong luận án và các kết quả được phân tích, thảo luận chi tiết và đầy đủ từ nguồn tài liệu tham khảo trong và ngoài nước theo đúng quy định.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Nội dung luận án phù hợp tên đề tài, với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Về đối tượng nghiên cứu sử dụng trong luận án có cơ sở khoa học, nguồn gốc rõ ràng

Về phương pháp và kỹ thuật sử dụng trong luận án

Các phương pháp nghiên cứu, tiếp cận sử dụng trong luận án rất phong phú đều là phương pháp chuẩn, cập nhật, phù hợp. Nghiên cứu thực hiện trên các nhóm phương pháp chính như sau: i) Phương pháp phân loại thực vật bằng hình thái so sánh, phân tử; ii) Phương pháp nuôi cấy mô, tái sinh và nhân nhanh ở lan; iii) Phương pháp tạo tạo lan đột biến; iv) Phương pháp nghiên cứu nhân giống, huấn luyện cây ở vườn ươm. Ngoài ra còn có các phương pháp, kỹ thuật sử dụng trong đánh giá hình thái và di truyền của các dòng lan đột biến; Nhóm các phương pháp sinh lý, hóa sinh đánh giá dòng đột biến

Các số liệu thu được trong luận án được xử lý thống kê nên đảm bảo độ tin cậy cao

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án có ý nghĩa khoa học và đặc biệt có ý nghĩa thực tiễn cao. Luận án có đóng góp về khoa học và thực tiễn cho chuyên ngành công nghệ sinh học thực vật/nuôi cấy mô và cung cấp cơ sở khoa học tin cậy phương pháp gây đột biến tạo giống biến dị ở lan giả hạc. Luận án đã cung cấp những dẫn liệu khoa học mới, i) là nghiên cứu khoa học lần đầu mô tả chi tiết các đặc điểm nhận dạng lan Gia hạc tím Huế, kết quả bổ sung vào khóa phân loại các đặc điểm nhận dạng loài này ở khu vực TP. Huế. ii) là nghiên cứu đầu tiên xây dựng quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên lan Giả hạc tím Huế bằng hóa chất colchicine và dimethyl sulphate. Nghiên cứu đã chọn lọc được 27 dòng lan biến dị, trong đó có 14 dòng từ Colchicine và 13 dòng từ DMS. Đồng thời lựa chọn được 6 dòng triển vọng có sự khác biệt rõ về hình thái và di truyền để nghiên cứu phát triển. Đánh giá được đa dạng di truyền của các dòng lan đột biến được tạo ra. iii) Tạo được chế phẩm vi sinh từ một số chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập trên cây lan rừng và ứng dụng chế phẩm này vào việc chăm sóc lại cho cây lan con ở vườn ươm.

Ở giai đoạn vườn ươm, số liệu cho thấy các dòng đột biến có mức thích nghi khác nhau; ví dụ tỷ lệ sống của cây con đột biến sau giai đoạn trồng có thể đạt khoảng 56,60% (M17) hoặc 36,80% (M13), trong khi đối chứng cao hơn. Kết quả này phản ánh đúng thực tế: tạo biến dị thường đi kèm giảm sức sống do đó việc tác giả đi tiếp đến tối ưu chăm sóc và dùng vi sinh nội sinh là hợp lý.

Về độ tin cậy khoa học, luận án thể hiện việc sử dụng thống kê (SE, Duncan test $p<0,05$) trong trình bày bảng kết quả, giúp nâng mức tin cậy khi so sánh nghiệm thức.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc...của luận án

Ưu điểm

Luận án có kết cấu và hình thức phù hợp với luận án tiến sĩ, chất lượng in ấn đảm bảo, tài liệu tham khảo phong phú. Luận án gồm 158 trang A4, bao gồm; Mở đầu (4 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu và cơ sở khoa học của đề tài (30 trang); Chương 2: Đối tượng, Vật liệu, và phương pháp nghiên cứu (26 trang); Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận (83 trang); Kết luận và đề nghị (1 trang); Danh mục các công trình đã công bố liên quan đến luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo gồm 15 trang Luận án đã tham khảo và tổng quan 188 tài liệu, trong đó có > 50% tài liệu tham khảo sử dụng trong 5 năm trở lại đây (2020) bao gồm 46 tài liệu tiếng Việt, 132 tài liệu tiếng Anh. Luận án có 43 bảng số liệu, 46 hình minh họa, 20 phụ lục kết quả và 5 công trình công bố liên quan. Các hình ảnh của luận án tương đối rõ ràng, chú thích đầy đủ dễ theo dõi và tham khảo.

Luận án có tính hệ thống từ thu thập, tạo vật liệu, gây biến dị, sàng lọc, chọn dòng và ra cây vườn ươm vườn ươm, thể hiện đúng logic nghiên cứu chọn tạo giống theo hướng ứng dụng. Các nội nghiên cứu phân chia hợp lý, kết quả thu được rõ ràng tin cậy. Kết luận và đề nghị rõ ràng, có định hướng nghiên cứu theo

Nhược điểm / tồn tại cần chỉnh sửa

Còn một số ít nhầm lẫn ở phần chữ viết tắt "DMS": trong danh mục chữ viết tắt ghi "DMS = Dimethyl sulfide", trong khi ở nột số đoạn text DMS là tác nhân alkyl hóa (dimethyl sulfate). Cần chuẩn hóa lại để tránh sai bản chất hóa chất.

Một số lỗi in ấn, chính tả nên được rà soát

Nên cân nhắc bổ sung thêm trong thảo luận: tại sao chưa dùng flow cytometry, kế hoạch kiểm chứng đa bội/khảm khi triển khai khảo nghiệm.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Từ kết quả luận án, NCS đã công bố 5 bài báo khoa học được đăng trên các Tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước và quốc tế, cụ thể 01 bài quốc tế SCIE, Q4 SCIMGO; 01 bài đăng tạp chí Khoa học, Đại học Huế;; 03 bài Hội nghị/Hội thảo Khoa học trong nước, các bài báo đều là các kết quả khoa học quan trọng của luận án.

1.(2023). Conservation of *Dendrobium anosmum* 'tim Hue' by in vitro propagation. Tạp chi Joumal Propagation of Ornamental Plants, Tập 23, số 2, 39-48.

(2024). Anh 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. (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. (2024). Nghiên cứu ảnh hưởng của Dimethyl sulphate (DMS) đến tạo biến dị lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl). Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, 467-473.

5.(2024). Nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng. Tạp chí Đại học Huế, Tập 133, số 1C

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

Luận án của NCS Nguyễn Hữu Thọ đã đáp ứng đầy đủ các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ Ngành Sinh học. Đề tài nghiên cứu có tính cấp thiết, có đóng góp mới rõ ràng cho khoa học và thực tiễn.

Về bản tóm tắt luận án: Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành và đầy đủ những nội dung cơ bản của luận án.

Với những nhận xét trên, tôi khẳng định rằng luận án của NCS Nguyễn Hữu Thọ đạt yêu cầu của một luận án tiến sĩ về cả nội dung khoa học lẫn hình. Do đó, luận án xứng đáng được đưa ra bảo vệ cấp Đại học Huế và nghên cứu sinh xứng đáng được nhận học vị Tiến sĩ Sinh học.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

(Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế)

Tôi đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế

Hà Nội, *ngày* 2 *tháng* 2 *năm 2026*

Xác nhận của cơ quan
TRƯỞNG PHÒNG
QUẢN LÝ TỔNG HỢP

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH HỌC

Trần Hồ Quang

Người nhận xét ký tên

Phạm Bích Ngọc

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: QUÁCH NGÔ DIỄM PHƯƠNG
Học hàm: PGS. Học vị: Tiến sĩ
Chuyên ngành: Hóa Sinh
Cơ quan công tác: Khoa SH-CNSH, Trường ĐH KHTN, ĐHQG-HCM
Chức trách trong hội đồng: ủy viên
Họ và tên nghiên cứu sinh: NGUYỄN HỮU THỌ
Chuyên ngành: Sinh học Mã số: 9420101

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

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. ***Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án***

Luận án có ý nghĩa khoa học rõ rệt khi nghiên cứu phương pháp tạo đột biến ở loài lan Giả Hạc tím Huế – một giống lan bản địa có giá trị cao nhưng đa dạng di truyền thấp. Về tính mới, đây là công trình đầu tiên sử dụng chất hóa học Dimethyl sulfate (DMS) để gây đột biến trên lan *Dendrobium anosmum*. Trước đó, phương pháp DMS hầu như chưa được áp dụng cho hoa lan, do đó kết quả nghiên cứu đã mở ra hướng đi mới trong chọn tạo giống lan đột biến. Luận án không chỉ đóng góp dữ liệu khoa học về ảnh hưởng của DMS đến mô thực vật, mà còn cung cấp hiểu biết mới về cơ chế đột biến hóa học trên đối tượng hoa lan. Nghiên cứu này phù hợp với xu hướng hiện nay trong sinh học thực vật và công nghệ sinh học nông nghiệp. Việc sử dụng nuôi cấy mô kết hợp với gây đột biến nhân tạo là hướng nghiên cứu hiện đại nhằm tạo ra sự đa dạng di truyền ở cây trồng cảnh quan. Trên thế giới, gây đột biến được xem là công cụ quan trọng để tạo giống cây cảnh mới. Do đó, luận án đã bắt kịp xu thế khoa học khi áp dụng phương pháp gây đột biến để tạo giống lan quý, đồng thời kết hợp với nuôi cấy *in vitro* nhằm nhanh chóng nhân và sàng lọc biến dị.

2. ***Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo***

Luận án cho thấy tính trung thực và không có dấu hiệu trùng lặp nội dung với các công trình khoa học đã công bố trước đó. Chủ đề "gây đột biến lan Giả Hạc tím Huế bằng phương pháp thực nghiệm" là mới và đặc thù, chưa trùng lặp với bất kỳ luận án nào trong và ngoài nước tính đến hiện tại. Qua tìm hiểu, một số nghiên cứu liên quan đến gây đột biến trên hoa lan đã được thực hiện (ví

dụ như gây đột biến bằng tia gamma trên một số loài lan *Dendrobium* khác), nhưng chưa có công trình nào tiến hành trên *D. anosmum* "tím Huế" với phương pháp hóa chất DMS.

Về số liệu và kết quả, các dữ liệu trong luận án được NCS thu thập và trình bày rõ ràng, có đối chứng và thống kê, chứng tỏ tính xác thực của kết quả. Việc trích dẫn tài liệu tham khảo được tác giả thực hiện khá đầy đủ và đúng quy cách.

3. ***Sự phù hợp của tên đề tài với nội dung luận án, giữa nội dung luận án với chuyên ngành và mã số chuyên ngành***

Tên đề tài hoàn toàn phù hợp với nội dung luận án, nội dung nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành Sinh học của nghiên cứu sinh

4. ***Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu***

Các thí nghiệm trong luận án đa phần được thực hiện bằng các kỹ thuật nuôi cấy mô/ tế bào thực vật của chuyên ngành sinh lý thực vật kết hợp di truyền sinh học phân tử. Các phương pháp nghiên cứu được áp dụng hợp lý, đáng tin cậy và được thiết kế bài bản.

5. ***Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó***

Kết quả nghiên cứu của luận án đóng góp ý mới cho lĩnh vực khoa học chuyên ngành:

- Xác định được các điều kiện phù hợp để nhân giống *in vitro* lan Gia hạc tím Huế, đặc biệt tạo protocorm và mô sẹo cung cấp nguồn vật liệu đầu cho nghiên cứu gây đột biến.
- Về khía cạnh đột biến, luận án đã thử nghiệm thành công việc sử dụng Colchicine và DMS để gây biến dị trên protocorm và mô sẹo lan. Đóng góp nổi bật là xác định được nồng độ và thời gian xử lý Colchicine, DMS tối ưu để có thể tạo được 27 dòng lan biến dị sau chọn lọc (14 dòng từ Colchicine, 13 dòng từ DMS), sau đó đánh giá bằng RAPD để có được 6 dòng có khác biệt rõ về hình thái và di truyền. Kết quả này là mới và có ý nghĩa khoa học vì lần đầu tiên cung cấp dữ liệu về ngưỡng tác động của Colchinine, DMS trên mô lan *in vitro*. Ngoài ra, luận án đã phát hiện các biểu hiện biến dị cụ thể: biến đổi màu sắc, kích thước; các chồi tái sinh có thay đổi về hình dạng và cách sắp xếp tế bào biểu bì lá, khí khổng, mạch dẫn so với đối chứng. Những quan sát ở cấp độ vi mô này cung cấp hiểu biết sâu hơn về ảnh hưởng của đột biến lên cấu trúc mô thực vật – một đóng góp học thuật quan trọng.
- Đã nghiên cứu tái sinh 1 số dòng lan đột biến thành công
- Xây dựng thành công quy trình chăm sóc lan con *in vitro* phù hợp cho giai đoạn vườn ươm, đồng thời nghiên cứu ứng dụng được chế phẩm vi sinh vật nội sinh trong chăm sóc cây lan con tại vườn, giảm sử dụng phân hóa học và thuốc bảo vệ thực vật.

6. ***Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc,...của luận án***

Ưu điểm:

Nghiên cứu có điểm mạnh ở tính hệ thống và bám nhu cầu thực tiễn: xây dựng được chuỗi kỹ thuật từ tạo vật liệu *in vitro* đến xử lý tạo biến dị, sàng lọc chọn dòng và bước đầu xác nhận khác biệt bằng chỉ thị phân tử, đồng thời mở rộng hướng vi sinh nội sinh/thuần dưỡng nhằm tăng khả năng ứng dụng.

Luận án được trình bày bài bản, rõ ràng, đúng quy định

Hạn chế:

Luận án vẫn còn 1 số điểm thiếu thuyết phục, cần chỉnh sửa để hoàn thiện hơn nếu có thể gồm:

Nội dung:

- Protocorm/ mô sẹo được lấy làm làm vật liệu đầu cho nghiên cứu gây đột biến cần được mô tả làm rõ hơn: có được đảm bảo từ 1 cá thể đơn ban đầu không? Hay có khả năng bị biến dị soma không? Vì sẽ khó thuyết phục khác biệt quan sát được là do xử lý hóa chất hay do vốn dị đã mang biến dị nền của mẫu xử lý.
- mục tiêu của NCS khi sử dụng cả 2 tác nhân gây đột biến với 2 cơ chế khác nhau hoàn toàn là cochichine (gây đa bội) và DMS (alkyl hóa DNA gây đột biến điểm) là gì? Tại sao không thấy NCS tách nhóm mô tả hình thái, so sánh để có thể quy nguồn cơ chế tác động cho từng tác nhân? Nên chăng trình bày so sánh kết quả của 2 nhóm tác động để có thể phân biệt được đa bội (thường làm mô/cơ quan lớn lên, thay đổi kích thước khí khổng…) với đột biến điểm (thường không làm tăng kích cỡ tế bào nhưng gây đa hình phân tử).
- sử dụng RAPD để kiểm tra biến đổi di truyền liệu có tin cậy không khi đây là 1 kỹ thuật với độ lặp lại thấp, dễ cho band giả ?
- mô tả biến dị chủ yếu ở mô sẹo/chồi/lá non, chưa có được dữ liệu về hoa (kiểu cánh, môi, màu, sắc tố, hương, thời gian nở) vốn là đích ứng dụng của lan cảnh

Hình thức trình bày

- *Thiếu sự nhất quán trong trình bày toàn luận án*: tên hóa chất lúc in hoa, lúc lại thường (cochicine, Cochinine); tên khoa học lúc đầy đủ, lúc viết tắt chữ đầu (*Dendrobium anosmum* Lindl., *D. anosmum* Lindl.), một số chỗ trình bày tỷ lệ phần trăm và số thập phân (ví dụ 56,67%; 14, 67%; 11,59%…) chưa nhất quán về khoảng trắng/định dạng
- Ký hiệu công thức nghiên cứu xử lý đột biến của cochicine và DMS (CT1-CT25) cần được phân biệt khác nhau để khi trình bày kết quả người đọc dễ theo dõi

7. ***Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố***

Các bài báo của tác giả công bố đều thể hiện nội dung luận án. Trong đó: 01 bài báo quốc tế (SCIE/Scopus), 01 bài báo trong nước (tạp chí ĐH Huế), 01 hội thảo quốc tế, 02 hội nghị toàn quốc

Đây là những tạp chí, hội nghị có giá trị khoa học.

8. ***Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không***

Luận án đáp ứng yêu cầu đối với 1 luận án tiến sĩ, bản tóm tắt phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án tuy nhiên cần bổ sung kết quả quan sát NST/ lập karyotype của các mẫu biến dị do colchicine như trong báo có tổng kết.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

Đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế

Ngày 12 tháng 2 năm 2026

Người phản biện

(Ký và ghi rõ họ và tên)

Quách Ngô Diễm Phương

Xác nhận của cơ quan

Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM xác nhận:

PGS.TS. Quách Ngô Diễm Phương

hiện đang là Giảng viên cao cấp

tại Khoa Sinh học - CNSH

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 12 tháng 2 năm 2026

TL. HIỆU TRƯỞNG

TRƯỞNG PHÒNG TỔ CHỨC - HÀNH CHÍNH

PHÓ TRƯỞNG PHÒNG

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thị Kim Chi

PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29/12/2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp tại Đại học Huế (phòng I.1) ngày 27/2/2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh NGUYỄN HỮU THỌ

với đề tài Nghiên cứu tạo tổ hợp dòng tế bào gà Hạc Kim Huế (Dendrobium aposmum Lindl.) và đánh giá hiệu quả bằng phương pháp thực nghiệm

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐ TÁN THÀNH ☒

PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29/12/2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp tại Đại học Huế ngày 27/2/2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ với đề tài Nghiên cứu tạo một số chủng lan giả hoa tím thẻ (Dendrobium anosmum Lindl.) bằng phương pháp thể nguyên sinh.

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐ TÁN THÀNH ☒

PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29/12/2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp tại Đại học Huế

ngày 27/2/2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ

với đề tài Nghiên cứu tạo một số dòng lan Giả hạc tím Huế (Dendrobium aniosmum Lindl.) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

.....

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐ TÁN THÀNH ☒

PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 4512/QĐ-ĐHH ngày 29/12/2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp tại Đại học Huế
ngày 27/02/2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ
với đề tài Nghiên cứu tạo một số dòng lan giả hạc tím thuế (Dendrobium anosmum Lindl.) đột biến bằng phương pháp thực nghiệm

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐ TÁN THÀNH ☒

PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 23/12/2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp tại phòng I.1, Đại học Huế ngày 27/2/2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh Nguyễn Mậu Thọ

với đề tài Nghiên cứu tác dụng làm giảm hoa tím Huế (Dendrobium anosmum Lindl.) gây tổn viêm bằng phương pháp Thực nghiệm

.....

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐ TÁN THÀNH ☑

PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 2512 /QĐ-ĐHH ngày 24 / 12 /2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp tại Đại học Huế,
ngày 27 / 2 /2026, để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ
với đề tài Nghiên cứu, tạo một số dòng lạc giá, lạc tím Huế đột biến bằng phương pháp hữu nghiệm.

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐ TÁN THÀNH ☒

PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 2512/QĐ-ĐHH ngày 29/12/2025 của Giám đốc Đại học Huế đã họp tại Phòng I.1 - Đại học Huế ngày 27/12/2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh Nguyễn Hữu Thọ với đề tài Nghiên cứu tác một số dược liệu giá trị thuộc chi (Dendrobium Linnaeus) phục vụ bảo tồn phát triển nguồn

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐ TÁN THÀNH ☒

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

Huế, ngày 6 tháng 5 năm 2026

BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA
SAU HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC

1. Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hữu Thọ

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

Khóa: 2021

Ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Bảo vệ luận án cấp cơ sở ngày: 05/8/2025

Người hướng dẫn:

1. TS. Nguyễn Thị Kim Cúc

2. PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng

Dựa trên những nhận xét, góp ý và đề nghị của các thành viên trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học đối với bản luân án, nghiên cứu sinh xin tiếp thu và sửa chữa luận án theo các điểm sau:

STT	Yêu cầu của Hội đồng	Sữa chữa hoặc bảo lưu	Số trang
1	***a. Phần mục lục*:** - Còn một số ít nhầm lẫn ở phần chữ viết tắt "DMS": trong danh mục chữ viết tắt ghi "DMS =Dimethyl sulfide", trong khi ở nột số đoạn text DMS là tác nhân alkyl hóa (dimethyl sulfate). Cần chuẩn hóa lại để tránh sai bản chất hóa chất.	-Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Toàn luận án
2	***b. Phần mở đầu:***		

	- Cần phải khẳng định Luận án là chỉ mới là bước đầu trong việc tạo dòng biến dị của giống lan Giả hạc tím Huế.	- Đã điều chỉnh để làm nổi bật mục tiêu của đề tài chỉ mới là bước đầu trong việc tạo dòng biến dị của giống lan Giả hạc tím Huế.	-Trang 2
	- Cần xác định lại đối tượng nghiên cứu của Luận án, giống lan Giả hạc tím Huế là vật liệu nghiên cứu, không phải là đối tượng nghiên cứu	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: **Phạm vi nghiên cứu:** Nghiên cứu quá trình gây đột biến thực nghiệm bằng colchicine và DMS trên vật liệu nuôi cấy *in vitro*. Nghiên cứu sự phát sinh biến dị di truyền và hình thái của các dòng lan sau xử lý đột biến, làm cơ sở khoa học cho sàng lọc và lựa chọn dòng đột biến phục vụ định hướng chọn tạo giống lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.)	-Trang 2
	- Ở phần ý nghĩa thực tiễn, việc khẳng định dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến có nguồn gene ổn định là chưa có cơ sở, vì chưa qua quá trình đánh giá và kiểm chứng ở các thế hệ tiếp theo từ dòng biến dị thế hệ T_0.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: "…Tạo ra một số dòng lan giả hạc Tím Huế đột biến có hình thái khác biệt, có nguồn biến dị phong phú, cung cấp nguồn vật liệu cho quá trình chọn lọc và tạo giống…"	-Trang 3

	- Ở phần những điểm mới của luận án, việc giới hạn khu vực Tp. Huế là không cần thiết, vì quá hẹp đối với những nội dung này. Bên cạnh đó, việc đánh giá đa dạng di truyền của các dòng lan đột biến được tạo ra không phải là điểm mới của Luận án, đây chỉ là công việc thực hiện trong nội dung của Luận án.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: "- Nghiên cứu là lần đầu mô tả chi tiết các đặc điểm nhận dạng về hình thái và phân tử dòng lan Giả hạc tím thu thập tại Tp. Huế, kết quả bổ sung vào khoá phân loại các đặc điểm nhận dạng loài này. - Lần đầu tiên xây dựng quy trình tạo giống đột biến thực nghiệm trên lan Giả hạc tím Huế bằng hoá chất colchicine và dimethyl sulphate. -Phân lập được một số chủng vi sinh vật nội sinh từ lan rừng và ứng dụng chế phẩm vi sinh nội sinh trong chăm sóc cây lan con ở vườn ươm, góp phần định hướng phát triển mô hình chăm sóc lan theo hướng sinh học, bền vững."	-Trang 3-4
	- *Cấu trúc và lập luận phần Mở đầu:* Phần Mở đầu nhìn chung đầy đủ nhưng nên cấu trúc lại theo trình tự logic hơn: (1) Tổng quan họ/chi phong lan (giá trị sinh học - sinh thái - kinh tế); (2) Thu hẹp vào *Dendrobium*	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: … "Trong tự nhiên, *Dendrobium* là một trong sáu chi phong lan phổ biến được ưa chuộng do các giá trị về thẩm mỹ, dược liệu, và kinh tế	-Trang 4

	anosmum và dòng Giả hạc tím Huế (vị trí phân loại, giá trị, tình trạng khan hiếm); (3) Làm rõ nhu cầu đa dạng hóa nguồn giống, mặt hoa, màu sắc cho ngành hoa Việt Nam; (4) Phương pháp gây đột biến thực nghiệm; Cụm "6 giống phong lan" (trang 1) sửa thành "sáu chi phong lan"; Câu "phục vụ người sưu tầm lan" (trang 2) nên mở rộng theo hướng phục vụ sản xuất quy mô lớn và phát triển ngành hoa cảnh, tránh giới hạn ở nhu cầu chơi lan. - Mục tiêu "tạo vật liệu khởi đầu in vitro" nên điều chỉnh theo hướng "xây dựng/hoàn thiện quy trình nhân giống in vitro", vì tạo vật liệu khởi đầu chỉ là một phần của quy trình. -Cần xác định dòng và giống là 2 từ với nghĩa khác nhau. Trong bối cảnh của luận án dòng sẽ phù hợp hơn.	mà chi lan này mang lại."…. "nhằm tạo ra một số dòng đột biến có giá trị từ nguồn giống lan bản địa này, cũng như làm đa dạng nguồn vật liệu cho quá trình lựa chọn giống hoặc phục vụ sản xuất giống lan này, phát triển ngành nghề hoa cây cảnh, đồng thời đề tài còn nhân giống *in-vitro* cây mẹ đầu dòng góp phần bảo tồn nguồn gen của giống lan bản địa." - Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: … "- Hoàn thiện quy trình nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum* Lindl.). " - Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: NCS đã chỉnh sửa "giống"=> "dòng	-Trang 2 -Toàn luận án
3	***c. Phần tổng quan tài liệu*:** - Phần Tổng quan các vấn đề nghiên cứu, ở trang 5, nội dung đề cập về 4 loại giả hành *Dendrobium* cần liệt kê và mô tả cụ thể hơn, thay vì chỉ nêu thông tin lấp lửng như vậy.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: - Giả hành *Dendrobium* có 4 loại chính: (a) giả hành dạng thân gỗ (cane woody), (b) giả	-Trang 5

		hành dạng thân trụ (cane cylindric), (c) giả hành dạng thân chùy (cane clavate fleshy), và (d) giả hành dạng củ tròn (bulbous round), đại diện điển hình là *D.anosmum*, *D. bigibbum, D. nobile*, và *D. lindleyi*.	
	- Nội dung mô tả về đặc điểm lan Giả hạc (trang 6 và 7) nên bổ sung hình ảnh minh hoạ. - Phần mô tả về bộ NST của lan Giả hạc (trang 8) cần bổ sung kích thước khi mô tả về kích thước lớn nhỏ.	- Đã bổ sung hình **Hình 1.1 :** Hình thái của *Dendrobium anosmum* Lindl. [92] - Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: - Có sự khác biệt về kích thước nhiễm sắc thể ở các loài khác nhau, hầu hết các loài thuộc *Dendrobium* đều có nhiễm sắc thể nhỏ (1- 3 µm), nhưng một số loài như *D. macrophyllum, D. spectabile* và *D. anosmum* (*superbum*) có nhiễm sắc thể lớn gấp 3 đến 4 lần so với các loài khác kích thước từ 1,88 – 2,51 µm . Số lượng nhiễm sắc thể của loài *D. anosmum* (*superbum*) là 2n = 38, kích thước lớn đạt 2,51 ± 0,11 µm [194].	-Trang 7 -Trang 8-9

	- Trang 14: 'Một nguyên tắc cơ bản trong nuôi cấy mô tế bào là các tế bào làm vật liệu nuôi cấy càng non thì khả năng nuôi cấy thành công càng cao', nên giải thích, dựa trên cơ sở khoa học	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: "Tế bào non (như mô phân sinh, đỉnh sinh trưởng) có khả năng phân chia mạnh, chưa phân hóa chuyên sâu, và mang tính toàn năng cao, giúp quá trình phản phân hóa thành mô sẹo (callus) và tái sinh cơ quan dễ dàng hơn, nâng cao tỷ lệ thành công, đồng thời tế bào non thường sạch bệnh."	-Trang 14
4	***d. Phần phương pháp nghiên cứu:*** - Cần xác định lại đối tượng nghiên cứu của Luận án, giống lan Giả hạc tím Huế là vật liệu nghiên cứu, không phải là đối tượng nghiên cứu	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: ***Đối tượng nghiên cứu:*** - Quá trình gây đột biến thực nghiệm bằng colchicine và DMS trên vật liệu nuôi cấy *in vitro*. - Sự phát sinh biến dị di truyền và hình thái của các dòng lan sau xử lý đột biến. - Cơ sở khoa học cho sàng lọc và lựa chọn dòng đột biến phục vụ định hướng chọn tạo giống lan Giả hạc tím Huế. ***Vật liệu nghiên cứu*** - Vật liệu thực vật	-Trang 36

	- Phần Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu, danh mục 63	Lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.) được thu thập tại Thành phố Huế, đã được Bảo tàng Thiên nhiên Duyên hải miền Trung giám định và xác định đúng loài theo văn bản số 01/BT-NCKH, với mẫu hiệu VNCC-MAG-001 (Phụ lục 1). Vật liệu thực vật sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: + Quả lan chín sinh lý. + Các đoạn thân có chứa chồi ngủ của cây lan Giả hạc tím Huế khỏe mạnh, sạch bệnh, dùng cho nuôi cấy *in vitro* tạo vật liệu khởi đầu. + Mô sẹo sơ cấp được tạo ra từ nuôi cấy đoạn thân có chồi ngủ. + Protocorm phát triển từ hạt *in vitro*. Đây là các dạng vật liệu nuôi cấy *in vitro* được sử dụng làm nền vật liệu cho các thí nghiệm xử lý hóa chất gây đột biến (colchicine và DMS). - Đã rà soát, chỉnh sửa và bổ sung tài liệu tham khảo	-Trang 36-38

	mỗi RAPD sử dụng trong nghiên cứu cần bổ sung nguồn tham khảo bên cạnh đơn vị cung cấp là hãng Operon Technologies. Cần bổ sung thông tin chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên lan sử dụng trong nghiên cứu.	theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	
	- Mục 2.3.4 và 3.4 nên chỉnh tiêu đề thành "Hoàn thiện quy trình tái sinh *in vitro* một số dòng lan đột biến có triển vọng" để thể hiện đúng giá trị khoa học.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Trang 54, 127
	- Phương pháp và thiết kế thí nghiệm: Không dùng cụm "vào mẫu" (trang 40-41), thay bằng "tạo vật liệu khởi đầu nuôi cấy *in vitro*"; Chuẩn hóa cách mô tả thiết kế thí nghiệm: nêu rõ bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, số lần nhắc lại và đơn vị thí nghiệm; Các bảng 2.4, 2.5, 2.6… nên bỏ cột "môi trường" nếu chỉ là môi trường nền cố định; Mục gây đột biến (2.3.2.1): cần mô tả rõ tính đồng nhất vật liệu trước xử lý.	- Đã rà soát, chỉnh sửa và bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Toàn luận án
	- Chương 2, phương pháp nghiên cứu cần cấu trúc lại theo từng nội dung nghiên cứu. Những phương pháp chính được sử dụng để thực hiện nội dung nghiên cứu thì phải đưa vào luận án, phụ lục chỉ là những nội dung đi kèm để bổ sung thêm minh chứng làm	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Trang 36-60

	rõ hơn các nội dung đã trình bày trong luận án hoặc số liệu thô, kết quả xử lý thống kê, hình ảnh minh họa... Ví dụ như: Đối với nội dung nghiên cứu: Đánh giá đặc điểm hình thái/di truyền của các dòng lan đột biến, nên trình bày theo trình tự như sau: Tách chiết DNA tổng_Kiểm tra chất lượng DNA_ Thực hiện phản ứng PCR_ Tinh sạch sản phẩm PCR_ Giải trình tự DNA_ Phân tích kết quả và xây dựng cây di truyền. - Đưa phụ lục 4 và 7 vào chương 2, bổ sung phương pháp giải trình tự DNA, nếu thuê ngoài thì cần ghi rõ địa chỉ công ty, giải trình tự 1 chiều hay hai chiều.	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: "Tất cả các phản ứng đều được thực hiện trong máy luân nhiệt Máy luân nhiệt MJ mini thermal cycler (ThermoFisher, Mỹ). Các sản phẩm PCR được điện di bằng cách sử dụng gel agarose 1% và so sánh với thang chuẩn 1kb (Bioline, UK) để xác định kích thước của sản phẩm khuếch đại. Các sản phẩm khuếch đại PCR sau đó được tinh sạch bằng cách sử dụng ISOLATE II PCR và Gel Kit (Bioline, UK) và sau đó được thực hiện phản ứng giải trình tự gen trực tiếp với cặp mồi tương ứng trên	-Trang 39-41 Phụ lục 4, phụ lục 7.

		máy ABI 3100 (Aplied Biosystems, Mỹ) tại công ty 1st Base -Malaysia (https://base-asia.com/), phương thức giải trình tự hai chiều." Phần phụ lục 4 và 7, NCS xin phép hội đồng được bảo lưu ở phần phụ lục không chuyển vào phần phương pháp. Lý do: 2 phụ lục này là mô tả chi tiết về phương pháp thực hiện, NCS đã nêu và dẫn nhập vào phần phương pháp. Mặcc khác, việc để 2 phụ lục 4 và 7 ở phần phụ lục giúp luận án đảm bảo số trang theo quy định.	
	- Bổ sung phương pháp phân tích kết quả và xây dựng cây di truyền. -Cần xác định rõ có bao nhiêu cây đầu dòng được đưa vào trong nghiên cứu này?	- Đã rà soát và chỉnh sửa bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. - Đã rà soát và chỉnh sửa bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể, nghiên cứu thu thập mẫu (quả và đoạn thân có chồi ngủ) từ 1 cây ban đầu.	-Trang 39-41 -Trang 39-40
5	***e. Phần kết quả và thảo luận:*** - Hầu hết các hình minh hoạ đều không được dẫn vào nội dung bài viết.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Các hình minh hoạ đều được	-Trang 61-143

		phân tích và dẫn vào nội dung bài viết.	
	- Hình 3.2 trang 66, các hình chi tiết C và D là đã là protocorm nên chú thích không nên ghi là hạt lan gieo được 25 ngày và 35 ngày, thay vào đó là "Protocorm hình thành từ hạt nảy mầm sau 25, 35 ngày".	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Trang 67
	- Phần 3.2.1. Gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng colchicine và DMS, trang 80 và 91, sự khác biệt về hình thái, thay đổi kiểu hình giữa dòng biến dị và đối chứng được nêu rất nhiều nhưng lại không có các mô tả sự khác biệt, sự thay đổi này là gì.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Đã bổ sung mô tả sự khác biệt, sự thay đổi giữ các dòng biến dị và đối chứng, cụ thể: … "khác biệt chủ yếu là hình dạng protocorm như phát triển không cân đối, không còn hình dạng bầu tròn như mẫu đối chứng, bề mặt xù xì, màu xanh không đều, hình dạng lá mầm dày hơn, xanh đậm, không còn thuôn dài như đối chứng và đặc điểm phát sinh chồi bị quấn phần đầu, mầm chồi to nhưng bề mặt có nhiều u gờ."	-Trang 81-92.
	- Bảng 3.5 trang 84 và Bảng 3.6 trang 85, kích thước protocorm với đơn vị là cm là rất lớn, cần kiểm tra lại tính chính xác.	- Đã rà soát lại về đơn vị đo kích thước protocorm ở bảng 3.5 và 3.6, xin phép hội đồng là bảo lưu lại, vì kích thước xác định là chiều dài nhất của protocrom, hơn nữa giai đoạn	-Trang 85-86

		này protocrom phát triển thành các khối mô lớn, nên dùng đơn vị là cm (kích thước dao động từ 0,26-0,68 cm ở bảng 3.5 và 0,18-0,57 cm ở bảng 3.6).	
	- Các Hình 3.12 và Hình 3.13 trang 90, trình bày trạng thái mô sẹo sau khi xử lý bằng colchicine và DMS đều không mô tả rõ ràng, cả trong nội dung bài viết. Những nội dung về sự khác biệt hình thái giữa các nghiệm thức thí nghiệm so với đối chứng (trang 87, 91) được đề cập, nhưng không mô tả là khác biệt như thế nào.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: đã chỉnh sửa và bổ sung phần mô tả các điểm khác biệt:.. "Mô sẹo đối chứng hình thái phát triển cân đối ra các hướng, có màu xanh lá nhạt, mầm chồi hình thành và phát triển đều, khối mô đặc mộng nước. Ngược lại, đối với các mô sẹo được xử lý hoá chất colchicine và DMS đều có sự khác biệt so với đối chứng, chủ yếu tập trung vào các đặc điểm như màu sắc, kích thước, hình dạng và đặc điểm mô. Những thay đổi cụ thể như mà xanh lá nhạt hơn và có ngã vàng, phát triển của mộ sẹo không đều theo các hướng, mô xốp. Một số ít mô sẹo có sự phát triển thành các phiến mỏng và một số bị chết một phần mô sẹo. Mầm chồi hình thành không đều, kích	-Trang 88

	- Kết quả nghiên cứu của Luận án cho thấy, số chồi, số lá, số rễ tạo ra, cũng như chiều cao chồi, cây, chiều dài rễ các dòng biến dị biến bằng colchicine và DMS hầu hết đều cao hơn so với mẫu đối chứng trong nuôi cấy *in vitro*. Nguyên nhân là gì cho những hiện tượng này?	thước thước thường lớn đối với mô sẹo xử lý bằng colchicine." - Nguyên nhân có được kết quả này có thể là do: 1. Các mẫu (protocrom và mô sẹo) được sử dụng sau khi xử lý hoá chất đều là những mẫu thích ứng được với môi trường, khoẻ mạnh và sinh trưởng tốt; 2. Các thay đổi của mẫu do tác động của hoá chất đột biến có thể đã làm thay đổi những cơ chế tổng hợp các chất hay cảm ứng với các loại kích thích sinh trưởng tốt hơn. Tuy nhiên, không phải tất cả đều có những thay đổi này, bên cạnh những thí nghiệm có kết quả tốt hơn so với đối chứng thì cũng có những kết quả thấp hơn đối chứng.;3. Đối với colchicine ở nồng độ thấp nó còn có tác dụng nhưng một chất kích thích sinh trưởng.	-Trang 93-103
	- Bảng 3.1 (trang 62): nếu "không có sự khác biệt thống kê" thì cần rà soát lại việc kết luận 8 giờ chiếu sáng là tối ưu; Bảng 3.9 (trang 94): nên dùng "chồi tái sinh từ mẫu xử lý hóa chất" thay vì "chồi đột biến".	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Trang 61-93

	- Trình bày kết quả: Cần nêu rõ tổng số dòng đột biến được khảo sát (ví dụ 34 dòng) và liệt kê mã dòng; Khi mô tả đặc điểm hoa cần ghi rõ tuổi cây/thời điểm đánh giá; Các bảng kết quả đã xử lý thống kê nên trình bày trong phần nội dung chính, không chuyển xuống phụ lục; Danh mục bảng/hình cần thống nhất cách viết hoa; Rà soát lỗi chính tả và thuật ngữ tiếng Anh.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Tuy nhiên, ở phần một số bảng xử lý thống kê được trình bày ở phần phụ lục NCS xin phép hội đồng được bảo lưu vì: 1. Tất cả các bảng thống kê trình bày ở phần phụ lục đều được nêu và dẫn nhập vào phần trình bày kết quả; 2. Việc đưa một số bảng thống kê vào phần phụ lục cũng là ý kiến đóng góp của hội đồng cơ sở; 3. Đưa một số bảng vào phần phụ lục còn nhằm mục đích đảm bảo số trang của luận án (160 trang) theo quy định của Đại học Huế.	-Trang 103-110
	- Protocorm/ mô sẹo được lấy làm làm vật liệu đầu cho nghiên cứu gây đột biến cần được mô tả làm rõ hơn: có được đảm bảo từ 1 cá thể đơn ban đầu không? Hay có khả năng bị biến dị soma không? Vì sẽ khó thuyết phục khác biệt quan sát được là do xử lý hóa chất hay do vốn dị đã mang biến dị nền của mẫu xử lý.	- Protocorm/ mô sẹo được lấy làm làm vật liệu đầu cho nghiên cứu gây đột biến được lấy từ 1 cá thể đơn ban đầu. Mô sẹo và protocrom được sử dụng để xủ lý hoá chất là các mô sẹo và protocrom sơ cấp, điều này sẽ hạn chế tối đa khả năng phát sinh biến dị soma. Mặt khác tất cả các thí nghiệm xử lý hoá chất luôn có nghiệm thức đối chứng không xử lý hoá chất để so sánh đối chứng.	-Trang 39-40

	- Mục tiêu của NCS khi sử dụng cả 2 tác nhân gây đột biến với 2 cơ chế khác nhau hoàn toàn là cochichine (gây đa bội) và DMS (alkyl hóa DNA gây đột biến điểm) là gì? Tại sao không thấy NCS tách nhóm mô tả hình thái, so sánh để có thể quy nguồn cơ chế tác động cho từng tác nhân? Nên chăng trình bày so sánh kết quả của 2 nhóm tác động để có thể phân biệt được đa bội (thường làm mô/cơ quan lớn lên, thay đổi kích thước khí khổng…) với đột biến điểm (thường không làm tăng kích cỡ tế bào nhưng gây đa hình phân tử).	-Mục tiêu của việc sử dụng đồng thời colchicine và DMS là nhằm mở rộng phổ biến dị di truyền, tạo nguồn vật liệu đột biến đa dạng cả về cơ chế tế bào học (đa bội hoá) lẫn biến đổi ở mức DNA (đột biến điểm), phục vụ sàng lọc chọn giống. Luận án định hướng tạo nguồn biến dị và sàng lọc vật liệu, không nghiên cứu cơ chế sinh học phân tử riêng biệt của từng tác nhân. + NCS muốn trình bày chung để so sánh biểu hiện hình thái. Phân tích cơ chế tác động riêng biệt của từng tác nhân là hướng nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo NCS mong muốn được tiếp tục.	-Trang 81-92
	- Sử dụng RAPD để kiểm tra biến đổi di truyền liệu có tin cậy không khi đây là 1 kỹ thuật với độ lặp lại thấp, dễ cho band giả ?	- NCS thống nhất với ý kiến hội đồng là RAPD là kỹ thuật có hạn chế về độ lặp lại và độ phân giải. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, RAPD không được sử dụng như công cụ định danh di truyền, mà được sử dụng với vai trò sàng lọc ban đầu nhằm đánh giá mức độ biến dị di truyền, phân	-Trang 122-126

		nhóm quần thể và lựa chọn vật liệu tiềm năng cho chọn tạo giống. Việc chuẩn hoá quy trình PCR, sàng lọc mồi, lặp lại phản ứng, lựa chọn band ổn định và xử lý số liệu thống kê đã giúp đảm bảo độ tin cậy khoa học cần thiết cho mục tiêu nghiên cứu của luận án. Các dòng được chọn từ phân tích RAPD là cơ sở định hướng cho các nghiên cứu xác nhận sâu hơn bằng chỉ thị phân tử có độ phân giải cao trong các nghiên cứu tiếp theo.	
	-Mô tả biến dị chủ yếu ở mô sẹo/chồi/lá non, chưa có được dữ liệu về hoa (kiểu cánh, môi, màu, sắc tố, hương, thời gian nở) vốn là mục đích ứng dụng của lan cảnh. + Cần có một mô tả (hình ảnh minh hoạ) về giải phẫu hoa của các dòng biến dị bên cạnh hình thái hoa trình bày ở Hình 3.21 trang 108, tương tự như Hình 3.1 trang 60. - Phụ lục 11 phải để ở chương 3 kết quả. Bổ sung thêm cột hình ảnh vào bảng mô tả đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế.	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. cụ thể các đặc điểm mô tả ở bảng 3.14, hình 3.21; 3.22 - Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể hình 3.22 - Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: NCS đã bổ sung hình ảnh mô tả vào phụ lục 11.	-Trang 108-110 -Trang 108-110 -Phụ lục 11

		NCS xin phép hội đồng được bảo lưu Phụ lục 11 ở phần Phụ lục.	
	- Bổ sung tất cả các hình là kết quả chạy trên gel agarose kèm chú thích thông tin hình ảnh. Phần này có thể đưa vào phụ lục.	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Phụ lục 20
	- Bổ sung kết quả xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch DNA tổng sau khi tách chiết. Phần này có thể đưa vào phụ lục.	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Trang 122
	- Kiểm tra lại xử lý thống kê các kết quả thể hiện trên hình 3.4, 3.6, 3.24, 3.25, 3.27, 3.30 và bổ sung kết quả xử lý thống kê vào phụ lục.	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Phụ lục 21	-Trang 61-143, Phụ lục 21
	- Tất cả các hình, biểu đồ cần bổ sung số lần lặp lại thí nghiệm, số lượng cây thí nghiệm/lần cho một công thức vào chú thích hình, biểu đồ.	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Toàn luận án
	- Bổ sung hình ảnh hoa của 6 dòng tạo đột biến được chọn để khảo sát (nếu có).	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Hình 3.21, 3.22	-Trang 108, 109
	-Sau khi xác định được đa dạng di truyền của các dòng xử lý đột biến thì nên có bảng mô tả so sánh về sự sai khác hình thái và trình tự nucleotic để xác định điểm đột biến so với dòng gốc ban đầu, tối thiểu là phải so sánh	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. NCS đã có bảng tổng hợp so sánh các đặc điểm của dòng xử lý hoá chất và đối chứng (Bảng 3.14). Phạm vi nghiên cứu chỉ dừng lại ở mức dùng chỉ thì RAPD để xác	-Trang 108

	được 6 dòng lựa chọn khảo sát từ 27 dòng tạo đột biến.	định đa dạng di truyền làm cơ sở để lựa chọn dòng có triển vọng làm nguyên liệu cho chọn tạo giống sau này. Nghiên cứu không thực hiện giải trình tự toàn bộ bộ gen của các dòng biến dị và đối chứng để so sánh. Đây cũng là một định hướng tiếp theo của nghiên cứu mà NCS mong muốn được thực hiện sau này.	
	- Thiếu chính xác về khái niệm và cơ sở khoa học + Luận án có sự nhầm lẫn giữa "bảo tồn nguồn gen" và "đa dạng hóa nguồn gen". Đột biến thực nghiệm là quá trình làm biến đổi cấu trúc di truyền, đi ngược lại nguyên tắc bảo tồn nguyên trạng nguồn gen quý của địa phương.	- NCS xin tiếp thu ý kiến của hội đồng về mặt khái niệm khoa học rằng bảo tồn nguồn gen và đa dạng hoá nguồn gen là hai khái niệm khác nhau. Bảo tồn nguồn gen là bảo tồn trạng thái di truyền nguyên gốc, trong khi đột biến thực nghiệm là quá trình tạo biến đổi di truyền có chủ đích. Luận án NCS theo hướng khai thác nguồn gen bản địa làm vật liệu để tạo đa dạng di truyền phục vụ chọn giống. Trong nghiên cứu này, trước khi thực hiện xử lý đột biến thực nghiện, nghiên cứu đã thực hiện nhân giống *in*	-Trang 2-3

		vitro từ hạt và thân của lan này cũng nhằm mục đích bảo tồn nguồn gen này. Mặc khác, việc nhân giống *in vitro* trong luận án nhằm bảo tồn ex situ vật liệu gốc và tạo nguồn vật liệu đồng nhất cho nghiên cứu, không nhằm thay thế quần thể tự nhiên. Do đó, luận án theo hướng đa dạng hoá và khai thác nguồn gen cho chọn giống, không phải bảo tồn di truyền nguyên trạng, và NCS đã chỉnh sửa lại thuật ngữ diễn đạt để tránh nhầm lẫn về mặt khái niệm khoa học.	
	+ Thiếu các tài liệu tham khảo khoa học để khẳng định dòng "Tím Huế" là đặc hữu cũng như thực trạng bị khai thác quá mức như tác giả nêu.	- Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Tuy nhiên, các nghiên cứu về dòng lan Giả hạc tím Huế là rất ít, hầu như không có, NCS chủ yếu sử dụng nguồn tài liệu từ các website online và tài liệu về lan Giả hạc tím	
	+ Việc sử dụng các marker (ITS, *trn*L, *mat*K, *rbc*L) chỉ phù hợp để nhận diện loài, không có giá trị phân loại dưới cấp loài (subspecies/variety). Tác giả	- NCS xin thống nhất với ý kiến của hội đồng rằng các marker ITS, *trnL*, *mat*K, *rbc*L chủ yếu có giá trị nhận diện và xác định loài, không phải	

	chưa áp dụng các chỉ thị hiệu quả hơn, vd: SSR hoặc phân tích sắc tố anthocyanin, để phân biệt các dòng/giống.	là chỉ thị phân giải cao cho phân loại dưới cấp loài. Trong luận án, các marker này được sử dụng đúng mục đích khoa học, nhằm khẳng định chính xác đối tượng nghiên cứu là *Dendrobium anosmum* trước khi triển khai các nội dung gây đột biến và chọn giống. Chỉ thị SSR hoặc các chỉ thị phân giải cao khác, cũng như phân tích sắc tố anthocyanin, sẽ cho độ phân giải tốt hơn trong phân biệt dòng, và đây là định hướng nghiên cứu phát triển tiếp theo từ kết quả của luận án.	
	- Chưa đồng nhất giữa mục tiêu chọn tạo giống và kết quả thực nghiệm + Mục tiêu đột biến là tìm kiếm biến dị ưu tú (hoa to, màu sắc đột phá), nhưng kết quả thực tế lại tạo ra các dòng thoái hóa (M14, M16) với hoa nhỏ hơn, màu sắc nhạt nhòa và mất đi viền tím quý giá của cây gốc.	- NCS thống nhất rằng mục tiêu cuối cùng của chọn giống là tạo biến dị ưu tú, tuy nhiên về bản chất khoa học, gây đột biến thực nghiệm luôn tạo phổ biến dị rất rộng, trong đó phần lớn là biến dị trung tính hoặc bất lợi, và chỉ một tỷ lệ nhỏ là biến dị có giá trị. Sự xuất hiện các dòng thoái hóa như M14, M16 là hiện tượng phổ biến trong nghiên cứu đột biến.	

	+ Các tiêu chí cốt lõi như "hương thơm" và "độ bền" chỉ được mô tả cảm tính, thiếu số liệu đối chứng khoa học về nồng độ hợp chất thơm hoặc thời gian theo dõi hoa tàn thực tế. ***- Còn hạn chế về tính thực tiễn*** + Tác giả mới chỉ giải quyết được bài toán "gây đột biến" trong phòng thí nghiệm mà chưa tiến tới bước "tuyển chọn dòng ưu tú" - mục tiêu quan trọng nhất của chọn giống. - Việc đầu tư quy trình nhân giống bài bản cho những dòng có hình thái kém hơn cây hoang dã (wild-type) là không cần thiết và không mang lại giá trị thương mại trên thị trường hoa lan.	Luận án tạo nguồn biến dị → sàng lọc, nên chưa tạo ra biến dị ưu tú ngay từ đầu. + Về các chỉ tiêu hương thơm và độ bền hoa, luận án mới dừng ở mức đánh giá mô tả cảm quan, chưa thực hiện phân tích định lượng hợp chất thơm hay theo dõi độ bền hoa bằng thí nghiệm chuyên sâu. Đây là hạn chế và NCS dự định nếu có điều kiện sẽ tiếp tục nghiên cứu các chỉ tiêu này trong giai đoạn phát triển giống sau luận án. + NCS xin thống nhất với ý kiến của hội đồng: mục tiêu cuối cùng của chọn giống là tuyển chọn được dòng ưu tú. Tuy nhiên, về mặt khoa học, chọn giống thực nghiệm gồm nhiều giai đoạn: tạo biến dị → sàng lọc → phân nhóm → lựa chọn dòng tiềm năng → đánh giá → hoàn thiện giống. Luận án này được thiết kế ở giai đoạn tạo nguồn vật liệu đột biến và sàng lọc khoa học ban đầu, chưa phải giai đoạn hoàn thiện giống thương mại.	

		+ Việc xây dựng quy trình nhân giống không nhằm thương mại hoá các dòng có hình thái kém hơn dạng kiểu dại (wild-type), mà nhằm xây dựng chuẩn hệ thống nhân giống, huấn luyện và đánh giá để tạo nền tảng cho tuyển chọn dòng ưu tú ở giai đoạn tiếp theo. + Các dòng có hình thái kém được xem là vật liệu nghiên cứu, không phải sản phẩm thương mại. Những dòng có tiềm năng hình thái, sinh trưởng và khác biệt di truyền mới là đối tượng định hướng phát triển giống. Do đó, nghiên cứu này mới là nghiên cứu nền tảng cho chọn giống, không phải đề tài phát triển giống thương mại.	
	- Phân tích di truyền và tính ổn định của đột biến + Dù chỉ thị RAPD cho tỷ lệ đa hình cao (75,71%), luận án vẫn chưa giải thích được mối liên hệ giữa các biến đổi gen này với các tính trạng hình thái mong muốn. Chưa làm rõ tần suất xuất hiện biến dị có lợi trên tổng mẫu xử lý.	+ NCS thống nhất rằng chỉ thị RAPD phản ánh biến đổi ở mức DNA, nhưng không trực tiếp thiết lập quan hệ với từng tính trạng hình thái cụ thể. Trong luận án, RAPD được sử dụng với vai trò sàng lọc di	

	Nếu đa số là biến dị có hại, tính khả thi của quy trình sẽ bị đặt dấu hỏi. + Tác giả chưa có dữ liệu chứng minh các đặc điểm đột biến có duy trì ổn định qua các thế hệ nhân giống tiếp theo (đặc biệt sau nhiều chu kỳ in vitro) hay chỉ là những biến dị sinh lý nhất thời do môi trường. -Một số tên bảng còn không đúng nghĩa (bảng 3.14).	truyền và phân nhóm, không nhằm phân tích chức năng gen và tính trạng. Việc lựa chọn dòng giống được thực hiện theo hướng kết hợp giữa biến dị di truyền và biểu hiện hình thái mong muốn. + Về tần suất biến dị có lợi, thực nghiệm gây đột biến luôn tạo đa số biến dị trung tính hoặc bất lợi, do đó quy trình khoa học không dựa vào số lượng biến dị mà dựa vào cơ chế sàng lọc để chọn được số ít biến dị có giá trị. + Về tính ổn định, nghiên cứu này mới dừng ở giai đoạn sàng lọc và lựa chọn dòng tiềm năng, chưa phải giai đoạn đánh giá ổn định di truyền qua nhiều thế hệ nhân giống. Đánh giá tính ổn định qua các chu kỳ *in vitro* và các thế hệ tiếp theo là nội dung nghiên cứu phát triển tiếp theo, nghiên cứu sau luận án. - Đã rà soát và chỉnh sửa, bổ sung theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể NCS đã điều chỉnh tên bảng 3.14. Một số đặc điểm hình thái của mẫu lan Giả	

		hạc tím Huế đối chứng không xử lý hoá chất và mẫu được xử lý hoá chất (colchicine, DMS)	-Trang 108
6	***f. Phần kết luận và kiến nghị:*** - Phần Kết luận trang 143, nội dung "Nghiên cứu đã chọn lọc được 27 dòng lan biến dị, trong đó có 14 dòng từ colchicine và 13 dòng từ DMS" cần viết lại để rõ ràng hơn: 14 dòng từ gây đột biết với colchicine và 13 dòng từ gây đột biết với DMS. - Kết luận còn chung chung cần viết lại chi tiết hơn. -Dựa vào nội dung và kết quả nghiên cứu, nên điều chỉnh kết luận 1 thành: "Xác định mẫu lan Giả hạc tím thu được ở Huế thuộc loài *Dendrobium anosmum* Lindl. dựa vào đặc điểm hình thái và phân tử" thay vì " đã thành công trong việc xác định, thu thập đúng mẫu lan Giả hạc tím Huế...". Từ đó cũng nên điều chỉnh phần ý nghĩa khoa học (trang 3) và điểm mới 1 của luận án (trang 4).	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. - Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. - Đã rà soát và chỉnh sửa theo ý kiến đóng góp của hội đồng. Cụ thể: "...Nghiên cứu xác định mẫu lan Giả hạc tím thu được ở Huế thuộc loài *Denrobium anosmum* Lindl dựa vào đặc điểm hình thái và phân tử,..."	-Trang 144 -Trang 144 -Trang 144
7	***g. Phần tài liệu tham khảo:*** - Cần rà soát lại các tài liệu trích dẫn từ website tin tức (ví dụ tài liệu số 14, 33, 34) và thay thế bằng nguồn khoa học chính thống nếu có thể.	- Đã rà soát và chỉnh sửa và thay thế một số tài liệu tham khảo theo ý kiến đóng góp của hội đồng.	-Trang 1-159

8	***h. Phần phụ lục:*** - Cần cân nhắc đưa một số hình ảnh từ phụ lục vào nội dung Luận án để diễn đạt rõ lưu loát hơn.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng	Phụ lục 20, phụ lục 21
9	***i. Một số thuật ngữ, lỗi trình bày cần chỉnh sửa*** - Thuật ngữ "lan rừng" là cách gọi dân gian, thay vào đó, nên dùng từ "tự nhiên" hoặc "hoang dã" trong tiếng Anh là "wild type" trong văn bản khoa học sẽ phù hợp hơn. - Viết hoa chữ "huế" ở trang 3. - Chữ "TP HCM" ở trang 10 nên viết đầy đủ Thành phố Hồ Chí Minh. - Chữ "Glucose" ở trang 11 không cần thiết viết hoa. - Taq DNA pol ở trang 52 nên viết thành *Taq* DNA pol.- Không nên dùng "chúng tôi" ở trang 60, thay vào đó là Luận án hoặc Nghiên cứu. - Các thang đo trong một số hình, như Hình 3.17.1 không thống nhất. - Chữ "cở mẫu" trang 124 sai chính tả.	- Đã rà soát và chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng.	-Toàn luận án
	- Diễn đạt và thuật ngữ khoa học: Trang 8, dòng 4-5 từ trên xuống: diễn đạt về khối lượng hạt chưa chuẩn xác. Nên thay bằng cách mô tả "khối lượng rất nhỏ (ở mức miligam hoặc thấp hơn), do đó dễ phát tán nhờ gió"; Trang 13, dòng 11-12 từ trên xuống:	- Đã rà soát, chỉnh sửa và bổ sung theo góp ý của hội đồng.	-Toàn luận án

	cần bổ sung điều kiện khi nói về nguy cơ nhiễm bệnh ở quần thể nhân giống sinh dưỡng (xảy ra khi vật liệu ban đầu mang mầm bệnh); Trang 25 (mục RAPD): cần bổ sung rõ đây là kỹ thuật dựa trên nền tảng PCR và nêu ngắn gọn nguyên lý; Trang 61 (nhận diện bằng chỉ thị phân tử): nên diễn đạt lại câu mở đầu theo hướng "để củng cố thêm cơ sở nhận định…". Đồng thời cần tóm tắt kết quả BLAST (tỷ lệ tương đồng, E-value, bootstrap) trong nội dung chính, chỉ đưa bảng chi tiết xuống phụ lục.		
	- *Thiếu sự nhất quán trong trình bày toàn luận án*: tên hóa chất lúc in hoa, lúc lại thường (cochicine, Cochinine); tên khoa học lúc đầy đủ, lúc viết tắt chữ đầu (*Dendrobium anosmum* Lindl., *D. anosmum* Lindl.), một số chỗ trình bày tỷ lệ phần trăm và số thập phân (ví dụ 56,67%; 14, 67%; 11,59%…) chưa nhất quán về khoảng trắng/định dạng.	- Đã rà soát, chỉnh sửa và bổ sung theo góp ý của hội đồng.	-Toàn luận án
	- Ký hiệu công thức nghiên cứu xử lý đột biến của cochicine và DMS (CT1-CT25) cần được phân biệt khác nhau để khi trình bày kết quả người đọc dễ theo dõi. - Rà soát lại lỗi chính tả: trang 11, 12, 20, 38…	- Đã rà soát, chỉnh sửa và bổ sung theo góp ý của hội đồng. Cụ thể: Công thức xử lý colchicine (CT_C1-CT_C25), Công thức xử lý DMS (CT_D1-CT_D25).	-Trang 81-93

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Hữu Thọ

Xác nhận của tập thể hướng dẫn

TS. Nguyễn Thị Kim Cúc

PGS. TS. Trương Thị Bích Phượng

Xác nhận thư ký Hội đồng

PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Liên

Xác nhận chủ tịch Hội đồng

GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc

Xác nhận của đơn vị đào tạo

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
ĐẠI HỌC HUẾ

PGS.TS. Trương Thị Hồng Hải

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, Lã Thị Thu Hằng, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024**). Nghiên cứu ảnh hưởng của Dimethyl sulfide (DMS) đến tạo biến dị lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl).** Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, 467-473.

5. **Nguyễn Hữu Thọ**, Trương Thị Bích Phượng, Hồ Thị Xuân Tuý, 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

Propagation of Ornamental Plants
Vol. 23, № 2, 2023: 39-48

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

Nguyen Huu Tho[1,4], Nguyen Thi Oanh[1], Truong Thi Bich Phuong[2], Pham Thanh[3], Hoang Khanh Linh[3], and Nguyen Thi Kim Cuc[1]*

[1]Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam, *E-mail: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn
[2]Hue 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, 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% $HgCl_2$ 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). Sofar different crops, flowers, and fruitswere 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 successful 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

Received: April 13, 2023

Accepted: May 1, 2023

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 propagationand 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% H_2O_2 for 10-20 min (De Stefano et al. 2022), and 0.1% $HgCl_2$ for 5-10 min (Bing et al. 2018) and a different combination of 2% NaClO, 3% H_2O_2, and 0.1% $HgCl_2$ (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 $s^{-1}m^{-2}$ 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 $s^{-1}m^{-2}$, earthen floor with tarps, and equipped with an irrigation system to produce mish 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% $HgCl_2$ 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% H_2O_2 at 10 min (CT2), 15 min (CT3), and 20 min (CT4) showed a high ratio of infected and dead enplants, 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% $HgCl_2$ 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% $HgCl_2$ 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% $HgCl_2$ combination was better for disinfection than 2% NaClO and 3% H_2O_2, but the long-term exposure to $HgCl_2$ 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 *Dendribium* 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 $HgCl_2$ 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% $HgCl_2$ 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% $HgCl_2$ 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% $HgCl_2$. 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 $HgCl_2$ than other *Dendribium* 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_2O_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, respectively (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

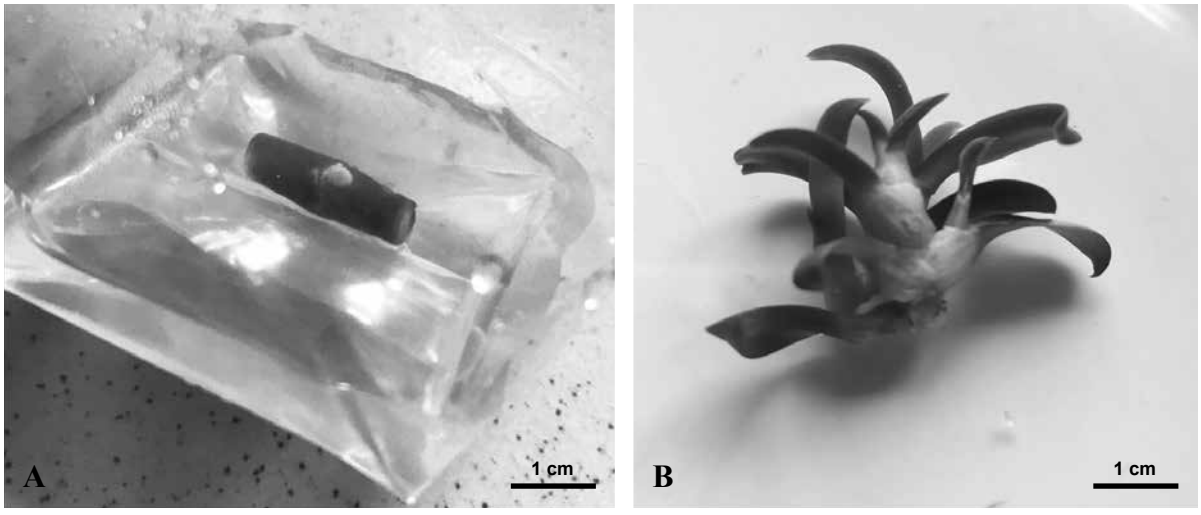


Fig. 1. *In vitro* shoot regeneration from nodal segments of *D. anosmum* 'Tim Hue'. A) *In vitro* shoot regeneration from nodal segments of *D. anosmum* 'Tim Hue' after 2 weeks, B) *In vitro* shoot regeneration from nodal segments of *D. anosmum* 'Tim Hue' after 8 weeks.

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. thyrsiflorum*, while Maharjan et al. (2020) suggested that KIN and GA_3 conbination 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.

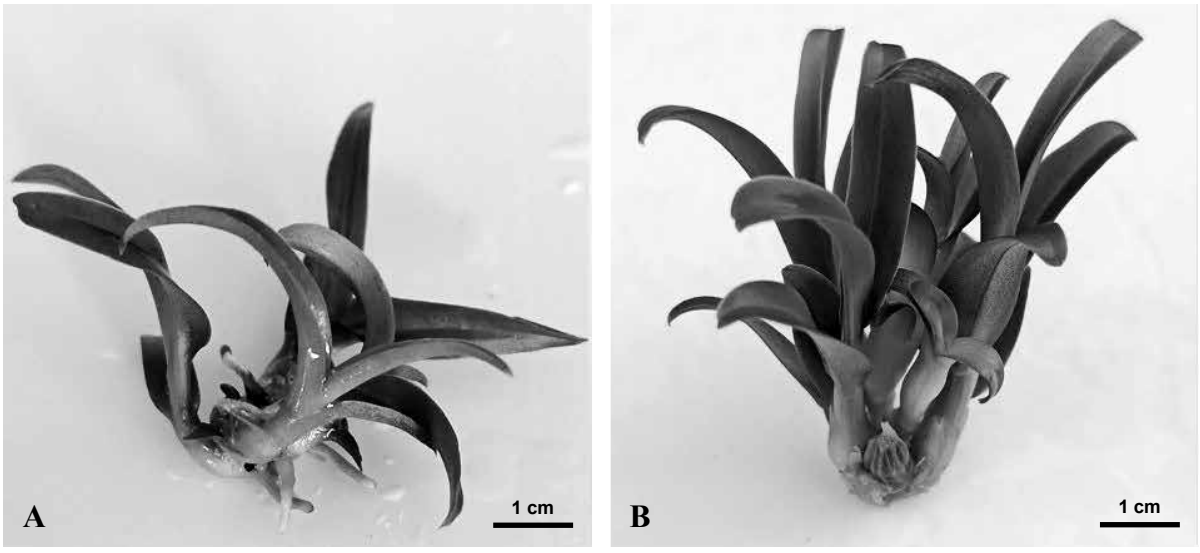


Fig. 2. Multiplication of shoots after 8 weeks of culture. A) PGRs-free medium, B) Culture medium supplemented with 1.5 mg l^{-1} BAP and 0.5 mg l^{-1} IAA.

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 medum was the best. On the other hand, Pham et al. (2018) suggested that the hybrid *D. caesar* (*D. striaenopsis* M. A. Clem.

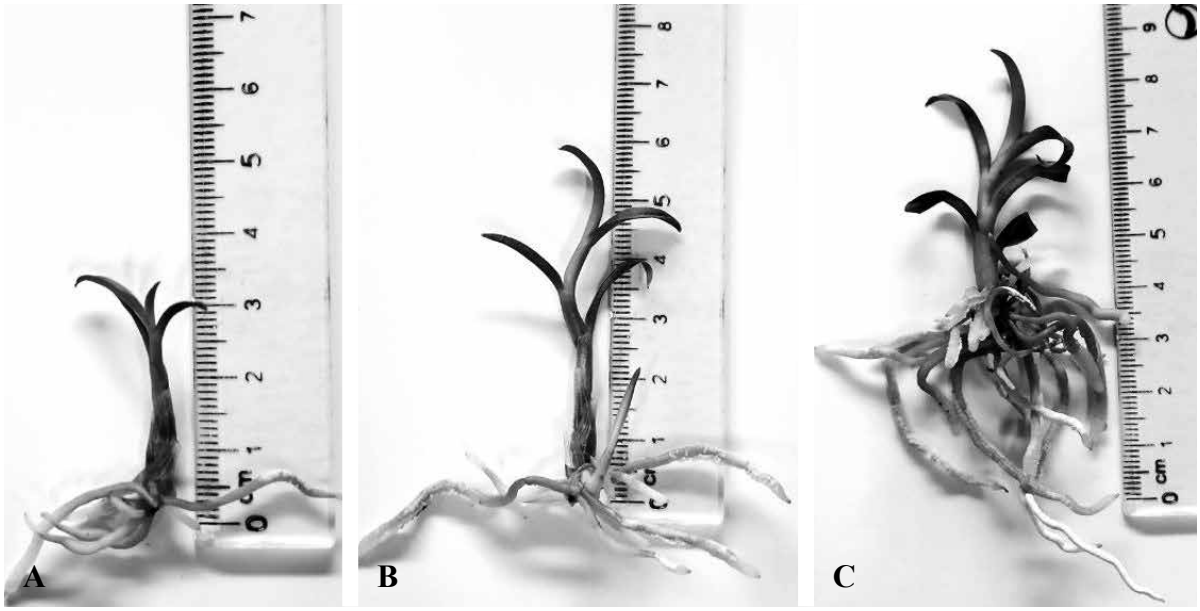


Fig. 3. Effect of auxins on rooting of *D. anosmum* 'Tim Hue' shoots. A) Control, B) Using 0.5 mg l^{-1} IAA, C) Using 0.7 mg l^{-1} NAA.

Table 5. Effect of media on the growth of *in vitro* plantlets of *D. anosmum* '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* Rchb. 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 researchers who suggested that rooting of *D. anosmum* and *D. thyrsiflorum* 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. anosmum* '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., Olfati 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:* Högberg 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* Rolfefrom 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 thyrsiflorum*. 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., Keawsaard 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-Temoxtle 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 THẤT 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 Chện, 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 Dựng, 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 CẤY 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 Chện, Dương Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thành Triết, Võ Trọng Tuân

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 ĐOÒNG, VƯỜN QUỐC GIA PHONG NHA - KẺ BÀNG, TỈNH QUẢNG BÌNH **115**

Bùi Văn Hướng, 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 CẤY IN-VITRO

Nguyễn Hữu Thọ[1,3], Nguyễn Thị Oanh[1], Trương Thị Bích Phượng[2], Nguyễn Thị Kim Cúc[1*]

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

[2]Trường 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 asomum 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 chuyền. 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-lx & 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 ấm 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 (Huyến, 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 thòng 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. asomum* 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 ± 2°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 này là ½ 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 ½ 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.

$$\text{Hệ số nhân chồi (lần)} = \frac{\textit{số chồi sau 6 tuần nuôi cấy}}{\textit{số chồi ban đầu}}$$ (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 (Ducan'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, Ducan'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 96º 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 96º 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 hành 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 này 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 tuỳ 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, Ducan'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 ½ 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. adastra*) đã dùng môi trường MS cho tất cả các thí nghiệm khảo sát và đều cho kết quả rất tốt, đối với giai đoạn gieo hạt có tỷ lệ nảy mầm lên đến 98,5 % khi môi trường có bổ sung thêm kích thích sinh trưởng BA (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.

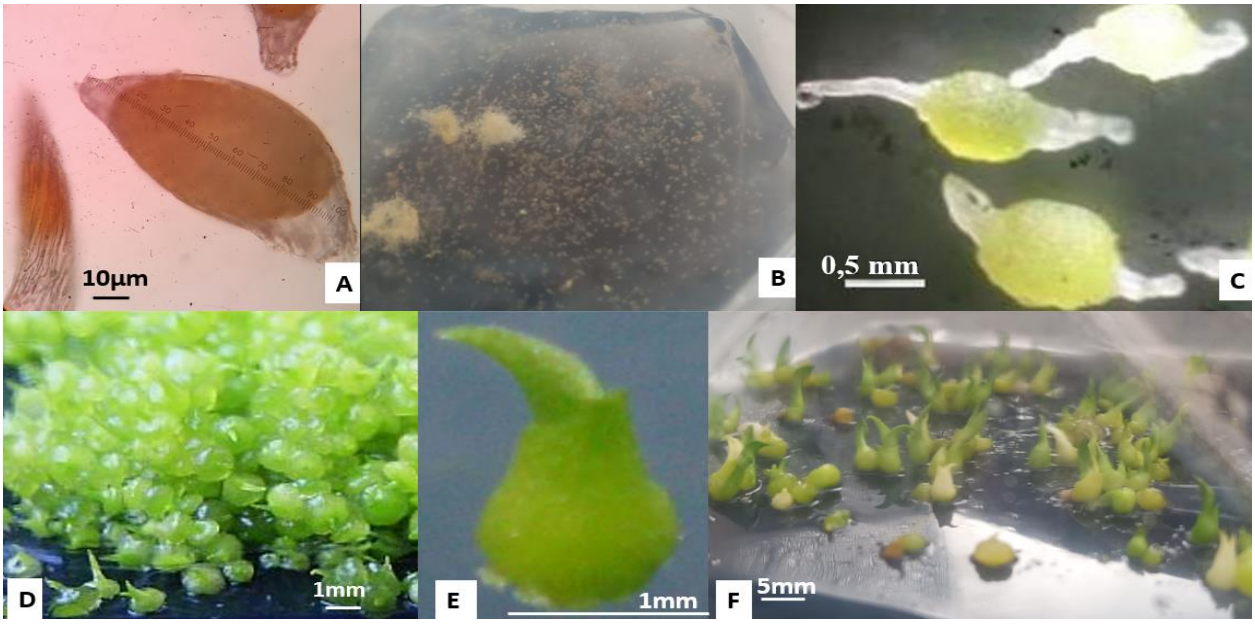
Bảng 3: Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan Giả hạc tím

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, Ducan'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 kì 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

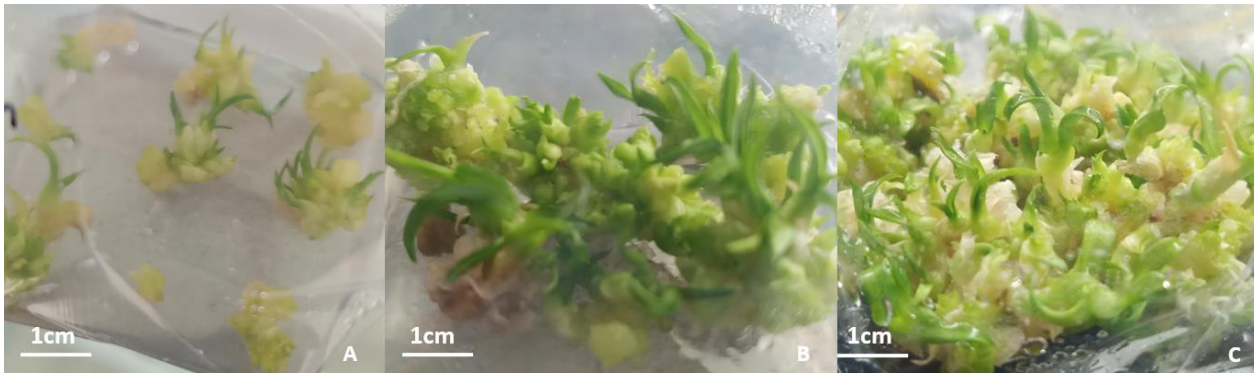
Những khối/cụm protocorm thu được từ thí nghiệm nuôi cấy khởi đầu được lựa chọn cấy sang môi trường tái sinh chồi. Môi trường dinh dưỡng được sử dụng là MS có bổ sung chất kích thích sinh trưởng BA và NAA. Kết quả tái sinh chồi từ protocorm của lan Giả hạc tím thu được sau 8 tuần nuôi cấy thể hiện qua 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 ± 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, Ducan'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 khoẻ. 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 + 0,5mg/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, Ducan'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.

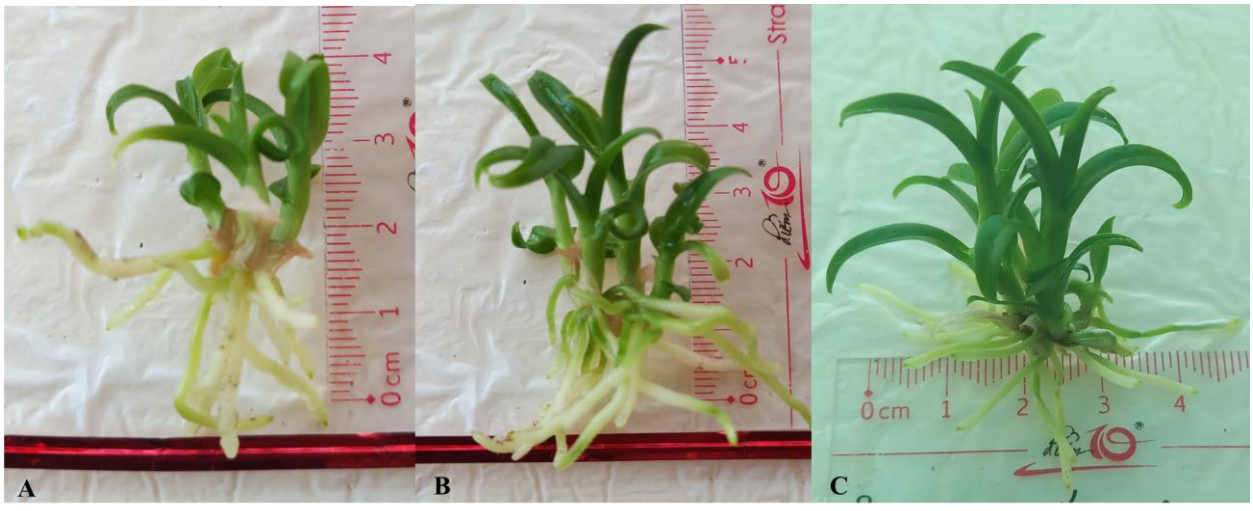
Bảng 6. Ảnh hưởng của kích thích sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi lan Giả hạc tím

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 ± 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, Ducan'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 khích 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 khích 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 96^0 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-lx, 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.Huyến, D. Đ. (2007). Tập 9 : Họ Lan - Orchidaceae Juss. Chi hoàng thảo - Dendrobium Sw. In D. Đ. Huyến (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-Arnao, M. T., & Thammasiri, K. (2020). Orchid Biology: Recent Trends & Challenges (S. M. Khasim, S. N. Hegde, M. T. González-Arnao, & 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 d*endrobium 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-vito 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 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 Oanh[1], Truong Thi Bich Phuong[2], Nguyen Thi Kim Cuc[1*]

[1]Institute of Biotechnology, Hue University.

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

[2]Hue University of Sciences, Hue University.

[3]College 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 asomum 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

ISBN: 978-604-357-275-9

SÁCH KHÔNG BÁN

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
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

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	*Dendrobium anosmum* 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 TRÂU ORGANIC NUTRI GREEN ĐẾN SINH TRƯỞNG, NĂNG SUẤT VÀ CHẤT LƯỢNG HẠT CÚC GAI (*Silybum marianum* (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 (*Dendrobium*) BẢN ĐỊA Ở PHÍA NAM VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ DNA (RAPD-PCR) Trịnh Thị Hương, Lê Đình Chắc	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 NHÃN (*Dimocarpus longan*) 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 THẾ GIỚI Ở VIỆT NAM Trương Quang Học, Hoàng Thị Thanh Nhàn , Hoàng Thị Ngọc Hà, Vũ Thục Hiền	953
100	*In vitro* PROPAGATION OF SWEET POTATO VARIETIES VC6, VC7 (*Ipomoea batatas* (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 Tuyet, 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 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) TẠI TỈNH THỪA THIÊN HUẾ Nguyễn Thị Quỳnh Trang, Phạm Thành, Hoàng Thị Kim Hồng	983

DOI: 10.15625/vap.2024.0094

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 Oanh[1], Truong Thi Bich Phuong[2], 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

[1]Institute of Biotechnology, Hue University
[2]Hue University – University of Sciences
[3]College 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 theses 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 (Ducan'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 ≤0.05.)

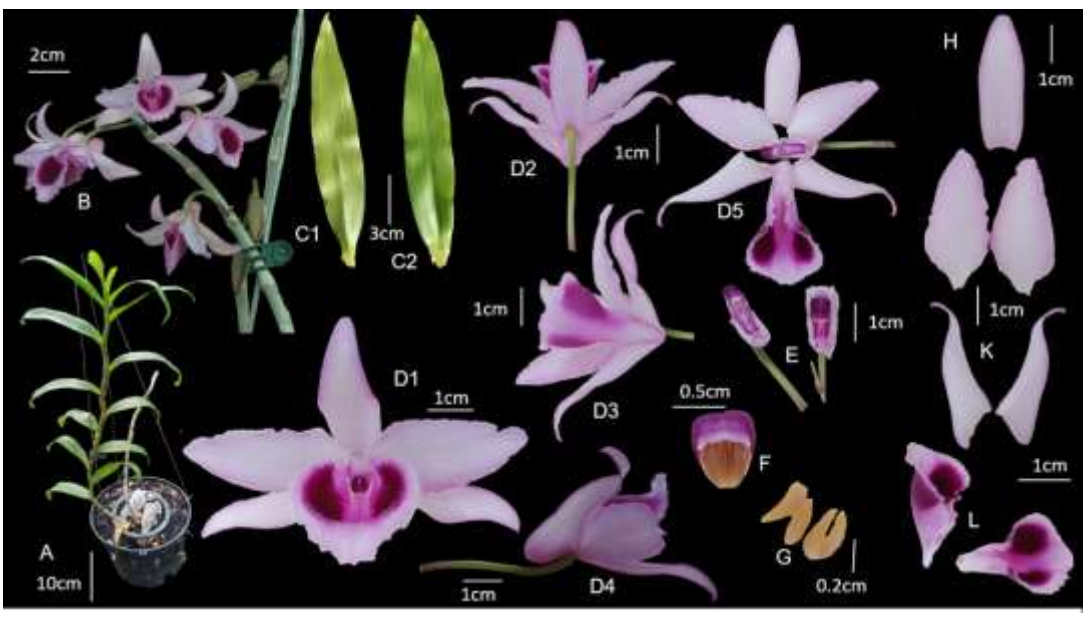


Fig 1. *Morphology of orchid D. anosmum 'tim hue'. A: Orchid; B. The location of the flower growing from the stem; C1,2: Upper and lower sides of leaves; D1,2,3,4,5: flower views (front, top, bottom, side and Spread flowers on a flat surface); E:* Column; *F: Anther and Pollinia; G: Pollinia; H: Upper 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 ≤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^{e}±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

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 Oanh[1], Trương Thị Bích Phượng[2], 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.

[1]Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế
[2]Trường Đại học Khoa học Huế, Đại học Huế
[3]Trường 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 Quyến, 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. Kỷ yếu hội nghị

660.6 - dc23

DUM0916p-CIP

Mã số sách: NC/505-2024

8. NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY HOA ĐÀO CHUÔNG (*Enkianthus quinqueflorus*) 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 (*Dendrobium anosmum* Lindl). **Nguyễn Hữu Thọ, Nguyễn Thị Oanh, Lã Thị Thu Hằng, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Kim Cúc** 467

10. DETERMINATION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR THE ENHANCEMENT IN SAPONINS EXTRACTION FROM ĐẢNG SÂM (*Codonopsis pilosula* Nannf.). **An D.X. Nguyen, Uyen P. Le, Nghi B.P. Nguyen, Phuc N.T. Le, Phu H. Le** 474

11. ĐỊNH DANH PHÂN TỬ VÀ NHÂN GIỐNG *in vitro* LAN KIẾM TIÊN VŨ (*Cymbidium finlaysonianum*). **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 *IN VITRO* CÂY CẨM CHƯỚNG NATALIE THÔNG QUA NUÔI CẤY ĐỈNH CHỒI. **Lê Văn Tường Huân** 487

13. ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CƯỜNG ĐỘ ÁNH SÁNG, NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG VÀ MẬT ĐỘ MẪU CẤY ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY HOA CHUÔNG (*Sinningia speciosa*) 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 Nhàn, Võ Thanh Phúc, Liêu Mỹ Đông, Đặng Thị Kim Thúy** 493

14. TÁI SINH CHỒI *IN VITRO* TỪ MẪU CẤY PHÁT HOA CỦA GIỐNG LAN HÀI PHẮC ĐỎ (*Phragmipedium Memoria* 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. *IN VITRO* 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 TƯ (*Exacum affine* Balf. F. Ex Regel) *IN VITRO* **Lê Nguyễn Lan Thanh, Trần Thị Sơn Tiền, 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 IN VITRO 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 *Lactobacillus* spp. ĐỐI KHÁNG VỚI LOÀI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* & *Aeromonas hydrophila* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA BỘT (*Pagasianodon hypophthalmus*). **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 *(Musa paradisiaca* 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 Oanh[1], Lã Thị Thu Hằng[3], Trương Thị Bích Phượng[2], Nguyễn Thị Kim Cúc[1*]

[1]Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh 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, Việt Nam

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

[4]Trường 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 (Huyến, 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 basesnhư vị trí N7 của guanin và vị trí N3 của adenin (Lawley, 1974), dẫn đến đột biến chuyển tiếp GC → AT (Singer, Grunberger, 1983). Đã có những nghiên cứu về tác động gây đột biến của DMS trên cây trồng như trên cây Dâu tây (Sekhi *et al*., 2022), DMS đã làm thay đổi một số đặc điểm sinh hoá trên cây Dâu tây như hàm lượng diệp lục, proline, enzyme…, trên cây Xà cừ (Mostafa, 2015), trên cây Huỳnh liên (Mostafa, Alhamd, 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^{o}C, áp suất 1 atm, trong 15 phút. Mẫu được giữ trong phòng nuôi ở nhiệt độ: 25 ± 2^{o}C, mật độ thông lượng photon quang hợp trong khoảng 13,5 - 27 µmol $s^{-1}m^{-2}$, 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

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, Ducan's test).

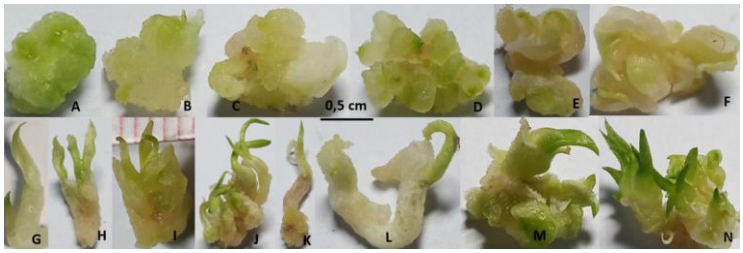
Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mô sẹo còn sống khi được xử lý bằng DMS cao nhất đạt được là 73,62% (CT1). Tỷ lệ mẫu có mầm chồi phát triển ở công thức này là 53,32%, tuy nhiên số mẫu có biểu hiện hình thái khác so với đối chứng lại thấp chỉ đạt 4,43%. Công thức xử lý bằng DMS với nồng độ xử lý 50 ppm trong 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).

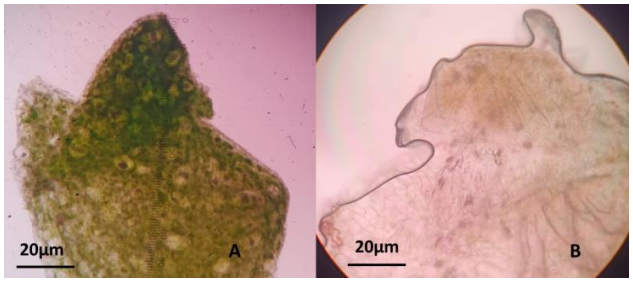


Hình 1. Một số hình dạng bất thường của mô sẹo và chồi sau khi xử lý DMS

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

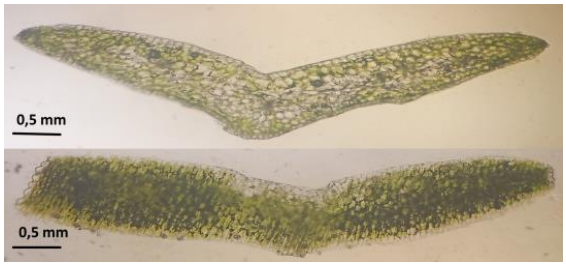
Thực hiện làm tiêu bản để quan sát đỉnh sinh trưởng, thân non, đầu rễ và biểu mô lá của các mẫu thí nghiệm. Đỉnh sinh trưởng ở mẫu đối chứng và xử lý DMS về hình thái đã có sự biến đổi khác nhau. Mẫu được xử lý DMS có đỉnh sinh trưởng hình dạng không ổn định, biến dạng nhiều vị trí, tế bào có xu hướng 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±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±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)

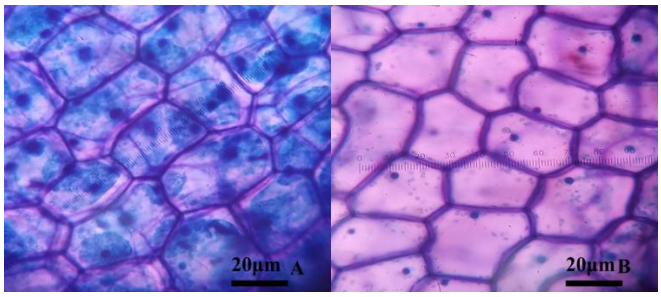
A: Lá đối chứng không xử lý hóa chất; B: Lá xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

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±0,21a	71,89±1,17a	28,62±1,14a	16,02±0,83a	3,84±0,20a	0,69±0,04b	252,47±10,90a	0,64±0,02a
DMS	19,33±0,13b	58,35±2,91b	27,60±1,25a	13,27±0,55b	2,95±0,12b	0,78±0,03a	247,13±10,16a	0,43±0,02b

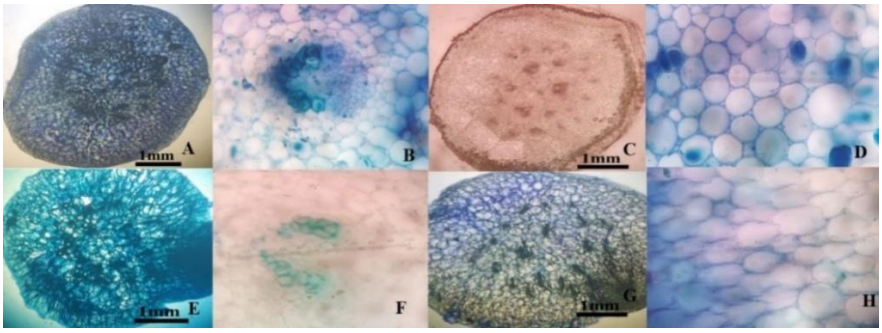
Các chữ cái khác nhau (a,b) trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p<0,05, Duncan's test.



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.

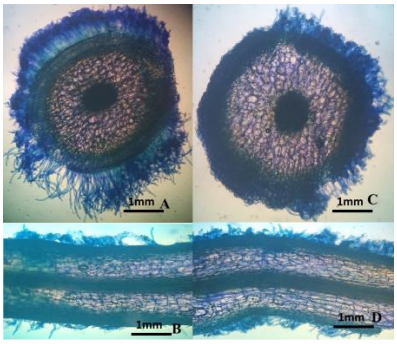
Giải phẫu phần thân non cho thấy rõ sự khác biệt giữa cây được xử lý DMS và cây đối chứng, số lượng bó mạch trong cấu trúc thân non của cây đối chứng trung bình 21,27±0,21 bó mạch/thân, dao động trong khoảng 20-22 bó mạch, sắp xếp thành nhiều vòng tròn từ ngoài vào trong đồng tâm, bó mạch tròn, kích thước tương đồng nhau và có đường kính 71,89±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±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±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 mạnh 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±10,90 lông hút/mm^2, chiều dài đạt 0,64±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±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±0,02 mm, ngắn hơn rất nhiều so với đối chứng (bảng 2, hình 6C, hình 6D).



Hình 6. Hình giải phẫu rễ lan Giả hạc tím Huế.

A, B: Mặt cắt ngang và dọc của rễ cây đối chứng;
C, D: Mặt cắt ngang và dọc của rễ cây xử lý DMS nồng độ 50 ppm trong 4 giờ.

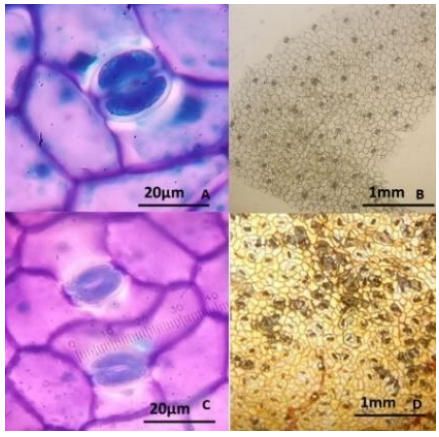
Đặc điểm tế bào khí khổng

Quan sát đặc điểm của khí khổng cho thấy chiều dài, chiều rộng, diện tích khí khổng và mật độ tế bào đạt lần lược 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±0,56a	13,33±0,56a	168,66±13,29a	235,80±4,30a
Cây xử lý DMS	14,84±0,56a	12,52±0,54a	148,82±11,47a	212,73±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 Giả hạc 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, mạnh 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 thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.TS.121 ".*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Huyến DĐ (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/ijpbg.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/ijpbg.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 Oanh[1], La Thi Thu Hang[3], Truong Thi Bich Phuong[2], Nguyen Thi Kim Cuc[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, Thua Thien Hue, Vietnam

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

[4]College 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 Tứ, 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

Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên
Tập 133, Số 1C, 179–191, 2024

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

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

Nguyễn Hữu Thọ[1,4], Trương Thị Bích Phượng[2], Hồ Thị Xuân Tuý[1], Phạm Thành[3], Nguyễn Thị Kim Cúc[1]*

[1] Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh 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 NH_3. 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 khoá: Bacillus, Burkholderia, IAA, Pseudomonas, vi khuẩn nội sinh

Isolation of endogenous bacteria from wild orchids

Nguyen Huu Tho[1,4], Truong Thi Bich Phuong[2], Ho Thi Xuan Tuy[1], Pham Thanh[3], Nguyen Thi Kim Cuc[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 NH_3. 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 mạnh 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

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

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), $Ca_3(PO_4)_2$ (5 g), $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 g), KCl (0,2 g), $MgSO_4.7H_2O$ (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; $MgSO_4.7H_2O$: 0,05 g/L; $CaCO_3$: 0,02 g/L; $FeSO_4.7H_2O$: 0,01 g/L; NaCl: 2 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

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

Môi trường Ashby xác định khả năng cố định đạm của vi sinh vật gồm có Glucose (nguồn carbon): 20 g/L; K_2HPO_4: 0,2 g/L; NaCl: 0,2 g/L; $MgSO_4.7H_2O$: 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 trãi 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 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 µL 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 Phốt pho 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

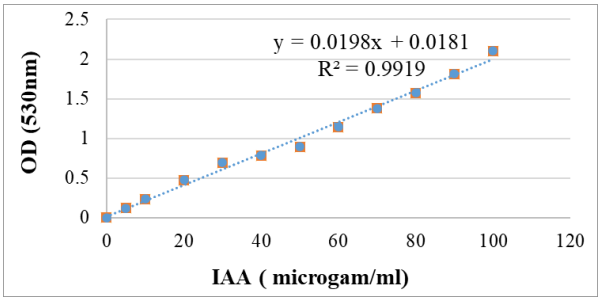
Xác định khả năng sinh NH_3 của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập bằng phương pháp định tính của Cappuccino & Sherman [28,29]. Các dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi trong ống 10 mL nước peptone, nuôi lắc 150 vòng/phút, trong 48-72h ở 28 ± 2°C. Sau đó cho 0,5 mL thuốc thử Nessler (K_2HgI_4) 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

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

đỏ thì 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.

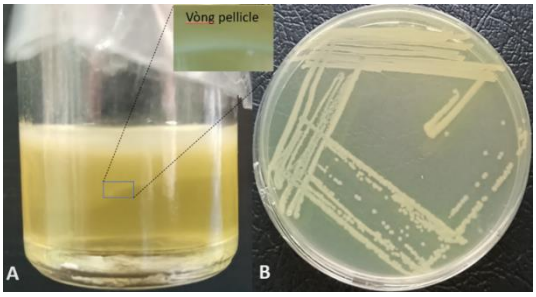
Phương pháp xử lý số liệu

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 Ducan'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].



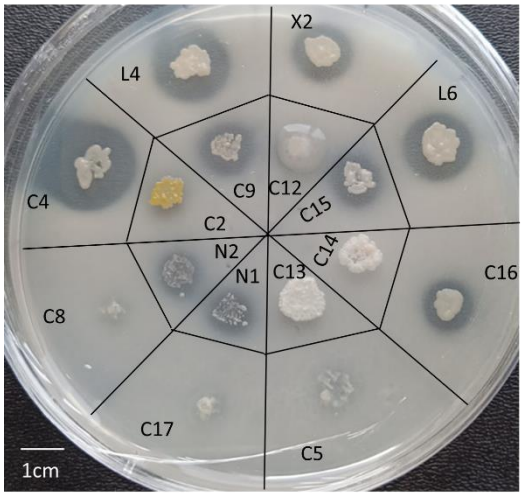
Hình 2. Phân lập và tạo dòng thuần khiết các vi khuẩn nội sinh. (A: phân lập vi khuẩn nội sinh trong môi trường bán lỏng NA; B: Tạo dòng thuần khiết)

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

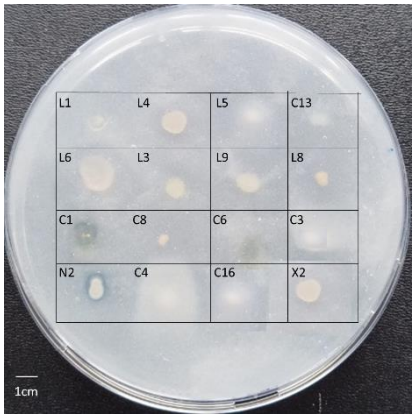
Trong nghiên cứu này, với 30 chủng đã phân lập và xác định được 18 chủng có khả năng phân giải lân, đây là hoạt tính hòa tan tri-canxi photphat (TCP) có trong môi trường Pikovaskya. Tuy nhiên khả năng phân giải lân ở mỗi chủng là khác nhau, mức độ đánh giá thông qua vòng sáng phân giải sau 72 h nuôi. 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

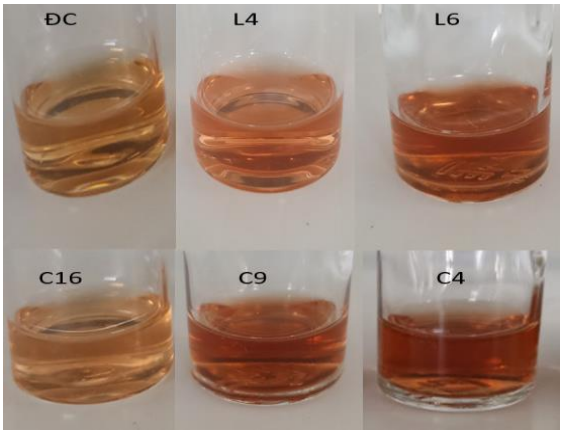
Kết quả xác định khả năng tổng hợp IAA cho thấy trong số 30 chủng được phân lập có 15 chủng có khả năng sinh IAA, dựa vào mức độ đậm nhạt của màu sắc thay đổi có thể xác định những chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp IAA cao hay thấp (Bảng 1, 2). Thí nghiệm cũng xác định 4 chủng L4, L6, C9, C4 là có 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

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

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 NH_3 của các chủng đã phân lập trình bày ở hình 6, trong số 30 chủng có được 18 chủng có khả năng sinh NH_3. 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 NH_3, màu càng nâu đậm thì hàm lượng càng cao. Phản ứng thí nghiệm theo phương trình phản ứng:

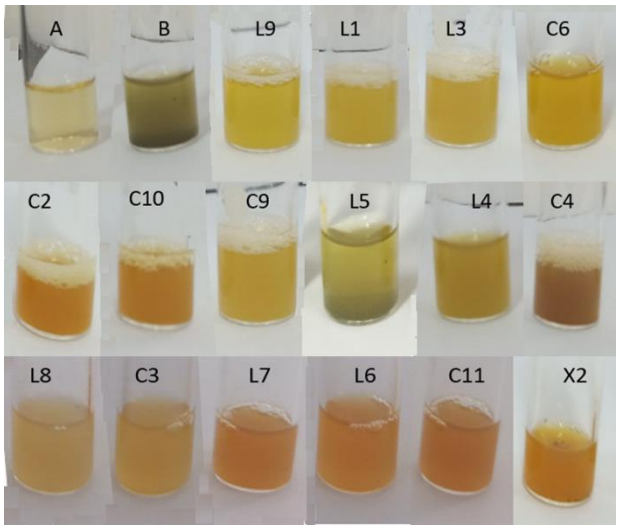
$2K_2HgI_4 + NH_3 + 3KOH \rightarrow Hg(HgIONH_2) + 7KI + 2H_2O$

(màu vàng)

$2K_2HgI_4 + NH_3 + KOH \rightarrow Hg(HgI_3ONH_2) + 5KI + H_2O$

(màu nâu)

Thí nghiệm cũng lựa chọn được 6 chủng có màu đậm nhất cho khả năng sinh NH_3 đó là chủng L4, L6, L7, C4, C11, X2 (Hình 6, bảng 1).



Hình 6. Thử nghiệm khả năng sinh NH_3 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 NH_3

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					
				Phân giải lân			Sinh NH_3	Ø khuẩn lạc trên MT Ashby (mm)	Hàm lượng IAA sinh ra (µg/ml)
	Màu sắc	Mép	Bề mặt	Ø vòng sáng phân giải và khuẩn lạc(mm)	Ø khuẩn lạc (mm)	Ø vòng sáng phân giải lân (mm)			
L1	Vàng	Lượn sóng	Trơn bóng	15	11	4	+	2	0,00
L2	Trắng đục	Lượn sóng	Trơn bóng	13	10	3	-	-	0,00
L3	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	16	8	8	+	11	0,00
L4	**Trắng sữa**	**Tròn đều**	**Khô ráp**	**20**	**5**	**15**	**+++**	**16**	**34,10**
L5	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	14	7	7	+	6	0,00
L6	**Trắng trong**	**Tròn đều**	**Trơn nhầy**	**19**	**6**	**13**	**+++**	**16**	**38,44**
L7	Vàng nhạt	Tròn đều	Trơn nhầy	16	5	11	+++	-	11,68
L8	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	17	8	9	++	7	0,00
L9	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	17	6	11	+	10	13,19
C1	Trắng trong	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	0,00
C2	Vàng	Lượn sóng	Trơn nhầy	4	4	0	+	5	6.58
C3	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	7	5	2	+	9	26,83
C4	**Trắng trong**	**Tròn đều**	**Trơn nhầy**	**21**	**6**	**15**	**+++**	**15**	**41,47**
C5	Trắng đục	Lượn sóng	Khô ráp	10	10	0	-	-	16,22
C6	Trắng trong	Lượn sóng	Trơn nhầy	6	6	0	++	-	0,00
C7	Vàng nhạt	Tròn đều	Trơn nhầy	3	3	0	-	-	11,73
C8	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	7	7	0	-	6	7,33
C9	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	16	10	6	+	-	36,98
C10	Vàng nhạt	Tròn đều	Khô ráp	2	2	0	+	8	0,00
C11	Vàng	Tròn đều	Trơn nhầy	15	6	9	+++	4	0,00
C12	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	6	6	0	-	-	7,13
C13	Trắng sữa	Lượn sóng	Trơn bóng	4	4	0	-	4	0,00

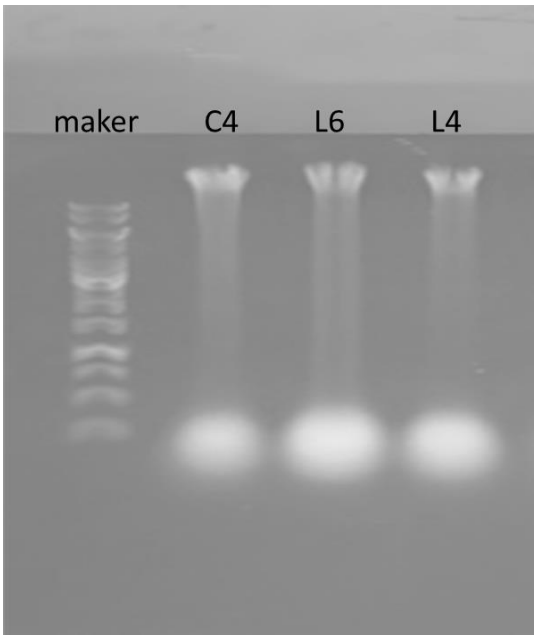
pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc tính hoá sinh					
				Phân giải lân					
	Màu sắc	Mép	Bề mặt	Ø vòng sáng phân giải và khuẩn lạc(mm)	Ø khuẩn lạc (mm)	Ø vòng sáng phân giải lân (mm)	Sinh NH_3	Ø khuẩn lạc trên MT Ashby (mm)	Hàm lượng IAA sinh ra (µg/ml)
C14	Trắng sữa	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	17,48
C15	Trắng sữa	Lượn sóng	Trơn nhầy	8	4	4	-	6	0,00
C16	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	10	6	4	+	6	4,61
C17	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	4	4	0	-	-	0,00
N1	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	5	2	3	-	3	22,89
N2	Trắng trong	Tròn đều	Trơn nhầy	5	3	2	+	8	0,00
X1	Cam	Lượn sóng	Trơn nhầy	5	5	0	-	2	0,00
X2	Trắng hồng	Lượn sóng	Trơn bóng	18	7	11	+++	13	0,00

Chú thích: +: có hoạt tính; ++: hoạt tính tốt; +++: hoạt tính rất tốt
-: không có hoạt tính; Ø: đường kính

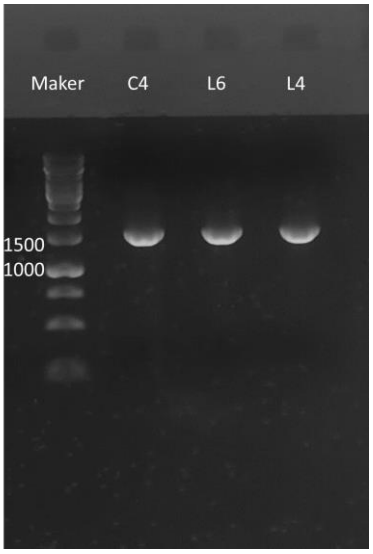
3.3 Kết quả định loại phân tử các chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập

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 NH_3, 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.

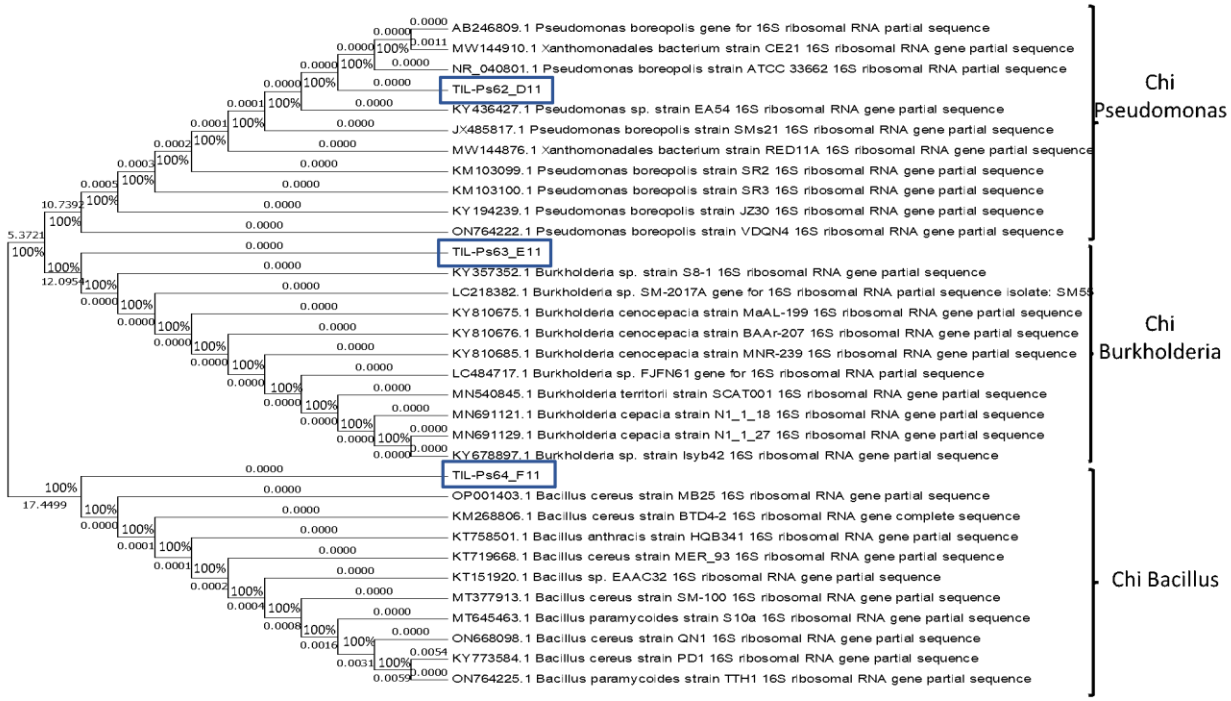


Hình 7. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn đã phân lập. Maker: Generuler 1kb DNA ladder (Thermofisher)

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

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

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 khuận 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 NH_3. 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, Christapher 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. Mikrobiologiia. 2001;70:567-573.
20. Schmidt KL, Peterson ND, Kustusch 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. Lynh 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 thuỷ,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 CĐ. 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.

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

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 NĐ, 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.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) (2026) 165:36
https://doi.org/10.1007/s11240-026-03456-5

ORIGINAL ARTICLE

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 Hoang[2] · Tuy Ho Thi Xuan[3] · Cuc Nguyen Thi Kim[1] · Phuong Truong Thi Bich[2]

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

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

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

Published online: 20 April 2026

(*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 µm) 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 × 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 × 3 NAA treatments × 3 replicates × 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 – chla, chlorophyll b – chlb, and carotenoids) were determined using the following equations, which were mentioned in a previous study (Hưng et al. 2022).

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

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

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

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 µmol/m^2s 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

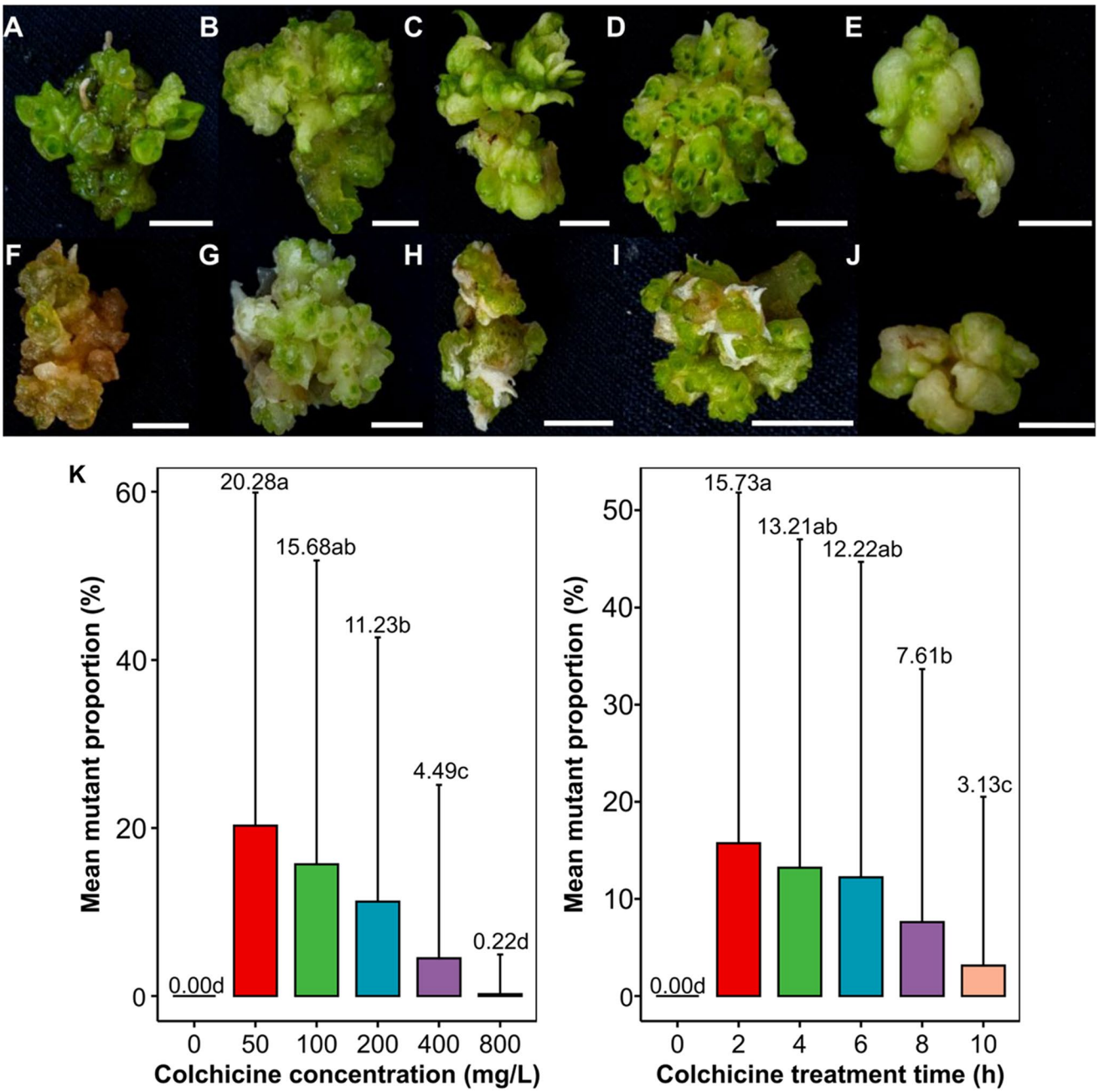


Fig. 1 Phenotypic observations of untreated (**A**) and colchicine-treated (**B-J**) calli and optimization of colchicine treatment for *D. anosmum* polyploidization (**K**). Callus growth and vitality decreased following exposure to colchicine for 2 h at increasing concentration gradients: 50 (**B**), 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

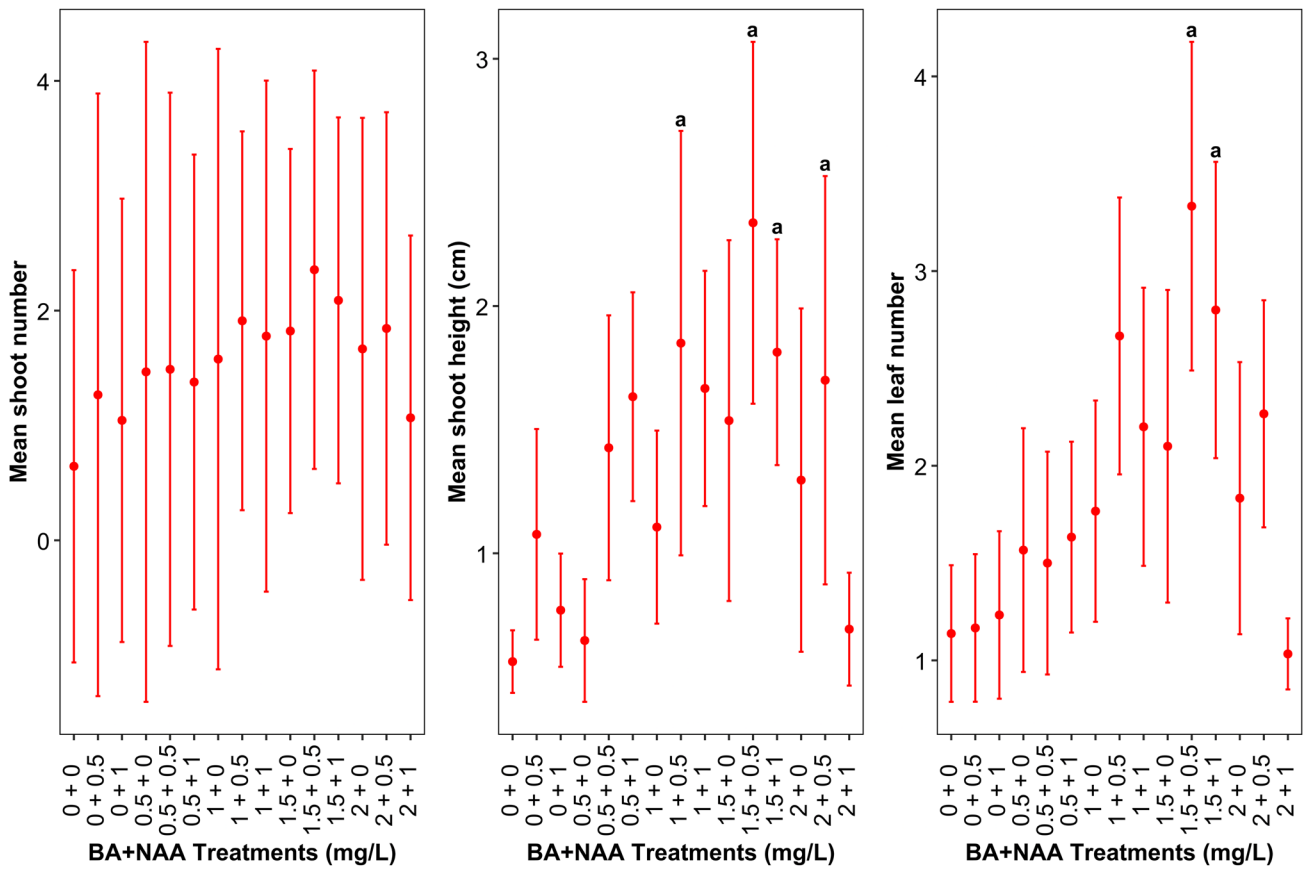


Fig. 2 Optimization of BA-NAA concentrations for shoot multiplication of *D. anosmum* callus treated with colchicine. Data points represent mean values, and error bars indicate standard deviations (mean ± SD). Means sharing the same letters are not significantly different ($p > 0.05$)

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 µm and 2.47 µm, 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

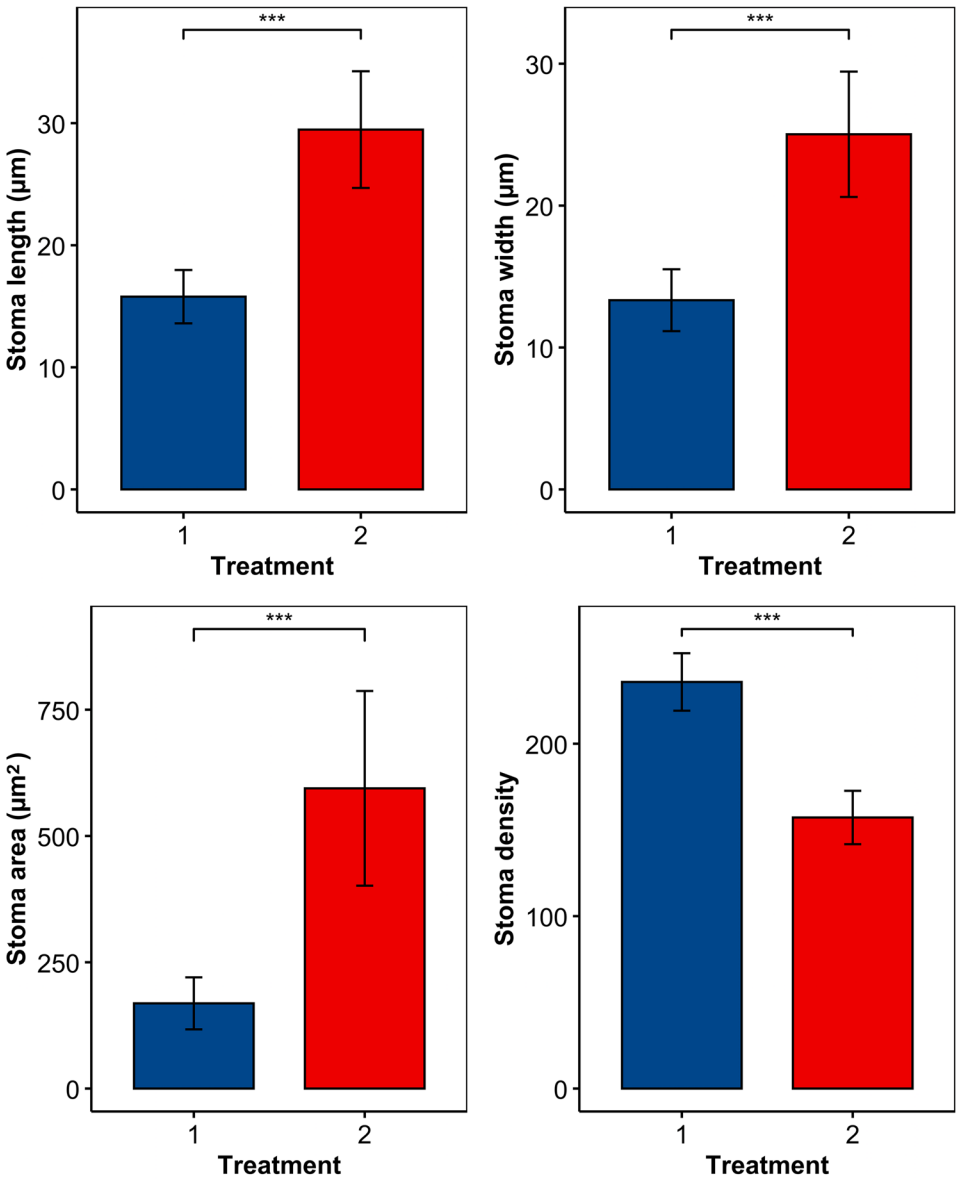


Fig. 5 Observations of stomatal features in colchicine-untreated (1) and colchicine-treated (2) shoots. The values are presented as means ± standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences between the groups (*** $p < 0.001$)

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).

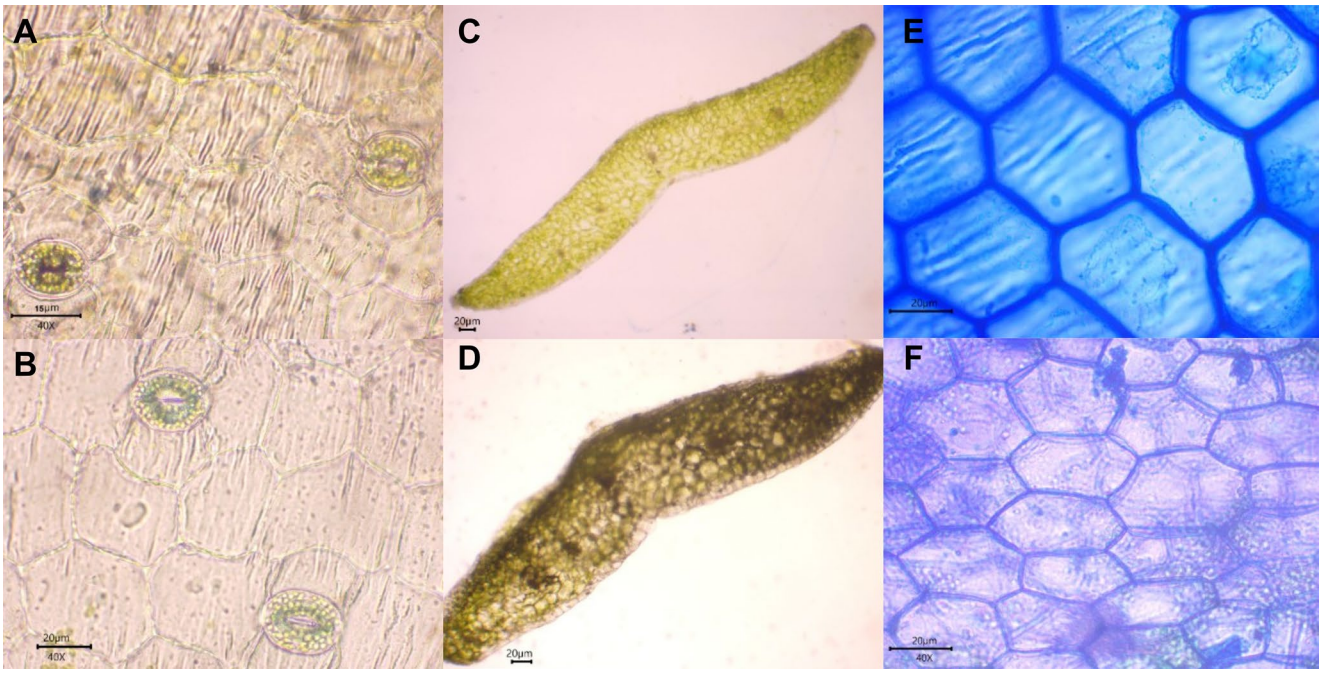


Fig. 6 Observations of microscopic leaf anatomical features, including stomatal size (**A, B**), leaf blade thickness (**C, D**), and leaf epidermal cell dimensions (**E, F**), were conducted for the control (**A, C, E**) and for shoots or plantlets regenerated from colchicine-treated calli (**B, D,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

Karyotying

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

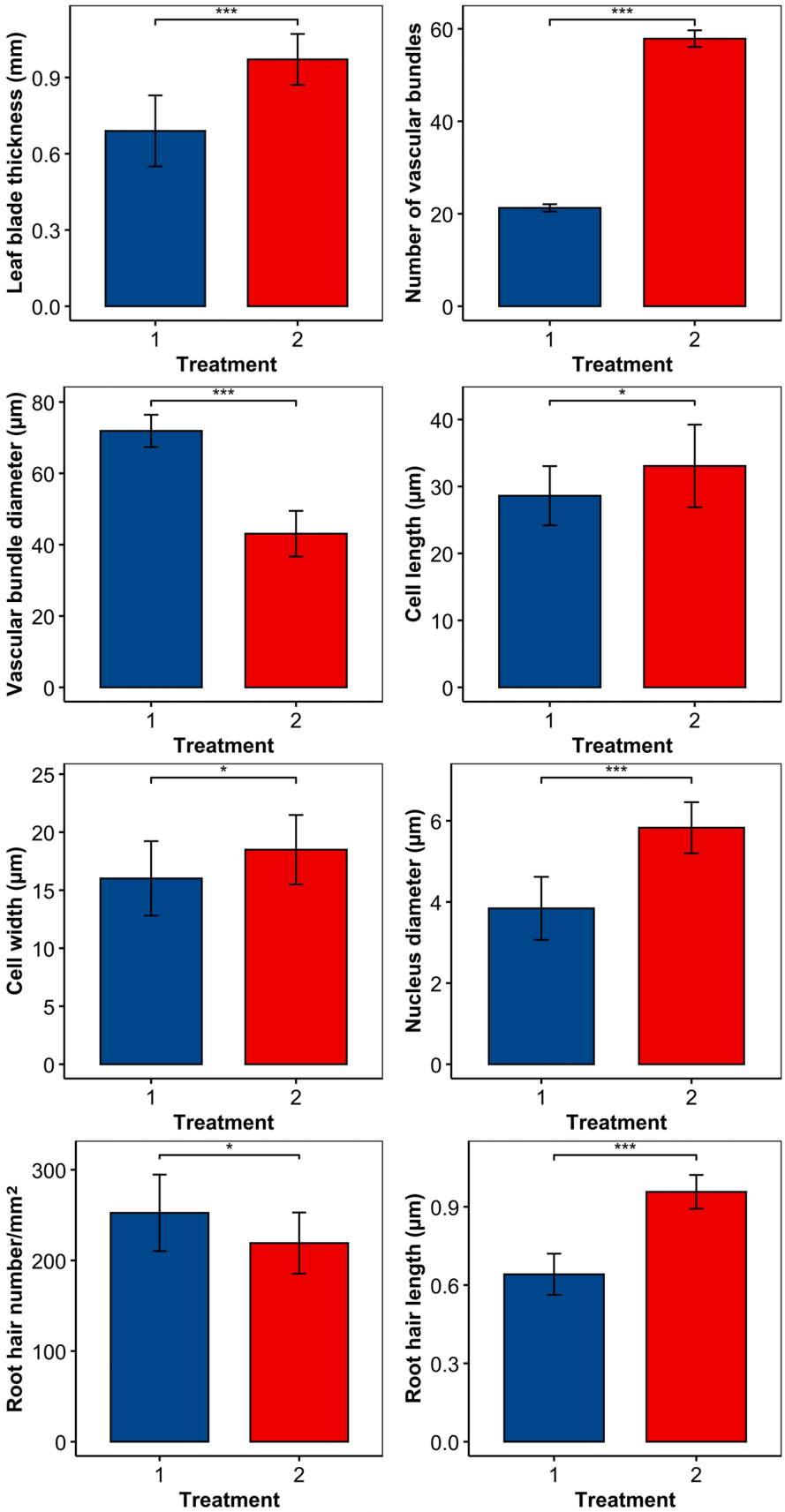


Fig. 7 Observations of various microscopic anatomical features in colchicine-untreated (1) and colchicine-treated (2) shoots. The values are presented as means ± standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences between the groups (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

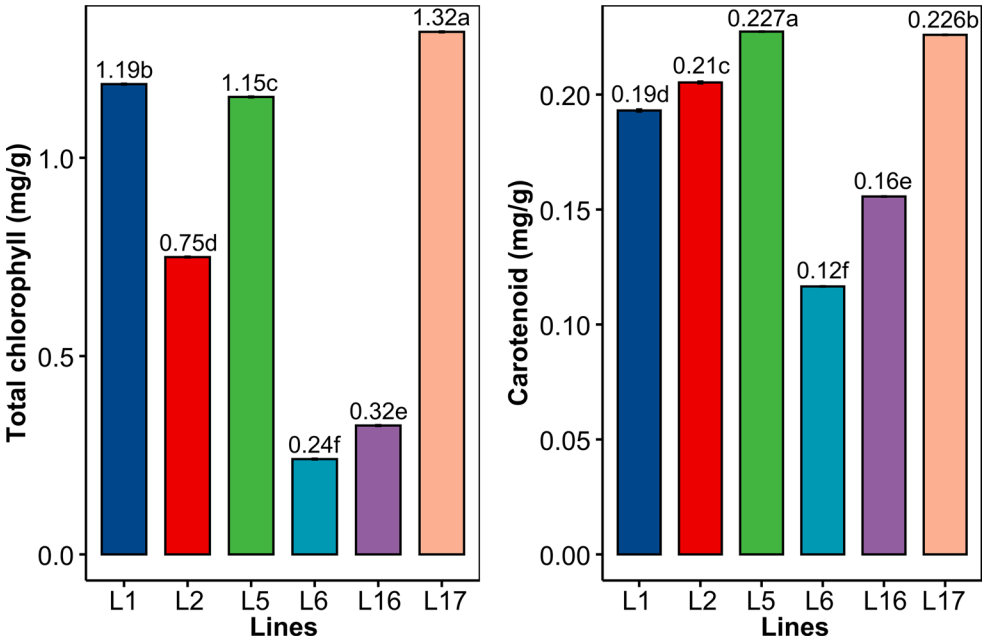


Fig. 8 Quantification of photosynthetic pigment contents in control (L1) and candidate polyploid (L2, L5, L6, L16, and L17) lines. Different letters show significant differences among the represented mean values ($p < 0.05$)

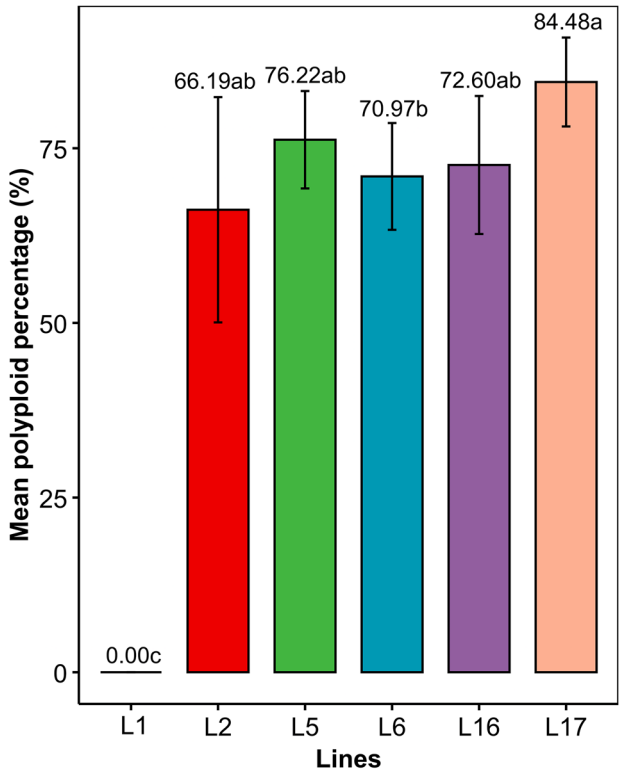


Fig. 9 Comparisons of polyploid percentages determined by karyotyping among five candidate polyploid (L2 to L17) and control (L1) lines. The values are means ± standard deviation. Means with a letter in common are not significantly different according to Games-Howell's test ($p > 0.05$)

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

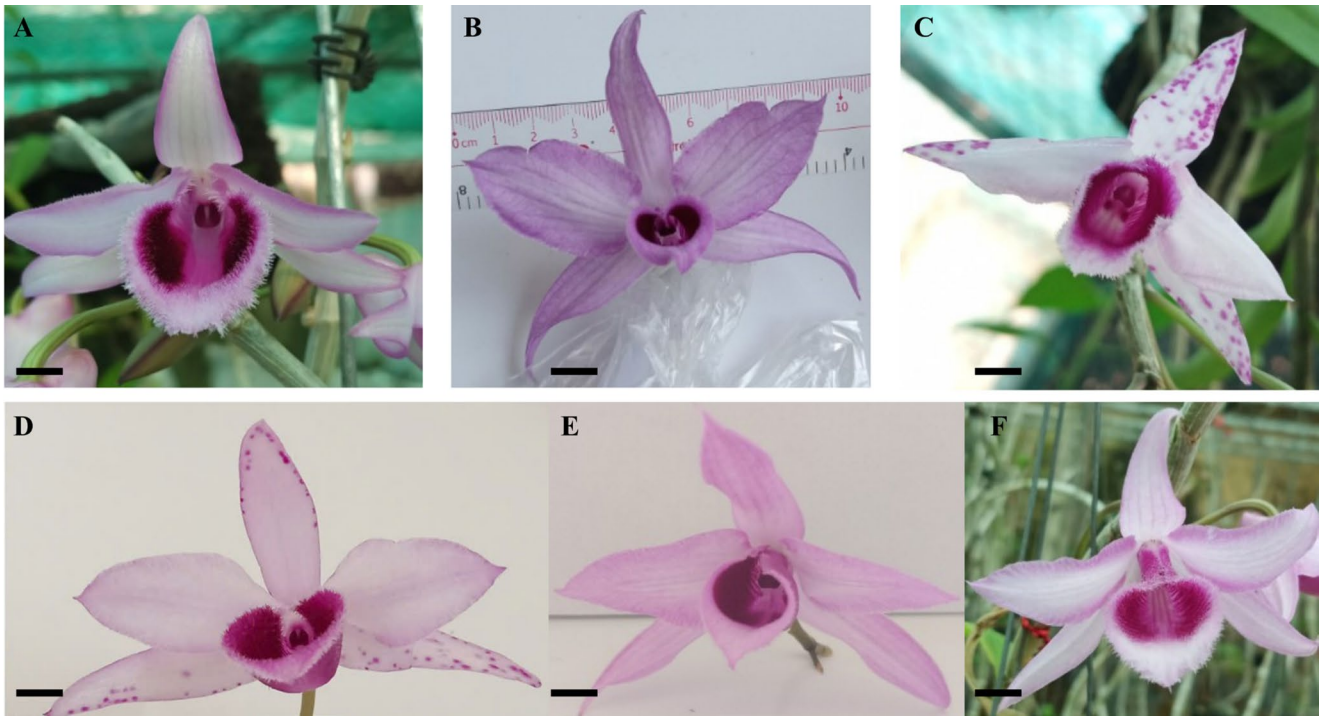


Fig. 10 Flower color observations from acclimatized plants of the control (**A**) and candidate polyploid lines, including L2 (**B**), L5 (**C**), L6 (**D**), L16 (**E**), and L17 (**F**). Scale bars: 10 mm

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-Norreel 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/10.3102/1076998600100 2113

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

Hưng 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, Khrustaleva 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* 'Donghong'. 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 Ornam 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, Tantiviwat S, Nanakorn M (2010) Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Eur J Hortic 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/S0103-84782000000100017

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 Hortic 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.