

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

Ngành: Sinh học
Mã số: 9420101

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2026

Công trình được hoàn thành tại: Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Thị Kim Cúc
PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng

Phản biện 1:

.....
.....
.....

Phản biện 2:

.....
.....
.....

Phản biện 3:

.....
.....
.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế, họp tại cơ quan Đại học Huế, vào hồi 11 giờ 30 ngày 27 tháng 2 năm 2026

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện quốc gia Việt Nam.
2. Trung tâm học liệu Đại học Huế.
3. Thư viện Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế.

MỞ ĐẦU

Mỗi vùng miền của Việt Nam có một vài dòng/giống lan Giả hạc đặc trưng có sự khác biệt về hình thái thân, lá, mặt hoa và thời điểm nở. Thừa Thiên Huế là dải đất nằm giữa hai miền Bắc Nam, có hệ thực vật phong phú trong đó có cả một số giống lan Giả hạc, điển hình là giống 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 sắp 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. 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.

Vì vậy để góp phần phát triển giống 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

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

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

- Bổ sung vào khoá phân loại loài lan Giả hạc tím Huế (*D. anosmum Lindl.*) những đặc điểm đặc trưng để nhận dạng. - Hoàn thiện quy trình nhân giống lan Giả hạc tím Huế bằng phương pháp 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 - Ứng dụng tạo chế phẩm vi sinh từ vi sinh vật nội sinh để chăm sóc cây lan con. - Kết quả nghiên cứu còn tạo ra nguồn cây giống lan Giả hạc tím Huế góp phần bảo tồn và phát triển.

Những điểm mới của luận án

- Đây là nghiên cứu đầu tiên mô tả chi tiết các đặc điểm nhận dạng của lan Giả hạc tím Huế. - Lần đầu tiên 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.

- CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

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*) bao gồm 1600 loài lan biểu sinh. Các chi này có đặc điểm là 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 [113]. Theo hệ thống phân loại APG III năm 2009 [75] thì lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum* Lindl.) thuộc ngành: *Magnoliophyta*, lớp: *Liliopsida*, bộ: *Asparagales*, họ: *Orchidaceae*, Chi: *Dendrobium*.



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

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

- Thân: thân giả hành, - Lá: lá có hình thoi thuôn dài, mọc cách so le, - Hoa: tập hợp thành chùm hoặc đơn lẻ, - Mùi hương: hoa lan Giả hạc luôn có mùi hương, dịu nhẹ, thơm ngát, - Thời điểm ra hoa: hoa thường nở rộ vào thời điểm cuối xuân - đầu hè. Quả lan thuộc loại quả nang, quả có dạng thuôn dài, - Rễ: rễ lan Giả hạc nhỏ có đường kính 1 - 1,5 mm, bám dính.

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

2.1. Nhân giống truyền thống

2.2 Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc

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

- Các yếu tố ảnh hưởng đến cây con sinh trưởng ở vườn là ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, nước, giá thể trồng.

4. Vi sinh vật nội sinh thực vật

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, từ đó ứng dụng vào làm các chế phẩm vi sinh.

5. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến

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. [166]. 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),... [123]. Trong số đó colchicine là hoá chất được dùng phổ biến nhất trong tạo đột biến đa bội ở thực vật [101]. 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, [122].

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

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 [78].

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

Trên thế giới, hoa lan được giới nhà khoa học quan tâm từ rất sớm bắt đầu từ trong thế chiến thứ II [131]. Để đáp ứng nhu cầu chơi lan 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], [37]. 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 [252], hoặc từ hạt của lan *D. anosmum* Lindl. ở Quảng Trị [51], hay ở An Giang [11].

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

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian 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. Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 5/2021 đến tháng 5/2024.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Quả lan đã chín sinh lý và những đoạn thân có chứa chồi ngủ. Vật liệu ban đầu sử dụng cho các thí nghiệm xử lý hoá chất đột biến là mô sẹo sơ cấp và protocorm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

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

2.3.1.1 Nhận dạng và thu thập mẫu nghiên cứu

Theo phương pháp mô tả đặc điểm hình thái hoa lan của De (2020) [93].

Định loại: Sử dụng phương pháp hình thái so sánh và định danh phân tử.

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

a. Vào mẫu Lan Giả hạc tím Huế

Thí nghiệm 1: Gieo hạt in-vitro

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).

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

Quá trình khử trùng được thực hiện trong tủ cấy bằng (Bảng 2.2).

Bảng 2.2. 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 ₂ O 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 và chất điều hòa sinh trưởng đến các giai đoạn nuôi cấy mô lan Giả hạc tím Huế

- Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo protocorm/mô sẹo từ lan Giả hạc tím Huế

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

Cụ thể dùng các môi trường: thử nghiệm với các loại môi trường MS, 1/2 MS, VW, Hyp, Knusond C, các môi trường có bổ sung thêm một số chất tùy vào từng công thức thí nghiệm.

c. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm/mô sẹo từ lan Giả hạc tím Huế

Thí nghiệm được bố trí theo các công thức bảng 2.3 và 2.4.

Bảng 2.3. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hình thành protocorm.

Công thức	NAA (mg/L)	BAP (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

Bảng 2.4. 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

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

Công thức nghiên cứu được thể hiện qua bảng 2.5.

Bảng 2.5. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của 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			

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

Công thức thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.6.

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

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

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

Công thức thí nghiệm cho ra rễ được thể hiện ở bảng 2.7.

Bảng 2.7. Công thức nghiên cứu ảnh hưởng của 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 Giả hạc tím Huế được thực hiện theo các bước như mô tả ở phụ lục 4.

2.3.2.1. Phương pháp gây đột biến lan Giả hạc tím Huế bằng colchicine và dimethyl sulphate

Mẫu được ngâm trực tiếp vào môi trường có chứa hoá chất, các công thức thí nghiệm thể hiện qua bảng 2.8. và bảng 2.9

Bảng 2.8. Công thức nghiên cứu xử lý đột biến bằng colchicine trên protocorm/mô sẹo

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

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

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

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

Các công thức thí nghiệm được bố trí giống các bảng 2.5; 2.6; 2.7

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

-*Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái của cây đột biến (Thân, rễ, lá, hoa);*-*Phương pháp nghiên cứu đặc điểm tế bào của các dòng đột biến;*-*Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hoá sinh của cây đột biến*

-*Phương pháp nghiên cứu đa dạng di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử RAPD*

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

Thực hiện theo công thức thí nghiệm tốt nhất ở bảng 2.4; 2.5 và bảng 2.6; 27 dùng cho chồi đột biến.

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

- *Nghiên cứu giá thể phù hợp để ra bầu cây con;* - *Nghiên cứu điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, độ sáng) ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây con ra vườn.;*- *Nghiên cứu ảnh hưởng của vi sinh vật nội sinh tới sinh trưởng của dòng lan Giả hạc tím Huế đột biến;* - *Xây dựng quy trình nhân giống và huấn luyện cây con in-vitro Giả hạc tím Huế*

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

2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu

- Số liệu xử lý bằng SPSS và Office excel 2019, NTSYSpc v2.1, BioEdit 7.0.5.3., MEGA X, ImageJ 1.8.0.

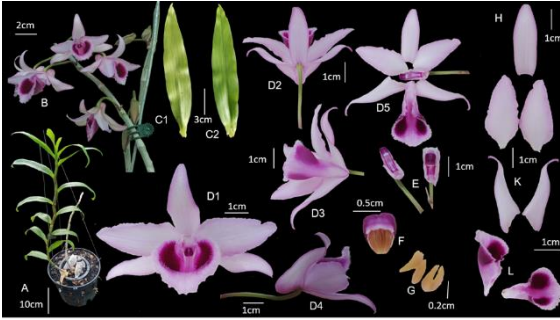
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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 hình thái*

Đặc điểm mô tả hình thái như thân, rễ, lá, hoa của giống lan Giả hạc tím Huế (2 năm tuổi trở lên) thu thập tại một số nhà vườn ở khu vực TP.Huế chúng tôi đã xây dựng bảng đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế được trình bày ở bảng 3.1, hình 3.1.



Hình 3.1. Đặc điểm hình thái của lan Giả hạc tím Huế (*Dendrobium anosmum* Lindl.)
- Nhận diện chỉ thị phân tử

Dựa trên 4 vùng gene (gồm *ITS*; *trnL*; *matK* và *rbcL*) chúng tôi đã xác định được tên khoa học của loài lan Giả hạc tím Huế là loài *D. anosmum* và được chúng tôi đặt tên là *Dendrobium anosmum* voucher GHTH (*D. anosmum* voucher GHTH).

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

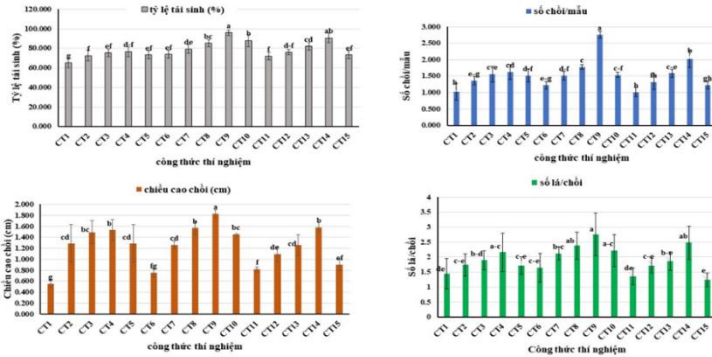
3.1.2.1 Nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế từ hạt

Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

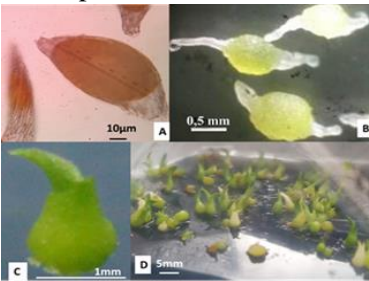
Bảng 3.1: Điều kiện tối ưu cho nhân giống *in-vitro* lan Giả hạc tím Huế từ hạt

T T	Giai đoạn nhân giống		Điều kiện tối ưu	Kết quả thử nghiệm
	1	Vào mẫu hạt	Khử trùng mẫu	Khử trùng quả bằng cồn 96° và đốt qua ngọn lửa đèn cồn, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày.
		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 +	- Ở CT1 (MS): Thời gian này 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 %.

		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



Hình 3.3. Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau 8 tuần nuôi cấy



Hình 3.2. Các giai đoạn phát triển của hạt lan Giả hạc tím Huế được gieo trên môi trường MS + 0,75 mg/L NAA+ 0,5 mg/L BA, được chiếu sáng 8 giờ/ngày.

(A. hạt lan mới lấy ra khỏi quả; B. Hạt lan gieo được 15 ngày; C. Hạt lan gieo được 25 ngày; D. Hạt lan gieo được 35 ngày.)

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

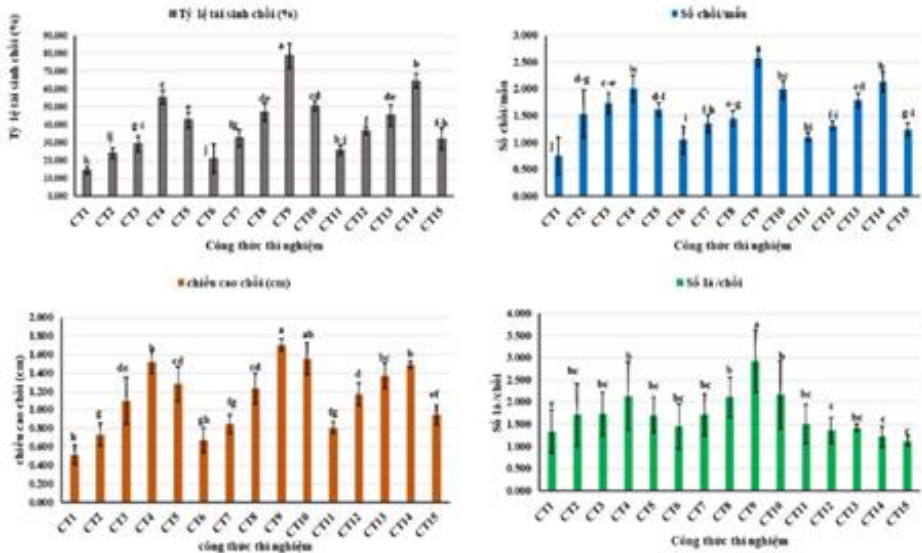
Kết quả được trình bày ở bảng 3.2.

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

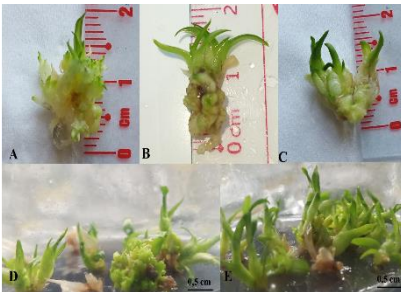
T	Giai đoạn nhân giống	Điều kiện tối ưu	Kết quả thử nghiệm
---	----------------------	------------------	--------------------

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 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.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở biểu đồ hình 3.6 sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 3.5: Biểu đồ ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo lan Giã hạt tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của lan Giã hạt tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy. (A. Đối chứng, môi trường không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng; B. Môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA; C. Môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA; D. Chồi trong bì môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA; E. Chồi trong bì môi trường có bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA.)

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

Kết quả thu được sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của BA và IAA đến khả năng nhân chồi lan Giã hạt tím Huế sau 8 tuần nuôi cấy.

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	0,0	$1,13 \pm 0,1^e$	$1,23 \pm 0,1^d$	$0,23 \pm 0,01^c$	$2,00 \pm 0,2^c$	nhỏ yếu, màu xanh hơi vàng.
1,5	0,0	$2,33 \pm 0,3^d$	$1,74 \pm 0,1^c$	$0,29 \pm 0,04^c$	$2,00 \pm 0,2^c$	nhỏ, màu xanh nhạt.
1,5	0,1	$3,33 \pm 0,3^c$	$2,10 \pm 0,1^b$	$0,36 \pm 0,04^b$	$3,67 \pm 0,2^b$	trung bình, màu xanh nhạt.
1,5	0,3	$4,30 \pm 0,3^b$	$2,04 \pm 0,1^b$	$0,38 \pm 0,02^b$	$4,32 \pm 0,3^a$	mập, cao, màu xanh đậm.
1,5	0,5	$6,00 \pm 0,3^a$	$3,03 \pm 0,1^a$	$0,51 \pm 0,08^a$	$4,70 \pm 0,2^a$	mập, cao, màu xanh đậm.
1,5	0,7	$3,67 \pm 0,3^{bc}$	$2,13 \pm 0,1^b$	$0,35 \pm 0,04^b$	$3,67 \pm 0,2^b$	trung bình, màu xanh nhạt.

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

Khả năng ra rễ của lan Giả hạc tím Huế rất tốt đạt 100%. Trên môi trường bổ sung NAA, cho nồng độ 0,7 mg/L NAA hiệu quả ra rễ tốt nhất.

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* và *Dimethyl sulphate*

3.2.1.1 Gây đột biến trên protocorm lan Giả hạc tím Huế

Sau thời gian 4 tuần nuôi dưỡng trong môi trường dinh dưỡng các thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của protocorm giảm dần khi nồng độ hoá chất và thời gian xử lý tăng lên. Tỷ lệ mẫu sống cao nhất sau khi xử lý hoá chất là ở CT1 với nồng độ là 50 ppm, xử lý trong 2 giờ (Bảng 3.14).

Thời điểm 8 tuần sau xử lý hoá chất, kết quả quan sát có sự khác biệt so với thời điểm 4 tuần. Hình thái của mẫu khác với đối chứng xuất hiện ngay công thức thí nghiệm CT1 với nồng độ xử lý 50 ppm và thời gian xử lý 2 giờ ở cả hai loại hoá chất colchicine là 16,22% và DMS là 7,83% (CT1, Bảng 3.15) .

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

Kết quả 4 tuần nuôi cấy sau khi mô sẹo được xử lý hoá chất cho thấy tỷ lệ sống của mô sẹo đạt cao nhất 57,78% (CT1) khi xử lý bằng colchicine so với đối chứng là 96,67%. Thí nghiệm xử lý bằng DMS có tỷ lệ sống cao nhất đạt 83,17% khi xử lý với nồng độ 50 ppm và trong thời gian 2 giờ (CT1).

Giai đoạn 8 tuần sau khi xử lý, CT1 xử lý bằng 50 ppm colchicine trong 2 giờ cho tỷ lệ mẫu sống 50% . Tỷ lệ mô sẹo còn sống khi được xử lý bằng 50 ppm DMS trong 2 giờ và nuôi cấy sau 8 tuần cao nhất đạt được là 73,62% (Bảng 3.17).

3.2.2 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi của protocorm và mô sẹo đã xử lý hoá chất

3.2.2.1 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm sau khi xử lý hoá chất

Khả năng tạo chồi của protocorm xử lý đã colchicine ở nghiệm thức đối chứng khi không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng BA và NAA bổ sung vào môi trường cụ thể với tỷ lệ tạo chồi 66,78 %. Kết quả tái sinh chồi tốt nhất của protocorm xử lý bằng colchicine được ghi nhận ở CT7 khi môi trường bổ sung 1 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA. Khả năng tái sinh chồi tốt nhất của protocorm xử lý DMS là khi bổ sung kết hợp BA và NAA với nồng độ 0,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA .

3.2.2.2 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo sau khi xử lý hoá chất

Khả năng tái sinh chồi của mô sẹo xử lý bằng colchicine ở công thức đối chứng (ĐC) khi không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng có được tỷ lệ hình thành chồi 12,44%. Công thức đạt kết quả tốt nhất là môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA. Khả năng tái sinh chồi tốt nhất của mô sẹo xử lý DMS được ghi nhận khi môi trường có bổ sung kết hợp 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA.

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

Khả năng nhân chồi của chồi xử lý colchicine ghi nhận kết quả tốt nhất khi môi trường được bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L IAA với hệ số nhân đạt được 4,47 lần (CT4).

Chồi được xử lý bằng DMS có khả năng nhân nhanh chồi ở môi trường được bổ sung thêm 1,5 mg/L BAP có khả năng nhân nhanh tốt với hệ số nhân chồi 1,93 lần.

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

Kết quả được trình bày ở bảng 3.18, bảng 3.19.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi đột biến xử lý bằng colchicine sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ NAA (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi					Đặc điểm của rễ và chồi
		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài của rễ (cm)	Chiều cao của cây (cm)	Số lá/cây	
ĐC	0	87,29±1,41 ^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	+

+: 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.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi đột biến xử lý bằng DMS sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ NAA (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi					Đặc điểm của rễ và chồi
		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài của rễ (cm)	Chiều cao của chồi	Số lá/chồi	
ĐC	0,0	73,63±1,08 ^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	++

+: 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.

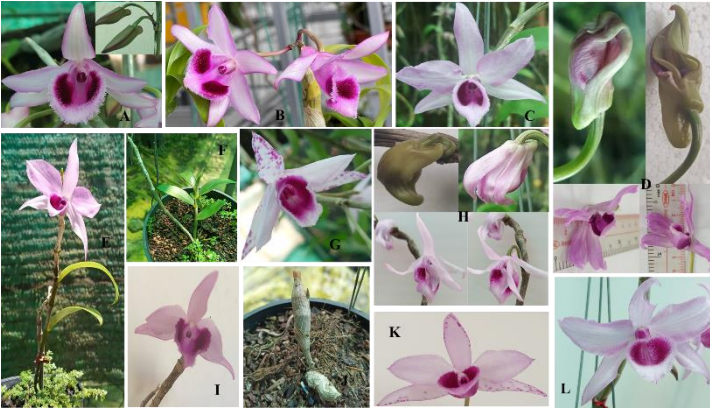
++++: rễ nhiều, dài to mập, rễ có màu trắng xanh, cây lá xanh đậm, lá dày, dài.

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

3.3.1. Đặc điểm hình thái của cây đột biến

Hình thái biến dị sai khác so với đối chứng xuất hiện sớm nhất ở giai đoạn protocorm và mô sẹo sau khi xử lý hoá chất được 6-8 tuần. 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 của protocorm được xử lý bằng colchicine lớn hơn so với protocorm xử lý bằng DMS và đối chứng (Hình 3.19).

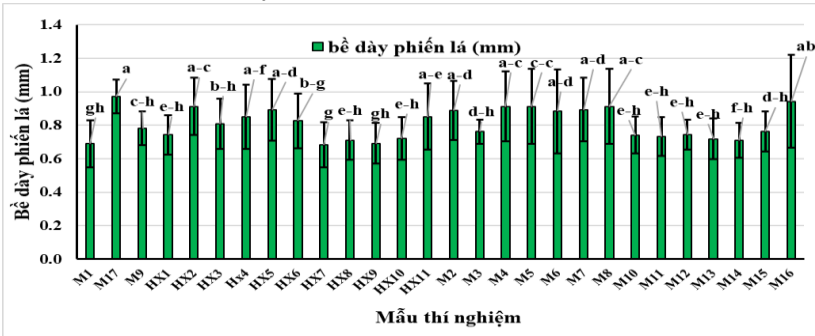
Tương tự như protocorm thì mô sẹo sau khi được xử lý bằng colchicine và DMS sau thời gian nuôi cấy 3- 4 tuần cũng xuất hiện các hình thái khác với đối chứng. (Hình 3.20).



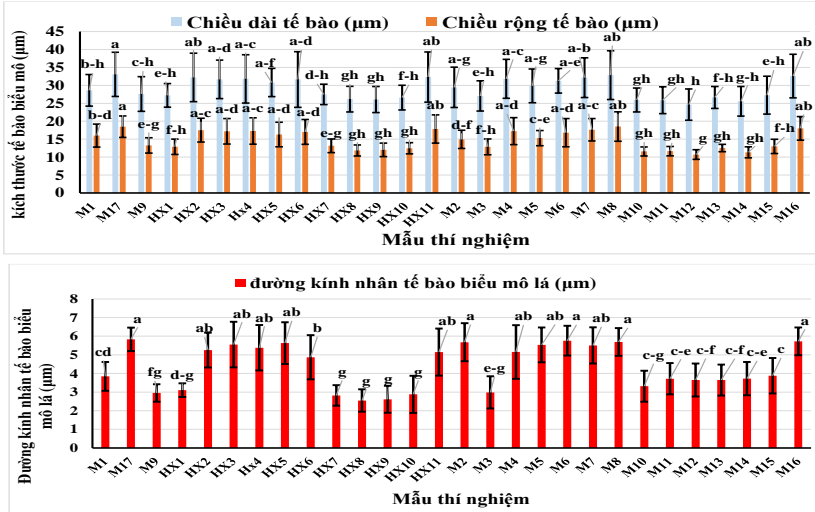
Hình 3.20. Hình thái biến dị mặt hoa của một số dòng đột biến.

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

3.3.2. Đặc điểm tế bào cây đột biến

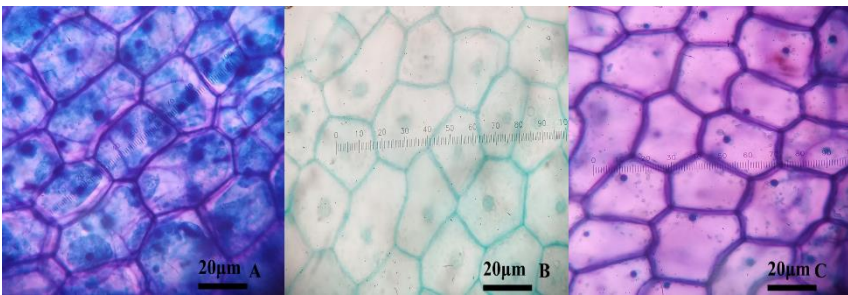


Hình 3.24: Biểu đồ bề dày của phiến lá lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy tái sinh chồi.



Hình 3.25: Biểu đồ kích thước (chiều dài, chiều rộng) và đường kính nhân của tế bào biểu mô lá

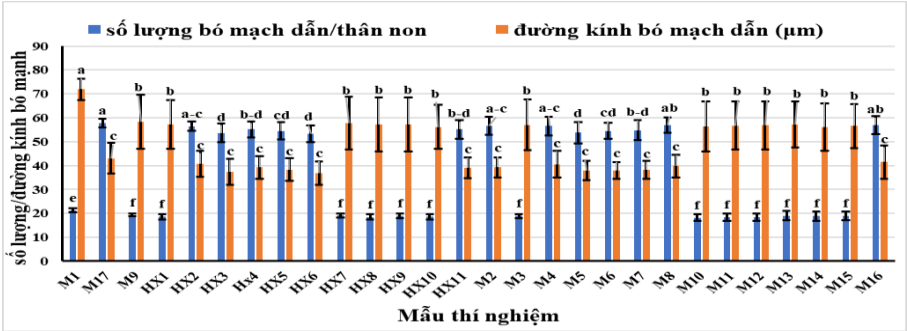
Các đặc điểm tế bào ở mẫu đối chứng, mẫu xử lý colchicine và mẫu xử lý DMS về hình thái, kích thước, số lượng, trật tự sắp xếp đều có sự biến đổi khác nhau (hình 3.25). Kết quả này cho thấy hoá chất colchicine và DMS đã có tác động đến cấu trúc mô, tế bào dẫn đến các thay đổi về hình dạng, trật tự sắp xếp và kích thước tế bào



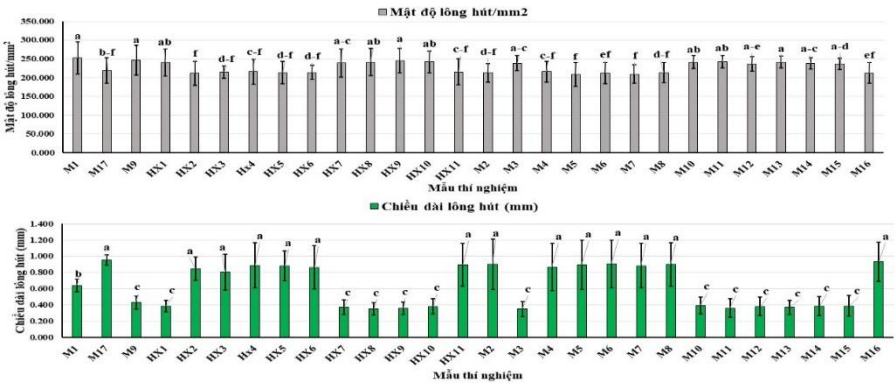
Hình 3.26. Tế bào biểu mô mặt dưới của lá lan Giả hạc tím Huế.

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

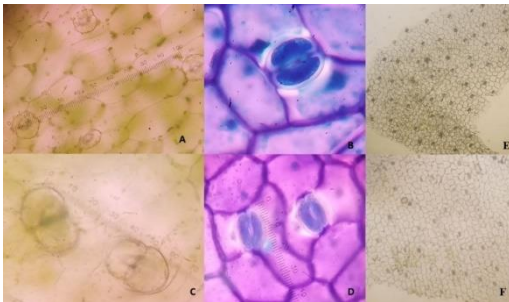
ppm trong 4 giờ (M9).)



Hình 3.27: Biểu đồ số lượng bó mạch và đường kính bó mạch dẫn trong thân non của lan Giả hạc tím Huế.



Hình 3.30: Biểu đồ thể hiện mật độ và chiều dài lông hút rễ lan Giả hạc tím Huế

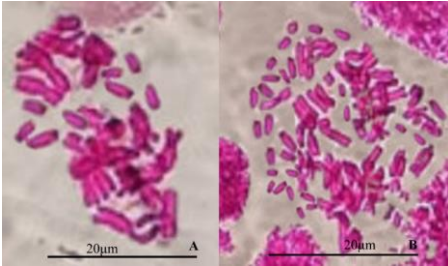


Hình 3.31. Hình thái khí khổng của lan Giả hạc tím Huế sau 3 tháng nuôi cấy chồi. **A, B:** Khí khổng ở lá cây đối chứng (40x); **C:** Khí khổng ở lá cây xử lý colchicine (40x); **D:** Khí khổng ở lá cây xử lý DMS (40x); **E:** Số lượng khí khổng ở lá đối

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

Phân tích 27 mẫu lá của cây có xử lý hoá chất đột biến cho kết quả hàm lượng Chl và caroten đều cao nhất hơn so với cây đối chứng.

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



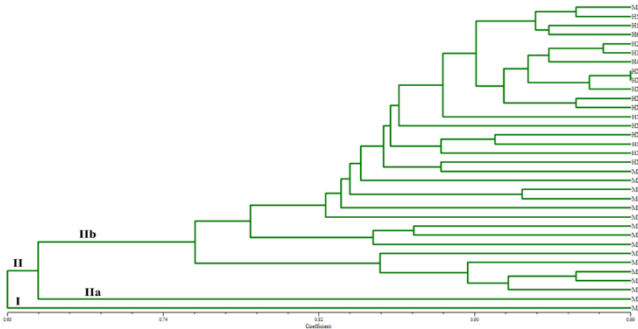
Hình 3.33. Bộ nhiễm sắc thể lan Gia Hạc tím Huế quan sát dưới kính hiển vi (100x). **A:** Bộ NST cây đối chứng $2n=38$; **B:** Bộ NST cây xử lý bằng colchicine, tứ bội $4n=76$ (M17).

3.3.3 Phân tích đa dạng di truyền

Kết quả chúng tôi chọn được 10 môi ngẫu nhiên RAPD (Bảng 3.22) để thực hiện phân tích đa dạng di truyền cho 34 mẫu lan được chọn lọc.

Bảng 3.22. Kết quả khuếch đại PCR dựa trên mỗi môi RAPD của 34 mẫu lan Gia Hạc tím Huế

TT	Môi	Tỷ lệ cá thể khuếch đại PCR thành công (%)	Số band DNA hình thành/môi	Số band DNA đa hình	Kích thước của band DNA (bp)	Tỷ lệ band DNA đa hình (%)
1	P6	100	8	8	650-1600	100,00
2	P9	100	9	9	450-1200	100,00
3	P16	100	5	4	450-800	80,00
4	P17	100	9	6	350-1450	66,67
5	P18	100	6	4	400-1100	66,67
6	OPA-03	100	6	3	750-1250	50,00
7	OPF-01	100	7	6	600-1050	85,71
8	OPF-05	100	5	3	600-900	60,00
9	OPO-04	100	9	6	500-1100	66,67
10	OPBH-16	100	6	4	500-800	66,67
Tổng số band DNA		-	70	53	-	-
Số band DNA trung bình/môi môi		100	7	5,3	-	75,71



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

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

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

Kết quả dòng M17 cho kết quả tốt nhất tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là 82,00%.

Bảng 3.24. 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

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

Kết quả tái sinh chồi từ mô sẹo của mẫu M17 và HX3 là tốt nhất với tỷ lệ 94,67% và 89,33%.

3.4.3. Nhân nhanh chồi của các dòng đột biến

Khả năng nhân chồi của chồi đột biến M17 là cao nhất với hệ số nhân chồi có được 7,53 lần.

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

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

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

-Quy trình được thể hiện qua 5 bước và sơ đồ hoá của 5 bước.

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

-Giá thể phù hợp để ra bầu cây con là xơ dừa: than trâu (1 : 1), w : w) và bảng dương xỉ có phủ rêu.

-Kết quả tốt nhất là dòng M17 với tỷ lệ sống đạt 56,60%.

-Hiệu quả cao nhất khi tỷ lệ che nắng 50%, cụ thể tỷ lệ sống đạt 56,67%.

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%.

-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.

-Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ pha trộn sinh khối vi sinh vật nội sinh và hỗn hợp dung dịch dinh dưỡng thích hợp và hiệu quả nhất là 1 : 50. 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%.

- Quy trình được trình bày qua 7 bước và được sơ đồ hoá.

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 từ Colchicine và 13 dòng từ DMS.

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

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

2. Đề nghị

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

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

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

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyen Huu Tho**, Nguyen Thi Oanh, Truong Thi Bich Phuong, Pham Thanh, Hoang Khanh Linh, and 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, and 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 Túy, Phạm Thành, Nguyễn Thị Kim Cúc (2024). Nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng. 2024. Tạp chí Đại học Huế, Tập 133, số 1C, 179-191.
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>