

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH  
\*\*\*\*\***

**NGUYỄN VĂN VINH**

**NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG LAN *DENDROBIUM* THẤP CÂY  
TRIỂN VỌNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI HỮU TÍNH  
KẾT HỢP CHIẾU XẠ VÀ NUÔI CÂY *IN VITRO***

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH NÔNG NGHIỆP**

**TP.HCM - 2019**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học mà tôi đã tiến hành và tổ chức thực hiện. Các số liệu và kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa được công bố bởi tác giả khác.

Tác giả luận án

**Nguyễn Văn Vinh**

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học và Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Tp.Hồ Chí Minh.

Tôi biết ơn sâu sắc và kính trọng đến: hai Thầy hướng dẫn PGS.TS. Bùi Văn Lệ và TS. Bùi Minh Trí đã tận tâm dạy bảo, truyền đạt những kiến thức quý báu và luôn đồng hành trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án. Cảm ơn Thầy Cô trong Hội đồng khoa học: TS. Võ Thái Dân đã hỗ trợ, cung cấp tài liệu khoa học, truyền đạt kiến thức, góp ý để tôi hoàn chỉnh luận án; PGS.TS. Phạm Thị Minh Tâm đã tận tình chia sẻ, giúp đỡ đồng viên tôi trong lúc khó khăn, truyền đạt những kiến thức quý báu và góp ý để hoàn chỉnh luận án; PGS.TS. Nguyễn Văn Kế đã tận tình góp ý chi tiết các nội dung học tập, nghiên cứu và nội dung của luận án, đã truyền đạt những kiến thức quý báu để tôi hoàn thành luận án này.

Cảm ơn Ban giám đốc Trung tâm Khuyến nông TP.HCM, anh Phạm Đức Dũng, chị Vũ Thị Nhâm, em Nguyễn Thị Tuyết Nhung, anh Nguyễn Hòa và đặc biệt là sự tận tụy của anh Huỳnh Lâm Thời và chị Phan Thị Thao đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Sở Khoa học và Công nghệ TP.HCM đã hỗ trợ kinh phí cho tôi thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học có liên quan đến luận án.

Cảm ơn các học viên cao học Tôn Thị Thúy, Phan Thị Hồng Ngọc, Nguyễn Quỳnh Như Anh đã cần mẫn, nhiệt huyết đồng hành trong các thí nghiệm; các em Nguyễn Thị Vân Anh, Lê Bá Lộc và các em Phạm Thị Phương Thảo, Huỳnh Ánh Quyên, Bùi Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thùy Dương, Phạm Thị Lệ Huyền, Nguyễn Thị Liêm, Đinh Phúc Sang, Huỳnh Thị Ngọc Linh đã có những đóng góp, khích lệ cho tôi trong quá trình thực hiện các nghiên cứu. Đề tài không thể hoàn thành nếu không có sự đóng góp từ các em, tôi chân thành cảm ơn vì điều đó.

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

TP.HCM, ngày tháng năm 2019  
Tác giả

Nguyễn Văn Vinh

## TÓM TẮT

Nghiên cứu “**Nghiên cứu tạo dòng lan *Dendrobium* thấp cây triển vọng bằng phương pháp lai hữu tính kết hợp chiếu xạ và nuôi cấy *in vitro***” được thực hiện nhằm xây dựng quy trình tạo giống lan *Dendrobium* thấp cây thông qua lai tạo, đột biến với sự hỗ trợ đánh giá quan hệ di truyền bằng chỉ thị phân tử và nuôi cấy *in vitro*. Mục tiêu cụ thể của nghiên cứu là xác định được điều kiện môi trường nuôi cấy và ánh sáng phù hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ lan *Dendrobium* thấp cây; tạo ra 2-3 dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây, 2 - 3 dòng lan *Dendrobium* thấp cây đột biến theo tiêu chí chọn dòng lai *Dendrobium* thấp cây triển vọng; xây dựng được quy trình tạo dòng lai *Dendrobium* thấp cây và quy trình tạo dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến; đánh giá được sự khác biệt di truyền của một số dòng lai, dòng đột biến có triển vọng so với bố mẹ của chúng bằng chỉ thị phân tử và nhân giống vô tính 2 - 3 dòng *Dendrobium* thấp cây lai, 2 - 3 dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến có triển vọng.

Bước đầu hạt lan lai đã được gieo trên các điều kiện môi trường với các chế độ chiếu sáng khác nhau. Đã xác định môi trường nuôi cấy *in vitro*, tỷ lệ ánh sáng dùng đèn LED đỏ và LED xanh dương, cường độ chiếu sáng tốt nhất cho sự nảy mầm, nhân chồi và tạo rễ của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây. Môi trường nuôi cấy và chế độ chiếu sáng tối ưu đã được sử dụng cho việc nuôi cấy hạt lan lai của 15 tổ hợp đậu quả và protocorm sau khi chiếu xạ với tia gamma  $^{60}\text{Co}$ .

Trong 20 cặp lai lan *Dendrobium* thấp cây nghiên cứu, đã có 15 tổ hợp lai đậu quả trong khoảng từ 25 – 100%. Trong 15 tổ hợp đậu quả chỉ có 9 tổ hợp hình thành hạt hữu thụ bao gồm: DM01x12, DM10x01, DM11x12, DM11x18, DM11x24, DM12x11, DM12x13, DM12x14 và DM24x11 với tỷ lệ đậu quả từ 58,3 – 100% và tỷ lệ hạt nảy mầm từ 63,7 – 97,3%. Từ các so sánh, đánh giá sinh trưởng và ra hoa của các tổ hợp này trong điều kiện *in vitro* và ngoài nhà lưới đã chọn được 3 dòng lai DM11x12:90, DM11x24:139, DM12x11:180 có triển vọng. Từ đó đã thiết lập được quy trình để chọn tạo dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây có triển vọng bằng phương pháp lai tạo gồm 7 bước cơ bản trong thời gian 22 tháng.

Việc chiếu xạ protocorm của tổ hợp DM12x13 đã xác định được liều gây chết 50% (LD<sub>50</sub>) là 68 Gy. Khi chiếu xạ tia gamma <sup>60</sup>Co trên protocorm, các liều 20, 40 và 60 Gy đều có tác dụng tăng tần suất biến dị với phổ biến dị rộng, đa dạng về cấu trúc hoa, màu sắc hoa, thân, lá và các tính trạng về giảm chiều cao, ra hoa sớm trong điều kiện *in vitro*. Kết quả so sánh, sàng lọc trong điều kiện nhà lưới đã chọn được 3 dòng đột biến có triển vọng DM12x13-20Gy:38, DM12x13-40Gy:76 và DM12x13-60G:142. Từ đó đã xây dựng được quy trình chọn tạo dòng lan *Dendrobium* thấp cây đột biến có triển vọng bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma <sup>60</sup>Co mẫu protocorm với 10 bước cơ bản trong thời gian 26 tháng.

Sau khi sàng lọc đã xác định 4 primer phù hợp nhất là OPA2, OPA4, OPA5 và OPA18 để đánh giá sự khác biệt di truyền giữa 8 giống bố mẹ, 8 dòng con lai và 3 dòng đột biến. Dòng đột biến DM12x13-40Gy:76 có sự khác biệt di truyền lớn nhất so với giống mẹ DM12 và các dòng con lai (hệ số tương đồng di truyền là 0,48 - 0,86). Đã nhân vô tính cả 3 dòng *Dendrobium* thấp cây lai, 03 dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến có triển vọng có chiều cao cây từ 15 - 20 cm, số giả hành từ 3 - 6 giả hành, số lá từ 4 - 6 lá, số hoa/phát hoa từ 6 hoa trở lên, đường kính hoa từ 4,5 cm trở lên, có màu sắc hoa khác với bố mẹ.

## SUMMARY

The study "Research to generate promising dwarf *Dendrobium* clones by breeding combined with mutation induction and *in vitro* culture" aimed to establish protocols of generating new dwarf *Dendrobium* via breeding and mutation induction and molecular assisted analysis. The objectives of the study were to determine suitable culture condition and light illumination regimes for the germination, shoots and roots induction of new dwarf *Dendrobium*; create 2 - 3 new hybrids dwarf *Dendrobium* and 2 - 3 new mutants dwarf *Dendrobium* reaching criteria of new dwarf *Dendrobium*; optimize protocol for creating new breed or mutated dwarf *Dendrobium*; assess genetic variation of promising lines as compared to their parents using molecular markers and *in vitro* propagation some promising lines.

The best culture conditions for the germination, shoots and root formations of new dwarf *Dendrobium* including culture medium, the ratio between red LED and blue LED, the intensity of illumination for germination, for shooting and rooting of *Dendrobium* were determined. These medium and the lighting regimes then were applied for sowing seeds of 15 hybrids and protocorm after irradiated with  $^{60}\text{Co}$  gamma rays. Among 20 pairs of dwarf *Dendrobium* hybrids, only 15 hybrid pairs gave seeds with a percentage of seed formation ranged from 25 - 100%. However, only 9 among these 15 combinations gave fertile seeds including DM01x12, DM10x01, DM11x12, DM11x18, DM11x24, DM12x11, DM12x13, DM12x14 and DM24x1 with the percentage of seed formation ranged from 58.3 - 100% and the germination rate reached from 63.7 - 97.3%. After comparison and screening *in vitro* as well as in greenhouse, three promising new hybrid lines including DM11x12:90, DM11x24:139, DM12x11:180 were selected. The results allowed to establish a protocol with 7 steps performing in 22 months of creating new hybrid dwarf *Dendrobium*.

The lethal dose of hybrid DM12x13 *Dendrobium* protocorm under the effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma ray was 68 Gy. The effective doses for treating protocorm of DM12x13 crossbred lines were 20, 40 and 60 Gy. These doses were suitable for

increase frequency of variation with generating wide-spread, diverse structure and color of flowers, stems and leaves; impacted on height reduction, early flowering in *in vitro* conditions. After comparison and screening, three promising new mutant lines including DM12x13-20Gy:38, DM12x13-40Gy:76 and DM12x13-60Gy:142 were selected. The results allowed to establish a protocol with 10 steps performing in 26 months of creating new mutant dwarf *Dendrobium*.

The four most efficient primers: OPA2, OPA4, OPA5 and OPA18 were determined and identified for evaluating genetic variation between 8 parents, 8 crossbred lines and 3 mutant lines. The results showed that DM12x13-40Gy:76 mutant line gave the largest genetic variation when compared to their mother DM12 and other crossbred lines (the genetic similarity coefficient from 0.48- 0.86).

*In vitro* propagation for three promising crossbred clones and three promising mutant clones which gave the plant height ranged from 15 - 20 cm, pseudobulb numbers ranged from 3 to 6, leaf number ranged from 4 to 6 leaves, flower numbers per inflorescence higher than 6, the flower diameter wider than 4.5 cm, the color of flowers different from their parents.

## MỤC LỤC

<b>LỜI CAM ĐOAN</b> .....	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN</b> .....	<b>ii</b>
<b>TÓM TẮT</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>v</b>
<b>MỤC LỤC</b> .....	<b>vii</b>
<b>DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DANH SÁCH CÁC BẢNG</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DANH SÁCH CÁC HÌNH</b> .....	<b>xix</b>
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>5</b>
1.1. Giới thiệu về hoa lan và lan <i>Dendrobium</i> .....	5
1.1.1. Đặc điểm hình thái của lan <i>Dendrobium</i> .....	5
1.1.1.1. Rễ .....	6
1.1.1.2. Thân và giả hành .....	6
1.1.1.3. Lá .....	6
1.1.1.4. Hoa .....	7
1.1.1.5. Sự thụ phấn ở lan .....	8
1.1.1.6. Quả .....	8
1.1.1.7. Hạt .....	8
1.1.2. Đặc điểm của lan <i>Dendrobium mini</i> .....	9
1.1.3. Thị trường hoa lan và xu hướng về giống lan <i>Dendrobium</i> .....	10
1.1.3.1. Thị trường hoa lan và lan <i>Dendrobium</i> .....	10
1.1.3.2. Tiềm năng và xu hướng phát triển thị trường hoa lan và lan <i>Dendrobium</i> .....	10
1.2. Chọn tạo giống thực vật .....	11
1.2.1. Đặc điểm di truyền của giống lan <i>Dendrobium</i> .....	12
1.2.2.1. Cơ sở khoa học của việc lai giống hoa lan .....	13
1.2.2.2. Đặc điểm nảy mầm của hạt lan và gieo hạt lan .....	15
1.2.2.3. Kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i> trong chọn tạo giống hoa lan .....	16
1.2.3. Ứng dụng đèn LED trong nuôi cấy <i>in vitro</i> .....	18



1.3. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến.....	20
1.3.1. Sơ lược về đột biến bằng kỹ thuật chiếu xạ .....	20
1.3.2. Cơ chế tạo đột biến của tia gamma $^{60}\text{Co}$ .....	20
1.3.3. Tác động của bức xạ gamma $^{60}\text{Co}$ lên thực vật .....	21
1.3.4. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ đến hiệu quả gây đột biến .....	21
1.3.5. Liều gây chết LD <sub>30</sub> , LD <sub>50</sub> và liều gây đột biến hiệu quả.....	22
1.3.6. Tần số đột biến <i>in vitro</i> .....	23
1.4. Các kỹ thuật được ứng dụng trong chọn tạo giống đột biến.....	23
1.4.1. Sự kết hợp của chọn giống đột biến bằng nuôi cấy thực vật <i>in vitro</i> và chiếu xạ tia gamma .....	23
1.4.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả gây đột biến của tia gamma.....	24
1.4.2.1. Ảnh hưởng của âm độ hạt .....	25
1.4.2.2. Ảnh hưởng của giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển cá thể .....	25
1.4.2.3. Ảnh hưởng của các kỹ thuật gây đột biến.....	25
1.4.3. Ưu và nhược điểm của phương pháp chọn giống bằng kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i> và xử lý đột biến bằng tia gamma.....	26
1.4.4. Ý nghĩa của phương pháp chọn giống đột biến .....	27
1.4.5. Ứng dụng tia gamma trong tạo giống hoa.....	27
1.4.6. Ứng dụng chỉ thị di truyền để chọn lọc dòng đột biến trong chọn giống cây trồng và hoa lan.....	28
1.4.6.1. Phương pháp đánh giá di truyền dựa vào chỉ thị hình thái .....	29
1.4.6.2. Phương pháp đánh giá di truyền dựa vào các chỉ thị phân tử DNA .....	29
1.5. Một số kết quả nghiên cứu về hoa lan trên thế giới .....	31
1.5.1. Một số kết quả nghiên cứu về lai tạo giống hoa lan trên thế giới.....	31
1.5.2. Một số kết quả nghiên cứu tạo giống hoa lan đột biến trên thế giới.....	32
1.6. Một số kết quả nghiên cứu về hoa lan tại Việt Nam.....	32
1.6.1. Một số kết quả nghiên cứu về lai tạo giống hoa lan tại Việt nam.....	32
1.6.2. Một số kết quả nghiên cứu tạo giống hoa lan đột biến tại Việt Nam .....	33
1.6.3. Một số nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> lan <i>Dendrobium</i> .....	34
1.6.4. Một số nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật RAPD để đánh giá sự khác biệt di truyền tại Việt Nam .....	34

1.7. Nhận xét chung .....	35
<b>CHƯƠNG 2 NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>37</b>
2.1. Nội dung 1: Xác định môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của hạt lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	38
2.1.1. Thí nghiệm 1. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	38
2.1.1.1. Thí nghiệm 1A. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nảy mầm của hạt lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	38
2.1.1.2. Thí nghiệm 1B. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của chồi lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	39
2.1.1.3. Thí nghiệm 1C. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tạo rễ của chồi lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	40
2.1.2. Thí nghiệm 2. Xác định tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	41
2.1.2.1. Thí nghiệm 2A: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng tối ưu từ đèn LED đơn sắc đến sự phát triển của hạt lan <i>Dendrobium in vitro</i> .....	41
2.1.2.2. Thí nghiệm 2B: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng tối ưu từ đèn LED đơn sắc đến sự tạo chồi lan <i>Dendrobium in vitro</i> .....	43
2.1.2.3. Thí nghiệm 2C: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng tối ưu từ đèn LED đơn sắc đến sự tạo rễ lan <i>Dendrobium in vitro</i> .....	44
2.1.3. Phương pháp xử lý số liệu .....	44
2.2. Nội dung 2. Lai tạo hoa lan <i>Dendrobium</i> thấp cây và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng .....	44
2.2.1. Thí nghiệm 3. Lai tạo một số tổ hợp lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	44
2.2.1.1. Vật liệu .....	44
2.2.1.2. Bố trí các cặp lai .....	47
2.2.1.3. Cách thức thực hiện .....	49

2.2.1.4. Các chỉ tiêu theo dõi/đánh giá.....	49
2.2.2. Thí nghiệm 4. Đánh giá sự nảy mầm và sinh trưởng của các hạt lai trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	49
2.2.3. Thí nghiệm 5. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển, đặc điểm hoa và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng .....	50
2.3. Nội dung 3. Chiếu xạ gây đột biến <i>in vitro</i> protocorm lan <i>Dendrobium</i> thấp cây và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng .....	52
2.3.1. Thí nghiệm 6. Ảnh hưởng của liều tia gamma $^{60}\text{Co}$ đến sinh lý và xác định $\text{LD}_{50}$ trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	54
2.3.1.1. Thí nghiệm 6A. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ gamma $^{60}\text{Co}$ đến tỷ lệ chết và xác định $\text{LD}_{50}$ của tổ hợp lai <i>Dendrobium</i> thấp cây DM12x13 ..	54
2.3.1.2. Thí nghiệm 6B. Ảnh hưởng của liều xạ gamma $^{60}\text{Co}$ đến khả năng gây đột biến và đánh giá sự sinh trưởng của các biến dị thuộc tổ hợp lai DM12x13 trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	55
2.3.2. Thí nghiệm 7. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển, đặc điểm hoa và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng .....	56
2.4. Nội dung 4. Đánh giá sự khác biệt di truyền và nhân giống một số dòng lai, dòng đột biến có triển vọng .....	57
2.4.1. Thí nghiệm 8. Sử dụng chỉ thị phân tử đánh giá sự khác biệt di truyền một số dòng lai và dòng đột biến có triển vọng.....	57
2.4.2. Thí nghiệm 9. Nhân giống vô tính một số dòng lai triển vọng và đánh giá sự sinh trưởng trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	59
2.4.3. Thí nghiệm 10. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển và đặc điểm hoa một số dòng lai triển vọng trong điều kiện nhà lưới.....	60
2.4.4. Thí nghiệm 11. Nhân giống vô tính một số dòng đột biến triển vọng và đánh giá sự sinh trưởng trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	61
2.4.5. Thí nghiệm 12. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển và đặc điểm hoa một số dòng đột biến triển vọng trong điều kiện nhà lưới.....	61
<b>CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>63</b>
3.1. Xác định môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của hạt lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	63

3.1.1. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	63
3.1.2. Xác định tỷ lệ ánh sáng đỏ-xanh dương và cường độ chiếu sáng thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	66
3.1.2.1. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các cường độ chiếu sáng khác nhau lên sự phát triển của hạt lan <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	66
3.1.2.2. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các cường độ chiếu sáng khác nhau đến sự hình thành và phát triển protocorm lan <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	67
3.1.2.3. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng khác nhau đến hệ số nhân và kích thước chồi lan <i>Dendrobium</i> thấp cây <i>in vitro</i> .....	69
3.1.2.4. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các cường độ chiếu sáng khác nhau đến sự phát triển rễ từ chồi lan <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	71
3.2. Lai tạo hoa lan <i>Dendrobium</i> thấp cây, đánh giá sinh trưởng, phát triển và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng.....	73
3.2.1. Lai tạo và đánh giá phản ứng của hoa sau khi thụ phấn ở 20 tổ hợp lai <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	73
3.2.1.1. Đánh giá đặc điểm thụ phấn của 20 tổ hợp lan lai.....	73
3.2.1.2. Xác định đặc điểm quá trình phát triển của quả.....	76
3.2.2. Sự nảy mầm của hạt lan lai trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	79
3.2.3. Đánh giá sự sinh trưởng của các con lai từ 9 tổ hợp lai trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	81
3.2.4. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển của các con lai trong điều kiện nhà lưới.....	82
3.2.4.1. Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x12 dựa trên đặc điểm hình thái.....	82
3.2.4.2. Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x24 dựa trên đặc điểm hình thái.....	84

3.2.4.3. Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM12x11 dựa trên đặc điểm hình thái.....	86
3.2.4.4. Đặc điểm hình thái của 3 dòng lai <i>Dendrobium</i> thấp cây có triển vọng được chọn lọc.....	89
3.2.5. Quy trình tạo dòng lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	90
3.3. Chiếu xạ gây đột biến <i>in vitro</i> protocorm lan <i>Dendrobium</i> thấp cây và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng .....	92
3.3.1. Xác định liều LD <sub>50</sub> .....	92
3.3.2. Chiếu xạ gây đột biến <i>in vitro</i> protocorm tổ hợp DM12x13 .....	94
3.3.2.1. Chọn lọc, quan sát hình thái các dòng biến dị đột biến trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	95
3.3.2.2. Một số kiểu biến dị lạ được ghi nhận sau khi chiếu xạ protocorm tổ hợp lai DM12x13.....	99
3.3.2.3. Nhận xét chung đối với tổ hợp DM12x13 sau khi được chiếu xạ .....	101
3.3.3. Sự sinh trưởng và phát triển các cá thể đột biến trong điều kiện nhà lưới ...	102
3.3.3.1. Số lá của 177 cá thể chiếu xạ từ protocorm <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	102
3.3.3.2. Số giả hành của 177 cá thể chiếu xạ từ protocorm <i>Dendrobium</i> thấp cây nảy mầm.....	104
3.3.3.3. Chiều cao giả hành của 177 cá thể chiếu xạ từ protocorm <i>Dendrobium</i> thấp cây.....	105
3.3.3.4. Sự sinh trưởng của tổ hợp lan lai DM12x13 được chiếu xạ bằng nguồn <sup>60</sup> Co.....	106
3.3.3.5. Sự hình thành, phát triển và đặc điểm của hoa .....	107
3.3.3.6. Chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng .....	108
3.3.4. Quy trình tạo dòng lan <i>Dendrobium</i> thấp cây đột biến.....	111
3.4. Đánh giá sự khác biệt di truyền và nhân giống một số dòng lai, dòng đột biến có triển vọng .....	113
3.4.1. Kết quả khuếch đại DNA với 10 primer RAPD .....	113
3.4.2. Phân tích mối quan hệ di truyền 8 dòng lan <i>Dendrobium</i> thấp cây bố mẹ với 8 cá thể lai tiềm năng và 3 cá thể đột biến triển vọng .....	123

3.4.3. Nhân dòng vô tính và khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng lai có triển vọng trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	125
3.4.4. Khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng lai có triển vọng trong điều kiện nhà lưới .....	127
3.4.5. Nhân dòng vô tính và khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng đột biến có triển vọng trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	129
3.4.6. Khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng đột biến có triển vọng trong điều kiện nhà lưới .....	131
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>133</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ .....</b>	<b>135</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>136</b>

## DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

VIẾT TẮT	THUẬT NGỮ TIẾNG VIỆT/TIẾNG ANH
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ALP	Amplicon Length Polymorphism
BA	Benzyl adenine
bp	Base pair
B5	Môi trường Gamborg
<sup>60</sup> Co	Cobalt-60
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
ctv	Cộng tác viên
DES	Diethylsulfate
DM	<i>Dendrobium mini</i>
DMS	Dimethylsulfate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
ĐC	Đối chứng
EL	Ethyleneimine
EMS	Ethylmethanesulphonate
GDM	giống <i>Dendrobium mini</i>
Gy	Gray
ha	Hecta
HQ	Huỳnh quang
IAEA	International Atomic Energy Agency
LD <sub>50</sub>	Lethal Dose 50%
LED	Light-emitting diode
VW	Môi trường Vacin & Went
MS	Murashige and Skoog
M1V1	Mutant 1 and vegetative 1
M1V2	Mutant 1 and vegetative 2
NAA	$\alpha$ -Naphthalene Acetic Acid
ND	Nội dung

NMU	Nitrosomethylurea
NN PTNT	Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
NST	Nhiễm sắc thể
NT	Nghiệm thức
nt.	Như trên
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLBs	Protocorm like bodies
PVP	Polyvinylpyrrolidone
Rad	Radian
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSRs	Simple Sequence Repeats
TCL	Thin cell layer
TDZ	Thidiazuron
TN	Thí nghiệm
TPHCM	Thành phố Hồ Chí Minh
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
USD	United States dollar
UV	Ultra violet



## DANH SÁCH CÁC BẢNG

<b>Bảng 1.1.</b> Một số kết quả ứng dụng chiếu tia gamma $^{60}\text{Co}$ để tạo giống hoa lan ....	28
<b>Bảng 2.2.</b> Đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 15 giống <i>Dendrobium</i> mini bố mẹ thuộc bộ sưu tập tại Trạm Huấn luyện và Thực nghiệm Nông nghiệp Văn Thánh được sử dụng làm vật liệu lai tạo .....	46
<b>Bảng 2.3.</b> Bố trí cặp lai và tính trạng kỳ vọng đối với con lai.....	47
<b>Bảng 2.4.</b> Tên và trình tự các primer RAPD được sử dụng trong nghiên cứu .....	58
<b>Bảng 2.5.</b> Thành phần phản ứng PCR .....	58
<b>Bảng 2.6.</b> Chu trình của phản ứng PCR .....	59
<b>Bảng 3.1.</b> Ảnh hưởng của 3 loại môi trường nuôi cấy lên sự nảy mầm, nhân chồi và tạo rễ lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	64
<b>Bảng 3.2.</b> Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc và cường độ chiếu sáng đến hệ số nhân protocorm của lan <i>Dendrobium</i> thấp cây sau cấy chuyển 8 tuần ...	68
<b>Bảng 3.3.</b> Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến hệ số nhân chồi và chiều cao chồi lan <i>Dendrobium in vitro</i> sau cấy 4 tuần .....	70
<b>Bảng 3.4.</b> Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến số rễ và chiều dài rễ của lan <i>Dendrobium</i> thấp cây <i>in vitro</i> sau cấy 4 tuần .....	71
<b>Bảng 3.5.</b> Thời gian xuất hiện biểu hiện hoa héo của 20 tổ hợp lan lai .....	74
<b>Bảng 3.6.</b> Đặc điểm của quả lan của 15 tổ hợp lai ở 75 ngày sau thụ phấn .....	76
<b>Bảng 3.7.</b> Tỷ lệ đậu quả, thời điểm thu hoạch quả và tỷ lệ quả không hạt của 15 tổ hợp nghiên cứu.....	77
<b>Bảng 3.8.</b> Đặc điểm sinh lý hạt của 15 tổ hợp đậu quả ở giai đoạn nảy mầm .....	80
<b>Bảng 3.9.</b> Khả năng sinh trưởng chồi và lá của 9 tổ hợp lai lan <i>Dendrobium</i> thấp cây tại thời điểm 180 ngày sau cấy trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	81
<b>Bảng 3.10.</b> Đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 8 cá thể lai có tiềm năng .....	88
<b>Bảng 3.11.</b> Đặc điểm của 3 dòng lai <i>Dendrobium</i> có triển vọng được chọn lọc.....	89
<b>Bảng 3.12.</b> Tỷ lệ chết của tổ hợp lai DM12x13 sau chiếu xạ ở 3 thời điểm khác nhau .....	92

<b>Bảng 3.13.</b> Ảnh hưởng của liều xạ đến biến dị về màu sắc lá của các con lai được chiếu xạ thuộc tổ hợp DM12x13 ở thế hệ M1V1 .....	97
<b>Bảng 3.14.</b> Ảnh hưởng của liều xạ đến biến dị về dạng lá của các con lai được chiếu xạ thuộc tổ hợp DM12x13 ở thế hệ M1V1 .....	98
<b>Bảng 3.15.</b> Ảnh hưởng của liều xạ đến biến dị về hình dạng và màu sắc giả hành của các con lai được chiếu xạ thuộc tổ hợp DM12x13 ở thế hệ M1V1 .....	98
<b>Bảng 3.16.</b> Sự phân nhóm theo số lá trên giả hành của 177 cá thể lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới .....	103
<b>Bảng 3.17.</b> Sự phân nhóm theo số giả hành của 177 cá thể lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới .....	104
<b>Bảng 3.18.</b> Sự phân nhóm theo chiều cao cây của 177 cá thể lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới .....	105
<b>Bảng 3.19.</b> Thông số các chỉ tiêu sinh trưởng của tổ hợp lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây DM12x13 được chiếu xạ bằng nguồn $^{60}\text{Co}$ sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới.....	106
<b>Bảng 3.20.</b> Ảnh hưởng của liều chiếu xạ đến một số đặc điểm chính của hoa các con lai được chiếu xạ của tổ hợp DM12x13 tại thời điểm 12 tháng được trồng ra nhà lưới.....	107
<b>Bảng 3.21.</b> Hình dạng, màu sắc hoa của cây bố mẹ, các cá thể con lai và các cá thể con lai đột biến triển vọng của tổ hợp lai DM12x13 .....	109
<b>Bảng 3.22.</b> Số sản phẩm khuếch đại, số băng đa hình và tỷ lệ băng đa hình tạo ra từ mỗi primer của 19 mẫu lan <i>Dendrobium</i> .....	114
<b>Bảng 3.23.</b> Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA2.....	115
<b>Bảng 3.24.</b> Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA4.....	117
<b>Bảng 3.25.</b> Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA5.....	119

<b>Bảng 3.26.</b> Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA18.....	121
<b>Bảng 3.27.</b> Tỷ lệ tương đồng giữa 8 dòng lan <i>Dendrobium</i> thấp cây bố mẹ với 8 cá thể lai tiềm năng và 3 cá thể đột biến triển vọng dựa trên hệ số tương ứng đơn giản (SM Coefficient).....	124
<b>Bảng 3.28.</b> Số chồi và chiều cao chồi của 3 dòng lai có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy.....	125
<b>Bảng 3.29.</b> Số rễ và chiều dài rễ của 3 dòng lai có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy.....	127
<b>Bảng 3.30.</b> Thông số chỉ tiêu sinh trưởng của 3 dòng lai có triển vọng ở thời điểm 8 tháng sau trồng.....	127
<b>Bảng 3.31.</b> Thông số chỉ tiêu về hoa của 3 dòng lai có triển vọng sau 10 tháng trồng nhà lưới.....	128
<b>Bảng 3.32.</b> Thông số chỉ tiêu sinh trưởng của 3 dòng đột biến có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy.....	129
<b>Bảng 3.33.</b> Số rễ và chiều dài rễ của 3 dòng đột biến có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy.....	130
<b>Bảng 3.34.</b> Thông số chỉ tiêu sinh trưởng của 3 dòng đột biến có triển vọng ở thời điểm 8 tháng sau trồng.....	131
<b>Bảng 3.35.</b> Thông số chỉ tiêu về hoa của 3 dòng đột biến có triển vọng sau 10 tháng trồng trong nhà lưới.....	132

## DANH SÁCH CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Giống lan <i>Dendrobium</i> cao cây và <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	9
<b>Hình 1.2.</b> Nhiễm sắc thể ở trung kỳ trong quá trình phân bào của 4 loài <i>Dendrobium</i> .....	12
<b>Hình 1.3.</b> Nhiễm sắc thể của các loài lan <i>Dendrobium</i> .....	12
<b>Hình 1.4.</b> Sự tái tổ hợp gen góp phần vào sự hình thành loài mới .....	14
<b>Hình 2.1.</b> Sơ đồ tổng hợp các thí nghiệm nghiên cứu .....	37
<b>Hình 2.2.</b> Hạt của tổ hợp lai DM12x13 và quá trình nảy mầm của hạt.....	38
<b>Hình 2.3.</b> Kiểu hình hoa của 15 giống <i>Dendrobium</i> mini bố mẹ được sử dụng để lai tạo .....	45
<b>Hình 2.4.</b> Các bước tạo dòng lan <i>Dendrobium</i> thấp cây đột biến .....	53
<b>Hình 3.1.</b> Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc từ đèn LED đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến tỷ lệ nảy mầm (%) hạt lan <i>Dendrobium in</i> <i>vitro</i> sau 39 ngày cấy .....	66
<b>Hình 3.2.</b> Protocorm lan <i>Dendrobium</i> sau 30 ngày gieo hạt .....	69
<b>Hình 3.3.</b> Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc đến hình thái chồi lan sau cấy 4 tuần.....	70
<b>Hình 3.4.</b> Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc đến hình thái rễ lan <i>Dendrobium</i> thấp cây <i>in vitro</i> sau cấy chuyển 4 tuần .....	72
<b>Hình 3.5.</b> Hình thái hoa của một số tổ hợp điển hình ở các thời điểm hoa héo 50% và hoa héo hoàn toàn. ....	75
<b>Hình 3.6.</b> Hình thái hoa của tổ hợp DM25x26 theo thời gian.....	75
<b>Hình 3.7.</b> Quả lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây của tổ hợp DM12x13 .....	78
<b>Hình 3.8.</b> Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x12 dựa trên đặc điểm hình thái .....	83
<b>Hình 3.9.</b> Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x24 dựa trên đặc điểm hình thái .....	85
<b>Hình 3.10.</b> Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM12x11 dựa trên đặc điểm hình thái .....	87
<b>Hình 3.11.</b> Quy trình tạo dòng lan lai <i>Dendrobium</i> thấp cây .....	91

<b>Hình 3.12.</b> Ảnh hưởng của tia Gamma $^{60}\text{Co}$ đến sức sống của protocorms tổ hợp lai DM12x13 sau 3 tháng chiếu xạ .....	93
<b>Hình 3.13.</b> Sự tương quan giữa tỷ lệ chết và liều xạ của tổ hợp lai DM12x13.....	94
<b>Hình 3.14.</b> Ảnh hưởng của liều xạ đến tốc độ tăng trưởng chiều cao cây con <i>in vitro</i> của tổ hợp lai DM12x13 theo thời gian.....	95
<b>Hình 3.15.</b> Một số biến dị tổ hợp DM12x13 tại thời điểm sau chiếu xạ 6 tháng.....	99
<b>Hình 3.16.</b> Sự biến đổi hình thái theo thời gian của biến dị biến đổi về màu sắc lá (diệp lục) và hình thái cây (không tạo rễ) trong điều kiện <i>in vitro</i> của tổ hợp lai DM12x13 ở liều xạ 60 Gy .....	100
<b>Hình 3.17.</b> Cây con tổ hợp lai chiếu xạ DM12×DM13 ra hoa trong ống nghiệm. Mũi tên chỉ vị trí phát hoa/hoa, thanh ngang có kích thước 1 cm. ....	101
<b>Hình 3.18.</b> Quy trình tạo dòng lan <i>Dendrobium</i> thập cây đột biến .....	112
<b>Hình 3.19.</b> PLBs phát sinh từ lát mỏng của 3 dòng lai sau 8 tuần nuôi cấy.....	125
<b>Hình 3.20.</b> Cụm chồi 03 dòng lai sau 6 tuần cấy trên môi trường tạo chồi .....	126
<b>Hình 3.21.</b> Các cá thể ra hoa thuộc dòng DM12x11:180.....	129
<b>Hình 3.22.</b> Cụm chồi 03 dòng đột biến sau 6 tuần cấy trên môi trường tạo chồi ..	130
<b>Hình 3.23.</b> Cây con của 03 dòng đột biến sau 6 tuần cấy chuyển trên môi trường tạo rễ.....	131

## MỞ ĐẦU

Nền kinh tế Việt Nam ngày một phát triển, mức sống của người dân được nâng cao, nhu cầu về sử dụng hoa lan, cây kiểng trong đời sống tinh thần ngày càng lớn. Hoa lan là sản phẩm mang giá trị kinh tế khá cao và chiếm vị trí đặc biệt trong thị trường hàng hóa nông nghiệp của các nước (Trần Thị Dung, 2010). Tại khu vực Thành phố Hồ Chí Minh và các tỉnh lân cận như Tây Ninh, Đồng Nai, Bình Dương có trên 100 loài lan khác nhau. Các loại hoa lan này có thể cho doanh thu từ 800 triệu – 1,3 tỷ đồng/ha/năm. Tuy nhiên, hơn 90% cây giống có nguồn gốc nhập nội từ Thái Lan, Đài Loan và một vài quốc gia Tây Âu như Bỉ, Hà Lan (Sở NN và PTNT TP.HCM, 2018). Điều đáng lưu ý là giá trị nhập khẩu hoa lan của Việt Nam luôn có chiều hướng tăng qua các năm, từ 5,5 triệu USD vào năm 2014 đã tăng lên 12,9 triệu USD vào năm 2018 (Sở NN và PTNT TP.HCM, 2019). Sự tham gia của các giống lan do chính người Việt Nam tạo ra còn rất hạn chế.

Xu hướng thị hiếu của người chơi lan *Dendrobium* hiện nay thiên về những nhóm *Dendrobium* đặc hữu của Việt Nam, các giống lai nhập nội có cấu trúc mới lạ và có những giống có hương thơm. Giống lan *Dendrobium* thấp cây có hình dáng thấp nhỏ được ghép trong những chậu lớn để trang trí nội thất, ban công, sân thượng. Bên cạnh đó, các giống hoa lan đột biến cũng đang rất được ưa chuộng và đem lại những giá trị mới mẻ cũng như tiềm năng kinh tế lớn với những ai sở hữu được giống lan đột biến mới lạ.

*Dendrobium* có những loài mang nhiều đặc tính nổi trội (về hình thái thân lá, cấu trúc hoa, màu sắc, sự phân bố sắc tố trên cánh hoa, mùi hương) nhưng thông thường, những đặc tính ưu việt này không tập trung vào một loài. Có những loài nổi bật về hình thái thân lá nhưng không đặc sắc về hoa, có loài màu sắc hoa đẹp, hoa có mùi hương đặc trưng nhưng hoa lại không bền (Dương Hoa Xô, 2011; Nguyễn Văn Tới, 2002).

Đối với kỹ thuật lai tạo giống lan thì việc nuôi cấy hạt trong điều kiện *in vitro* là điều kiện bắt buộc nên việc kết hợp giữa nuôi cấy mô tế bào và đột biến thực nghiệm sẽ làm tăng tần suất biến dị lên nhiều lần, giúp tăng hiệu quả và rút ngắn thời gian chọn tạo giống mới (Lê Trần Bình và ctv, 1997). Đối với các cây trồng

sinh sản hữu tính thì kỹ thuật gây đột biến cho phép rút ngắn thời gian chọn lọc phải mất từ 6 - 10 thế hệ đến chỉ cần 3 - 6 thế hệ, thậm chí chỉ cần 2 - 3 thế hệ. Tuy nhiên, lan với đặc thù là loài thường được nhân giống bằng kỹ thuật nhân giống vô tính do đó chỉ cần nhận được dòng đột biến sau đó có thể nhân vô tính trực tiếp để tạo thành giống mới mà không cần trải qua quá trình ổn định qua nhiều thế hệ như các cây nhân giống bằng hình thức sinh sản hữu tính. Trên thực tế, tần số xuất hiện đột biến khi sử dụng các tia phóng xạ có thể cao hơn trong tự nhiên khoảng 1000 lần (Lê Duy Thành, 2000). Vì vậy, việc nghiên cứu lai tạo kết hợp gây đột biến để tăng tần số đa dạng các dòng *Dendrobium* tạo ra các dòng *Dendrobium* thấp cây để trang trí nội thất, góp phần làm phong phú thêm chủng loại hoa chậu tươi trang trí trong nhà là một hướng đi thiết thực, góp phần tạo ra nhiều giống mới cũng như gia tăng nguồn biến dị cho giống lan này.

Hiện nay, những tiến bộ mới về bộ gen và kỹ thuật di truyền đang cách mạng hóa khả năng ghi nhận sự xuất hiện và đánh giá các kết quả của sự lai tạo ở thực vật. Người ta dễ dàng xác định các chỉ thị phân tử tương quan chặt với các dòng cha mẹ và con lai, cũng như từ các chỉ thị này nhận diện và xác định chính xác các giống mới được tạo ra. Sự kết hợp giữa chỉ thị hình thái truyền thống và chỉ thị phân tử hiện đại có ý nghĩa lớn để tạo ra các dòng lai và dòng đột biến mới, góp phần đẩy nhanh hiệu quả quá trình chọn tạo giống (Benjamin và ctv, 2017; Phan Thanh Kiém, 2016; Trần Thị Dung, 2010).

Đề tài “Nghiên cứu tạo dòng lan *Dendrobium* thấp cây triển vọng bằng phương pháp lai hữu tính kết hợp chiếu xạ và nuôi cấy *in vitro*” được thực hiện với mong muốn tận dụng lợi thế của tất cả các kỹ thuật kể trên để tạo ra các dòng lan mới có triển vọng.

## **Mục tiêu nghiên cứu**

### **Mục tiêu tổng quát**

Đề tài này nhằm xây dựng được quy trình tạo dòng *Dendrobium* thấp cây lai và đột biến. Tạo ra một số dòng lai và dòng đột biến đáp ứng theo định hướng giống mới của lan *Dendrobium* thấp cây, kiểm định được một số đặc trưng di truyền và nhân vô tính số lượng lớn các dòng triển vọng.

### **Mục tiêu cụ thể**

- Xác định được điều kiện môi trường nuôi cấy và ánh sáng phù hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ lan *Dendrobium* thấp cây.

- Xây dựng được quy trình tạo dòng lai *Dendrobium* thấp cây và quy trình tạo dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến.

- Tạo ra 2 - 3 dòng *Dendrobium* thấp cây lai, 2 - 3 dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến dựa trên các tiêu chí chọn dòng *Dendrobium* thấp cây triển vọng.

- Đánh giá được sự khác biệt di truyền của một số dòng lai, dòng đột biến có triển vọng so với bố mẹ của chúng bằng chỉ thị phân tử và nhân giống vô tính 2-3 dòng lai, 2-3 dòng đột biến có triển vọng.

### **Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài nghiên cứu**

#### **Ý nghĩa khoa học của đề tài**

- Đã ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* sử dụng đèn LED đơn sắc kết hợp phương pháp lai tạo hữu tính và chiếu xạ tia gamma  $^{60}\text{Co}$  gây đột biến protocorm phát sinh từ hạt lai lan *Dendrobium* thấp cây, đồng thời áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử để đánh giá khác biệt di truyền và nhân nhanh một số dòng triển vọng đã cho phép rút ngắn được thời gian tạo các dòng đột biến mới.

- Đã áp dụng phương pháp lai hữu tính kết hợp với chiếu xạ gây đột biến để tăng tần suất các cá thể có khác biệt so với bố mẹ và ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để chọn lọc dòng lan *Dendrobium* thấp cây có triển vọng.

#### **Ý nghĩa thực tiễn của đề tài**

- Xây dựng được quy trình tạo dòng lan *Dendrobium* thấp cây lai và đột biến có triển vọng. Quy trình kỹ thuật tạo dòng lai, dòng đột biến bằng phương pháp chiếu xạ protocorm cũng như ứng dụng đèn LED trong nhân giống vô tính phục vụ công tác nghiên cứu không chỉ đối với lan *Dendrobium* thấp cây mà còn có thể mở rộng với nhiều giống hoa lan khác.

- Tạo ra được 6 dòng *Dendrobium* thấp cây có đặc điểm hình thái khác với bố mẹ và có khả năng thương mại hóa, phù hợp để trang trí nội thất, bổ sung vào cơ cấu giống lan sản xuất tại Việt Nam, làm phong phú bộ giống lan sản xuất trong nước.

- Kết quả của luận án là nguồn tài liệu tham khảo tốt cho nghiên cứu và giảng dạy ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống lan.



### **Điểm mới của đề tài**

- Đối với ngành trồng và tạo giống lan ở Việt Nam, đề tài là công trình được thực hiện tuần tự và bài bản đầu tiên trên đối tượng lan *Dendrobium* thấp cây với các bước từ lai tạo, chọn lọc, đánh giá, cho đến bước nhân giống vô tính hướng tới việc tạo ra các dòng có khả năng thương mại hóa.

- Đề tài đã ứng dụng công nghệ chiếu sáng bằng đèn LED để tối ưu hóa quy trình nuôi cấy *in vitro* lan *Dendrobium* thấp cây đột biến.

- Đề tài đã kết hợp các phương pháp truyền thống với kỹ thuật hiện đại, kết hợp kỹ thuật gây đột biến trên protocorm phát sinh từ hạt lai lan *Dendrobium* thấp cây, qua đó nhận được tỷ lệ cây biến dị cao hơn cũng như tăng số dòng lan mới có triển vọng.

- Đề tài đã xây dựng được quy trình tạo dòng lai *Dendrobium* thấp cây và quy trình tạo dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến, tạo được 3 dòng lai và 3 dòng lan *Dendrobium* thấp cây đột biến có triển vọng, rút ngắn thời gian tạo giống lan *Dendrobium* thấp cây mới.

### **Đối tượng và phạm vi nghiên cứu**

#### **Đối tượng nghiên cứu**

- Đối tượng nghiên cứu là khả năng tạo giống lan *Dendrobium* thấp cây có triển vọng qua sử dụng phương pháp lai hữu tính kết hợp chiếu xạ và nuôi cấy *in vitro*.

- Đề tài thực hiện lai hoa trên nguồn vật liệu giống lan làm bố, mẹ không thuần chủng thuộc bộ sưu tập các giống lan *Dendrobium* thấp cây hiện hữu đã được sưu tập, nhập nội, thuần dưỡng và đánh giá hình thái tại Trạm huấn luyện và thực nghiệm Nông nghiệp Văn Thánh.

#### **Phạm vi nghiên cứu và giới hạn của đề tài**

- Tạo giống đột biến bằng chiếu xạ gamma từ nguồn nguyên liệu là tổ hợp lai không quy ước của lan *Dendrobium* thấp cây không thuần chủng, từ đó chọn lọc các dòng lai đột biến có triển vọng và nhân dòng vô tính đối với các dòng lai, dòng đột biến có triển vọng bằng phương pháp nuôi cấy mô để tránh tác động của sự phân ly tính trạng.

- Chỉ chọn 1 tổ hợp DM12x13 làm nguồn vật liệu chiếu xạ tia gamma  $^{60}\text{Co}$  để gây tạo đột biến.

- Đánh giá khác biệt di truyền bằng kỹ thuật RAPD với 10 primer.

# Chương 1

## TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Giới thiệu về hoa lan và lan *Dendrobium*

Cây hoa lan thuộc ngành hạt kín (Angiospermae), lớp một lá mầm (Monocotyledones), bộ phong lan (Orchidales), họ lan (Orchidaceae). Họ lan có khoảng 750 chi và khoảng 20.000 - 25.000 loài (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008; Trần Hợp, 1998), chiếm vị trí thứ hai sau họ cúc trong ngành thực vật hạt kín và là họ lớn nhất trong lớp một lá mầm. Qua kết quả chọn lọc và lai tạo, các nhà chọn giống và trồng lan đã bổ sung thêm hơn 150.000 giống lai tạo, trong đó lan *Dendrobium* có màu sắc phong phú với trên 1.600 loài và ngày càng có nhiều giống mới được lai tạo (Trần Thị Dung, 2010; Nguyễn Thiện Tích và ctv, 2006).

*Dendrobium* bao gồm các loài lan sống trên các cành cây nhưng không cộng sinh, phân bố nhiều ở Châu Âu và Nam Thái Bình Dương, đồng thời được tìm thấy nhiều ở Châu Úc, Tân Guinea, Thái Lan, Việt Nam và dãy núi Himalaya. *Dendrobium* mọc nhiều nhất ở vùng Đông Nam Á. Do quá đa dạng nên *Dendrobium* được chia thành 2 dạng chính: dạng đứng (*Dendrobium phalaenopsis*) và dạng thòng (*Dendrobium nobile*). Dạng *Dendrobium phalaenopsis* thường sinh trưởng tốt ở vùng khí hậu nóng, ẩm và dễ ra hoa. Dạng *Dendrobium nobile* thích hợp khí hậu mát mẻ ở vùng đồi núi cao (Trần Thị Dung, 2010; Phạm Hoàng Hộ, 1999; Trần Hợp, 1998). Lan *Dendrobium* thường nở hoa vào mùa xuân và mùa hè. Hiện nay, người ta đã lai tạo ra nhiều giống lai có thể ra hoa ở các mùa trong năm, màu sắc đa dạng, dễ trồng, hoa lâu tàn nên được nhiều người dân chọn trồng (Dương Hoa Xô, 2011).

#### 1.1.1. Đặc điểm hình thái của lan *Dendrobium*

*Dendrobium* có số lượng khá lớn, phân bố rộng rãi nên đặc điểm hình thái đa dạng, do đó không có một hình dạng chung nhất nào về hoa và dạng cây. *Dendrobium* thuộc nhóm nhiều giả hành, chồi hoa thường xuất hiện trên thân từ các nách lá, cơ thể là một hệ thống nhiều nhánh, sống lâu năm, bộ phận nằm ngang của chúng tạo thành thân rễ và rễ tăng trưởng không liên tục và có thời gian nghỉ sau mùa tăng trưởng.

### 1.1.1.1. Rễ

Rễ thường được hình thành từ căn hành. Cây có hệ rễ khí sinh, có một lớp mô hút ẩm dày bao quanh gọi là mạc. Mạc có thể hấp thụ hơi nước của không khí, cũng như tích trữ nước mưa và sương đọng. Rễ giúp cây hấp thu dinh dưỡng và chất khoáng, mặt khác giúp cây bám chặt vào giá thể, không bị gió cuốn. Một số loài có thân lá kém phát triển thậm chí còn tiêu giảm hoàn toàn, có hệ rễ chứa diệp lục tố giúp cây hấp thu đủ ánh sáng cần thiết cho sự ra hoa và quang hợp (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008; Nguyễn Công Nghiệp, 2004; Trần Hợp, 1998).

### 1.1.1.2. Thân và giả hành

*Dendrobium* thuộc nhóm nhiều giả hành (còn gọi là nhóm hợp trục) có hệ thống nhánh nằm ngang bò dài trên giá thể hoặc nằm sâu trong đất gọi là thân rễ. Ở thân các loài *Dendrobium* có nhiều đoạn phình lớn thành dạng củ giả, củ giả có hình trụ xếp chồng lên nhau thành một thân giả (giả hành). Đốt thân *Dendrobium* rất phong phú về hình dạng, hình trụ, hình trám, có múi hay dẹt, cong. Một số *Dendrobium* lá chỉ có ở các mầm non, rất nhanh tàn, lá thường vàng úa và rụng vào mùa thu, khi đó thân sẽ phình to giống như củ, là nơi dự trữ năng lượng. Giả hành là bộ phận rất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của lan. Giả hành có chứa diệp lục, đây là bộ phận dự trữ nhiều chất dinh dưỡng rất cần thiết cho sự phát triển của giả hành mới. Giả hành cũng là cơ quan dự trữ nước, do vậy cây lan có thể sống lâu trong điều kiện thiếu nước và khi gặp hạn thì các loài lan nhiều giả hành có thể duy trì sự sống lâu hơn các loài lan đơn thân (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008; Nguyễn Công Nghiệp, 2004; Trần Hợp, 1998).

### 1.1.1.3. Lá

Lá là cơ quan dinh dưỡng, là bộ máy đồng hóa thông qua quang hợp. Các lá mọc xen kẽ và ôm lấy thân giả do lá có tận cùng bằng một cuống hay thuôn dài xuống thành bẹ ôm thân, hình dạng và cấu trúc lá rất đa dạng. Lá *Dendrobium* hình kim, có rãnh hay phiến mỏng. Lá thường mềm mại mọng nước, dai, có màu xanh bóng, đậm hay nhạt tùy thuộc vào vị trí sống của cây. Phiến lá trải rộng hay gấp lại theo gân vòng cung như cái quạt hay chỉ gấp lại theo gân giữa như hình chữ V. Những lá sát dưới gốc đôi khi giảm đi chỉ còn những bẹ không phát triển hay giảm

hắn thành vảy hợp (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008; Nguyễn Công Nghiệp, 2004; Trần Hợp, 1998).

#### **1.1.1.4. Hoa**

*Dendrobium* ra hoa ở nách lá. Phát hoa mọc từ mắt ngủ trên giả hành gần ngọn và cả trên ngọn cây. Hoa *Dendrobium* thuộc loại hoa lưỡng tính, nhụy và nhị nằm trên cùng một trụ đơn, đây là đặc điểm nhận dạng đầu tiên của hoa lan. Cấu trúc hoa *Dendrobium* cực kỳ phong phú, hấp dẫn về hình dạng lẫn màu sắc, tuy nhiên luôn có đặc điểm chung như nhau: 3 cánh phía ngoài (cánh đài), 3 cánh phía trong (cánh tràng) và một trụ hoa ở giữa gắn liền nhụy với nhị.

Cánh môi rất đa dạng xếp đối diện với với cánh đài trên, luôn luôn ở phía trong cùng và thường có kích thước lớn hơn cả. Cánh môi có thể nguyên hay chia thùy. Rìa môi biến đổi rất phức tạp: cong hay thẳng, có khía răng, có tua viền hay chia cắt thành các sợi mảnh. Bề mặt cánh môi nhẵn hay có nhiều gân. Góc cánh môi thường mang tuyến mật, trong một chừa dài hay trong một u lồi, phần này hoặc dính vào chân của trục hợp nhụy hay là phần kéo dài ra phía trước của cằm.

- Nhụy và nhị nằm chính giữa hoa. Trục hợp nhụy mang phần nhị ở phía đầu gồm có 2 phần bao phấn và hóc phấn, phần nhụy nằm phía sau.

- Bao phấn: có tác dụng bảo vệ hạt phấn. Bao phấn nằm ở đầu trục hợp nhụy gần như ngang hoặc thẳng đứng và đối diện với cánh môi.

- Hóc phấn: lõm, mang khối phấn. Khối phấn gồm toàn bộ hạt phấn kết dính lại với nhau rất cứng do có tinh bột, sáp hay chất sừng. Số lượng khối phấn biến đổi từ 2, 4, 6 đến 8 xếp thành đôi một trong khoang, có dạng thuôn hay cong thành lưỡi liềm. Chừa (hoa) là một cấu trúc giống như mạng che chia đôi trục hợp nhụy trên một mặt phẳng ngang và được định vị giữa hạt phấn và bề mặt chất nhầy của vòi nhụy.

- Nhụy bao gồm đầu nhụy, vòi nhụy và bầu noãn. Vòi nhụy nằm dưới chừa hoa thường có chứa chất nhầy có tác dụng giữ chặt hạt phấn. Đầu nhụy là nơi diễn ra quá trình thụ phấn khi hạt phấn rơi vào (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008; Nguyễn Công Nghiệp, 2004; Trần Hợp, 1998).

### 1.1.1.5. Sự thụ phấn ở lan

Người ta ước tính rằng khoảng 60% họ lan được thụ phấn nhờ ong (Van der Pijl và Dodson, 1966). Hình dạng và tính đối xứng của hoa lan có thể là sự thích nghi với sự thụ phấn của nhóm côn trùng thụ phấn này. Ở hoa lan, các cánh hoa tạo thành một hốc bên trong để côn trùng thụ phấn phải xâm nhập vào để nhận phấn hoa. Hốc này thường được hình thành từ môi và trục hợp nhụy, những phần còn lại của hoa chỉ có chức năng hấp dẫn côn trùng. Ngoài ra, nhiều loài lan ngăn ngừa sự tự thụ phấn từ côn trùng mang hạt phấn bằng cách định hướng nơi dính phấn hoa. Tính đặc hiệu của loài mang hạt phấn và các loài thụ phấn đạt được thông qua sự tương thích giữa kích thước bên trong cánh hoa, vị trí trục hợp nhụy với kích thước côn trùng (Mchatton, 2011). Sự nén chặt của hạt phấn vào túi phấn kết hợp với chất dính làm cho việc thụ phấn chính xác hơn nhiều so với hầu hết các loài hoa khác và một loài ong có thể đóng vai trò là loài thụ phấn của nhiều loài lan mà không bị nhiễu (Du Puy và Cribb, 2007).

### 1.1.1.6. Quả

Quả lan *Dendrobium* thuộc loại quả nang, dạng hình trụ ngắn, phình ở giữa. Khi chín, quả nứt ra theo 3 – 6 đường nứt dọc, mảnh vỏ còn dính lại với nhau ở phía đỉnh và phía gốc (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008). Ở một số loài, quả chỉ nứt theo 1-2 khe dọc, thậm chí không nứt ra và hạt chỉ rời khỏi vỏ quả khi vỏ này mục nát.

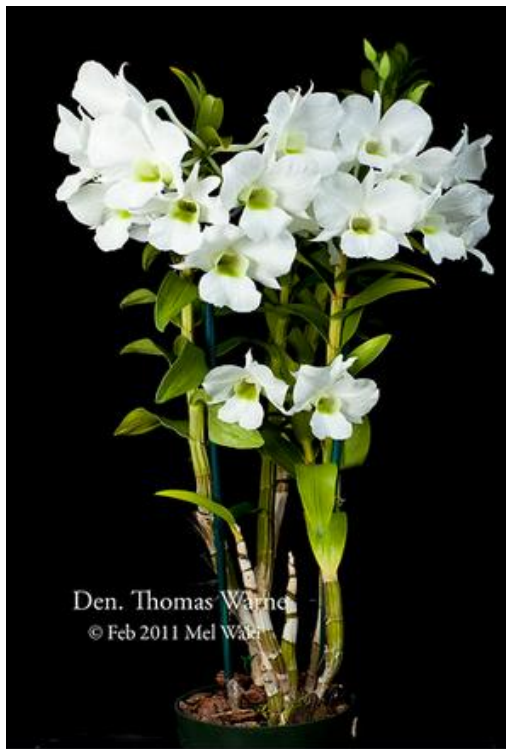
### 1.1.1.7. Hạt

Hạt lan *Dendrobium* rất nhiều nhưng nhỏ, một quả lan chứa từ mười ngàn đến một trăm ngàn hạt, đôi khi đến 3 triệu hạt. Phôi hạt cấu tạo bởi một khối chưa phân hoá, trên một mạng lưới nhỏ, xốp, chứa đầy không khí, phải trải qua 2 - 18 tháng hạt mới chín. Hạt *Dendrobium* không có nội nhũ vì vậy không dự trữ chất dinh dưỡng cung cấp cho hạt trong giai đoạn đầu tiên của sự nảy mầm do đó vào mùa nảy mầm thì hạt *Dendrobium* cần phải gặp được nấm cộng sinh phù hợp mà có thể phát triển. Phần lớn hạt thường chết do khó gặp nấm cộng sinh cần thiết trong môi trường tự nhiên để nảy mầm. Vì lý do này nên hạt nhiều, có thể theo gió bay rất xa, nhưng số lượng hạt nảy mầm thành cây lại rất hiếm. Chỉ ở trong những khu rừng già ẩm ướt, vùng nhiệt đới mới đủ điều kiện cho hạt lan nảy mầm. Hạt lan nảy mầm

trong điều kiện *in vitro* sẽ tạo ra một lượng lớn các tế bào ở thể protocorm. Protocorm thường ở dạng hình cầu, đường kính 1-2 mm, có màu xanh và dễ dàng được tách để nhân giống *in vitro*. Protocorm sau đó sẽ phát sinh hình thành phôi soma hoặc tạo thành cây con (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008; Nguyễn Thiện Tịch và ctv, 2006; Trần Hợp, 1998; Nguyễn Tiến Bản, 1990).

### 1.1.2. Đặc điểm của lan *Dendrobium mini*

*Dendrobium mini* là nhóm giống lan lai thấp cây, thân đứng. Nhóm lan này có nguồn gốc từ Thái Lan, Nhật Bản, sau đó được du nhập vào nước ta. Đặc điểm của nhóm lan này là cây dạng bụi, thấp cây (chỉ cao 15 – 20 cm), nhưng rất siêng hoa, hoa nở quanh năm. Cây tuy nhỏ nhưng nảy chồi rất mạnh, nảy chồi ngay cả trên các thân già hay cây suy yếu. Hoa có kích thước không lớn chỉ khoảng 4 x 5 cm nhưng hoa rất đẹp, số hoa trên cành từ 6 - 13 hoa, hoa lâu tàn (1,5 – 2 tháng) (Nguyễn Thị Mỹ Duyên, 2009).



a. *Dendrobium* Thomas Warne  
(cao cây)



b. *Dendrobium mini*  
(thấp cây)

**Hình 1.1.** Giống lan *Dendrobium* cao cây và *Dendrobium* thấp cây

### **1.1.3. Thị trường hoa lan và xu hướng về giống lan *Dendrobium***

#### **1.1.3.1. Thị trường hoa lan và lan *Dendrobium***

Thị trường xuất khẩu hoa lan trên thế giới tăng dần từ năm 2016 (193,4 triệu USD), đến hết năm 2018 giá trị xuất khẩu đạt ngưỡng cao nhất giai đoạn từ 2014 – 2018 (khoảng 217,6 triệu USD). Giá trị xuất khẩu về hoa lan hiện nay trên thế giới chủ yếu tập trung ở một vài quốc gia như Hà Lan, Thái Lan, Đài Loan, Singapore, New Zealand. Hằng năm, giá trị xuất khẩu từ ngành lan của Việt Nam đạt trên 4 triệu USD, trong đó Nhật Bản chiếm tỷ trọng 72,5% và Mỹ chiếm 11,3 %, các thị phần còn lại là các quốc gia Singapore, Úc, Hồng Kông, Ả Rập, Hà Lan. Hiện tại Việt Nam là quốc gia có giá trị xuất khẩu về hoa lan đứng thứ 6 trên thế giới, nhưng chiếm tỷ trọng rất nhỏ so với Hà Lan, Thái Lan. Mức độ biến động về giá trị xuất khẩu không thể hiện rõ nét qua các năm như thị trường thế giới do hoa lan của Việt Nam chưa đa dạng, thị phần xuất khẩu chỉ tập trung ở một vài quốc gia thuộc Châu Á như Nhật Bản, Singapore, Hồng Kông và Ả Rập (Trademap.org – CPTTP, tháng 4/2019). Giá trị nhập khẩu hoa lan của Việt Nam luôn tăng qua các năm, từ 5,5 triệu USD vào năm 2014 đã tăng lên trên 2 lần vào năm 2018 (12,9 triệu USD).

Hiện nay, TP. HCM đang là thị trường tiêu thụ và buôn bán hoa lan lớn nhất cả nước. Chúng loại lan ở TP.HCM cũng khá phong phú như *Dendrobium*, *Cattleya*, *Mokara*, *Vanda*, *Phalaenopsis* và loài lan được trồng nhiều nhất là *Mokara* (chiếm 44,8%), kế đến là *Denbrobium* (chiếm 39,6%). Diện tích trồng lan năm 2018 đạt 375 ha (tăng 21% so với năm 2015) (Sở NN và PTNT TP.HCM, 2019).

#### **1.1.3.2. Tiềm năng và xu hướng phát triển thị trường hoa lan và lan *Dendrobium***

Tiềm năng phát triển hoa lan và lan *Dendrobium* tại Việt Nam có những thuận lợi như điều kiện thời tiết khí hậu rất thuận lợi cho trồng hoa lan nhiệt đới, không kén đất như những cây trồng khác; đã có nhiều doanh nghiệp tham gia thị trường vật tư, dịch vụ xây dựng, cung cấp giống và ứng dụng công nghệ cao rất thuận lợi cho việc cải tạo thiết kế vườn và chăm sóc hoa lan; có nhiều Viện, Trường, Trung tâm nghiên cứu ngày một quan tâm nghiên cứu, ứng dụng công nghệ cao trong sản xuất hoa lan; các sự kiện văn hóa, kinh tế, chính trị và du lịch trong nước và quốc tế

ngày một gia tăng, nhu cầu thị trường hoa lan ngày càng tăng cao (Trung tâm Tư vấn và hỗ trợ Nông nghiệp TP.HCM, 2019).

Một số hạn chế sự phát triển hoa lan và lan *Dendrobium* tại Việt Nam bao gồm công tác nghiên cứu giống, lai tạo những loài lan đặc hữu chưa được triển khai đồng bộ, công tác bản quyền còn chậm, chưa được đầu tư đúng mức đã gây ra thế phụ thuộc rất lớn vào giống chủ yếu từ Thái Lan; các cơ sở nhân giống cây mô có quy mô và năng lực còn hạn chế, chất lượng không đồng đều và nhất là chưa đủ năng lực cung cấp giống cho nhu cầu sản xuất (Trung tâm Tư vấn và hỗ trợ Nông nghiệp TP.HCM, 2019).

Xu hướng thị hiếu của người chơi lan *Dendrobium* hiện nay thiên về những nhóm *Dendrobium* đặc hữu của Việt Nam, các giống lai nhập nội có cấu trúc mới lạ và có những giống có hương thơm. Bên cạnh đó, nhiều nghệ nhân đã tháp ghép các giống hoa lan *Dendrobium* tháp cây trên những thân cây khô để tạo thành nhiều hình dáng khác nhau hoặc ghép nhiều cây lan có hình dáng thấp nhỏ thành những chậu lớn để trang trí nội thất, ban công, sân thượng. Ngoài ra, các giống hoa lan đột biến đang rất được ưa chuộng và đem lại giá trị kinh tế lớn đối với những người chuyên sâu vào nhóm các cá thể lan khác lạ.

Như vậy, tiềm năng phát triển sản xuất hoa lan còn rất lớn. Tuy nhiên, để phát triển cho tiêu dùng nội địa và tạo lợi thế cạnh tranh trong xuất khẩu cần phải kêu gọi và hỗ trợ đầu tư mở rộng năng lực sản xuất giống cây mô đồng bộ về số lượng và chất lượng giống, giảm dần tỷ trọng nhập khẩu giống từ nước ngoài; tập trung đầu tư ứng dụng công nghệ sinh học trong nghiên cứu, lai tạo giống; sưu tập, thuần hóa và làm nguồn lai tạo các loài lan rừng đặc hữu của Việt Nam tiến đến đăng ký bản quyền quốc tế giống lan đã thuần hóa và lai tạo (Trung tâm Tư vấn và hỗ trợ Nông nghiệp TP.HCM, 2019).

## **1.2. Chọn tạo giống thực vật**

Tạo giống nhằm mục đích duy trì hay cải thiện các tính trạng của cây như kích thước, màu sắc hoa cũng như các đặc tính khác như tuổi thọ của hoa, chiều dài phát hoa, dạng lá, đặc tính dễ trồng, kháng sâu bệnh, tỷ lệ đậu quả cao. Với nỗ lực của các nhà chọn tạo giống đã tạo ra nhiều giống lan *Dendrobium* với nhiều màu sắc hấp dẫn, kiểu hình hoa đa dạng cung cấp cho thị trường (Dương Hoa Xô, 2011).

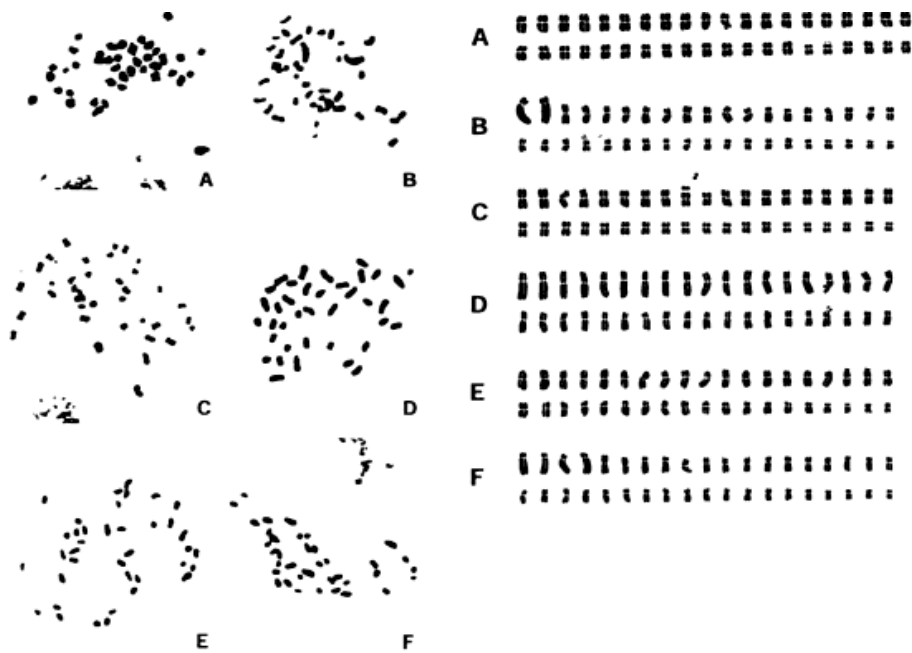


### 1.2.1. Đặc điểm di truyền của giống lan *Dendrobium*

Các nhà khoa học trên thế giới đã thực hiện nhiều nghiên cứu về bộ NST của lan *Dendrobium*. Chi *Dendrobium* trong họ lan là loài đa dạng về hình thái, sự phân bố địa lý các kết quả được báo cáo rất phong phú. Kiểu nhân của mỗi cá thể được xác định dựa trên số lượng, kích thước và hình dạng của các NST và NST sẽ có hình dạng dễ quan sát nhất vào kỳ giữa của phân bào nguyên phân.



**Hình 1.2.** Nhiễm sắc thể ở trung kỳ trong quá trình phân bào của 4 loài *Dendrobium* với A: *D. sanderiae*, B: *D. formosum*, C: *D. draconis* (Haruyuki Kamemoto và ctv, 1999)



**Hình 1.3.** Nhiễm sắc thể của các loài lan *Dendrobium*  
A: *D. leonis*, B: *D. discolor*, C: *D. monile*, D: *D. draconis*, E: *D. biggibum*,  
F: *D. phalaenopsis* (Haruyuki Kamemoto và ctv, 1999)

Ở các khu vực khác nhau thì số lượng NST của các loài *Dendrobium* là khác nhau, phần lớn số NST ở các loài là  $2n = 38$  như ở loài *Dendrobium nobile* và *D. moniliforme* (Shangguo và ctv, 2013). Một số ít loài có  $2n = 40$ ,  $2n = 36$  hoặc  $2n = 76$  hay  $80$ . Cụ thể ở loài *D. kingianum* có các mức bội thể như  $2n = 38$ ,  $3n=57$ ,  $4n = 76$  và  $6n = 114$  (Haruyuki Kamemoto và ctv, 1999).

### **1.2.2. Tạo giống hoa lan bằng phương pháp lai**

Mục đích của việc lai tạo là đem lại những cây tốt, đẹp và mới lạ hơn mà không tìm thấy trong tự nhiên như: hoa lớn hơn, màu sắc mới (sắc thuần hay biến thiên), nhiều hoa hơn, số lần ra hoa nhiều, hoa lâu tàn, dễ trồng, kháng bệnh và chịu nhiệt. Để tạo một giống lan lai mang những tính trạng tốt đạt yêu cầu, trước tiên phải chọn giống/dòng bố mẹ có các tính trạng về hình thái thân lá, cấu trúc hoa, màu sắc hoa, hương thơm. Thông thường, những đặc tính ưu việt không tập trung vào một loài nào như có những loài nổi bật về hình thái thân lá nhưng không đặc sắc về hoa; có loài màu sắc đẹp, mùi hương đặc trưng nhưng không thích hợp cho việc nuôi trồng với mục đích kinh tế (hoa không bền). Việc lai tạo sẽ đáp ứng phần nào các yêu cầu ngày càng đa dạng về mặt thị hiếu, thưởng ngoạn và tạo tiền đề cho việc khai thác kinh tế các giống hoa lan được lai tạo trong nước (Dương Hoa Xô, 2011).

#### **1.2.2.1. Cơ sở khoa học của việc lai giống hoa lan**

Lai giống là sự giao phối (thụ phấn, thụ tinh) giữa các dạng bố mẹ có kiểu gen khác nhau nhằm tạo ra con lai có nhiều đặc tính tốt. Sự giao phối có thể xảy ra trong tự nhiên không có sự can thiệp của con người (lai tự nhiên) hoặc do con người tiến hành (lai nhân tạo) đều tạo ra biến dị tái tổ hợp và đều có giá trị trong chọn giống (Phan Thanh Kiếm, 2016). Lai giống có thể tạo ra những biến đổi thích nghi của quần thể, thúc đẩy sự phát triển mạnh mẽ hơn các rào cản sinh sản hoặc tạo ra các dòng mới. Lai giống được sử dụng một cách có chủ đích trong việc tận dụng ưu thế lai, di chuyển các tính trạng mong muốn giữa các dòng và tạo ra các kiểu hình mới (Benjamin và ctv, 2017; Phan Thanh Kiếm, 2016).

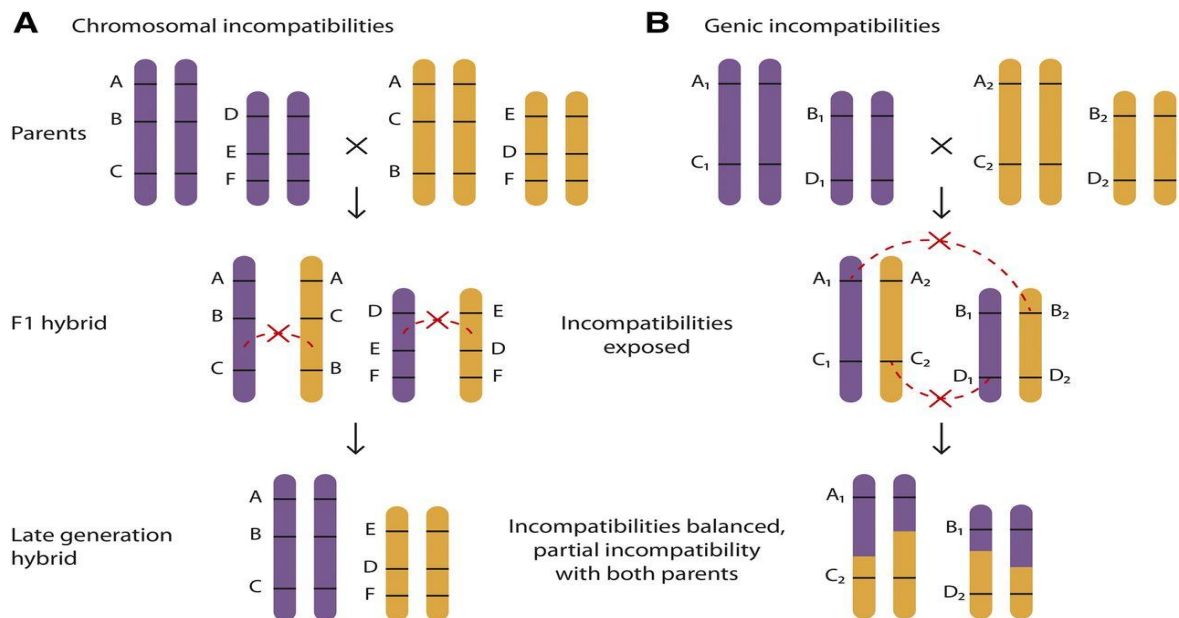
Sự tái tổ hợp gen liên quan đến việc sắp xếp lại các gen không tương hợp của cha và mẹ trong con lai. Nếu một số tính trạng không tương hợp quyết định sự có lợi ở chỉ cha hoặc mẹ và không có lợi cho dòng cha/mẹ còn lại thì con lai sẽ biểu

hiện tính trạng không vượt quá biểu hiện tính trạng của cha hoặc mẹ của chúng (Benjamin và ctv, 2017).

Trong lai giống, thời gian và kết quả chọn lọc trong quần thể lai phụ thuộc vào các kiểu lai khác nhau. Việc áp dụng kiểu lai nào phụ thuộc vào đặc tính di truyền của vật liệu sử dụng và mục tiêu cần đạt đến. Một số phương pháp lai thường được áp dụng như lai gần - lai giữa các giống, giữa các cá thể trong cùng một loài; lai xa - lai các cá thể giữa hai hay nhiều loài với nhau (Phan Thanh Kiếm, 2016).

- Lan nói chung và *Dendrobium* nói riêng ở mức độ tiến hóa không cao nên khả năng lai xa khá cao. Kỹ thuật lai xa giữa các loài khác nhau được áp dụng tương đối phổ biến đối với phong lan.

- Lai đơn là lai giữa hai cặp bố mẹ, tiến hành một lần. Khi lai đơn cây lai đời F1 nhận được chất liệu di truyền của bố và mẹ. Các kiểu gen ở các thế hệ được hình thành trên cơ sở tái tổ hợp các gen. Người ta tiến hành chọn lọc liên tục những cá thể ưu tú trong quần thể các thế hệ để tạo ra dòng thuần tốt. Kiểu lai này rất có ý nghĩa khi lai khác loài hoặc bổ sung một vài tính trạng cần thiết mà giống này cần có từ giống khác (Phan Thanh Kiếm, 2016).



**Hình 1.4.** Sự tái tổ hợp gen góp phần vào sự hình thành loài mới (Benjamin và ctv, 2017).

*Ghi chú: A: sự sắp xếp lại nhiễm sắc thể như đảo đoạn có trong nhiễm sắc thể của bố mẹ có thể được biểu hiện khác nhau trong quần thể con lai, tạo ra sự không tương hợp một phần so với dòng bố mẹ; B: sự hình thành loài từ tái tổ hợp gen có thể liên quan đến sự sắp xếp lại các gen không tương hợp; X: các alen không tương hợp được kết nối bằng một đường màu đỏ đứt nét.*

- Lai thuận nghịch: là lai hai cặp đơn mà vị trí bố mẹ được đổi cho nhau. Nếu ký hiệu  $A \times B$  là cặp lai thuận thì  $B \times A$  quy ước là cặp lai nghịch. Nếu kết quả phép lai  $A \times B$  khác phép lai  $B \times A$  thì chứng tỏ  $A$  và  $B$  không giống nhau về di truyền tế bào chất. Trong trường hợp này cho phép chọn được giống làm mẹ tốt nhất về năng suất hay tính chống chịu. Mặt khác trong lai xa sẽ có cơ hội tạo ra nhiều kiểu gen hơn trong trường hợp hai bộ máy di truyền tế bào chất không giống nhau (Phan Thanh Kiếm, 2016).

Lai giống đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến hóa của nhiều dòng thực vật. Việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong phân tích bộ gen đã làm rõ sự phân ly kiểu gen giữa các con lai có thể tạo ra sự đa dạng kiểu hình mới, cho phép sự thích nghi với môi trường mới và góp phần vào sự hình thành loài mới. Lai giống có thể thể hiện kiểu hình ngay lập tức thông qua sự biểu hiện của các con lai. Về lâu dài, lai giống có thể dẫn đến sự thích nghi cục bộ thông qua sự di chuyển của các alen mới và trong một số trường hợp, với sự phân ly quá mức sẽ dẫn đến sự hình thành các loài lai mới (Benjamin và ctv, 2017).

#### **1.2.2.2. Đặc điểm nảy mầm của hạt lan và gieo hạt lan**

Hạt lan rất khó nảy mầm trong tự nhiên (chỉ nảy mầm từ 1 – 2%) do hạt lan có kích thước rất nhỏ và không chứa chất dinh dưỡng dự trữ. Vì vậy, trong tự nhiên, để nảy mầm, hạt lan cần cộng sinh với một số loài nấm. Có 3 loại nấm cộng sinh trên nhiều giống lan khác nhau được biết bao gồm: nấm *Rhizoctonia repens* đặc thù cho *Cattleya*, *Laelie*, *Cypripedium*; nấm *Rhizoctonia mucoroides* cho *Vanda* và *Phalaenopsis*; nấm *Rhizoctonia lanuginosa* cho *Oncidium*, *Miltonia*. Các loài nấm này sẽ phân giải các chất hữu cơ khó hấp thu cung cấp đường để hạt phát triển thành cây. Bù lại, cây khi lớn sẽ cung cấp nước, các khoáng chất cho nấm. Tuy nhiên, hiện nay việc gieo hạt lan được tiến hành trong phòng thí nghiệm rất hiệu quả (Dương Hoa Xô, 2011).

Hiện nay có nhiều công thức môi trường để gieo hạt lan như môi trường Murashige và Skoog (MS), Vacin & Went (VW), Knudson C. Thường sau khi thụ tinh, một cây lan cần thời gian từ 3 – 12 tháng để quả chín (Dương Hoa Xô, 2011; Đỗ Khắc Thịnh, 2011). Ngoài ra, để đảm bảo sự thành công việc tạo cây con lai bằng kỹ thuật lai giống từ hai loài lan có nhiễm sắc thể khác nhau nhiều, người ta có

thể gieo hạt hoàn toàn mới đó là phương pháp gieo hạt xanh. Trong một số trường hợp bất thường, những hạt có khả năng nảy mầm chỉ hình thành trong giai đoạn đầu của sự phát triển quả và có thể chết đi trước khi toàn bộ vỏ hạt chín. Vì thế, gieo hạt xanh là phương pháp được các nhà lai giống dùng để gieo các cây lai xa với hy vọng nuôi sống một vài cây con duy nhất. Phương pháp này có lợi điểm gieo hạt khi quả chưa bị nứt nên những hạt bên trong chưa bị nhiễm các nấm bệnh như khi quả chín. Ngoài ra, vỏ quả có thể được khử trùng với Clorox 50%. Vỏ được tách bằng công cụ được khử trùng, lúc này hạt được gieo trực tiếp mà không cần phải khử trùng nữa. Thời gian thu hoạch quả xanh của các loài lan khác nhau như: *Phalaenopsis* (90 – 100 ngày), *Vanda* (90 – 120 ngày), *Oncidium* (60 – 75 ngày), *Dendrobium* (90 ngày) (Dương Hoa Xô, 2011).

### **1.2.2.3. Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong chọn tạo giống hoa lan**

Nuôi cấy *in vitro* là kỹ thuật được dùng để nhân giống dưới điều kiện vô trùng, dựa vào tính toàn thể của tế bào thực vật. Các tế bào đơn, các tế bào trần, mẫu lá, rễ có thể được dùng để tái sinh thành cây mới trong môi trường nuôi cấy có chất dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (Badr and Jean, 1995). Nền môi trường nuôi cấy với nồng độ và tỷ lệ khác nhau của các nguyên tố đa lượng, vi lượng, vitamin có ảnh hưởng rất rõ đến nuôi cấy *in vitro* cây lan. Nhiều tác giả đã xác nhận dùng các môi trường Vacin Went (VW), Murashige và Skoog (MS), Knudson (KC) rất tốt cho cây mô các loài thuộc họ lan (Vũ Ngọc Lan, 2013). Sự tăng trưởng và phát triển của thực vật nuôi cấy cũng phụ thuộc vào việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật vào trong môi trường (Edwin và ctv, 2008). Ngoài ra, trong nuôi cấy lan người ta còn bổ sung một số chất hữu cơ như nước dừa, dịch chiết nấm men, dịch chiết khoai tây, bột chuối khô... và chất làm thay đổi trạng thái môi trường như các loại thạch (agar). Thông thường, môi trường Murashige and Skoog là thích hợp cho phần lớn các trường hợp. Để hình thành chồi nách yêu cầu nồng độ thấp của auxin và cytokinin, để phát khởi chồi bất định cần nồng độ cao của cytokinin và thêm một lượng auxin cân bằng. Để sản xuất mô sẹo cần nồng độ cao của auxin kết hợp với nồng độ thấp cytokinin (Lê Văn Hoàng, 2008).

Nguyễn Xuân Dũng và ctv (2014) đã khảo sát môi trường thích hợp cho sự tái sinh PLBs từ lát mỏng đoạn thân lan *Dendrobium sonia* cho thấy trên môi trường

MS bổ sung BA 0,5 mg/l kết hợp với NAA 0,5 hay 1,0 mg/l thích hợp nhất cho việc tạo PLBs từ lát cắt mỏng đoạn thân lan *Dendrobium sonia* và tăng sinh tốt nhất trên môi trường MS bổ sung BA 3 mg/l và NAA 1mg/l.

Panjan S. và Kamnoon K. (2011) đã nghiên cứu sự hình thành PLBs trực tiếp từ cơ quan cây *Dendrobium* mini bằng cách sử dụng Thidiazuron. Protocorm 2 tháng tuổi được sử dụng cho cảm ứng tạo PLBs bằng cách cấy vào môi trường lỏng MS cơ bản bổ sung BA nồng độ 4,4; 8,8; 13,2; 17,6 hoặc 22  $\mu$ M (tương đương với 1, 2, 3, 4 hoặc 5 mg/L) và TDZ nồng độ 4,5; 9; 13,5; 18 hoặc 22,5  $\mu$ M (tương đương với 1, 2, 3, 4 hoặc 5 mg/L) trong bình tam giác 100 mL, được lắc vòng với vận tốc 120 vòng/phút. Sau 9 tuần nuôi cấy, môi trường MS bổ sung 18  $\mu$ M TDZ cho tỷ lệ tạo PLBs cao nhất, đạt 86% và số lượng PLBs cao nhất, đạt 3,6 PLBs/mỗi protocorm ban đầu.

Nguyễn Thanh Tùng và ctv (2010) đã nghiên cứu và cho rằng môi trường MS bổ sung kinetin 3 mg/L kết hợp với NAA 0,3 mg/L cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất, môi trường cơ bản MS có 3% saccharose, 0,8% agar bổ sung NAA 2 mg/L là thích hợp nhất cho việc tạo rễ *in vitro* cây lan *Dendrobium aduncum*.

Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2009) đã tiến hành nhân giống lan *Dendrobium anosmum*, *Dendrobium* mini bằng phương pháp nuôi cấy mô và nghiên cứu các loại giá thể trồng lan *Dendrobium* mini thích hợp và cho hiệu quả cao. Kết quả cho thấy quả lan *Dendrobium anosmum* sau khi được tự thụ 4 tháng, khử trùng và gieo hạt vào môi trường thích hợp. Sau 3 tháng gieo cấy thì tất cả các hạt đều nảy mầm tốt, tỷ lệ đạt được là  $\geq 85\%$  trên môi trường MS + NAA 1 mg/L và môi trường MS + BA 1 mg/L + NAA 0,2 mg/L. Chồi lan *Dendrobium anosmum* tạo rễ tốt nhất trên môi trường MS + NAA 1 mg/L. Đối với giống lan *Dendrobium* mini, chồi phát triển tốt trên môi trường 1/2 MS + BA 1 mg/L. Môi trường 1/2 MS + NAA 0,2 mg/L cho kết quả tạo rễ tốt đối với lan *Dendrobium* mini.

Aktar và ctv (2007) đã tiến hành nuôi cấy PLBs (protocorm like bodies) *Dendrobium* trên các môi trường Knudson C (KC), Vacin & Went (VW), 1/2 Murashige và Skoog (1/2MS), New Phalaenopsis (NP) và khảo sát sự hình thành chồi, lá trên môi trường bổ bột chuối Sabri (Sb), than hoạt tính (C) và nước dừa

(Cw). Kết quả cho thấy trong các loại môi trường nghiên cứu, môi trường  $\frac{1}{2}$  MS cho sự tăng sinh PLBs và số lượng chồi cao nhất.

### 1.2.3. Ứng dụng đèn LED trong nuôi cấy *in vitro*

Ánh sáng là yếu tố quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Thực vật sử dụng ánh sáng như nguồn năng lượng để tổng hợp các hợp chất hữu cơ qua quá trình quang hợp, hay sử dụng ánh sáng như nguồn thông tin cho các chương trình quang chu kỳ, quang hướng động và quang phát sinh hình thái. Những đáp ứng này phụ thuộc vào cường độ, chất lượng ánh sáng (bước sóng), thời gian chiếu sáng và quang kỳ chiếu sáng. Vì vậy, có thể sử dụng ánh sáng nhân tạo để kiểm soát sự sinh trưởng và phát triển thực vật trong nhà kính và trong nuôi cấy *in vitro* (Dương Tấn Nhựt, 2017).

Nhìn chung, đèn huỳnh quang trước đây luôn là nguồn chiếu sáng chính trong nuôi cấy mô thực vật. Tuy nhiên, nguồn sáng này phát ra bước sóng từ 350 – 750 nm, trong đó có nhiều bước sóng không có lợi cho sự sinh trưởng của thực vật. Đèn LED đã được chứng minh như nguồn sáng hiệu quả cho các phòng thí nghiệm nghiên cứu cây trồng hoặc các hệ thống hỗ trợ tái sinh sinh học. Sử dụng đèn LED có thể chọn lựa bước sóng phù hợp với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, qua đó có thể nâng cao năng suất sinh học một cách tối đa (Dương Tấn Nhựt, 2017).

Billorea và ctv (2019) đã nghiên cứu ảnh hưởng của bức xạ gamma và ánh sáng đơn sắc đối với sự phát triển của nuôi cấy chồi *in vitro* lan *Dendrobium sonia*. Chồi lan được chiếu xạ bằng tia gamma đã phát triển và tăng trưởng khác biệt khi nuôi trong điều kiện ánh sáng đơn sắc trắng, xanh, vàng và đỏ. Các chồi được chiếu xạ với liều chiếu từ 15 - 45 Gy đã làm giảm chiều cao, khối lượng tươi và diện tích lá. Ánh sáng đơn sắc ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ sống và sự tăng trưởng của chồi được chiếu xạ. Nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng vàng và đỏ đã ảnh hưởng tích cực đến sự sống sót của chồi chiếu xạ với sự gia tăng đáng kể khối lượng tươi, chiều dài chồi và hàm lượng chất diệp lục. Nuôi cấy chồi được chiếu xạ từ 15 - 100 Gy trong điều kiện ánh sáng vàng làm gia tăng diện tích lá cao hơn so với nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng đỏ.

Billore và ctv (2017) đã đánh giá tác động của đèn LED đơn sắc đối với quá trình hình thành tế bào, sự tăng sinh chồi và tạo rễ lan *Dendrobium sonia*. Nguồn

sáng khác nhau như đèn LED trắng (W), đèn LED xanh (B), đèn LED vàng (Y) và đèn LED đỏ (R) đã được dùng để nuôi cấy chồi lan *Dendrobium sonia* với chu kỳ 16 giờ chiếu sáng và 8 giờ tối. Ánh sáng đơn sắc với bước sóng cao (ánh sáng vàng) đã tạo sự tăng sinh chồi cao hơn (98%), hình thành PLBs sớm hơn, hình thành chồi sớm hơn so với các nghiệm thức nuôi cấy dưới ánh sáng đỏ, xanh và trắng. Nuôi PLBs dưới ánh sáng LED vàng cũng cho số lượng chồi cao hơn (29 chồi/cây) so với nuôi cấy dưới ánh sáng LED đỏ, xanh và trắng. Kết quả cho thấy các nguồn ánh sáng đơn sắc đã kích thích việc nuôi cấy PLBs *Dendrobium sonia* và việc nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng đơn sắc đã làm tăng hiệu quả của nhân giống *in vitro*.

Lin và ctv (2011) đã nghiên cứu ảnh hưởng của chất lượng ánh sáng đến sự sinh trưởng protocorm like bodies (PLBs) của lan *Dendrobium docinale*. PLBs của lan *Dendrobium docinale* được nuôi trong một số điều kiện ánh sáng khác nhau trong ống nghiệm, cụ thể là trong điều kiện tối; ánh sáng trắng huỳnh quang (Fw); đèn LED đỏ; đèn LED xanh; 50% Đèn LED đỏ + 50% đèn LED xanh; 67% Đèn LED đỏ + 33% Đèn LED xanh; và 33% đèn LED đỏ + 67% đèn LED xanh. Các thông số tăng trưởng, số lượng chồi được tạo ra trên mỗi PLBs, nồng độ diệp lục và nồng độ caroten được đo sau 90 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ PLBs tạo chồi là 85% khi được nuôi dưới điều kiện đèn LED xanh. Ngược lại, tỷ lệ PLBs tạo chồi nhỏ hơn 60% trong điều kiện tối, ánh sáng trắng huỳnh quang và đèn LED đỏ. Số lượng chồi được tạo ra trên mỗi PLB nhiều hơn 1,5 lần khi PLBs được nuôi dưới điều kiện đèn LED xanh; 50% Đèn LED đỏ + 50% đèn LED xanh và 33% đèn LED đỏ + 67% đèn LED xanh so với PLBs được nuôi cấy trong các điều kiện ánh sáng khác (trong tối hoàn toàn, đèn huỳnh quang, đèn LED đỏ hoặc 67% Đèn LED đỏ + 33% Đèn LED xanh). Nồng độ chất diệp lục và caroten cao hơn đáng kể khi PLBs được nuôi dưới điều kiện đèn LED xanh và các tỷ lệ đèn LED đỏ cộng với LED xanh khác nhau, so với các nghiệm thức còn lại (trong tối hoàn toàn, đèn huỳnh quang và LED đỏ). Đèn LED xanh, đèn huỳnh quang và 33% đèn LED đỏ + 67% đèn LED xanh tạo ra sự tích lũy chất khô cao. Nghiên cứu này cho thấy rằng đèn LED xanh hoặc 33% đèn LED đỏ + 67% đèn LED xanh có thể thúc đẩy việc nhân chồi của PLBs của *Dendrobium docinale* và làm tăng và sự tích lũy chất khô *in vitro*.



### 1.3. Tạo giống bằng phương pháp gây đột biến

Cơ sở cho chọn tạo giống là các biến dị. Tuy nhiên, do biến dị tự nhiên không đủ nhiều đáp ứng tham vọng các nhà tạo giống nên các nhà tạo giống cần áp dụng gây tạo đột biến.

Mục đích của tạo giống đột biến là có thể tác động đến cấu trúc, màu sắc, thân, lá, hoa; các tính trạng về giảm chiều cao (dạng thấp cây – dwarf), đột biến diệt lục tố, kháng sâu bệnh, tăng cường độ quang hợp và chín sớm (Lapade, 2002).

#### 1.3.1. Sơ lược về đột biến bằng kỹ thuật chiếu xạ

Trong điều kiện tự nhiên, tần số đột biến xuất hiện rất thấp (khoảng  $10^{-6}$ ) và thay đổi tùy thuộc vào từng loại cây trồng và từng gen chuyên biệt (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2007). Tần số đột biến tự nhiên thường rất thấp và đột biến có lợi cho sản xuất thì còn thấp hơn rất nhiều lần. Do đó, không thể chọn lọc giống dựa vào đột biến tự nhiên mà cần có biện pháp làm tăng tần số đột biến để tạo nguồn vật liệu cho chọn giống. Vì vậy, việc chọn giống đột biến nhân tạo ngày càng được quan tâm. Tuy có nhiều hạn chế nhưng chọn giống đột biến đã và đang đóng góp vào thành công của chọn giống. Ngoài ra, kỹ thuật chiếu xạ tia  $\gamma$  kết hợp với phương pháp nuôi cấy mô đã được chứng minh là hữu ích cho nhân giống đột biến và kỹ thuật này đã góp phần cải thiện cây trồng nông nghiệp và cây cảnh. Theo báo cáo của chương trình FAO / IAEA chung về kỹ thuật hạt nhân trong nông nghiệp, đã có 3100 giống đột biến được phát hành chính thức từ 170 loài thực vật khác nhau ở hơn 60 quốc gia. Trong số các giống đột biến, khoảng 90% các giống đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng bức xạ (Lagoda, 2009). Một số giống hoa mới có giá trị thương mại cao như hoa *Chrysanthemum morifolium* (Datta và ctv, 2001; Lamseejan và ctv, 2000; Nagatomi và ctv, 2000; Dowrick và Bayoumi, 1966), hoa *Anthurium andraeanum* (Pochooa, 2005), hoa *Curcuma alismatifolia* (Abdullah và ctv, 2009), hoa *Lilium longiflorum* (Chinone và ctv, 2005) đã được tạo ra bởi tia  $\gamma$  (Duong Hoa Xo and Le Quang Luan, 2017).

#### 1.3.2. Cơ chế tạo đột biến của tia gamma $^{60}\text{Co}$

Trong các giống được tạo ra bằng phương pháp gây đột biến thì phần lớn được tạo ra bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma. Khi tia bức xạ đi qua tế bào sẽ tạo nên hiện tượng ion hóa trong tế bào. Các electron bị tách khỏi phân tử và ở trạng

thái kích thích (trạng thái năng lượng cao) sẽ làm biến đổi DNA (Breen và Murphy, 1995). Bên cạnh đó, tia gamma có thể tương tác với các nguyên tử hoặc phân tử để tạo nên các gốc tự do trong tế bào và làm thay đổi cấu trúc của tế bào. Các gốc tự do này ảnh hưởng đến quá trình sinh lý, sinh hóa hay kiểu hình của cây. Điều này phụ thuộc vào liều chiếu xạ (Moghanddam và ctv, 2011).

### 1.3.3. Tác động của bức xạ gamma $^{60}\text{Co}$ lên thực vật

Độ nhạy cảm phóng xạ của thực vật bậc cao thay đổi trong một giới hạn rộng. Việc ức chế quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật được xem là hậu quả của những rối loạn sâu sắc trong phân chia nhiễm sắc thể của tế bào. Độ nhạy cảm của hạt giống với phóng xạ thể hiện ở liều từ 20 – 640 Gy. Có những hạt giống thực tế không mọc sau khi bị chiếu ở liều 20 Gy. Trong khi đó, hạt giống *Brassica oleracea* L. và một số hạt giống khác hầu như mọc bình thường sau khi chiếu ở liều 640 Gy. Trong nhiều trường hợp, liều chiếu xạ thấp (20 – 80 Gy) kích thích cây mọc khỏe (Nguyễn Tiến Thịnh và Lê Văn Thức, 2006; IAEA, 1995).

Các công trình thực nghiệm cho thấy bức xạ gamma  $^{60}\text{Co}$  liều cao (>300 Gy) làm chậm lớn, ngừng phát triển và có thể làm thay đổi đặc tính di truyền của cây. Độ ẩm có vai trò quan trọng trong tổn thương do chiếu xạ hạt giống. Do đó, cùng một điều kiện chiếu xạ như nhau nhưng hạt giống ẩm nhạy cảm với tia phóng xạ một cách rõ rệt so với những hạt giống khô. Datta và ctv (2005) tiến hành trên cây *Chrysanthemum morifolium* cho tần số là 10 – 20% ở liều chiếu là 5 – 10 Gy. Mohanty và Panda (1988) cho rằng tần số đột biến diệt lục tổ và hình thái giảm lần lượt từ 12 xuống 1% và 22 xuống 2% từ thế hệ đột biến thứ nhất đến thế hệ đột biến thứ ba. Sức sống của *Dianthus* và *Delphidium* giảm xuống 50% khi cây con bị xử lý tia gamma ở liều 50 – 100 Gy (Gericke và Knuth, 1979). Jayachandran và Mohankumar (1992) cho biết hiện tượng khảm ở cây *Zingiber officinale* từ 2,5 – 6,5 % khi xử lý tia gamma. Ngoài ra, sự tăng liều chiếu xạ làm thay đổi cơ quan sinh dưỡng nhưng không làm thay đổi đặc tính ra hoa ở cây *Zingiber officinale* (Giridharan và Balakrishnan, 1992).

### 1.3.4. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ đến hiệu quả gây đột biến

Một trong những yêu cầu cơ bản nhất để tạo giống đột biến thành công là chọn liều lượng xử lý thích hợp (liều gây đột biến hiệu quả). Đối với mục đích chọn

giống, mục tiêu đạt được là có một số lượng đột biến mong muốn đối với một tính trạng quan tâm mà ít gây phá vỡ tính toàn vẹn của bộ gen cây trồng nhất (Mba, 2013).

Thông thường, đơn vị bức xạ được tính bằng Gy (theo hệ thống quốc tế SI),  $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$  (Vũ Đình Hòa và ctv, 2005). Ngoài ra, liều hấp thụ là năng lượng phát ra của bức xạ từ nguồn sang đối tượng và được đối tượng hấp thụ Gy/giây hoặc kGy/giờ. Liều chiếu xạ được sử dụng để gây đột biến phụ thuộc vào độ mẫn cảm của loài, cũng như cấu trúc của cây. Ngoài ra, Sparrow và ctv (1968) còn cho rằng tính mẫn cảm của cây đối với liều chiếu xạ còn phụ thuộc vào cấu trúc nhân tế bào như thể tích nhân, số lượng NST và mức độ bội thể. Cây *Musa paradise* tứ bội có tính mẫn cảm thấp hơn cây tam bội và nhị bội (Novak và ctv, 1990). Tỷ lệ chết sẽ tăng cao cùng với việc tăng liều chiếu. Tuy nhiên, một số kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng khả năng sinh trưởng của mẫu cây *in vitro* tăng lên khi được chiếu xạ ở liều thấp (Ancora và Sonnino, 1995; Yang và Schmidt, 1994).

### **1.3.5. Liều gây chết LD<sub>30</sub>, LD<sub>50</sub> và liều gây đột biến hiệu quả**

Những tổn thương về sinh lý tạo nên giới hạn thực tế trong gia tăng liều chiếu. Khả năng gây chết 100% là ngưỡng cao nhất. Chính vì lý do này nên yêu cầu đặt ra đối với những tác nhân gây đột biến được sử dụng đó là ít làm tổn thương ở thực vật nhưng phải có ảnh hưởng lớn trong di truyền. Hai chỉ số LD<sub>30</sub> (liều gây chết 30%) và LD<sub>50</sub> (liều gây chết 50%) thường được sử dụng để dự đoán mức độ tổn thương của giống và cũng là hai chỉ số thông dụng trong xử lý đột biến giống. LD<sub>30</sub> là ngưỡng giúp xác định liều có tác dụng gây kích thích sinh trưởng và LD<sub>50</sub> là ngưỡng mà ở đó tác nhân gây đột biến có thể tạo ra những biến đổi trong bộ máy di truyền của thực vật (Nguyễn Tiến Thịnh và Lê Văn Thức, 2006; IAEA, 1995).

Sparrow và ctv (1967) cũng cho biết rằng cần xử lý ở các liều chiếu xạ khác dao động quanh liều chiếu xạ LD<sub>50</sub> để tăng khả năng chọn giống đột biến. Do đó, việc xác định liều chiếu xạ LD<sub>50</sub> ở các loài khác nhau là rất quan trọng trong việc chọn tạo giống đột biến. Tuy nhiên, mức độ mẫn cảm cũng được đo bằng % tỷ lệ mẫu chiếu xạ còn sống và sự phát triển của mẫu (Hegde, 2006). Sự giảm tỷ lệ nảy mầm, chiều cao cây con, tỷ lệ sống, số chồi, dạng hạt và kiểm tra khả năng sinh sản ở thế hệ thứ hai cũng như đột biến diệp lục tố là những thông số được tính toán

trong kiểm tra mức độ miễn cảm khi xác định liều gây đột biến hiệu quả (Mba, 2013).

### **1.3.6. Tần số đột biến *in vitro***

Có thể định nghĩa tần số đột biến được tính bằng số lượng đột biến ở một liều chiếu xạ trên quần thể của tế bào, sinh vật, giao tử, cây hoặc bộ phận cây ở số lượng quần thể xử lý đột biến (Harten, 1998) hoặc tần số đột biến có thể tính bằng % cá thể đột biến từ vật liệu được chiếu xạ (Mo), cây con sống ở thế hệ đột biến đầu tiên (M1) hoặc những cây đột biến ở thế hệ đột biến thứ 2 (M2) (Ojiewo và ctv, 2007). Trong khi đó, Suzuki và ctv (1989) định nghĩa tần số đột biến là tần số mà ở đó có các dạng đột biến xuất hiện trong quần thể tế bào hoặc cá thể. Định nghĩa này gồm cả dạng đột biến có lợi và bất lợi.

Lê Duy Thành (2000) cho rằng tần số xuất hiện đột biến khi sử dụng các tia phóng xạ cao hơn trong tự nhiên khoảng 1.000 lần. Tần số đột biến tăng khi tăng liều chiếu xạ như ở cây *Pyrus pyrifolia* Nakai và cây *Malus domestica* từ nuôi cấy phôi (Zagaja và ctv, 1982; Lapins và ctv, 1969).

## **1.4. Các kỹ thuật được ứng dụng trong chọn tạo giống đột biến**

### **1.4.1. Sự kết hợp của chọn giống đột biến bằng nuôi cấy thực vật *in vitro* và chiếu xạ tia gamma**

Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* kết hợp với chiếu xạ là phương pháp kết hợp giữa kỹ thuật nuôi cấy mô với phương pháp gây tạo đột biến. Sự kết hợp này sẽ làm tăng tần số biến dị di truyền lên nhiều lần so với phương pháp thông thường, rút ngắn thời gian trong công tác chọn tạo giống mới mang lại khả năng tạo biến dị rất cao. Phương pháp này còn có khả năng tạo đột biến ở giai đoạn sớm của quá trình hình thành và phát triển cá thể (phôi non hoặc mô sẹo). Nhờ vậy, tần số đột biến cao và khả năng thu nhận những thể đột biến đồng nhất về kiểu gen trở nên dễ dàng hơn. Nuôi cấy *in vitro* không những là công cụ hữu hiệu để lưu giữ, duy trì và nhân những thể đột biến lạ, quý hiếm mà còn là phương pháp phân lập và làm thuần những dòng đột biến nào đó. Trong nhiều trường hợp, nuôi cấy *in vitro* là cách có hiệu quả nhất để duy trì và bảo quản những biến dị di truyền, đặc biệt là những thể đột biến khảm, nhờ đó khắc phục được sự đào thải của những tế bào quý hiếm do tính cạnh tranh trong mô (Nagatomi, 2000; Trần Thượng Tuấn, 1992).

Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong phân lập các thể đột biến ở cây trồng nhân giống sinh dưỡng (phương pháp gây tạo đột biến *in vitro*) có thể giải quyết các vấn đề như: (1) thông qua cơ chế tái sinh cây khởi đầu (*de novo*) do tính toàn thể (topipotency – phát sinh cơ quan và phát sinh phôi soma) mà thể đột biến thuần có thể được tái tạo ngay trong lòng các khu đột biến (sector); (2) Thông qua cơ chế phá bỏ ưu thế đỉnh, thúc đẩy sự sinh trưởng cành nhánh mà kích thước của sector đột biến tăng nhanh chóng làm sớm lộ diện thể đột biến thuần; (3) Mẫu vật *in vitro* luôn có kích cỡ rất nhỏ bé tạo thuận lợi trong xử lý chiếu xạ cũng như tăng cao độ nhạy cảm phóng xạ (Đỗ Khắc Thịnh, 2011; Đỗ Hữu Át, 1996; IAEA, 1986).

Trong kỹ thuật *in vitro*, bằng việc tái sinh các thể đột biến cá thể lại đem lại lợi ích cho ngành kinh doanh cây cảnh. Ngoài ra, kỹ thuật đột biến kết hợp với nuôi cấy mô tế bào là phương pháp có hiệu quả nhất đối với việc cải thiện giống bằng phương pháp vô tính như *Musa paradise*, *Malus domestica*, *Ananas comosus*, *Chrysanthemum morifolium*, *Rosa* sp. (Ahloowalia và Maluszynski, 2000; Trần Thượng Tuấn, 1992).

Như vậy, việc áp dụng phối hợp kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* với tác nhân đột biến đã mang lại cuộc cách mạng kỹ thuật trong lĩnh vực tạo giống cây trồng ứng dụng, đặc biệt là nhóm cây trồng nhân giống sinh dưỡng. Với sự góp sức của kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, những nhà tạo giống cây trồng có cơ hội làm việc với những mẫu vật không truyền thống như: có sự tái sinh cây do tính toàn thể (đột biến thuần, tránh khảm, rút ngắn thời gian chọn lọc); có mô phân sinh mầm với số lượng tế bào tham gia thấp (tần số đột biến cao hơn, phổ biến dị rộng hơn, dễ phân lập đột biến hơn); cho phép xử lý thuận tiện với những bức xạ phổ biến cũng như với với những tác nhân đột biến đặc biệt (neutron ion beam) (Duong Hoa Xo và Le Quang Luan, 2017; Le Quang Luan, 2012; Nguyễn Tiến Thịnh và ctv, 2006).

#### **1.4.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả gây đột biến của tia gamma**

Việc nghiên cứu các nhân tố ảnh hưởng đến hiệu quả gây đột biến của tia gamma có ý nghĩa quan trọng trong việc định hướng sự phát sinh đột biến, đặc biệt là các đột biến có ý nghĩa cải tiến giống cũ hoặc tạo giống mới. Có nhiều nhân tố ảnh hưởng: kiểu gen của giống, loại tác nhân phóng xạ, ẩm độ hạt, nồng độ oxy, nhiệt độ khi tiếp xúc phóng xạ, nhân tố kháng đột biến, các giai đoạn khác nhau của

quá trình phát triển cá thể, các pha khác nhau của chu kỳ phát triển tế bào và điều kiện gieo trồng (Đỗ Hữu Át, 1996).

#### **1.4.2.1. Ảnh hưởng của ẩm độ hạt**

Thông thường xử lý hạt khô hay ướt để gây đột biến cảm ứng. Độ ẩm của hạt có liên quan chặt chẽ tới sự phát sinh hàng loạt các biến dị và đột biến. Khi chiếu xạ bằng tia gamma lên hạt lúa khô và ướt, nhiều tác giả đã kết luận tần số sai hình NST, đột biến diệt lục và các đột biến nhìn thấy ở  $M_2$  trong trường hợp xử lý hạt ướt là cao hơn nhiều so với việc xử lý hạt khô (Đỗ Hữu Át, 1996).

#### **1.4.2.2. Ảnh hưởng của giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển cá thể**

Nghiên cứu hiệu quả của các giai đoạn khác nhau khi xử lý đột biến là một hướng được nhiều tác giả chú ý. Hạt non mẫn cảm với các tác nhân đột biến hơn hạt đã già, tần số và phổ đột biến cũng khác nhau ở các ở các hạt có độ chín khác nhau. Một số nghiên cứu cho thấy giai đoạn giao tử có độ nhạy cảm với tác nhân đột biến cao hơn giai đoạn hợp tử và tiền phôi, giai đoạn nhú mầm và giai đoạn cây con thì mẫn cảm với phóng xạ hơn hạt khô và cây trưởng thành. Như vậy, có thể nói ở giai đoạn càng sớm của quá trình phát triển cá thể thì độ cảm ứng với các tác nhân gây đột biến càng cao (Đỗ Hữu Át, 1996).

Đỗ Khắc Thịnh (2011) cho rằng hiệu quả di truyền sẽ khác nhau tùy thuộc vào sự chiếu xạ vào pha nào của chu kỳ tế bào. Chiếu xạ vào pha G1 sẽ gây sai hình NST, vào pha S gây sai hình NST hoặc chromatide (vì một số NST đã nhân đôi) và chiếu xạ vào pha G2 gây sai hình chromatide. Nếu chiếu xạ vào kỳ trước gây sai hình dưới mức chromatide vì lúc đó đơn vị đứt là  $\frac{1}{2}$  chromatide. Như vậy, có quan hệ giữa các pha của chu kỳ tế bào với sự xuất hiện các biến đổi tiềm tàng và chuyển chúng thành các đột biến thực sự. Sự cảm ứng phóng xạ của NST tùy thuộc vào các pha khác nhau của chu kỳ tế bào và sắp xếp theo thứ tự sau:  $G2 > M > S > G1$  (Đỗ Khắc Thịnh, 2011; Hegde, 2006).

#### **1.4.2.3. Ảnh hưởng của các kỹ thuật gây đột biến**

Biến dị dòng soma là biến dị liên quan đến những thay đổi về mặt di truyền xảy ra ở cây được tái tạo thông qua nuôi cấy mô tế bào thực vật. Tuy nhiên, tần số và phổ biến dị tự phát là rất thấp, chưa kể đến một số biến dị có lợi lại liên kết với những đặc tính gây hại cho cây. Trong những năm gần đây, việc phát triển phương

pháp mới – xử lý đột biến kết hợp nuôi cấy *in vitro* – đã mở ra triển vọng to lớn trong cải tạo giống cây trồng. Nhờ đó, tần số và phổ biến dị dòng soma được tăng lên đáng kể (Mba, 2013; Đỗ Khắc Thịnh, 2011).

Nuôi cấy *in vitro* kết hợp gây tạo đột biến có khả năng tạo đột biến ở giai đoạn sớm của quá trình hình thành và phát triển cá thể (phôi non hoặc mô sẹo). Nhờ vậy, số đột biến cao và có khả năng thu nhận những thể đột biến đồng nhất về kiểu gen trở nên dễ dàng hơn. Nuôi cấy *in vitro* là công cụ hữu hiệu để lưu giữ, duy trì và nhân dòng đột biến quý nào đó (Đỗ Khắc Thịnh, 2011; Novak và ctv, 1990).

Khi nuôi cấy mô, kéo dài số lần cấy chuyển có thể làm tăng tỷ lệ biến dị dòng soma và sau hơn 12 lần cấy chuyển tỷ lệ đột biến ở các cây con mới tái sinh tăng một cách đáng kể. Như vậy, công nghệ sinh học và kỹ thuật nuôi cấy mô - tế bào đã mở ra một triển vọng mới trong việc sử dụng các thành tựu của tạo giống đột biến ở mức độ mô, tế bào (Lê Tiến Dũng, 2002).

#### **1.4.3. Ưu và nhược điểm của phương pháp chọn giống bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* và xử lý đột biến bằng tia gamma**

Ưu điểm của phương pháp là có thể chiếu xạ một số lượng lớn các tế bào trong một diện tích nhỏ, nhiều yếu tố ngoại cảnh có thể được kiểm soát hơn; sử dụng tế bào trần, tế bào đơn để gây tạo đột biến làm cho việc chọn lọc và tạo dòng thuần được dễ dàng và nhanh chóng, khả năng thu được biến dị dạng thể khảm rất thấp nên thuận tiện cho công tác chọn lọc và tạo dòng; tần suất đột biến thường khá cao vì mỗi tế bào đều có cơ hội tiếp xúc trực tiếp với tác nhân gây đột biến và hàng chục dòng biến dị tiềm năng có thể được chọn lọc nhanh chóng chỉ sau một vài thế hệ, ít tốn kém, tốc độ tạo dòng thuần nhanh (Kumar và ctv, 2012; Nagatomi và ctv, 2005; Lapade và ctv, 2002; Lê Trần Bình và ctv, 1997).

Nhược điểm của phương pháp là mặc dù chiếu xạ rất hiệu quả trong tạo giống đột biến nhưng một số yếu tố như tỷ lệ auxin, cytokinin, điều kiện dinh dưỡng và những stress *in vitro* cũng có thể tạo ra biến dị soma (Xu và ctv, 2013; Devarumath và ctv, 2002).

Như vậy, sự thành công của bất kỳ chương trình chọn giống nào cũng cần sự khảo sát để nhận dạng những đột biến mong muốn xảy ra với tần số thấp trong một

số lượng lớn những đột biến khác nhưng có giá trị chọn giống cao (Mullainathan và Umavathi, 2014).

#### **1.4.4. Ý nghĩa của phương pháp chọn giống đột biến**

Phương pháp chọn giống đột biến cung cấp nguồn vật liệu di truyền mang các tính trạng mới để trực tiếp hoặc gián tiếp tạo ra giống mới; có thể thay đổi, cải tiến những tính trạng đơn gene và đa gene như tạo ra cây trồng có khả năng kháng sâu, bệnh, các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, cải tiến hàm lượng các chất có ích, tăng chất lượng sản phẩm, giảm chiều cao cây, tạo ra tính chín sớm, tăng năng suất, tạo ra tính bất dục đực (nhân và tế bào chất), có thể cải tiến đồng thời nhiều tính trạng (Zhang và ctv, 2006; Vũ Đình Hòa và ctv, 2005); tạo giống đột biến cho phép tạo và chọn lọc những thể đột biến một cách đơn giản, hiệu quả, nhanh chóng, rẻ tiền và có thể làm thay đổi thành phần bộ máy di truyền, tạo ra một số kiểu hình mong muốn khó có được bằng con đường biến dị tự nhiên (Joseph và ctv, 2004).

#### **1.4.5. Ứng dụng tia gamma trong tạo giống hoa**

Để làm cơ sở cho việc sử dụng nguồn phóng xạ một cách có hiệu quả, việc tìm hiểu tác dụng của các tia phóng xạ, khả năng gây ra các đột biến ở từng loại cây trồng và sử dụng phóng xạ nào cho phù hợp là một vấn đề đặt ra đối với các nhà chọn tạo giống. Do đó, tìm hiểu nguồn phóng xạ và cơ sở lý luận của phương pháp tạo giống đột biến là một việc làm cần thiết đối với những người ứng dụng phương pháp “đột biến cảm ứng” để tạo giống mới (Lê Tiên Dũng, 2002).

Khả năng chịu đựng bức xạ tùy thuộc vào giống và giai đoạn xử lý. Đối với tia gamma liều phổ biến ở mức 20 – 40 Gy với xuất liều 90 Gy/giờ thích hợp xử lý cho protocorm cây *Cymbidium*. Nghiên cứu bức xạ tia gamma với liều 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 Gy đối với cây con hai lá của một số giống lan, kết quả cho thấy liều trên 70 Gy cho tỷ lệ cây chết cao (Thammasiri, 1996).



**Bảng 1.1.** Một số kết quả ứng dụng chiếu tia gamma  $^{60}\text{Co}$  để tạo giống hoa lan

Giống/Loài	Mẫu cây	LD <sub>50</sub>	Liều gây đột biến hiệu quả	Tác giả
<i>Cymbidium</i>	Protocorm	-	20 – 40 Gy	Thammasiri, 1996
<i>Mokara</i> Chark Kuan	PLBs	-	20 - 40 Gy	Ling, 1999
<i>Dendrobium</i> Jacky	PLBs	-	60 - 70 Gy	
<i>Dendrobium</i> Sonia Earsakul	PLBs	70 Gy		Thana và ctv, 2005
<i>Dendrobium</i> <i>udomsri</i>	cây con	-	30 và 50 Gy	Trần Thanh Tuyền, 2010
<i>Phalaenopsis</i> giống Ds.	cây con	40 Gy	20 – 40 Gy	Đỗ Khắc Thịnh, 2011
Lan hài hồng	PLBs	20 Gy		
<i>Paphiopedilum</i> <i>delenatii</i>	chồi	23,7 Gy		Le Quang Luan và ctv, 2012
<i>Paphiopedilum</i> <i>callosum</i>	cây con	38 Gy		
	chồi	27,1 Gy		
<i>Cymbidium</i> La bell “Anna Belle”	chồi	41,0 Gy	20 - 50 Gy	Duong Hoa Xo và Le Quang Luan, 2017
	cây con	83,1 Gy		
	chồi	27,1 Gy		
<i>Dendrobium</i> Sonia-28	PLBs	43 Gy		Dehgahi và Joniyasa, 2017
<i>Zygopetalum</i> <i>maculatum</i> (Kunth) Garay	PLBs	12,6 Gy		Sherpa và ctv, 2018

#### 1.4.6. Ứng dụng chỉ thị di truyền để chọn lọc dòng đột biến trong chọn giống cây trồng và hoa lan

Chỉ thị di truyền có thể chia thành hai loại; chỉ thị truyền thống và chỉ thị phân tử DNA. Chỉ thị truyền thống gồm chỉ thị hình thái (đây là những tính trạng hoặc

các đặc điểm hình thái như cấu trúc, màu hoa, kiểu hình hạt, đặc điểm sinh trưởng, sự biến đổi sắc tố), chỉ thị tế bào (đặc trưng cấu trúc của NST), chỉ thị sinh hóa (các isozym, protein và các chất trao đổi chất). Chỉ thị phân tử DNA là những thay đổi trong phân tử DNA và được chia thành nhiều loại dựa trên sự khác nhau về phương pháp và kỹ thuật xác định sự đa hình (Nguyễn Đức Thành, 2014).

Chỉ thị phân tử DNA rất phong phú do sự đa dạng của DNA, tính ổn định và sự không lệ thuộc của chúng vào các yếu tố môi trường. Các chỉ thị di truyền phân tử được sử dụng để xác định mối quan hệ giữa các cá thể trong cùng một loài, là cơ sở cho việc phân loại dưới loài, phát triển loài mới và mối quan hệ tiến hóa giữa loài. Chúng cũng có thể được dùng để chọn tổ hợp lai. Kiểu chỉ thị này được sử dụng rất có hiệu quả để lập bản đồ phân tử cho những cây trồng có phương thức sinh sản sinh dưỡng hay sinh sản vô tính khó khăn. Bên cạnh đó, chỉ thị phân tử giúp cho việc tư liệu hóa nguồn gốc giống cây trồng trở nên dễ dàng và chính xác, giúp cho việc bảo hộ các nhà chọn giống cây trồng. Kết hợp giữa chọn giống đột biến và chỉ thị phân tử có thể rút ngắn quá trình chọn giống (Hoàng Trọng Phán và Trương Thị Bích Phượng, 2008).

#### **1.4.6.1. Phương pháp đánh giá di truyền dựa vào chỉ thị hình thái**

Kỹ thuật đánh giá đa dạng ở mức hình thái là phương pháp truyền thống, bao gồm việc miêu tả những đặc điểm, cấu trúc hình thái bên ngoài.

Đối với hoa lan, phương pháp đánh giá chỉ thị hình thái cụ thể là: (a) Đặc điểm của thân (giả hành): cấu trúc, hình dáng, kích thước (chiều dài, chiều rộng và đường kính). (b) Đặc điểm của lá: màu sắc, số lượng của lá trung bình của một cây, chiều dài và chiều rộng của lá, hình dáng của lá, cấu trúc lá. (c) Đặc điểm của hoa: màu sắc, số lượng hoa trên phát hoa, số lượng phát hoa trên thân, chiều dài phát hoa, cách sắp xếp của cánh hoa, kích thước, thời gian ra hoa, thời gian hoa tồn tại (Trần Duy Dương, 2015).

#### **1.4.6.2. Phương pháp đánh giá di truyền dựa vào các chỉ thị phân tử DNA**

Để đánh giá bản chất di truyền của các cá thể dựa vào hệ gen của chúng, các chỉ thị DNA đã được ứng dụng cho nhiều mục đích khác nhau của các đối tượng khác nhau như: xây dựng thư viện bộ gen, xác định cây phát sinh chủng loại, đánh giá đa dạng di truyền, xác định quan hệ họ hàng.

Chỉ thị RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Loại chỉ thị này được sinh ra bởi phản ứng PCR, do sự nhân bội những đoạn DNA hệ gen, sử dụng những đoạn primer đơn lẻ, ngẫu nhiên (random primer) dài khoảng 9 - 10 nucleotide dưới nhiệt độ bắt cặp thấp (khoảng 37<sup>0</sup>C) (Williams và ctv, 1990). Sản phẩm của phản ứng được phân tách bằng điện di trên gel agarose, nhuộm bằng ethidium bromide và quan sát dưới đèn cực tím. RAPD là kỹ thuật phân loại phân tử dễ sử dụng, được ứng dụng trong xác định tính đa dạng sinh học và quan hệ họ hàng của các giống thực vật, động vật khác nhau trong các loài. Lợi thế của loại chỉ thị này là không cần biết thông tin về trình tự. Sản phẩm PCR khi dùng với primer ngẫu nhiên thường đa dạng, có chiều dài từ 100 - 500 nucleotide và khi điện di gel agarose được phân tách thành các phân đoạn khác nhau. Khi bộ gen của các mẫu giống nghiên cứu có sự khác biệt nhau, kết quả PCR nhận được các đoạn khác biệt nhau (Hunt và Page, 1992; Lerceteau và ctv, 1997). Chỉ thị RAPD là loại chỉ thị trội, vì vậy không phân biệt được thể dị hợp. Mặc dù vậy, chỉ thị này vẫn là một công cụ hữu hiệu trong việc lập bản đồ ở những dòng nhị bội, những dòng cận phối hay các quần thể lai ngược. Chỉ thị RAPD còn có một hạn chế nữa là độ nhạy của RAPD bị phụ thuộc vào điều kiện của phản ứng, đôi khi kết quả không lặp lại được, đặc biệt là ở những đối tượng có bộ gen lớn như lúa mì. Do đó, trong phân tích di truyền, để đảm bảo kết quả có độ chính xác cao, người ta thường sử dụng kết hợp kỹ thuật RAPD với các kỹ thuật phân tử khác (Hansen và ctv, 1998; Hopkins và Hilton, 2001; Li và ctv, 2007; Xue và ctv, 2010; Chattopadhyay và ctv, 2012).

Ding Ge và ctv (2005) đánh giá đa dạng và xác định quan hệ di truyền của 8 quần thể lan rừng *Dendrobium officinale* bằng kỹ thuật RAPD với 10 primer ngẫu nhiên. Kết quả cho thấy mức độ đa dạng cao trong quần thể và kỹ thuật RAPD là công cụ hữu dụng để phân tích sự khác biệt di truyền giữa các giống.

Obara – Okeyo và Kako (1998) thực hiện kỹ thuật RAPD (Random amplified polymorphic DNA) để nhận biết các dòng *Cymbidium* và xác định mức độ biến dị di truyền. Kết quả phân tích khoảng cách di truyền đã dự đoán được các nhóm giống có quan hệ với nhau và giữa cha mẹ với thế hệ sau.

## 1.5. Một số kết quả nghiên cứu về hoa lan trên thế giới

### 1.5.1. Một số kết quả nghiên cứu về lai tạo giống hoa lan trên thế giới

Haruyuki Kamemoto và ctv (1999) cho rằng loài lan *D. pulchellum* được dùng để lai tạo ra loài *D. Gattton Sunray* và được chứng nhận đầu tiên từ Royal Horticultural Society, Canada. Về mặt hình thái, hoa của chúng rất giống nhau, màu sắc và môi hoa cũng đều vàng và có hai đốm nâu đỏ ở họng hoa. Duy chỉ có màu cánh hoa và đài hoa của loài *D. pulchellum* màu hồng kem, và loài còn mang đặc tính nguyên thủy là hoa nở theo mùa (đầu mùa mưa), trong khi loài *D. Gattton sunray* có màu cánh hoa và đài hoa màu vàng, hoa ngoài nở tập trung theo mùa chính thì còn có thể nở quanh năm (Haruyuki Kamemoto và ctv, 1999).

Rajkumar Kishor và ctv (2006) đã nghiên cứu lai tạo và nuôi cấy *in vitro* loài lan lai *Ascocenda* 'Kangla' thành công. Loài *Ascocenda* 'Kangla' lai được hình thành bằng cách lấy hạt phấn từ loài *Ascocentrum ampullaceum* (Roxb.) Schltr. var. *auranticum* để thụ phấn cho hoa loài *Vanda coerulea* Griff. và tỷ lệ thành công đạt 60%. Môi trường  $\frac{1}{2}$  MS hiệu quả nhất cho sự phát triển của hạt lai giữa *V. coerulea*  $\times$  *A. auranticum*. Môi trường đáp ứng tốt nhất cho sự phát triển của chồi là môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 2,3  $\mu$ M kinetin + 0,5  $\mu$ M  $\alpha$ -naphthalene acetic acid.

Vendrame và ctv (2008) đã nghiên cứu sự thụ phấn của các giống lan lai *Dendrobium* sử dụng phấn hoa được bảo quản lạnh. Hiệu quả thụ phấn được đánh giá cho phấn hoa từ hai giống lai *Dendrobium* 'Sena Red' và 'Mini WRL'. Tỷ lệ đậu quả ở các nghiệm thức từ 60 - 80%.

Xu và ctv (2013) đã nghiên cứu thụ phấn và sự nảy mầm của hạt lan *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. Kết quả cho thấy quá trình thụ phấn chéo xảy ra tốt nhất vào thời điểm 2 - 4 ngày sau lai.

Udomdee và ctv (2013) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường saccharose và sự trưởng thành của hạt đối với sự nảy mầm *in vitro* của các giống lai *Dendrobium nobile*. Kết quả gieo hạt trên môi trường Hyponex cho thấy tỷ lệ nảy mầm của hạt lan lai giống *Den. Lucky Girl*  $\times$  *Den. Second Love* 'Kirameki' đạt 0; 34,23; 80,03 và 65,75 % tương ứng với thời điểm thu hoạch quả 2, 3, 4 và 5 tháng. Tỷ lệ nảy mầm của hạt lan lai giống *Den. Lucky Girl*  $\times$  *Den. Hamana Lake* 'Kumi' đạt 0; 40,32; 83,41 và 0 % tương ứng với thời điểm thu hoạch quả 2, 3, 4 và 5 tháng.

Tỷ lệ nảy mầm của hạt lan tự thụ của giống lan *Den. Second Love* ‘Kirameki’ đạt 0; 28,13; 90,06 và 0 % tương ứng với thời điểm thu hoạch quả 2, 3, 4 và 5 tháng.

### **1.5.2. Một số kết quả nghiên cứu tạo giống hoa lan đột biến trên thế giới**

Piluek và Lamseejan (2002) thực hiện chiếu xạ lên *Dendrobium* sp. giai đoạn 2 lá đều ghi nhận tỷ lệ sống sót giảm khi tăng liều lượng xử lý. Thana và ctv (2005) đã nghiên cứu ảnh hưởng của chiếu xạ tia gamma lên sự phát triển của lan *Dendrobium* Sonia Earsakul *in vitro*, kết quả liều gây chết 50% mẫu chiếu xạ (LD<sub>50</sub>) là 70 Gy khi chiếu xạ PLBs bằng tia gamma. Cũng theo báo cáo của Piluek và Lamseejan (2006), đối với loài *Phalaenopsis violacea*, tỷ lệ sống sót của các mô lan có sự khác biệt ở các liều lượng xử lý là 20 Gy (100%), 40 Gy (58,7%), 60 Gy (13,3%), 80 Gy (0,0%). Xử lý tia phóng xạ đối với protocorm của loài Ngọc Điểm *Rhynchostylis gigantea* kết quả với liều lượng 20 Gy cho tỷ lệ sống sót trung bình và phát triển thành cây con mạnh khỏe, trong khi ở các liều 40, 60 và 80 Gy có tỷ lệ sống sót thấp, cây phát triển rất chậm và hầu hết chết sau 4 tháng xử lý.

Theo Piluek và Lamseejan (2006), trong thí nghiệm xử lý đột biến tia gamma <sup>60</sup>Co với liều lượng 20, 40, 60, 80, 110 và 130 Gy trên 8 loài lan, mức độ phản ứng của từng nhóm giống và loài có sự khác nhau. Loài lan *Grammatophyllum speciosum* có tỷ lệ sống sót 98 – 100% trên tất cả các liều lượng, trong khi loài lan *Calanthe ruben* có tỷ lệ sống sót 0% ở tất cả các liều lượng.

## **1.6. Một số kết quả nghiên cứu về hoa lan tại Việt Nam**

### **1.6.1. Một số kết quả nghiên cứu về lai tạo giống hoa lan tại Việt nam**

Nguyễn Văn Tới (2002) đã đạt được một số kết quả bước đầu về lai tạo giống lan địa phương Đà Lạt - Lâm Đồng. Kết quả thu nhận được từ 2 cặp lai *Renanthera evrardii* Guillaum x *Renanthera imschootiana* Rofle. và cặp lai *Renanthera evrardii* Guillaum x *Vanda denisoniana* Bens. et Rchb.f. đã ra hoa cho thấy có thể chọn lọc từ nguồn gen lan tự nhiên của địa phương để lai tạo cho ra những chủng loại hoa mới, các cặp lai có thể sử dụng các loài cùng chi và khác chi.

Phan Trọng Dũng (2007) nghiên cứu lai tạo tuyển chọn giống mới, ứng dụng công nghệ sinh học trong công tác nhân giống hoa phong lan phục vụ nông nghiệp. Kết quả trong 14 giống lai tạo thành công, tác giả đã đăng ký bảo hộ sở hữu trí tuệ được quốc tế công nhận 12 giống phong lan mới lai tạo.

Theo Đỗ Khắc Thịnh (2011) đã lai tạo gồm 20 giống lan Hồ Điệp nhập nội và 2 giống lan hoang dại bản địa (tiểu Hồ Điệp – *Phalaenopsis pulcherrima*). Kết quả có 9 tổ hợp lai phát triển thành cây, trong đó 7 tổ hợp lai có hoa, 2 tổ hợp lai giữa giống lai và lan hoang dại không cho hoa. Hồ Điệp hoang dại không thụ phấn khi làm cây bố, nhưng thụ phấn, cho quả khi chúng làm cây mẹ và cây lai thương mại là cây bố.

Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM đã lai tạo thành công hơn 50 tổ hợp lai giữa các giống lan nhập nội với nhau và giữa lan nhập nội với lan rừng Việt Nam. Đã có 40 cá thể lai có triển vọng đã được các nhà khoa học đánh giá và chọn lọc. Đã có 6 dòng lan mới được bảo hộ và 6 dòng lan đã nộp đơn đang chờ tiến hành các thủ tục để được bảo hộ (Hà Thị Loan và ctv, 2018).

### **1.6.2. Một số kết quả nghiên cứu tạo giống hoa lan đột biến tại Việt Nam**

Lê Văn Hòa và ctv (2007) khi tăng liều chiếu xạ đã làm giảm hệ số gia tăng chiều cao chồi *Dendrobium*, liều chiếu 150 và 200 Gy cho hệ số gia tăng chiều cao chồi thấp hơn ở mức có ý nghĩa  $P_{0.01}$  so với tất cả các công thức khác có liều chiếu xạ thấp hơn.

Trần Thanh Tuyền (2010) đã xác định đặc tính sinh trưởng và ra hoa trên lan *Dendrobium udomsri* với 5 liều lượng chiếu xạ tia gamma. Kết quả cho thấy sự chiếu xạ bằng tia gamma  $^{60}\text{Co}$  đã ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và phát triển, làm thay đổi kiểu hình của lan *Dendrobium udomsri*. Chiếu xạ tia gamma có ảnh hưởng lên hàm lượng sắc tố trong lá cây lan *Dendrobium udomsri*.

Đỗ Khắc Thịnh (2011) xử lý chiếu xạ bằng tia gamma  $^{60}\text{Co}$  có ảnh hưởng khác biệt đến đặc điểm sinh trưởng, biến dị hình thái và màu sắc của các bộ phận thân, lá của cây hồ điệp giống Ds. Tỷ lệ sống sót, khả năng sinh trưởng phát triển của cây càng giảm khi liều lượng chiếu xạ càng cao, cây chết 100% từ liều lượng 60 Gy trở lên sau 7 tháng chiếu xạ. Liều chiếu xạ gây chết  $\text{LD}_{50} = 40$  Gy. Chiếu xạ tia gamma  $^{60}\text{Co}$  ở liều lượng 20 – 40 Gy thích hợp tạo phổ biến dị rộng, đa dạng khi xử lý cho cây lan hồ điệp giai đoạn cây con 3 lá.

Dương Hoa Xô và Lê Quang Luân (2017) đã khảo sát thể đột biến *in vitro* của địa lan La bell ‘Anna Belle’ khi kết hợp giữa chiếu xạ và oligochitosan. Môi trường tối ưu để nhân giống protocorm like bodies (PLBs) và chồi của địa lan La bell

‘Anna Belle’ đã được nghiên cứu để chuẩn bị các mẫu *in vitro* dùng cho chiếu xạ. Giá trị LD<sub>50</sub> (liều gây chết 50% mẫu) của PLBs, chồi và cây con tương ứng là 35,0, 41,0 và 83,1 Gy sau 4 tháng. Các đột biến trong ống nghiệm đã được tạo ra bởi sự chiếu xạ PLBs với liều trong khoảng 20 - 50 Gy. Tần số đột biến cao nhất (3,83) của địa lan La bell ‘Anna Belle’ khi chiếu xạ các mẫu PLBs là 30 Gy.

### **1.6.3. Một số nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan *Dendrobium***

Nguyễn Thanh Tùng và ctv (2010) đã áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống *in vitro* cây lan hoàng thảo thân gãy (*Dendrobium aduncum*). Kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung kinetin 3,0 mg/L kết hợp với NAA 0,3 mg/L cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 5,67 chồi/mẫu sau 6 tuần nuôi cấy. Các chồi phát triển tốt thu được từ các thí nghiệm trên có thân mập, chiều cao khoảng 2 - 3 cm được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3,0% saccharose, 0,8% agar bổ sung NAA từ 0,5 - 2,0 mg/L để khảo sát khả năng hình thành rễ.

Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2009) đã tiến hành nhân giống lan *Dendrobium anosmum*, *Dendrobium mini* bằng phương pháp nuôi cấy mô và nghiên cứu các loại giá thể trồng lan *Dendrobium mini* thích hợp và cho hiệu quả cao. Kết quả cho thấy quả lan *Dendrobium anosmum* sau khi được tự thụ 4 tháng, khử trùng và gieo cấy hạt vào môi trường thích hợp. Sau 3 tháng gieo cấy thì tất cả các hạt đều nảy mầm tốt, tỷ lệ đạt được là  $\geq 85\%$  trên môi trường MS + NAA 1 mg/L và môi trường MS + BA 1 mg/L + NAA 0,2 mg/L. Chồi lan *Dendrobium anosmum* phát triển và nhảy chồi rất tốt trên môi trường MS + BA 2 mg/L, ở thời điểm 3 tháng sau khi cấy đạt 3,17 chồi, chồi cao 2,06 cm. Chồi lan *Dendrobium anosmum* tạo rễ tốt nhất trên môi trường MS + NAA 1 mg/L. Đối với giống lan *Dendrobium mini*, chồi lan *Dendrobium mini* phát triển và nhảy chồi rất tốt trên môi trường 1/2 MS + BA 1 mg/L, ở thời điểm 2 tháng sau khi cấy đạt 3,8 chồi, chồi cao 1,26 cm. Môi trường 1/2 MS + NAA 0,2 mg/L cho kết quả tạo rễ tốt đối với lan *Dendrobium mini*.

### **1.6.4. Một số nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật RAPD để đánh giá sự khác biệt di truyền tại Việt Nam**

Hồ Viết Thế và ctv (2017) đã sử dụng 10 chỉ thị RAPD để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 12 mẫu thuộc chi *Chrysanthemum* spp. ở miền Nam. Kết quả

phân tích cây phát sinh loài cho thấy hệ số tương đồng di truyền của các mẫu dao động trong khoảng 0,59 – 0,86. Trong tất cả các primer được sử dụng đều cho tỷ lệ đa hình cao với trung bình 25,6 băng đa hình trên mỗi primer, trong đó tổng cộng có 27 băng đa hình đặc trưng sử dụng để phân biệt các giống *Chrysanthemum* spp. ở mức độ phân tử.

Trần Duy Dương (2015) nghiên cứu đa dạng di truyền và xác định chỉ thị nhận dạng một số nguồn gen hoa lan hoàng thảo (thuộc chi *Dendrobium*) bản địa của Việt Nam. Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 32 mẫu giống hoa lan Hoàng Thảo bằng chỉ thị phân tử RAPD cho thấy hệ số tương đồng di truyền của các giống lan Hoàng Thảo nghiên cứu dao động trong khoảng từ 23 đến 100%.

### 1.7. Nhận xét chung

Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là một kỹ thuật cơ bản và không thể thiếu đối với quá trình lai tạo và nhân dòng hoa lan nói chung, *Dendrobium* nói riêng. Tuy nhiên, hiệu quả quá trình lai tạo cao hay thấp vẫn cần nhiều nghiên cứu tối ưu hóa và hoàn thiện hóa. Các môi trường như MS, ½ MS, VW thường được sử dụng cho gieo hạt và nhân giống các dòng lan *Dendrobium in vitro*. Tuy nhiên, việc nghiên cứu về môi trường nuôi cấy *in vitro* cho đối tượng lan *Dendrobium* thấp cây còn hạn chế.

Việc nuôi cấy *in vitro* sử dụng đèn LED đơn sắc được thực hiện trên đối tượng *Dendrobium sonia* và *Dendrobium docinale* đã làm tăng hiệu quả của nhân giống, thúc đẩy việc nhân chồi và làm tăng và sự tích lũy chất khô *in vitro*. Ánh sáng đơn sắc ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ sống và sự tăng trưởng của chồi *Dendrobium sonia* được chiếu xạ. Tuy nhiên vẫn chưa có nghiên cứu trên đối tượng *Dendrobium* thấp cây.

Việc lai tạo hoa lan đã được tiến hành phổ biến trên thế giới, tại Việt Nam có một số nghiên cứu về các giống *Phalaenopsis*, *Dendrobium* và các giống lan rừng. Nguồn bố mẹ để lai tạo chủ yếu được sưu tầm từ các giống nhập nội và trong nước, chưa có nghiên cứu tạo giống *Dendrobium* có kiểu hình thấp cây tại Việt Nam.

Công tác tạo giống đột biến trên giống hoa đạt được một số thành tựu nhất định nhất là ứng dụng tia gamma trong việc chiếu xạ gây đột biến. Trên hoa lan đã có một số đề tài nghiên cứu, bước đầu đã có một số kết quả có thể làm tiền đề để



ứng dụng nghiên cứu tạo giống đột biến. Đến thời điểm hiện tại, Việt Nam vẫn chưa có công trình tạo giống hoa lan *Dendrobium* thấp cây đột biến được công bố.

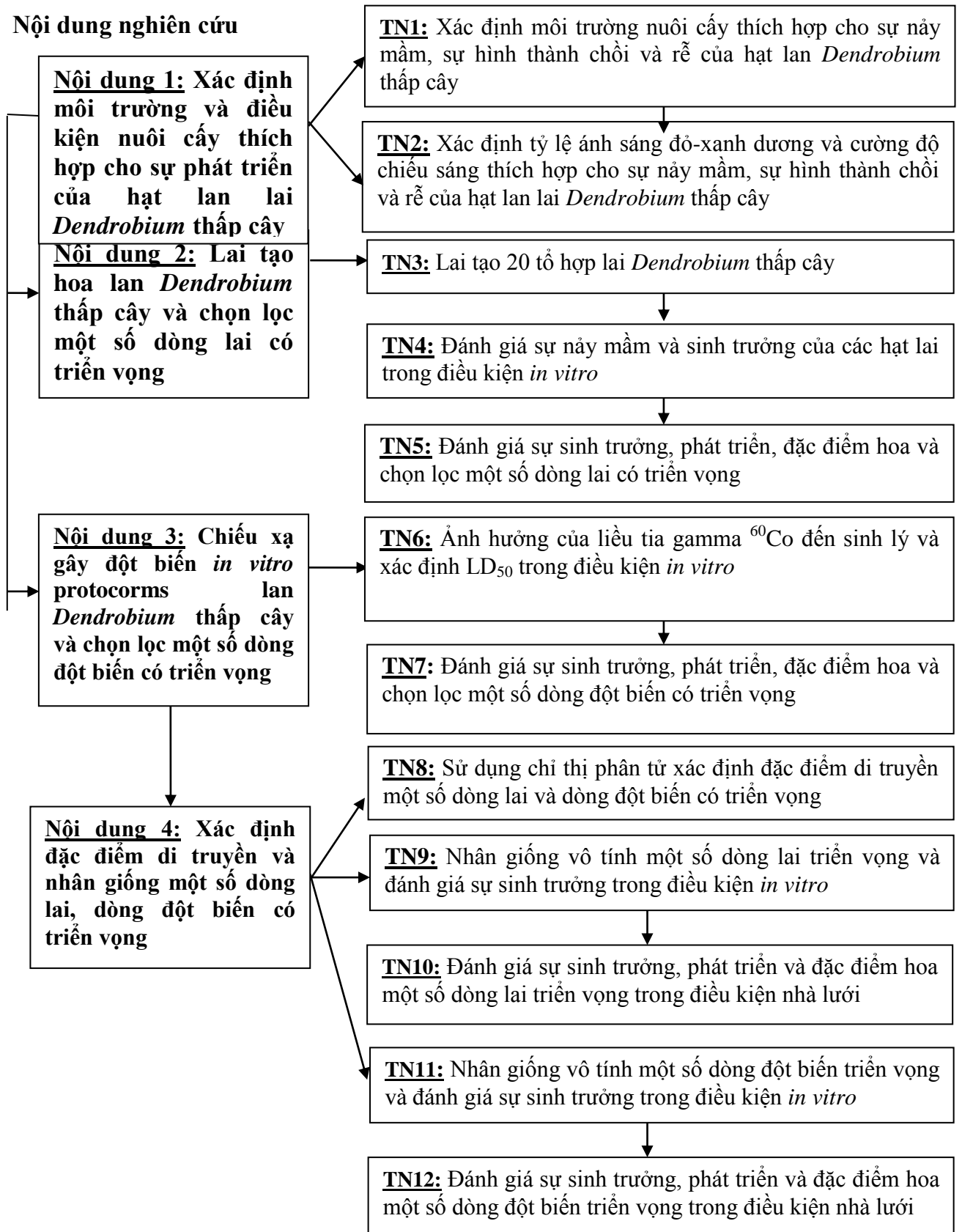
Kỹ thuật sinh học phân tử đã được nghiên cứu ứng dụng phân tích đa dạng di truyền, nhận diện giống hoa và các thành tựu khác trong chọn tạo giống mới một cách nhanh chóng và chính xác. Nhiều tác giả đã ứng dụng kỹ thuật RAPD và nhận thấy RAPD là công cụ hữu dụng để phân tích sự khác biệt di truyền giữa các giống, dòng hoa lan mới được tạo ra. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có công bố nào nghiên cứu về ứng dụng chỉ thị phân tử trên hoa lan *Dendrobium* thấp cây mới.

Như vậy, với những kết quả tổng hợp được từ phân tổng quan cho thấy có nhiều nghiên cứu về hoa lan trên thế giới và Việt Nam. Tuy nhiên, vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu có hệ thống về tạo giống mới trên hoa lan *Dendrobium* thấp cây. Chính vì vậy, kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ là tiền đề cơ bản làm tài liệu tạo giống hoa lan *Dendrobium* thấp cây mới tại Việt Nam.

## Chương 2

### NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Nội dung nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ tổng hợp các thí nghiệm nghiên cứu

Thời gian thực hiện: từ tháng 10/2012 đến tháng 12/2017. Địa điểm: Trạm Huấn luyện và Thực nghiệm Nông nghiệp Văn Thánh – Trung tâm Khuyến nông TP.HCM, Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường - Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

## **2.1. Nội dung 1: Xác định môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây**

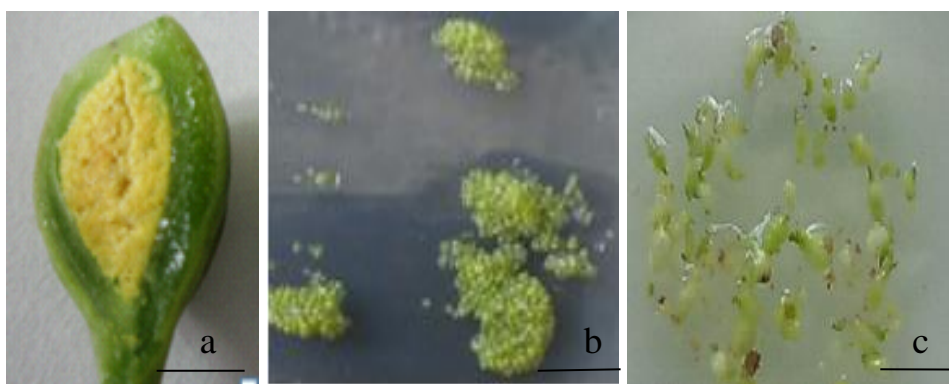
Đối với tạo giống hoa lan, nuôi cấy *in vitro* là điều kiện bắt buộc để có thể gieo hạt thành công, tạo ra cây lan con. Đối với nuôi cấy *in vitro*, môi trường và ánh sáng là hai điều kiện cơ bản cần thiết. Vì vậy, việc xác định môi trường nuôi cấy và chế độ ánh sáng cho sự phát triển thích hợp của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây phải được thực hiện đầu tiên. Tiến hành lai tạo một tổ hợp lai làm nguồn vật liệu xác định môi trường nuôi cấy và chế độ ánh sáng cho sự phát triển thích hợp của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây trước khi tiến hành lai tạo đồng loạt để chọn lọc một số dòng lai có triển vọng.

### **2.1.1. Thí nghiệm 1. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây**

#### **2.1.1.1. Thí nghiệm 1A. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nảy mầm của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây**

##### **a. Vật liệu**

Hạt của tổ hợp lai DM12x13. Ba môi trường gieo hạt bao gồm môi trường Murashige và Skoog (MS), môi trường ½ MS (đa lượng giảm ½ so với MS) và môi trường Vacin & Went (VW). Cả ba môi trường đều được bổ sung saccharose 30 g/L và agar 7 g/L.



**Hình 2.2.** Hạt của tổ hợp lai DM12x13 và quá trình nảy mầm của hạt

(a) hạt sau 75 ngày lai; (b) hạt sau 20 ngày gieo; (c) protocorm hình thành sau 30 ngày gieo hạt. Thanh ngang có kích thước 1 cm.

## b. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố, gồm 3 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, mỗi ô thí nghiệm được thực hiện trên 3 bình. Bình nuôi cấy có dung tích 250 ml, mỗi bình chứa 50 ml môi trường được hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

## c. Cách thức thực hiện

Quả lan thí nghiệm thuộc giống lan *Dendrobium* mini được thu sau 2,5 tháng kể từ khi thụ phấn. Quả lan sau đó được rửa bằng nước cất và khử trùng trong dung dịch Javel và cồn 70°. Sau đó quả lan được cắt hai đầu và dùng dao xẻ dọc tách làm hai. Hạt lan được lấy ra khỏi quả và rải đều trên bề mặt môi trường đã được chuẩn bị. Hạt sau gieo được đặt dưới đèn chiếu sáng với chu kỳ 16 giờ sáng/8 giờ tối. Ẩm độ của phòng nuôi cấy: 70 – 80%. Nhiệt độ trung bình ở không gian bên dưới hệ thống chiếu sáng:  $25 \pm 2$  °C. Môi trường được chỉnh pH = 5,8 và cho vào bình nuôi cấy có dung tích là 250 mL, mỗi bình chứa 50 mL môi trường. Khi hóa xanh, hạt lan được trải đều trên bề mặt môi trường để đếm tổng số hạt, sau đó theo dõi và đếm số hạt lan nảy mầm theo thời gian.

## d. Chỉ tiêu theo dõi

- Mức độ nảy mầm: +: mức độ nảy mầm < 50%; ++: mức độ nảy mầm từ 50 - 69%, +++: mức độ nảy mầm từ 70% - 84% , ++++: mức độ nảy mầm  $\geq$  85%.
- Hình thái protocorm: quan sát bằng mắt thường hình thái và màu sắc protocorm.
- \* Quy ước hạt lan nảy mầm: hạt lan xuất hiện mầm lá xanh.
- \* Thời gian theo dõi: 60 ngày sau khi gieo hạt.

### **2.1.1.2. Thí nghiệm 1B. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của chồi lan lai *Dendrobium* thấp cây**

#### a. Vật liệu

Chồi của tổ hợp lai DM12x13 có chiều cao khoảng 0,5 cm. Ba môi trường nhân chồi bao gồm môi trường Murashige và Skoog (MS), môi trường ½ MS và môi trường Vacin & Went (VW). Cả ba môi trường đều được bổ sung nước dừa 150 mL/L, khoai tây 50 g/L, than hoạt tính 0,5 g/L (Vũ Ngọc Lan, 2013).

#### b. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố, gồm 3 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, mỗi ô thí nghiệm được thực hiện trên 3 bình, mỗi bình cấy 9 chồi.

#### c. Cách thức thực hiện

Chọn những chồi có chiều cao khoảng 0,5 cm cấy sang môi trường nhân chồi đã chuẩn bị sẵn.

#### d. Chỉ tiêu theo dõi

- Số chồi (chồi/mẫu cấy): đếm số 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.

Thời gian ghi nhận chỉ tiêu: 15, 30, 45, 60 ngày sau khi cấy chuyển.

### **2.1.1.3. Thí nghiệm 1C. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tạo rễ của chồi lan lai *Dendrobium* thấp cây**

#### a. Vật liệu

Chồi của tổ hợp lai DM12x13 có chiều cao khoảng 1 – 1,2 cm và có 2 - 3 lá.

#### b. Bố trí thí nghiệm

Tương tự thí nghiệm 1B.

#### c. Cách thức thực hiện

Chọn những chồi có chiều cao khoảng 1 – 1,2 cm và có 2 - 3 lá cấy sang môi trường tạo rễ đã chuẩn bị sẵn.

#### d. Chỉ tiêu theo dõi

Quan sát và ghi nhận ảnh hưởng của ba môi trường lên sự tạo rễ chồi lan lai thông qua các chỉ tiêu:

- 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.

- Chiều cao chồi và số lá/chồi: tương tự thí nghiệm 1B.

Thời gian ghi nhận chỉ tiêu: 15, 30, 45, 60 ngày sau khi cấy chuyển.

## **2.1.2. Thí nghiệm 2. Xác định tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây**

### **2.1.2.1. Thí nghiệm 2A: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng tối ưu từ đèn LED đơn sắc đến sự phát triển của hạt lan *Dendrobium in vitro***

#### a. Vật liệu

- Quả lan lai *Dendrobium* thấp cây được lai tạo từ tổ hợp lai DM13x24.

- Đèn LED: đèn LED đỏ (bước sóng 660 nm), đèn LED xanh dương (bước sóng 460 nm) (hiệu điện thế cho 1 bóng đèn LED là 3 V, cường độ dòng điện cho 1 đèn LED là 20 mA, công suất cho 1 đèn LED là 0,06 W, công ty HENGUANG ELECTRON– Đài Loan). Đèn huỳnh quang (dài 1,2 m; 40 W, công ty bóng đèn Rạng Đông – Việt Nam). Máy đo cường độ ánh sáng – Lux kế (WALK LAB – Mỹ).

- Môi trường gieo hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây là môi trường tốt nhất từ kết quả thí nghiệm 1: môi trường  $\frac{1}{2}$  MS + saccharose 30 g/L + agar 7 g/L

#### b. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 2 yếu tố cải tiến, yếu tố R là tỷ lệ đèn LED, yếu tố I là cường độ chiếu sáng. Thí nghiệm gồm 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức gồm 3 bình, mỗi bình 3 mẫu cây.

Tổng số bình cho 1 thí nghiệm:  $12 \times 3 \times 3 = 108$  (bình).

Yếu tố R (Ratio) là tỷ lệ đèn LED đỏ/đèn LED xanh dương, gồm 3 tỷ lệ:

R1: 100% đèn LED đỏ: 0% đèn LED xanh dương

R2: 50% đèn LED đỏ: 50% đèn LED xanh dương

R3: 75% đèn LED đỏ: 25% đèn LED xanh dương

Yếu tố I (Intensity) là cường độ chiếu sáng của đèn LED, gồm 4 mức:

I1: 200 lux

I3: 600 lux

I2: 400 lux

I4: 800 lux

Nghiệm thức đối chứng gồm 9 bình, mỗi bình 3 mẫu cây được nuôi dưới ánh sáng đèn huỳnh quang ở cường độ chiếu sáng là 2000 lux. Nghiệm thức này được dùng làm đối chứng để so sánh với nghiệm thức tốt nhất nuôi dưới hệ thống đèn LED

(thông qua việc thực hiện kiểm tra trắc nghiệm T – test giữa nghiệm thức đối chứng với nghiệm thức đèn LED).

Các đèn LED được gắn đúng với tỷ lệ đèn thí nghiệm (Bảng 2.1) và cách đều nhau trên một bảng mạch đèn LED có diện tích 122 cm<sup>2</sup> (dài 46 cm x rộng 2,65 cm).

**Bảng 2.1.** Số lượng bóng đèn tương ứng với từng nghiệm thức

Nghiệm thức	Tỷ lệ - cường độ chiếu sáng	Số đèn (đèn)		
		LED đỏ	LED xanh dương	Huỳnh quang
R1I1	100Đ – 200 lux	24	0	0
R1I2	100Đ – 400 lux	48	0	0
R1I3	100Đ – 600 lux	72	0	0
R1I4	100Đ – 800 lux	96	0	0
R2I1	50Đ:50X – 200 lux	12	12	0
R2I2	50Đ:50X – 400 lux	24	24	0
R2I3	50Đ:50X – 600 lux	36	36	0
R2I4	50Đ:50X – 800 lux	48	48	0
R3I1	75Đ: 25X – 200 lux	16	8	0
R3I2	75Đ: 25X – 400 lux	32	16	0
R3I3	75Đ: 25X – 600 lux	49	24	0
R3I4	75Đ: 25X – 800 lux	64	32	0
ĐC	100HQ – 2000 lux	0	0	1

*Đ: đỏ, X: xanh dương, HQ: huỳnh quang, ĐC: đối chứng.*

Ánh sáng bên ngoài và ánh sáng giữa các nghiệm thức đèn LED sẽ được ngăn cách hoàn toàn bằng những tấm màng nhựa màu đen, đặc và dày (1 mm).

Với mật độ đèn đã được thiết lập, trong mỗi ô thí nghiệm, độ cao đèn sẽ được điều chỉnh để cường độ chiếu sáng đo ở bề mặt bình nuôi cấy vừa đạt như cường độ mà nghiệm thức đã dự kiến. Sau khi bố trí số đèn LED với tỷ lệ và cường độ chiếu sáng tương ứng cho từng nghiệm thức (Bảng 2.1), cường độ chiếu sáng của đèn LED ở 4 mức (200 lux, 400 lux, 600 lux, 800 lux) và đèn huỳnh quang (2000 lux) ở các nghiệm thức được kiểm tra lại bằng máy đo cường độ ánh sáng (Lux kế).

### c. Cách thức thực hiện

Quả lan thí nghiệm thuộc giống lan *Dendrobium* mini được thu sau 2,5 tháng kể từ khi đậu quả. Cách khử trùng quả và gieo hạt tương tự thí nghiệm 1A. Đèn LED đỏ, đèn LED xanh dương được sử dụng trong thí nghiệm. Môi trường được chỉnh pH = 5,8 và cho vào bình nuôi cấy có dung tích là 250 mL, mỗi bình chứa 50 mL môi trường. Hạt lan hóa xanh (15 ngày sau gieo hạt) ở từng nghiệm thức được trải đều trên bề mặt

môi trường để đếm tổng số hạt cấy (hạt hóa xanh và hạt nâu), sau đó tiếp tục theo dõi và đếm số hạt lan nảy mầm ở thời điểm 39 ngày sau gieo hạt.

d. Chỉ tiêu theo dõi

- Theo dõi và đếm số hạt lan nảy mầm ở thời điểm 39 ngày sau gieo hạt.

- Tỷ lệ nảy mầm (%) = Số hạt nảy mầm/Tổng số hạt gieo x 100%

### **2.1.2.2. Thí nghiệm 2B: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng tối ưu từ đèn LED đơn sắc đến sự tạo chồi lan *Dendrobium in vitro***

a. Vật liệu

Protocorm từ thí nghiệm 2A có đường kính 3 mm; Môi trường nhân chồi lan lai *Dendrobium* thấp cây là môi trường tốt nhất từ kết quả thí nghiệm 1: ½ MS + nước dừa 150 mL/L + saccharose 20 g/L + agar 7 g/L + khoai tây 50 g/L + than hoạt tính 0,5 g/L.

b. Bố trí thí nghiệm

Tương tự thí nghiệm 2A.

c. Cách thức thực hiện

Protocorm từ thí nghiệm 2A có đường kính 3 mm được cấy chuyển qua môi trường nhân chồi. Sau 8 tuần cấy chuyển, protocorm phát triển thành chồi. Chọn những chồi khỏe, chiều cao từ  $1 \pm 0,25$  cm, có 1 hoặc 2 lá để cấy chuyển và theo dõi ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến hệ số nhân protocorm, tỷ lệ tạo chồi, hệ số nhân chồi lan *Dendrobium mini in vitro* sau 4 tuần cấy chuyển.

d. Chỉ tiêu theo dõi

- Giai đoạn protocorm: Tính hệ số nhân protocorm (HSN) theo công thức:

+  $HSN = \frac{\text{Tổng số lượng protocorm sau 8 tuần cấy chuyển}}{\text{Tổng số lượng protocorm ban đầu}}$ .

- Giai đoạn chồi: Tính tỷ lệ tạo chồi ở thời điểm sau 4 tuần cấy chuyển theo công thức:  $\text{Tỷ lệ tạo chồi (\%)} = \frac{\text{Tổng số chồi phát sinh} \times 100}{\text{Tổng số chồi ban đầu}}$ .

- Hệ số nhân chồi (HSNC) = Tổng số chồi tạo ra/3.

(Số chồi: đếm tất cả các chồi mới hình thành có chiều cao > 5 mm).



### **2.1.2.3. Thí nghiệm 2C: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng tối ưu từ đèn LED đơn sắc đến sự tạo rễ lan *Dendrobium in vitro***

#### a. Vật liệu

Chồi lan từ thí nghiệm 2B có chiều cao từ  $2 \pm 2,25$  cm, có 1 – 2 lá. Môi trường tạo rễ lan lai *Dendrobium* thấp cây là môi trường tốt nhất từ kết quả thí nghiệm 1: MS+ nước dừa 150 mL/L + saccharose 20 g/L + agar 7 g/L + khoai tây 50 g/L + than hoạt tính 0,5 g/L.

#### b. Bố trí thí nghiệm

Tương tự thí nghiệm 2A.

#### c. Cách thức thực hiện

Chọn những chồi khô, chiều cao từ 2 - 2,25 cm, có 1 – 2 lá để cấy chuyển qua môi trường tạo rễ, mỗi bình 3 chồi để theo dõi ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến sự hình thành và phát triển rễ từ chồi lan *Dendrobium* thấp cây.

#### d. Chỉ tiêu theo dõi

- Số rễ trung bình/chồi = Tổng số rễ/3 (Đếm những rễ có chiều dài trên 1 cm).

- Chiều dài rễ trung bình (cm) = Tổng chiều dài rễ/3 (Dùng thước có chia vạch đo chiều dài của rễ dài nhất và đo từ góc rễ đến chóp rễ).

### **2.1.3. Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thí nghiệm 1 được thu thập ở các mốc thời gian đã xác định và xử lý, phân tích bằng phần mềm SPSS phiên bản 19.0.

Số liệu thí nghiệm 2 được phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và SAS 9.1. So sánh nghiệm thức tốt nhất nuôi dưới hệ thống đèn LED với nghiệm thức đối chứng nuôi dưới đèn huỳnh quang thông qua việc thực hiện kiểm tra trắc nghiệm T – test.

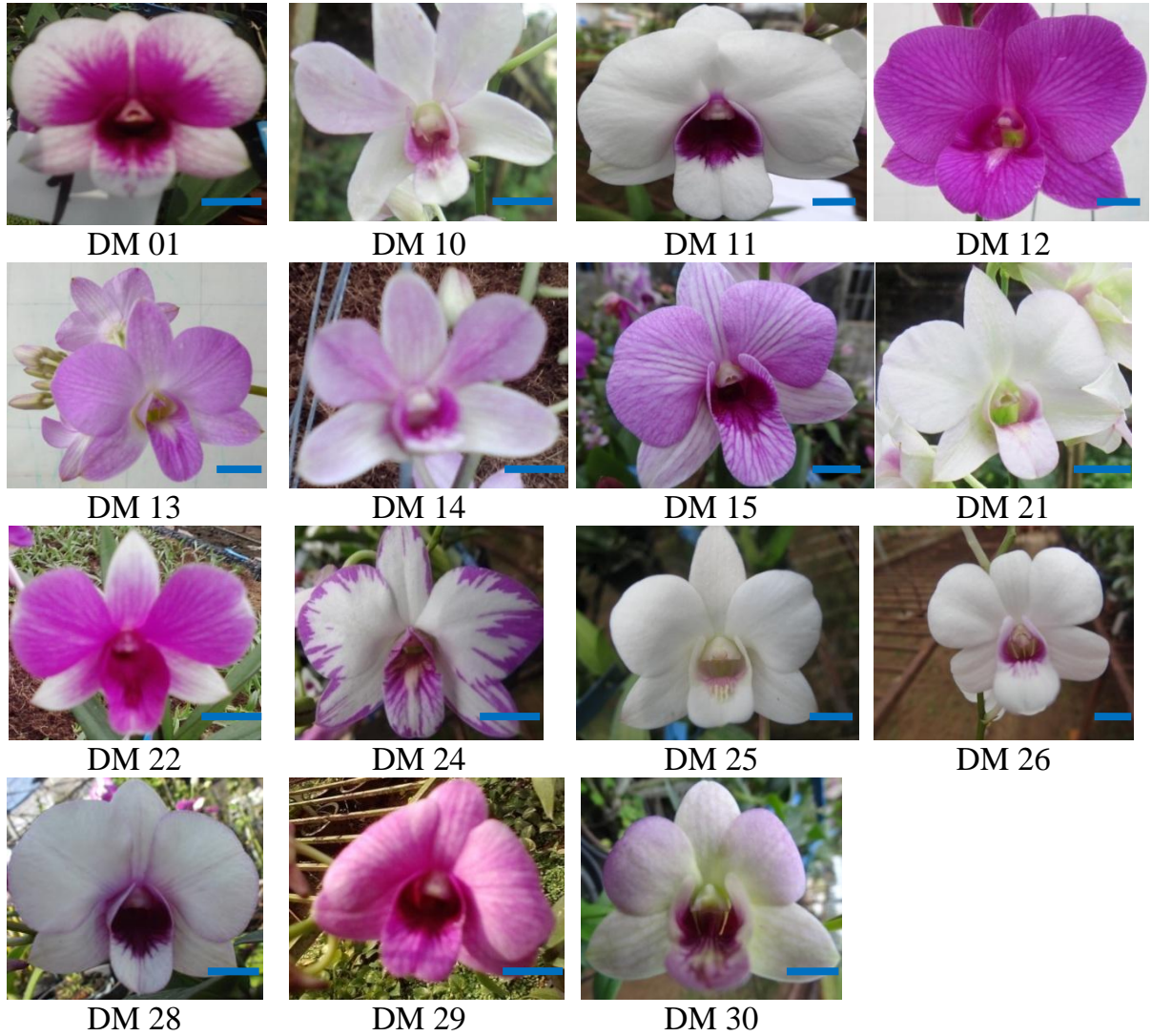
## **2.2. Nội dung 2. Lai tạo hoa lan *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng**

### **2.2.1. Thí nghiệm 3. Lai tạo một số tổ hợp lai *Dendrobium* thấp cây**

#### **2.2.1.1. Vật liệu**

15 giống lan *Dendrobium* mini thuộc bộ sưu tập tại Trạm Huấn luyện và Thực nghiệm Nông nghiệp Văn Thánh thuộc Trung tâm Khuyến Nông TP.HCM. Các giống

*Dendrobium* mini này được nhập nội từ Thái Lan, được thuần dưỡng và theo dõi sinh trưởng, phát triển tại thời điểm cây 16 - 18 tháng tuổi. Kiểu hình hoa, đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 15 giống *Dendrobium* mini bố mẹ thể hiện qua Hình 2.4 và Bảng 2.2.



Ghi chú: thanh ngang có kích thước 1 cm.

**Hình 2.3.** Kiểu hình hoa của 15 giống *Dendrobium* mini bố mẹ được sử dụng để lai tạo

**Bảng 2.2.** Đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 15 giống *Dendrobium* mini bố mẹ thuộc bộ sưu tập tại Trạm Huấn luyện và Thực nghiệm Nông nghiệp Văn Thánh được sử dụng làm vật liệu lai tạo

Kí hiệu giống	Chiều cao cây (cm)	Giả hành		Lá			Hoa				
		Chiều cao (cm)	Số giả hành (giả hành)	Số lá (lá)	Dài lá (cm)	Rộng lá (cm)	Số phát hoa/ cây (phát hoa)	Đường kính (cm)	Số hoa/ phát hoa (hoa)	Chiều dài phát hoa (cm)	Màu sắc hoa
DM01	21	11,0	12,0	6,7	11,1	3,7	6,0	4,5	11,5	28,0	Tím trắng
DM10	16	9,5	4,0	4,5	9,4	3,4	1,0	4,2	19,0	23,0	Trắng tím nhạt
DM11	25	17,4	4,0	5,3	13,8	4,6	2,0	6,4	9,0	28,9	Trắng lưỡi tím đậm
DM12	21	12,3	4,0	5,3	12,2	4,1	2,0	6,3	8,7	21,8	Tím đậm sọc
DM13	20	11,0	4,0	5,7	9,6	4,8	3,0	4,5	9,3	24,0	Tím nhạt
DM14	18	7,3	5,0	4,7	8,5	2,8	2,0	4,0	7,2	20,0	Trắng phớt hồng
DM15	20	11,7	3,0	5,5	11,2	2,8	2,0	5,6	12,0	20,4	Tím nhạt sọc
DM21	23	18,1	5,0	5,7	13,1	4,4	1,0	4,7	14,0	30,0	Trắng tím
DM22	22	3,3	6,0	3,0	8,4	2,8	1,0	4,6	10,0	20,0	Tím trắng
DM24	20	8,5	6,0	4,0	11,5	3,8	2,0	4,9	12,7	28,7	Trắng viền tím
DM25	17	9,7	6,0	5,0	9,1	2,8	3,0	4,3	7,5	16,6	Trắng lưỡi tím nhạt
DM26	16	9,5	4,0	4,5	10,5	3,5	1,0	4,2	6,5	13,4	Trắng lưỡi tím
DM28	18	11,1	6,0	4,7	10,6	2,9	1,0	4,6	8,0	20,3	Trắng lưỡi tím, cánh môi dài
DM29	15	8,3	3,0	4,3	8,3	2,9	1,0	4,3	7,0	15,0	Tím nhạt sọc
DM30	17	9,9	5,0	4,7	10,1	2,7	1,0	4,5	4,0	13,4	Trắng hồng

### 2.2.1.2. Bố trí các cặp lai

Dựa vào các đặc điểm hình thái về chiều cao, số hoa trên phát hoa, đường kính hoa, cấu trúc và màu sắc hoa của bố, mẹ và các đặc điểm mong đợi của con lai để bố trí các cặp lai cho phù hợp.

Tiêu chí chọn dòng lai *Dendrobium* thấp cây triển vọng theo định hướng: có chiều cao cây từ 15 - 20 cm, số giả hành từ 3 – 6 giả hành, số lá từ 4 – 6 lá, số hoa/phát hoa từ 6 hoa trở lên, đường kính hoa từ 4,5 cm trở lên, có màu sắc hoa khác với bố mẹ. Bố trí cặp lai và tính trạng định hướng con lai thể hiện ở Bảng 2.3.

**Bảng 2.3.** Bố trí cặp lai và tính trạng kỳ vọng đối với con lai

STT	Mã hóa (Name code)	Tổ hợp lai (Mẹ x Bố)	Tính trạng kỳ vọng đối với con lai
1	DM01x12	DM01 x DM12	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như nhiều hoa, phát hoa dài; mang đặc tính hoa to, lâu tàn của cây bố.
2	DM10x01	DM10 x DM01	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như nhiều hoa, phát hoa dài, mang đặc tính hoa to, lâu tàn của cây bố.
3	DM11x18	DM11 x DM18	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như hoa to, nhiều hoa, phát hoa dài và dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
4	DM12x11	DM12 x DM11	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như hoa to, nhiều hoa và mang đặc tính chiều dài phát hoa dài, hoa dày, lâu tàn của cây bố. Dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
5	DM11x12	DM11 x DM12	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như hoa to, dày, lâu tàn, nhiều hoa, phát hoa dài và dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
6	DM13x11	DM13 x DM11	Con lai kế thừa tính trạng kiểu hình thân lá của cây mẹ và cải thiện tính trạng chiều dài phát hoa dài, hoa dày, lâu tàn của cây bố.
7	DM24x11	DM24 x DM11	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như nhiều hoa, phát hoa dài, cấu trúc màu sắc hoa của mẹ và mang đặc tính hoa to, dày, lâu tàn của cây bố.
8	DM11x24	DM11 x DM24	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như hoa to, dày, lâu tàn và mang đặc tính nhiều hoa, cấu trúc màu sắc hoa của cây bố.
9	DM24x01	DM24	Con lai kế thừa tính trạng cấu trúc màu sắc

		x	hoa của mẹ và mang đặc tính nhiều phát hoa nở cùng lúc, siêng hoa của cây bố.
		DM01	
		DM13	Con lai kế thừa tính trạng kiểu hình thân lá của cây mẹ, mang đặc tính siêng hoa và cấu trúc màu sắc hoa của cây bố.
10	DM13x24	x	
		DM24	
		DM14	Con lai kế thừa tính trạng kiểu hình thân lá của cây mẹ, mang đặc tính hoa to và siêng hoa và cấu trúc màu sắc hoa của cây bố.
11	DM14x12	x	
		DM12	
		DM12	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như hoa to, nhiều hoa, phát hoa dài và mang đặc tính phát hoa dài và kiểu hình thân lá của cây bố
12	DM12x13	x	
		DM 13	
		DM13	Con lai kế thừa tính trạng kiểu hình thân lá của cây mẹ, mang đặc tính hoa to và siêng hoa của cây bố.
		DM12	
		DM26	Con lai kế thừa tính trạng cấu trúc màu sắc hoa của cây mẹ và có kiểu hình thân lá của cây bố.
14	DM26x13	x	
		DM13	
		DM12	Con lai mang đặc tính của cây mẹ như hoa to, nhiều hoa, phát hoa dài và dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
15	DM12x14	x	
		DM14	
		DM26	Con lai cải thiện tính trạng cấu trúc màu sắc, siêng hoa của cây bố. Dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
16	DM26x24	x	
		DM24	
		DM15	Con lai cải thiện tính trạng số giả hành, số phát hoa nở cùng lúc của cây bố và dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
17	DM15x25	x	
		DM25	
		DM25	Con lai kế thừa tính trạng số giả hành, số phát hoa nở cùng lúc của cây bố và dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
18	DM25x26	x	
		DM26	
		DM28	Con lai kế thừa cấu trúc, màu sắc, siêng hoa của cây mẹ và dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
19	DM28x26	x	
		DM26	
		DM28	Con lai kế thừa cấu trúc, màu sắc, siêng hoa của cây mẹ và dễ tạo ra ưu thế lai về màu sắc hoa tương phản của bố và mẹ.
20	DM28x30	x	
		DM30	

### 2.2.1.3. Cách thức thực hiện

Dựa trên cơ sở của phương pháp lai hữu tính Đỗ Khắc Thịnh (2011) đã thực hiện trên lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis*) (chi tiết các bước lai tạo được thể hiện ở phụ lục 5). Vị trí thực hiện sự thụ phấn là hoa đầu tiên đến hoa thứ 5.

Mỗi tổ hợp lai 9 hoa. Sự hình thành của quả tính từ sau khi thụ phấn 10 ngày.

### 2.2.1.4. Các chỉ tiêu theo dõi/đánh giá

- Theo dõi quá trình thụ phấn, phát triển của quả:
  - + Thời điểm hoa héo 50% (ngày): Tính từ khi thụ phấn đến khi cánh hoa có biểu hiện héo.
  - + Thời điểm hoa héo hoàn toàn (ngày): Tính từ khi thụ phấn đến khi cánh hoa héo hoàn toàn và cuống hoa có biểu hiện phình to.
  - + Chiều dài quả (cm): Đo chiều dài khi quả đã già.
  - + Đường kính quả (cm): Đo ở vị trí phình to nhất khi quả đã già.
  - + Khối lượng quả (g): cân khối lượng ngay khi thu hoạch quả.
  - + Hình dạng quả: Ghi nhận hình dạng quả khi quả đã già.
- Tỷ lệ đậu quả của các tổ hợp lai: Tỷ lệ quả đậu (%) = (số quả thu được/số hoa đã lai) x 100.
- Thời gian thu hoạch quả (ngày): Tính từ khi thụ phấn đến khi cuống quả chuyển từ xanh sang vàng.
- Tỷ lệ quả không hạt (%) = (số quả không hạt/tổng số quả thu được) x 100.

## 2.2.2. Thí nghiệm 4. Đánh giá sự nảy mầm và sinh trưởng của các hạt lai trong điều kiện *in vitro*

### 2.2.2.1. Vật liệu

Quả lan *Dendrobium* thấp cây được lai tạo từ các giống sưu tập. Môi trường gieo hạt, nhân chồi và tạo rễ lan lai *Dendrobium* thấp cây: tương tự thí nghiệm 2 (trang 42). Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ 24 - 26 °C, điều kiện ánh sáng là kết quả tốt nhất từ thí nghiệm 2.

### 2.2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Giai đoạn gieo hạt: bố trí tuần tự không lặp lại với 15 nghiệm thức tương ứng với 15 tổ hợp lai đậu quả, mỗi bình gieo 9 cụm hạt. Sau 20 ngày, cấy chuyển qua bình mới, mỗi bình cấy 50 protocorm, mỗi nghiệm thức 10 bình.

Giai đoạn chồi và tạo rễ: bố trí tuần tự không lặp lại với 9 nghiệm thức tương ứng với 9 tổ hợp lai có tỷ lệ nảy mầm tốt nhất, mỗi nghiệm thức cấy 5 bình, mỗi bình 10 chồi.

### 2.2.2.3. Cách thức thực hiện

Phương pháp khử trùng và gieo hạt: tương tự thí nghiệm 1 (trang 39). Sau 30 ngày gieo hạt, hạt đã hóa xanh chuyển thành dạng protocorm, cấy chuyển sang bình mới. Khi chồi đạt chiều cao khoảng 2 cm, chọn những chồi có kích thước đều nhau để cấy chuyển qua môi trường nhân chồi, mỗi bình cấy 10 chồi. Cấy chuyển 2 lần trên môi trường nhân chồi, mỗi lần cách nhau 2 tháng, sau đó cấy chuyển sang môi trường tạo rễ.

## 2.2.3. Thí nghiệm 5. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển, đặc điểm hoa và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng

### 2.2.3.1. Vật liệu và thiết bị

Chín tổ hợp lan lai *Dendrobium* thấp cây, mỗi tổ hợp lai chọn ngẫu nhiên 30 cây đủ tiêu chuẩn đưa ra trồng trong nhà lưới (cây cao từ 5 - 6 cm, có 3 - 4 lá).

Giá thể trồng lan: 100% xơ dừa đã qua xử lý.

### 2.2.3.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu tuần tự không lặp lại. Mỗi tổ hợp có 30 cây (cá thể) và toàn bộ số cây theo dõi thí nghiệm được đánh dấu theo thứ tự từ 1 đến 270. Tổng số chậu (cá thể) lan theo dõi:  $9 \times 30 = 270$  (chậu). Trong đó:

- Tổ hợp DM01x12: được mã hóa theo thứ tự từ DM01x12:01 đến DM01x12:30.
- Tổ hợp DM10x01: được mã hóa theo thứ tự từ DM10x01:31 đến DM10x01:60.
- Tổ hợp DM11x12: được mã hóa theo thứ tự từ DM11x12:61 đến DM11x12:90.

- Tổ hợp DM11x18: được mã hóa theo thứ tự từ DM11x12:91 đến DM11x12:120.
- Tổ hợp DM11x24: được mã hóa theo thứ tự từ DM11x24:121 đến DM11x24:150.
- Tổ hợp DM12x11: được mã hóa theo thứ tự từ DM11x24:151 đến DM11x24:180.
- Tổ hợp DM12x13: được mã hóa theo thứ tự từ DM12x13:181 đến DM12x13:210
- Tổ hợp DM12x14: được mã hóa theo thứ tự từ DM12x14:211 đến DM12x14:240
- Tổ hợp DM24x11: được mã hóa theo thứ tự từ DM12x13:241 đến DM12x13:270.

### **2.2.3.3. Cách thức thực hiện**

Sau 6 tháng nuôi cấy *in vitro*, đưa cây con ra vườn ươm để thuần dưỡng 4 tuần, sau đó bố trí cây lan con vào chậu, mỗi chậu một cây.

Quy trình trồng và chăm sóc lan theo quy trình của Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Công nghệ cao TP.HCM (2011).

### **2.2.3.4. Chỉ tiêu theo dõi**

*Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá đặc điểm lá, cây:*

- + Số lá/cây (lá): đếm số lá trên cây
- + Chiều dài lá (cm): chọn lá lớn nhất trên cây để đo, đo từ gốc lá đến chóp lá.
- + Chiều rộng lá (cm): chọn lá lớn nhất trên cây để đo, đo khoảng cách 2 mép lá ở vị trí giữa lá.
- + Chiều cao giả hành (cm): chọn giả hành cao nhất, đo từ gốc đến cổ lá cao nhất.
- + Chiều cao cây (cm): chọn giả hành cao nhất, đo từ gốc đến chóp lá cao nhất.
- + Đường kính giả hành (cm): chọn thân cao nhất để đo, đo đường kính ở vị trí giữa thân
- + Số giả hành: đếm số giả hành của cây ở thời điểm cây trưởng thành

*Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá đặc điểm hoa:*

- + Chiều dài phát hoa (cm): đo chiều dài cuống chính của phát hoa
- + Số hoa trên phát hoa (hoa): đếm tất cả số hoa trên 1 phát hoa



- + Số phát hoa/cây: đếm số phát hoa trên tất cả các giả hành của cây
- + Mô tả cấu trúc, màu sắc hoa: ghi nhận cấu trúc sắp xếp cánh hoa (hở hay kín), màu sắc cánh hoa, cánh môi.
- + Thời gian ra hoa (tháng): tính từ khi trồng đến khi cây xuất hiện phát hoa
- + Thời gian hoa nở (ngày): tính từ lúc cây xuất hiện phát hoa đến khi hoa đầu tiên nở.
- + Tuổi thọ hoa (ngày): tính từ lúc hoa đầu tiên nở đến lúc hoa đầu tiên tàn.
- + Mùa trở hoa: ghi nhận mùa ra hoa.

Trên cơ sở các thông số trên chọn lọc ra được một số dòng lan lai có triển vọng từ các con lai để đánh giá đặc điểm di truyền.

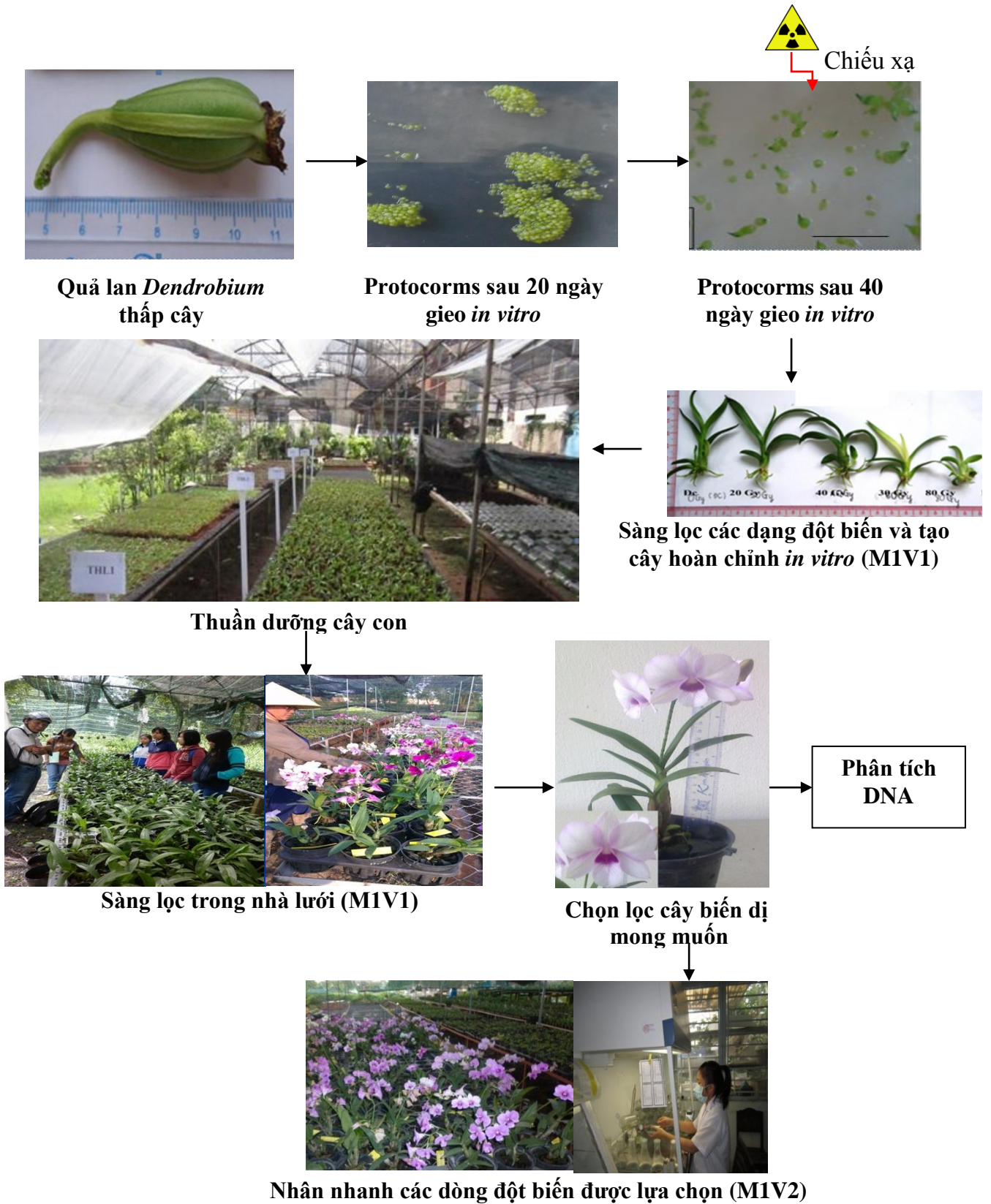
### **2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thí nghiệm 3 và 4 được thu thập ở các mốc thời gian đã xác định và xử lý, phân tích bằng phần mềm SPSS phiên bản 19.0.

Từ các số liệu ghi nhận được về đặc điểm lá, cây và đặc điểm hoa thuộc thí nghiệm 5, sử dụng phần mềm Minitab để phân nhóm mối quan hệ di truyền giữa các cá thể trong mỗi tổ hợp lai và xác định khoảng cách di truyền dựa trên đặc điểm hình thái.

### **2.3. Nội dung 3. Chiếu xạ gây đột biến *in vitro* protocorm lan *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng**

Chiếu xạ gây đột biến *in vitro* protocorm lan *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng được thực hiện theo sơ đồ sau:



**Hình 2.4.** Các bước tạo dòng lan *Dendrobium* thắp cây đột biến

Tiêu chí chọn dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến triển vọng theo định hướng: có chiều cao cây từ 15 - 20 cm, số giả hành từ 3 – 6 giả hành, số lá từ 4 – 6 lá, số hoa/phát hoa từ 6 hoa trở lên, đường kính hoa từ 4,5 cm trở lên, có màu sắc hoa khác với bố mẹ.

### **2.3.1. Thí nghiệm 6. Ảnh hưởng của liều tia gamma $^{60}\text{Co}$ đến sinh lý và xác định LD<sub>50</sub> trong điều kiện *in vitro***

#### **2.3.1.1. Thí nghiệm 6A. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ gamma $^{60}\text{Co}$ đến tỷ lệ chết và xác định LD<sub>50</sub> của tổ hợp lai *Dendrobium* thấp cây DM12x13**

##### a. Vật liệu

- Protocorm của tổ hợp lai *Dendrobium* thấp cây DM12x13.
- Nguồn tia gamma  $^{60}\text{Co}$  (Issledavachel, Liên Xô cũ) tại Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt, suất liều 90 Gy/h, liều xạ 0 Gy (đối chứng), 20, 40, 60, 80 và 100 Gy.
- Môi trường và điều kiện nuôi cấy tương tự thí nghiệm 4.

##### b. Bố trí thí nghiệm

Bố trí theo kiểu tuần tự không lặp lại, số nghiệm thức tương ứng với 6 liều chiếu xạ khác nhau 0, 20, 40, 60, 80, 100 Gy, mỗi nghiệm thức 3 đĩa petri, mỗi đĩa petri 100 protocorm. Tổng số bình thí nghiệm: 6 liều xạ x 3 đĩa x 10 bình = 180 bình, mỗi bình 10 protocorm.

##### c. Cách thức thực hiện

Phương pháp khử trùng và gieo hạt tương tự thí nghiệm 1. Sau 30 ngày nuôi cấy, hạt đã hóa xanh chuyển thành dạng protocorm, cấy chuyển sang đĩa petri chứa môi trường mới, mỗi đĩa petri cấy 100 protocorm để tiến hành chiếu xạ sau 10 ngày cấy chuyển. Sau khi chiếu xạ 7 ngày, cấy chuyển protocorm sang bình thủy tinh để theo dõi, mỗi đĩa cấy chuyển thành 10 bình, mỗi bình 10 protocorm để tránh rủi ro về nhiễm khuẩn, tạo thông thoáng cho sự phát triển của protocorm và để xác định tỷ lệ chết của protocorm sau chiếu xạ.

##### d. Chỉ tiêu theo dõi

- Tỷ lệ chết của protocorm sau chiếu xạ sau 3 tháng, 5 tháng và 7 tháng, được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ chết (\%)} = \frac{\text{Số protocorm chết}}{\text{Tổng số protocorm}} \times 100.$$

\* Quy ước; protocorm được xem là chết khi hóa nâu hoặc không tái sinh được thành chồi.

- Xác định liều lượng chiếu xạ gây chết 50% (Sensitive dose) theo mô tả của Randhawa (2009).

### **2.3.1.2. Thí nghiệm 6B. Ảnh hưởng của liều xạ gamma $^{60}\text{Co}$ đến khả năng gây đột biến và đánh giá sự sinh trưởng của các biến dị thuộc tổ hợp lai DM12x13 trong điều kiện *in vitro***

#### a. Vật liệu

- Protocorm của tổ hợp lai DM12x13 sau chiếu xạ ở các liều 0, 20, 40, 60, 80 Gy.

- Môi trường và điều kiện nuôi cấy tương tự thí nghiệm 4.

#### b. Bố trí thí nghiệm

Tương tự thí nghiệm 6A.

#### c. Cách thức thực hiện

Ở thời điểm 7 ngày sau chiếu xạ, protocorm được cấy chuyển qua môi trường nhân chồi. Theo dõi tác động của tia xạ lên chiều cao của cây, số lá theo thời gian. Chọn lọc các cây *in vitro* có biểu hiện biến dị và mô tả sự biểu hiện qua kiểu hình lá, màu sắc lá, kiểu hình thân, màu sắc thân, các biến dị lạ.

#### d. Chỉ tiêu theo dõi

- Theo dõi tác động của tia xạ lên chiều cao cây (cm), số lá theo thời gian;

- Số dòng biến dị.

- Tần suất biến dị:  $f\% = f/n \times 100$  (f: số cá thể biến dị trong lô; n: số lượng cá thể trong lô).

- Ghi nhận các biến dị lạ khác biệt so với bố mẹ:

\* Kiểu hình lá: cách bố trí lá trên thân, hình dạng và màu sắc của lá.

\* Kiểu hình thân: nhiều giả hành hoặc sự xuất hiện nhiều chồi trên thân, hình dạng và màu sắc của thân.

### **2.3.2. Thí nghiệm 7. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển, đặc điểm hoa và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng**

#### **2.3.2.1. Vật liệu**

Những cây con có xuất hiện biến dị, đủ tiêu chuẩn đưa ra trồng trong nhà lưới (cây cao từ 5 - 6 cm, có 3 - 4 lá).

#### **2.3.2.2. Bố trí thí nghiệm**

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu tuần tự không lặp lại, với 5 nghiệm thức tương ứng với 5 liều xạ, mỗi liều xạ có từ 18 - 54 cây (cá thể) và toàn bộ số cây theo dõi thí nghiệm được đánh dấu theo thứ tự từ 1 đến 177, trong đó:

- Liều xạ 0 Gy (Đối chứng): được mã hóa theo thứ tự từ DM12x13-0Gy:01 đến DM12x13-0Gy:30.

- Liều xạ 20 Gy: được mã hóa theo thứ tự từ DM12x13-20Gy:31 đến DM12x13-20Gy:57.

- Liều xạ 40 Gy: được mã hóa theo thứ tự từ DM12x13-40Gy:58 đến DM12x13-40Gy:101.

- Liều xạ 60 Gy: được mã hóa theo thứ tự từ DM12x13-60Gy:102 đến DM12x13-60Gy:159.

- Liều xạ 80 Gy: được mã hóa theo thứ tự từ DM12x13-80Gy:160 đến DM12x13-80Gy:177.

#### **2.3.2.3. Cách thức thực hiện**

Các biến dị *in vitro* ở thí nghiệm 6B đủ tiêu chuẩn được đem ra vườn ươm để thuần dưỡng 4 tuần, sau đó bố trí cây lan con vào chậu, mỗi chậu một cây, giá thể là vỏ dừa khô.

Kỹ thuật trồng và chăm sóc lan tương tự thí nghiệm 5.

#### **2.3.2.4. Chỉ tiêu theo dõi**

Tương tự thí nghiệm 5. Trên cơ sở các thông số thí nghiệm, chọn lọc ra được một số dòng đột biến có triển vọng để đánh giá đặc điểm di truyền.

### 2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm 6 và 7 được phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

## 2.4. Nội dung 4. Đánh giá sự khác biệt di truyền và nhân giống một số dòng lai, dòng đột biến có triển vọng

### 2.4.1. Thí nghiệm 8. Sử dụng chỉ thị phân tử đánh giá sự khác biệt di truyền một số dòng lai và dòng đột biến có triển vọng

#### 2.4.1.1. Vật liệu thí nghiệm

Lá non của 8 giống lan *Dendrobium* mini được chọn làm bố mẹ, 8 cá thể con lai, 3 cá thể đột biến có triển vọng.

#### 2.4.1.2. Phương pháp nghiên cứu

##### a. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Trong nghiên cứu này, kế thừa phương pháp tách DNA có sử dụng CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) của Obara-Okeyo và Kako (1998) làm cơ sở và một số điều chỉnh nhỏ để tách chiết DNA tổng số của các mẫu lan *Dendrobium* thấp cây mới chọn lọc và bố mẹ.

##### b. Kiểm tra DNA trên gel agarose

- Lấy 5  $\mu$ L mẫu DNA trộn với 4 - 5  $\mu$ L loading dye (saccharose 40%, 0,001% Bromphenol Blue trong đệm TAE 1X, pH 8) cho vào giếng.
- Điện di ở 100 V, cường độ 3 A trong thời gian 15 phút.
- Soi băng gel điện di dưới đèn tia UV và chụp ảnh băng gel.

##### c. Kiểm tra DNA bằng máy đo quang phổ

Sau khi thu nhận được nucleic acid, xác định hàm lượng của DNA bằng máy đo quang phổ.

##### d. Thực hiện phản ứng RAPD

**Bảng 2.4.** Tên và trình tự các primer RAPD được sử dụng trong nghiên cứu

Tên primer	Trình tự (5'-3')
OPA1	CAGGCCCTTC
OPA2	TGCCGAGCTG
OPA3	AGTCAGCCAC
OPA4	AATCGGGCTG
OPA5	AGGGGTCTTG
OPA9	GGGTAACGCC
OPA11	CAATCGCCGT
OPA13	CAGCACCCAC
OPA17	GACCGCTTGT
OPA18	AGGTGACCGT

Nguồn: các primer RAPD ở Bảng 2.4 thuộc nhóm OPA do hãng Operon cung cấp.

Các primer này đã được sử dụng trên cơ sở kế thừa kết quả nghiên cứu trên 10 giống lan rừng *Dendrobium* ở vùng Đông Nam Bộ của Việt Nam (Trần Thị Dung, 2010).

*\* Điều kiện phản ứng PCR*

Phản ứng PCR thực hiện trên máy Biorad với thể tích 25  $\mu$ L. Thành phần và nồng độ của các chất tham gia phản ứng như Bảng 2.5.

**Bảng 2.5.** Thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Nồng độ đầu	Nồng độ cuối/phản ứng
PCR buffer	10 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM
dNTPs	25 mM	0,2 mM
Primer	100 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M
Taq polymerase	5U/ $\mu$ L	1 U
DNA khuôn		25 ng
H <sub>2</sub> O		Vừa đủ 25 $\mu$ L

Phản ứng PCR được tiến hành trong ống Eppendorf 0,2 mL và thực hiện trên máy Biorad theo chu trình sau:

**Bảng 2.6.** Chu trình của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	94	4 phút	1
2	94	1 phút	45
	35	1 phút	
	72	4 phút	
3	72	7 phút	1
4	4	Giữ	

Sau khi kết thúc, sản phẩm PCR được bảo quản trong tủ lạnh 4°C cho đến khi tiến hành điện di.

\* Điện di sản phẩm PCR:

- Điện di trên gel agarose 1% (0,4 g agarose + 40 mL TAE 1X, đun tới khi agarose tan hết, để nguội xuống tới khoảng 50°C thì bổ sung thêm 3,5 µL EtBr, lắc đều và đổ vào khuôn gel có cài lược).

- Điều kiện điện di: điện thế 120 V, cường độ 3 A.

- Lấy 12 µL sản phẩm PCR trộn với 3 µL loading dye, đảo đều, cho vào giếng rồi tiến hành điện di.

- Sau khi điện di, soi bản gel dưới đèn UV và ghi nhận hình ảnh.

#### **2.4.2. Thí nghiệm 9. Nhân giống vô tính một số dòng lai triển vọng và đánh giá sự sinh trưởng trong điều kiện *in vitro***

##### **2.4.2.1. Vật liệu**

3 cá thể con lai có triển vọng: DM11x12:90, DM11x24:139 và DM12x11:180.

##### **2.4.2.2. Bố trí thí nghiệm**

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 bình, mỗi bình 9 mẫu. Số nghiệm thức là 3 nghiệm thức tương ứng với 3 cá thể con lai được chọn.



### 2.4.2.3. Cách thức thực hiện

Chồi của các dòng lan chọn lọc được khử trùng, tách bỏ lá và được cắt thành những lát mỏng theo chiều ngang (tTCL) với kích thước khoảng 1,0 - 1,5 mm. Lát mỏng tế bào được cấy lên môi trường cơ bản  $\frac{1}{2}$  MS có bổ sung BA 3 mg/L kết hợp với NAA 0,5 mg/L để phát sinh protocorm like body (PLBs) từ tTCL. Sau 2 tháng nuôi cấy, những PLBs thu được có sức sống tốt, được tách thành cụm nhỏ có kích thước 0,3×0,3 cm với khoảng 4 - 6 PLB, được cấy lên môi trường cơ bản MS có bổ sung BA 1 mg/L và NAA 1 mg/L. Sau 2 tháng, PLBs có sức sống tốt lại được tách thành cụm nhỏ có kích thước 0,3×0,3 cm với khoảng 4 - 6 PLBs, được cấy lên môi trường cơ bản MS có bổ sung BA 1 mg/L và NAA 1 mg/L. Các PLBs này được chuyển lên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS + nước dừa 150 mL/L + saccharose 20 g/L + agar 7 g/L + khoai tây 50 g/L + than hoạt tính 0,5 g/L để hình thành chồi sau 6 tuần nuôi cấy. Sau 2 lần cấy chuyển, mỗi lần cách nhau 2 tháng, chồi được cấy qua môi trường MS có bổ sung saccharose 30 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 200 mL/L + agar 8 g/L + than hoạt tính 0,5 g/L + chất điều hòa sinh trưởng NAA với nồng độ 2 mg/L để tạo rễ (Phụ lục 11).

### 2.4.2.4. Chỉ tiêu theo dõi

- Số lượng chồi (chồi), chiều cao chồi (cm), số lượng rễ (rễ) và chiều dài rễ (cm): tương tự thí nghiệm 1 (trang 39).

## 2.4.3. Thí nghiệm 10. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển và đặc điểm hoa một số dòng lai triển vọng trong điều kiện nhà lưới

### 2.4.3.1. Vật liệu

Cây con đủ tiêu chuẩn về thân, lá, rễ của 3 dòng con lai triển vọng thuộc thí nghiệm 9, mỗi dòng 300 cây.

### 2.4.3.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại, số nghiệm thức tương ứng với 3 dòng con lai được chọn. Mỗi ô cơ sở 100 cây.

### 2.4.3.3. Cách thức thực hiện

Sau 2 tháng từ khi xử lý tạo rễ, chọn những cây con có chiều cao đồng đều (3 - 4 cm, có từ 4 - 5 lá) chuyển ra vườn ươm để ươm khoảng 3 - 4 tuần. Cây lan con

được trồng trong chậu, mỗi chậu một cây, giá thể là dứa miếng. Quy trình trồng và chăm sóc lan tương tự thí nghiệm 5.

#### **2.4.3.4. Chỉ tiêu theo dõi**

- Chiều cao cây (cm), chiều cao giả hành (cm), số giả hành (giả hành), đường kính giả hành (cm), số lá (lá), chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) ở thời điểm 8 tháng sau trồng.

- Chiều dài phát hoa (cm), số hoa/phát hoa (hoa), đường kính hoa (cm), tỷ lệ cây ra hoa (%).

Cách đo đếm chỉ tiêu tương tự thí nghiệm 5.

#### **2.4.4. Thí nghiệm 11. Nhân giống vô tính một số dòng đột biến triển vọng và đánh giá sự sinh trưởng trong điều kiện *in vitro***

##### **2.4.4.1. Vật liệu**

3 dòng đột biến có triển vọng: Dòng DM12x13-20Gy:38, Dòng DM12x13-40Gy:76, Dòng DM12x13-60Gy:142.

##### **2.4.4.2. Bố trí thí nghiệm**

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 bình, mỗi bình 9 mẫu. Số nghiệm thức là 3 nghiệm thức tương ứng với 3 dòng đột biến được chọn.

##### **2.4.4.3. Cách thức thực hiện**

Tương tự thí nghiệm 9.

##### **2.4.4.4. Chỉ tiêu theo dõi**

Tương tự thí nghiệm 9.

#### **2.4.5. Thí nghiệm 12. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển và đặc điểm hoa một số dòng đột biến triển vọng trong điều kiện nhà lưới**

##### **2.4.5.1. Vật liệu**

Cây con đủ tiêu chuẩn về thân, lá, rễ của 3 dòng đột biến triển vọng thuộc thí nghiệm 11, mỗi dòng 300 cây.

#### 2.4.5.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại, số nghiệm thức tương ứng với 3 dòng đột biến được chọn. Mỗi ô cơ sở 100 cây.

#### 2.4.5.3. Cách thức thực hiện

Tương tự thí nghiệm 10.

#### 2.4.5.4. Chỉ tiêu theo dõi

Tương tự thí nghiệm 10.

#### 2.4.6. Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích kết quả di truyền bằng phần mềm NTSYSpc: Từ kết quả phản ứng PCR – RAPD thí nghiệm 8 tiến hành xác định mức độ đa hình của các dòng *Dendrobium* bằng cách so sánh các phân đoạn DNA. Các phân đoạn được ghi nhận dựa trên sự có mặt hay không có mặt của chúng trên ảnh điện di. Nếu xuất hiện phân đoạn DNA kí hiệu là 1 và không thì kí hiệu là 0. Các số liệu thu được sẽ được xử lý và phân tích trong chương trình NTSYSpc version 2.1 (Numerical Taxonomy SYStem), số liệu này sẽ được xử lý để xây dựng ma trận tương đồng (Similarity matrix) hoặc ma trận khoảng cách (Distance matrix). Các ma trận này biểu hiện cho mối quan hệ xa gần về mặt di truyền giữa các mẫu phân tích và được xây dựng dựa trên công thức toán học của Nei và Li (1979):

$$S_{xy} = 2xy/(x + y)$$

Trong đó: xy: số băng giữa 2 mẫu

x: số băng của mẫu x

y: số băng của mẫu y

$S_{xy}$ : hệ số tương đồng giữa 2 mẫu x và y

Từ  $S_{xy}$  tính được khoảng cách di truyền giữa x và y:  $D_{xy} = 1 - S_{xy}$ .

Số liệu thí nghiệm 9,10,11 và 12 được thu thập ở các mốc thời gian đã xác định và xử lý, phân tích bằng phần mềm SPSS phiên bản 19.0.

## Chương 3

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Xác định môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây

##### 3.1.1. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây

Do hạt không có nội nhũ nên việc gieo hạt là bước đầu tiên và là một bước rất quan trọng trong công tác lai tạo và chọn giống lan *Dendrobium*. Nếu bước gieo hạt không hoàn thiện thì các bước tiếp theo không thể tiến hành và do đó toàn bộ quá trình chọn lọc con lai sẽ không cho kết quả như mong đợi. Nhiều tác giả đã sử dụng môi trường Vacin và Went (VW) và Murashige và Skoog (MS) trong nuôi cấy mô và gieo hạt nhiều loài thuộc họ lan (Vũ Ngọc Lan, 2013). Kết quả về sự chuyển biến hình thái của hạt lan *Dendrobium* thấp cây khi gieo trên ba môi trường MS, ½ MS và VW (đều có bổ sung saccharose 30 g/L + agar 7 g/L) được thể hiện qua Bảng 3.1.

Hạt lan rất khó nảy mầm trong tự nhiên (chỉ nảy mầm từ 1 – 2%) do hạt lan có kích thước rất nhỏ và không chứa chất dinh dưỡng dự trữ. Việc gieo hạt lan được thực hiện trong phòng thí nghiệm là bắt buộc trong công tác lai tạo giống lan (Dương Hoa Xô, 2011). Bảng 3.1 cho thấy tại thời điểm 60 ngày sau khi gieo, các protocorm trên môi trường MS và ½ MS phát triển đồng đều với nhau có nhiều lá mầm khỏe, màu xanh tươi, mức độ nảy mầm lớn hơn 85%. Môi trường VW cũng có mức độ nảy mầm lớn hơn 85%, tuy nhiên do thành phần dinh dưỡng của môi trường VW thấp hơn môi trường MS nên protocorm trên môi trường VW nhỏ, có màu xanh nhạt và không phát triển nhanh như những hạt lan được gieo trên môi trường MS. Môi trường ½ MS tuy hàm lượng đa lượng chỉ bằng một nửa so với môi trường MS, nhưng trong giai đoạn gieo hạt tỷ lệ nảy mầm và chất lượng protocorm giống như môi trường MS, vì trong giai đoạn này các protocorm còn nhỏ nên sử dụng ít các nguyên tố đa lượng. Kết quả nghiên cứu này tương tự như nghiên cứu của Rajkumar Kishor và ctv (2006) khi gieo hạt loài lan lai *Ascocenda* ‘Kangla’: môi trường ½ MS hiệu quả nhất cho sự phát triển của hạt lai giữa *V. coerulea* × *A. auranticum*, tiếp theo là môi trường Vacin and Went (VW) và Knudson C (KC).

**Bảng 3.1.** Ảnh hưởng của 3 loại môi trường nuôi cấy lên sự nảy mầm, nhân chồi và tạo rễ lan lai *Dendrobium* thấp cây

Chỉ tiêu theo dõi	Môi trường nuôi cấy		
	MS	½ MS	VW
Giai đoạn nảy mầm (60 ngày sau gieo hạt)			
Mức độ nảy mầm	++++	++++	++++
Hình thái protocorm	protocorm tròn (3 – 4 mm), xanh hơi đậm	protocorm tròn (3 – 4 mm), xanh hơi đậm	Protocorm tròn (2 - 3 mm), xanh nhạt
Giai đoạn nhân chồi (60 ngày sau khi cấy chuyên)			
Số chồi (chồi)	5,95 <sup>b</sup> ± 0,35	8,92 <sup>a</sup> ± 0,46	4,77 <sup>b</sup> ± 0,59
Chiều cao chồi (cm)	1,55 <sup>a</sup> ± 0,06	1,58 <sup>a</sup> ± 0,24	1,02 <sup>b</sup> ± 0,06
Số lá (lá)	3,19 <sup>b</sup> ± 0,58	3,52 <sup>a</sup> ± 0,72	3,08 <sup>b</sup> ± 0,37
Giai đoạn tạo rễ (60 ngày sau khi cấy chuyên)			
Số rễ (rễ)	16,81 <sup>a</sup> ± 0,55	9,59 <sup>b</sup> ± 0,82	8,88 <sup>b</sup> ± 1,33
Chiều dài rễ (cm)	5,77 <sup>a</sup> ± 1,05	4,11 <sup>ab</sup> ± 0,98	3,36 <sup>b</sup> ± 0,44
Chiều cao chồi (cm)	4,14 <sup>a</sup> ± 1,12	2,89 <sup>b</sup> ± 0,48	2,66 <sup>b</sup> ± 0,59
Số lá trên chồi (lá)	5,21 <sup>a</sup> ± 1,31	4,07 <sup>b</sup> ± 0,58	4,11 <sup>b</sup> ± 0,05

Ghi chú: +: mức độ nảy mầm < 50%; ++: mức độ nảy mầm từ 50 - 69%, +++: mức độ nảy mầm từ 70% - 84% , ++++: mức độ nảy mầm ≥ 85%.

Trong cùng nhóm thời gian của cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.01$ .

Nhân chồi là giai đoạn cho phép nhân nhanh số lượng lớn cây trong thời gian ngắn. Chồi lan lai *Dendrobium* thấp cây được cấy trên ba môi trường MS, ½ MS, VW để nhân chồi. Số chồi, chiều cao chồi và số lá/chồi được theo dõi và được thể hiện qua Bảng 3.1.

Bảng 3.1 cho thấy tại thời điểm 60 ngày sau khi cấy, môi trường ½ MS vẫn là môi trường có số chồi và số lá cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với hai môi trường còn lại. Trong khi đó, môi trường MS lại là môi trường cho chiều cao chồi cao nhất nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so với chiều cao chồi ở môi trường ½ MS. Ngoài ra, khi quan sát hình thái phát triển của mẫu trên các

môi trường thì chồi được nuôi trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS có nhiều ưu điểm vượt trội hơn hai môi trường còn lại như cây to khỏe, lá xanh mượt. Kết quả nghiên cứu tương tự như nghiên cứu của Rajkumar Kishor và ctv (2006) khi nhân chồi loài lan lai *Ascocenda* 'Kangla'. Năm 2007, Kong và ctv đã nghiên cứu và đề xuất môi trường nhân nhanh chồi trên giống lan *Dendrobium strongylanthum* là môi trường  $\frac{1}{2}$  MS. Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2009) đã nhân giống lan *Dendrobium* mini và kết quả cho thấy chồi lan *Dendrobium* mini phát triển tốt trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS, ở thời điểm 2 tháng sau khi cấy đạt 3,8 chồi, chồi cao 1,26 cm.

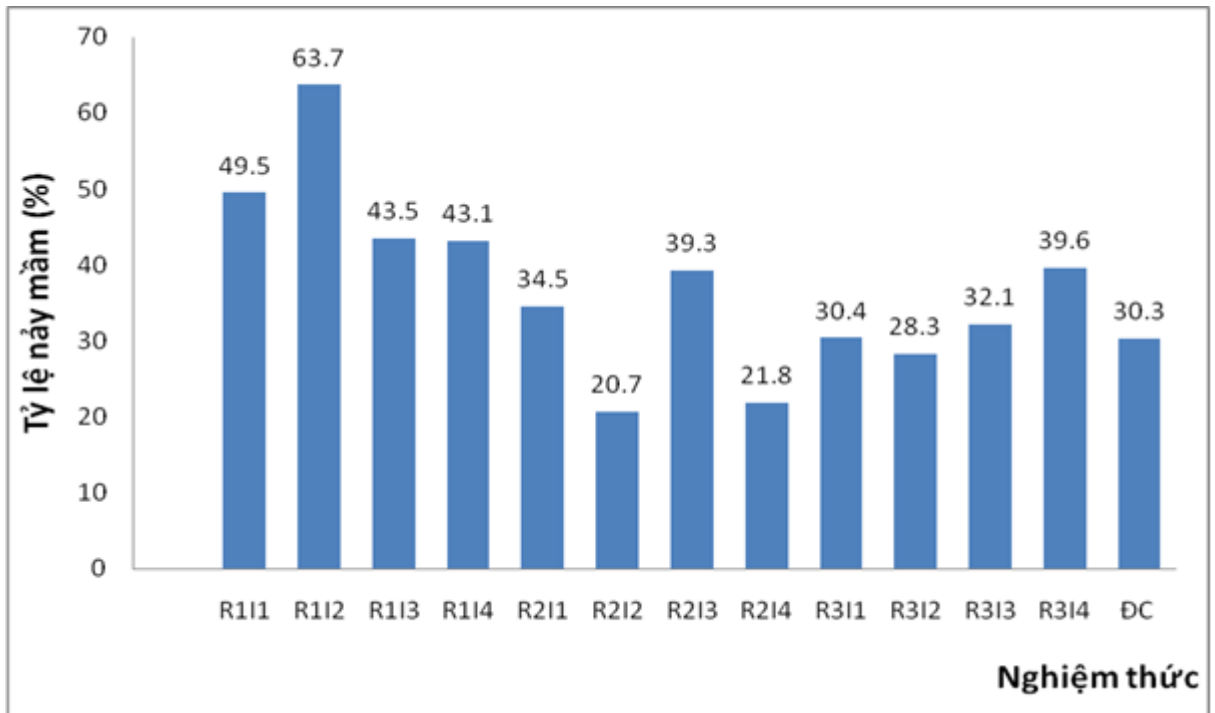
Bảng 3.1 cho thấy sau khi cấy 60 ngày, số lượng rễ của chồi lan lai *Dendrobium* thấp cây trên 3 môi trường khác nhau đã khác nhau và môi trường MS cho số lượng rễ cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với môi trường  $\frac{1}{2}$  MS và môi trường VW. Ngoài ra, chồi cấy trên môi trường MS thời điểm 60 ngày có chiều cao và số lá cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 môi trường còn lại. Kết quả nghiên cứu này tương tự như nghiên cứu của Nguyễn Thanh Tùng và ctv (2010) khi tạo rễ *in vitro* chồi lan hoàng thảo thân gãy (*Dendrobium aduncum*) trên môi trường MS. Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2009) đã tiến hành nhân giống lan *Dendrobium anosmum* và nhận thấy chồi lan *Dendrobium anosmum* tạo rễ tốt nhất trên môi trường MS.

Như vậy, điều kiện môi trường thích hợp nhất để gieo hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây là môi trường  $\frac{1}{2}$  MS + saccharose 30 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 200 mL/L + than hoạt tính 0,5 g/L + agar 7 g/L; môi trường thích hợp nhất cho nhân chồi lan lai *Dendrobium* thấp cây là môi trường  $\frac{1}{2}$  MS + saccharose 20 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 150 mL/L + than hoạt tính 0,5 g/L + agar 7 g/L; môi trường thích hợp nhất cho sự tạo rễ chồi lan lai *Dendrobium* thấp cây là môi trường MS + saccharose 20 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 150 mL/L + than hoạt tính 0,5 g/L + agar 7 g/L. Các môi trường này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.1.2. Xác định tỷ lệ ánh sáng đỏ-xanh dương và cường độ chiếu sáng thích hợp cho sự nảy mầm, sự hình thành chồi và rễ của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây

#### 3.1.2.1. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các cường độ chiếu sáng khác nhau lên sự phát triển của hạt lan *Dendrobium* thấp cây

Sự kết hợp giữa tỷ lệ ánh sáng đèn LED đơn sắc với cường độ chiếu sáng đã ảnh hưởng khác nhau đến quá trình nảy mầm của hạt lan *Dendrobium in vitro* sau 39 ngày gieo, kết quả được trình bày ở Hình 3.1.



**Hình 3.1.** Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc từ đèn LED đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến tỷ lệ nảy mầm (%) hạt lan *Dendrobium in vitro* sau 39 ngày cấy

Ghi chú: R1: 100Đ, R2: 75Đ:25X, R3: 50Đ:50X; I1: 200 lux, I2: 400 lux, I3: 600 lux, I4: 800 lux; ĐC: đèn huỳnh quang, 2000 lux.

Hình 3.1 cho thấy tỷ lệ giữa ánh sáng đỏ và xanh dương và cường độ chiếu sáng đã ảnh hưởng đến quá trình nảy mầm của hạt lan *Dendrobium* thấp cây *in vitro*. Sau 39 ngày nuôi cấy, dưới tỷ lệ 100% ánh sáng đỏ ở các cường độ chiếu sáng 200 lux và 400 lux, hạt lan đạt tỷ lệ nảy mầm cao trên 50% so với các chế độ chiếu sáng đèn LED khác. Trong đó, sự kết hợp của 50% ánh sáng đỏ và 50% ánh sáng xanh dương ở cường độ chiếu sáng 400 lux, 800 lux hạt lan đạt tỷ lệ nảy mầm thấp nhất (20,7% và 21,8% tương ứng). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả Ryu

và ctv (2012) khi nghiên cứu trên loài *Taraxacum officinale*, tác giả đã ghi nhận đèn LED đỏ cho tỷ lệ nảy mầm cao hơn đèn LED xanh dương cũng như sự phối hợp giữa LED xanh dương và LED đỏ.

Dưới cùng cường độ chiếu sáng 400 lux, hạt lan đạt tỷ lệ nảy mầm cao nhất 63,70% ở nghiệm thức 100% ánh sáng đỏ, thấp nhất 20,7% ở nghiệm thức (50Đ: 50X). Nhìn chung, xu hướng giảm ánh sáng đỏ và thay thế bằng ánh sáng xanh dương làm tỷ lệ nảy mầm của hạt lan *Dendrobium in vitro* giảm xuống.

Thực hiện kiểm tra trắc nghiệm T – test giữa nghiệm thức ánh sáng đèn huỳnh quang (đối chứng) và nghiệm thức ánh sáng đèn LED (100Đ, 400 lux) cho thấy sự khác biệt về tỷ lệ nảy mầm có ý nghĩa thống kê, trong đó tỷ lệ nảy mầm của nghiệm thức đối chứng chỉ đạt 30,3%, thấp hơn nghiệm thức nuôi dưới ánh sáng đèn LED (100Đ, 400 lux) - 63,7%. Kết quả thí nghiệm cho thấy quá trình nảy mầm của hạt lan *Dendrobium* không những phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy mà còn phụ thuộc vào chất lượng ánh sáng. Đối với hạt lan *Dendrobium*, ánh sáng đỏ giữ vai trò quan trọng đối với tiến trình nảy mầm của hạt. Điều này có thể do sự nhạy cảm của hạt với ánh sáng được quyết định bởi nhóm protein nhạy cảm với ánh sáng đỏ (Phytochrome) có trong vỏ hạt. Phytochrome cảm nhận ánh sáng vùng đỏ, đỏ xa và truyền tín hiệu xúc tiến quá trình nảy mầm của hạt (Brown và ctv, 1995). Đối với lan *Dendrobium*, Phytochrome cảm nhận ánh sáng vùng đỏ truyền tín hiệu xúc tiến sự nảy mầm của hạt lan, giúp hạt lan nuôi dưới 100% ánh sáng LED đỏ đạt tỷ lệ nảy mầm cao hơn so với hạt nuôi dưới các hệ thống đèn LED khác. Như vậy, ánh sáng LED đỏ giữ vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm của hạt lan *Dendrobium*.

### **3.1.2.2. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các cường độ chiếu sáng khác nhau đến sự hình thành và phát triển protocorm lan *Dendrobium* thấp cây**

Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ-xanh dương và cường độ chiếu sáng từ đèn LED đơn sắc đến sự hình thành và phát triển protocorm lan *Dendrobium* thấp cây được thể hiện qua Bảng 3.2.



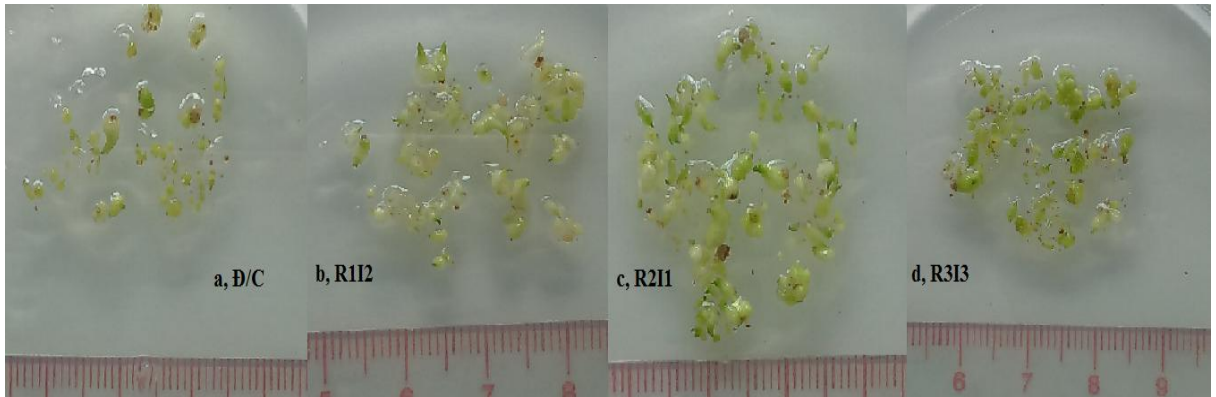
**Bảng 3.2.** Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc và cường độ chiếu sáng đến hệ số nhân protocorm của lan *Dendrobium* thấp cây sau cấy chuyên 8 tuần

Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ ánh sáng (%) (R)	Cường độ chiếu sáng (lux) (I)				Trung bình R
		200	400	600	800	
Hệ số nhân protocorm (lần)	100Đ	1,8 <sup>cd</sup>	2,4 <sup>a</sup>	1,8 <sup>bcd</sup>	1,8 <sup>cd</sup>	1,9 <sup>AB</sup>
	50Đ: 50X	2,2 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>bcd</sup>	1,9 <sup>bcd</sup>	1,6 <sup>d</sup>	1,8 <sup>B</sup>
	75Đ: 25X	2,0 <sup>abcd</sup>	2,1 <sup>abc</sup>	2,2 <sup>ab</sup>	1,9 <sup>bcd</sup>	2,0 <sup>A</sup>
	Trung bình I	2,0 <sup>A</sup>	2,1 <sup>A</sup>	2,0 <sup>A</sup>	1,8 <sup>B</sup>	
		$F_R = 3,3^*$	$F_I = 8,4^{**}$	$F_{RI} = 6,4^{**}$	$CV = 7,9 \%$	

Số liệu hệ số nhân protocorm (lần) được chuyển đổi theo công thức ( $\sqrt{x}$ ) trước khi xử lý thống kê. Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức xác suất  $P < 0,01$  (\*\*),  $P < 0,05$  (\*)

Bảng 3.2 cho thấy dưới ánh sáng đèn LED, protocorm không những phát triển tốt mà còn đạt hệ số nhân cao khi hạt được chiếu sáng dưới 100% ánh sáng LED đỏ và (75Đ: 25X). Kết quả này trái ngược với nhận định của Xu và cs (2009), tác giả đã khẳng định dưới ánh sáng LED xanh dương tỷ lệ mẫu của lan *Oncidium in vitro* hình thành PLBs cao nhất và thấp nhất ở ánh sáng LED đỏ. Khi hạt được chiếu sáng 400 lux, protocorm đạt hệ số nhân cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ba cường độ chiếu sáng còn lại. Hệ số nhân protocorm cao nhất là 2,4 lần ở nghiệm thức (100Đ, 400 lux) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức đèn LED khác. Hệ số nhân protocorm thấp nhất (1,6 lần) ở nghiệm thức (50Đ: 50X, 800 lux).

Thực hiện kiểm tra trắc nghiệm T – test giữa nghiệm thức đối chứng đèn huỳnh quang và nghiệm thức (100Đ, 400 lux), hệ số nhân protocorm ở nghiệm thức đối chứng chỉ 1,7 lần, trong khi nghiệm thức (100Đ, 400 lux) đạt 2,4 lần và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Habiba và ctv (2014) khi khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng khác nhau lên quá trình sinh trưởng và phát triển của PLBs (protocorm like body) ở loài lan *Dendrobium kingianum in vitro*. Tác giả này nhận định rằng ánh sáng trắng của đèn huỳnh quang, sự kết hợp ánh sáng LED đỏ và LED xanh dương (50Đ: 50X) cho kết quả PLBs được hình thành đều thấp hơn so với 100% LED xanh dương hoặc 100% LED đỏ.



**Hình 3.2.** Protocorm lan *Dendrobium* sau 30 ngày gieo hạt

- a. Đèn huỳnh quang, b. (100 Đ, 200 lux), c. (75Đ: 25X, 200 lux),  
d. (50Đ: 50X, 600 lux)

### 3.1.2.3. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các tỷ lệ ánh sáng đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng khác nhau đến hệ số nhân và kích thước chồi lan *Dendrobium* thấp cây *in vitro*

Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc đỏ-xanh dương và cường độ chiếu sáng đến hệ số nhân chồi lan *Dendrobium* thấp cây *in vitro* sau cấy chuyển 4 tuần được thể hiện qua Bảng 3.3.

Kết quả Bảng 3.3 thể hiện sự khác biệt về hệ số nhân chồi lan *Dendrobium* thấp cây *in vitro* khi chồi được nuôi dưới các tỷ lệ ánh sáng LED khác nhau. Dưới các tỷ lệ ánh sáng đèn LED đơn sắc khác nhau, sự khác biệt về hệ số nhân chồi lan *Dendrobium* giữa các tỷ lệ ánh sáng không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, khi chồi được chiếu sáng 800 lux thì chồi đạt hệ số nhân chồi cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các cường độ ánh sáng 200 lux, 400 lux, 600 lux. Sự kết hợp giữa tỷ lệ ánh sáng và cường độ chiếu sáng cho chồi đạt hệ số nhân cao nhất 1,8 lần khi chồi nuôi dưới điều kiện (75Đ: 25X, 800 lux), trong đó hệ số nhân chồi thấp nhất 1,2 lần khi chồi được chiếu sáng (50Đ: 50X, 400 lux) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức đèn LED khác. Nhìn chung, chồi lan *Dendrobium* sau khi cắt hết rễ được nuôi cấy dưới tỷ lệ ánh sáng LED đỏ/xanh dương ở các cường độ chiếu sáng khác nhau vẫn sinh trưởng và phát triển bình thường nhưng khi giảm tỷ lệ ánh sáng LED xanh dương, chồi lan cho nhiều chồi phát sinh và đạt giá trị cao nhất ở điều kiện ánh sáng (75Đ: 25X, 800 lux).

**Bảng 3.3.** Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến hệ số nhân chồi và chiều cao chồi lan *Dendrobium in vitro* sau cấy 4 tuần

Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ ánh sáng (%) (R)	Cường độ chiếu sáng (lux) (I)				Trung bình R
		200	400	600	800	
Hệ số nhân chồi (lần)	100Đ	1,3 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	1,3
	50Đ: 50X	1,3 <sup>b</sup>	1,2 <sup>b</sup>	1,4 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	1,3
	75Đ: 25X	1,3 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	1,4 <sup>b</sup>	1,8 <sup>a</sup>	1,4
	Trung bình I	1,3 <sup>AB</sup>	1,2 <sup>B</sup>	1,3 <sup>AB</sup>	1,5 <sup>A</sup>	
		$F_R = 3,0^{ns}$	$F_I = 4,5^{**}$	$F_{RI} = 2,8^*$	$CV = 10,2\%$	
Chiều cao chồi (cm)	100Đ	4,2 <sup>a</sup>	4,0 <sup>ab</sup>	3,6 <sup>ab</sup>	4,2 <sup>a</sup>	4,0 <sup>A</sup>
	50Đ: 50X	3,5 <sup>ab</sup>	3,5 <sup>ab</sup>	3,4 <sup>ab</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	3,4 <sup>B</sup>
	75Đ: 25X	3,1 <sup>b</sup>	2,2 <sup>c</sup>	3,6 <sup>ab</sup>	3,4 <sup>ab</sup>	3,1 <sup>B</sup>
	Trung bình I	3,6	3,2	3,5	3,6	
		$F_R = 20,7^{**}$	$F_I = 2,2^{ns}$	$F_{RI} = 3,8^{**}$	$CV = 10,2\%$	

Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức xác suất  $P < 0,01$  (\*\*), ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.3 và Hình 3.3 cho thấy dưới ánh sáng đỏ (100%) chồi lan cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với hai tỷ lệ ánh sáng (50Đ: 50X) và (75Đ: 25X). Chồi lan sinh trưởng tốt và đạt cao nhất 4,2 cm khi chồi được nuôi dưới điều kiện (100Đ, 800 lux) và sự khác biệt này rất có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức đèn LED khác. Trong đó, chiều cao chồi thấp nhất 2,2 cm khi chồi nuôi dưới tỷ lệ ánh sáng (75Đ: 25X, 400 lux). Như vậy, ánh sáng đỏ có tác dụng kéo dài đốt thân chồi, kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hoenecke và ctv (1992).



**Hình 3.3.** Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc đến hình thái chồi lan sau cấy 4 tuần (Đ/C: đối chứng, R114: 100Đ – 800 lux, R2I2: 50Đ: 50X – 400 lux, R3I2: 75Đ: 25X – 400 lux)

### 3.1.2.4. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED ở các cường độ chiếu sáng khác nhau đến sự phát triển rễ từ chồi lan *Dendrobium* thấp cây

Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc từ đèn LED đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến số rễ và chiều dài rễ của lan *Dendrobium* thấp cây *in vitro* sau cấy chuyên 4 tuần được thể hiện qua Bảng 3.4.

**Bảng 3.4.** Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đơn sắc đỏ/xanh dương và cường độ chiếu sáng đến số rễ và chiều dài rễ của lan *Dendrobium* thấp cây *in vitro* sau cấy 4 tuần

Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ ánh sáng (%) (R)	Cường độ chiếu sáng (lux) (I)				Trung bình R
		200	400	600	800	
Số rễ (rễ)	100Đ	2,9 <sup>a</sup>	2,4 <sup>ab</sup>	2,3 <sup>ab</sup>	2,3 <sup>ab</sup>	2,4
	50Đ: 50X	2,3 <sup>ab</sup>	2,7 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>	2,4 <sup>ab</sup>	2,5
	75Đ: 25X	2,6 <sup>a</sup>	1,9 <sup>b</sup>	2,8 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>	2,5
	Trung bình I	2,6	2,3	2,6	2,5	
	$F_R = 0,2^{ns}$	$F_I = 1,4^{ns}$	$F_{RI} = 2,8^*$	$CV = 13,3\%$		
Chiều dài rễ (cm)	100Đ	1,0 <sup>abc</sup>	0,9 <sup>bcd</sup>	0,8 <sup>d</sup>	0,8 <sup>cd</sup>	0,9 <sup>B</sup>
	50Đ: 50X	1,1 <sup>ab</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	1,0 <sup>abcd</sup>	1,1 <sup>A</sup>
	75Đ: 25X	1,1 <sup>ab</sup>	1,0 <sup>abcd</sup>	1,2 <sup>a</sup>	1,2 <sup>ab</sup>	1,1 <sup>A</sup>
	Trung bình I	1,1	1,0	1,0	1,0	
	$F_R = 22,7^{**}$	$F_I = 1,5^{ns}$	$F_{RI} = 3,3^{**}$	$CV = 8,9\%$		

Số liệu chiều dài rễ được chuyển đổi theo công thức ( $\sqrt{x}$ ) trong quá trình thống kê. Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất  $P < 0,01$  (\*\*), ns: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.4 cho thấy chồi lan sau khi cắt hết rễ được nuôi dưới ánh sáng đèn LED ở các tỷ lệ ánh sáng và cường độ chiếu sáng khác nhau vẫn sinh trưởng và phát triển bình thường, nhưng dưới điều kiện (100Đ, 200 lux), chồi lan đạt số rễ nhiều nhất (2,9 rễ/chồi) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, khi xét riêng từng yếu tố (yếu tố tỷ lệ ánh sáng, yếu tố cường độ chiếu sáng) sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, ánh sáng LED đỏ ở cường độ chiếu sáng thích hợp đã làm tăng số lượng rễ hình thành từ mẫu chồi trong vi nhân giống lan *Dendrobium* và kết quả này tương tự với nghiên cứu trên cây nho của Poudel và ctv (2008).

Bảng 3.4 cho thấy chồi lan nuôi ở nghiệm thức (75Đ: 25X, 600 lux) có chiều dài rễ dài nhất (1,2 cm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức

khác. Ở các cường độ chiếu sáng khác nhau, sự khác biệt về chiều dài rễ không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, ở các tỷ lệ ánh sáng khác nhau, sự khác biệt về chiều dài rễ có ý nghĩa thống kê. Ở nghiệm thức (75Đ: 25X), chồi lan có chiều dài rễ dài nhất (1,1 cm) và ngắn nhất khi chồi được nuôi dưới điều kiện 100% ánh sáng LED đỏ (0,9 cm). Kết quả này trái ngược với kết quả của Ryu và ctv (2012) khi nghiên cứu ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED lên quá trình nảy mầm, sinh trưởng và hàm lượng anthocyanin trên cây *Taraxacum officinale*, tác giả cho rằng chiều dài rễ của cây nuôi dưới 100% ánh sáng LED đỏ dài hơn so với rễ của cây nuôi dưới các chế độ chiếu sáng 100% LED xanh dương, (50Đ: 50X) hoặc ánh sáng đèn huỳnh quang.



**Hình 3.4.** Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc đến hình thái rễ lan *Dendrobium* thấp cây *in vitro* sau cây chuyên 4 tuần (a. Đ/C: đôi chứng, b. R1I1: 100Đ – 200 lux, c. R2I3: 50Đ: 50X – 600 lux, d. R3I3: 75Đ: 25X – 600 lux)

Về hình thái rễ, chồi lan ở nghiệm thức 100% LED đỏ và (75Đ: 25X) có bộ rễ xanh nhạt và ốm. Ở nghiệm thức (50Đ: 50X), chồi lan có rễ mập, khỏe, ngoài rễ được phủ một lớp mạc để giữ nước cho lan (Hình 3.4).

Từ các kết quả Bảng 3.2, 3.3 và 3.4 có thể kết luận hạt lan *Dendrobium* thấp cây phát triển và nảy mầm tốt nhất ở điều kiện ánh sáng (100Đ, 400 lux). Sự gia tăng số chồi lan *Dendrobium* thấp cây diễn ra nhanh nhất ở chế độ chiếu sáng (75Đ: 25X, 800 lux) và ra rễ tốt nhất ở chế độ chiếu sáng (50Đ: 50X, 400 lux).

### **3.2. Lai tạo hoa lan *Dendrobium* thấp cây, đánh giá sinh trưởng, phát triển và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng**

#### **3.2.1. Lai tạo và đánh giá phản ứng của hoa sau khi thụ phấn ở 20 tổ hợp lai *Dendrobium* thấp cây**

##### **3.2.1.1. Đánh giá đặc điểm thụ phấn của 20 tổ hợp lan lai**

Hiện tượng hoa héo do hai nguyên nhân: một là do hoa thụ phấn, hai là do hoa bị mất khối phần. Biểu hiện hoa héo cho biết kết quả sự thụ phấn đã xảy ra và là biểu hiện đầu tiên của quá trình thụ phấn. Sau khi thực hiện các phép lai giữa 15 giống lan *Dendrobium* thấp cây đã được thu thập thông qua 20 tổ hợp lai, biểu hiện hoa sau khi lai của các tổ hợp lai được theo dõi, kết quả thể hiện qua Bảng 3.5.

Sau khi tiến hành lai, đa số các tổ hợp lai có hiện tượng héo nhanh (50%) và héo hoàn toàn, chứng tỏ các tổ hợp lai trên đã xảy ra hiện tượng thụ phấn (Bảng 3.5). Trong các tổ hợp lai thì năm tổ hợp có thời gian hoa héo 50% khoảng 3 ngày, 12 tổ hợp có thời gian hoa héo 50% là 6 ngày, một tổ hợp có thời gian hoa héo 50% là 10 ngày (tổ hợp DM12x13). Riêng tổ hợp DM25 x DM26 có hiện tượng cuống phình lên nhưng hoa không bị héo (Hình 3.5). Thời gian hoa héo hoàn toàn dao động từ 6 - 10 ngày ở đa số các tổ hợp lai, riêng tổ hợp DM12x13 có thời gian hoa héo hoàn toàn là 20 ngày. Điều này có thể giải thích do lớp màng bao bọc các thùy chứa đựng các tế bào gốc của hạt lan thuộc giống DM13 hơi dày, đã làm chậm quá trình nảy mầm của hạt phấn, từ đó dẫn tới quá trình hoa héo ở tổ hợp DM12x13 là lâu nhất - 10,3 ngày sau thụ phấn (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2007).

**Bảng 3.5.** Thời gian xuất hiện biểu hiện hoa héo của 20 tổ hợp lai

Tổ hợp lai	Thời điểm hoa bắt đầu héo (ngày sau thụ phấn)	Thời điểm hoa héo hoàn toàn (ngày sau thụ phấn)
DM01x12	3,3 ± 0,3	6,3 ± 0,3
DM10x01	6,0 ± 0,0	10,3 ± 0,3
DM11x18	6,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0
DM12x11	6,3 ± 0,3	10,3 ± 0,6
DM11x12	6,0 ± 0,0	10,3 ± 0,3
DM13x11	6,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
DM24x11	3,3 ± 0,3	6,0 ± 0,6
DM11x24	6,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6
DM24x01	6,3 ± 0,3	10,0 ± 0,0
DM13x24	3,3 ± 0,3	6,0 ± 0,0
DM14x12	6,3 ± 0,3	10,3 ± 0,6
DM12x13	10,3 ± 1,0	20,3 ± 0,6
DM13x12	3,0 ± 0,0	6,3 ± 0,3
DM26x13	3,0 ± 0,0	rụng sau 3 ngày
DM12x14	6,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0
DM26x24	6,0 ± 0,0	rụng sau 6 ngày
DM15x25	3,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6
DM25x26	Không héo	rụng sau 45 ngày
DM28x26	6,3 ± 0,6	rụng sau 6 ngày
DM28x30	6,0 ± 0,0	rụng sau 6 ngày

Biểu hiện hoa héo cho biết kết quả sự thụ phấn đã xảy ra nhưng vẫn chưa cho biết được sự thụ tinh thành công hay không. Như vậy biểu hiện hoa héo chỉ là biểu hiện đầu tiên của quá trình thụ phấn. Để biết noãn đã được thụ tinh hay chưa cần phải theo dõi trong thời gian tiếp theo. Trong các tổ hợp lai được nghiên cứu thì tổ hợp DM26x13 có thời gian hoa héo 50% là 3 ngày, tương tự kết quả nghiên cứu của Xu và ctv (2013) trên đối tượng lan *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl (quá trình thụ phấn chéo xảy ra tốt nhất vào thời điểm 2 - 4 ngày sau lai). Tổ hợp DM26x24, DM28x26 và DM28x30 có thời gian hoa héo 50% là 6 ngày nhưng sau đó các hoa đều bị rụng. Điều này là do hạt phấn từ cây bố có cấu trúc không tương thích với vòi nhụy của cây mẹ dẫn tới ống dẫn phấn mọc ra khi hạt phấn nảy mầm ở đầu nhụy ngắn hơn hoặc dài hơn vòi nhụy của cây mẹ, điều này đã làm cho tinh tử không thể đến được bầu noãn và quá trình thụ tinh thất bại ở các tổ hợp lai trên (Zhang và ctv, 2006).

Tổ hợp lai  
DM12x11

Sau 3 ngày



Sau 6 ngày



Sau 10 ngày



Sau 20 ngày

DM12x13



DM15x25



Rụng sau 10 ngày

**Hình 3.5.** Hình thái hoa của một số tổ hợp điển hình ở các thời điểm hoa héo 50% và hoa héo hoàn toàn. Thanh ngang có kích thước 1 cm.

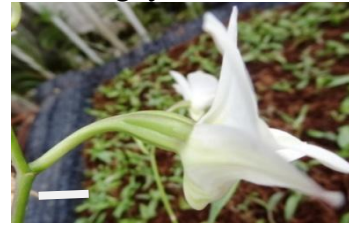
3 ngày



10 ngày



30 ngày



45 ngày



Rụng sau 45 ngày

Thanh ngang có kích thước 1 cm

**Hình 3.6.** Hình thái hoa của tổ hợp DM25x26 theo thời gian



Đặc biệt ở tổ hợp DM25x26 không có biểu hiện hoa héo nhưng cuống hoa phình to ra đến giai đoạn 45 ngày rồi rụng (Hình 3.6). Điều này có thể do hạt phấn của cây DM26 sau khi rơi trên đầu nhụy của cây DM25 đã kích thích sự phân chia của lớp tế bào vỏ bầu nhụy, làm chúng phát triển phình to ra, tuy nhiên sự thụ phấn đã không xảy ra nên sau 45 ngày, hoa bị rụng. Như vậy, trong 20 tổ hợp lai nghiên cứu thì đã có 15/20 tổ hợp đậu quả và cho quả phát triển hoàn chỉnh.

### 3.2.1.2. Xác định đặc điểm quá trình phát triển của quả

15 tổ hợp lai đậu quả tiếp tục được theo dõi quá trình phát triển của quả. Sự phát triển của quả lan của 15 tổ hợp lai hữu thụ sau 75 ngày thụ phấn được thể hiện qua Bảng 3.6.

**Bảng 3.6.** Đặc điểm của quả lan của 15 tổ hợp lai ở 75 ngày sau thụ phấn

Tổ hợp lai	Chiều dài quả (cm)	Đường kính quả (cm)	Khối lượng quả (g)	Hình dạng quả
DM01x12	3,73 <sup>b</sup> ± 0,06	1,23 <sup>bc</sup> ± 0,06	3,43 <sup>e</sup> ± 0,06	Ngắn, phình to ở giữa
DM10x01	3,07 <sup>a</sup> ± 0,06	1,37 <sup>cd</sup> ± 0,15	3,03 <sup>d</sup> ± 0,15	nt.
DM13x11	3,77 <sup>ab</sup> ± 0,06	1,43 <sup>de</sup> ± 0,06	3,73 <sup>fg</sup> ± 0,12	nt.
DM14x12	3,90 <sup>abc</sup> ± 0,10	1,43 <sup>de</sup> ± 0,06	4,13 <sup>hi</sup> ± 0,06	nt.
DM13x12	3,93 <sup>cde</sup> ± 0,06	1,43 <sup>de</sup> ± 0,06	4,10 <sup>hi</sup> ± 0,10	nt.
DM11x18	5,20 <sup>i</sup> ± 0,20	1,53 <sup>e</sup> ± 0,06	4,07 <sup>h</sup> ± 0,06	Dài, phình to ở giữa
DM12x11	5,83 <sup>j</sup> ± 0,15	1,53 <sup>e</sup> ± 0,06	4,23 <sup>i</sup> ± 0,12	nt.
DM11x12	5,10 <sup>i</sup> ± 0,10	1,47 <sup>de</sup> ± 0,06	4,07 <sup>h</sup> ± 0,06	nt.
DM12x13	4,23 <sup>g</sup> ± 0,15	1,33 <sup>cd</sup> ± 0,06	2,87 <sup>c</sup> ± 0,06	nt.
DM12x14	4,53 <sup>h</sup> ± 0,06	1,47 <sup>de</sup> ± 0,06	4,13 <sup>hi</sup> ± 0,06	nt.
DM15x25	4,57 <sup>h</sup> ± 0,06	1,33 <sup>cd</sup> ± 0,06	3,87 <sup>g</sup> ± 0,12	nt.
DM24x11	4,13 <sup>fg</sup> ± 0,12	1,10 <sup>a</sup> ± 0,10	2,33 <sup>a</sup> ± 0,06	Dài, thon, thẳng
DM24x01	4,10 <sup>efg</sup> ± 0,10	1,13 <sup>ab</sup> ± 0,06	2,53 <sup>b</sup> ± 0,06	nt.
DM13x24	3,90 <sup>abc</sup> ± 0,06	1,23 <sup>bc</sup> ± 0,06	3,07 <sup>d</sup> ± 0,06	nt.
DM11x24	4,43 <sup>h</sup> ± 0,12	1,37 <sup>cd</sup> ± 0,06	3,67 <sup>f</sup> ± 0,12	Dài, phình to ở giữa, cong

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Trong các tổ hợp lai, các tổ hợp DM11x18, DM12x11, DM11x12 có sự phát triển của quả sau 75 ngày thụ phấn với các chỉ tiêu như chiều dài, đường kính cao hơn các tổ hợp còn lại (Bảng 3.6). Hình dạng quả của các tổ hợp này đều có đặc

điểm là dài, phình to ở giữa và thẳng. Riêng các tổ hợp DM14x12, quả ngắn, phình to ở giữa và thẳng nhưng đường kính và khối lượng quả tương đối cao (đường kính quả 1,43 cm và khối lượng quả 4,13 g). Ngược lại, các tổ hợp DM24x11, DM24x01 và DM13x24 có quả dài nhưng thon, đường kính quả thấp nên dẫn đến khối lượng quả thấp.

Tùy theo giống mà thời gian chín của quả lan khác nhau, trung bình từ 90 - 200 ngày (Đỗ Khắc Thịnh, 2011). Tuy nhiên, qua quá trình thực nghiệm nhận thấy thời gian chín của quả lan lai *Dendrobium* thấp cây thấp hơn 90 ngày. Để đánh giá chất lượng của các quả lan thu được từ các tổ hợp lai khác nhau, tỷ lệ đậu quả, thời gian thu hoạch quả và tỷ lệ quả không hạt của các tổ hợp lai nghiên cứu được theo dõi, kết quả được thể hiện qua Bảng 3.7.

**Bảng 3.7.** Tỷ lệ đậu quả, thời điểm thu hoạch quả và tỷ lệ quả không hạt của 15 tổ hợp nghiên cứu

Tổ hợp lai	Tỷ lệ đậu quả (%)	Thời điểm thu hoạch quả (ngày)	Tỷ lệ quả không hạt (%)
DM01x12	66,7 <sup>bcd</sup> ± 14,4	65,3 <sup>a</sup> ± 5,0	0
DM10x01	75,0 <sup>bcd</sup> ± 25,0	65,7 <sup>a</sup> ± 0,0	0
DM11x18	66,7 <sup>bcd</sup> ± 14,4	75,0 <sup>b</sup> ± 5,0	0
DM12x11	100,0 <sup>d</sup> ± 0,0	80,0 <sup>b</sup> ± 5,0	0
DM11x12	75,0 <sup>bcd</sup> ± 0,0	80,7 <sup>b</sup> ± 5,0	0
DM13x11	91,7 <sup>cd</sup> ± 14,4	75,3 <sup>b</sup> ± 5,0	0
DM24x11	66,7 <sup>bcd</sup> ± 14,4	65,3 <sup>a</sup> ± 5,0	0
DM11x24	66,7 <sup>bcd</sup> ± 14,4	65,0 <sup>a</sup> ± 5,0	0
DM24x01	50,0 <sup>ab</sup> ± 25,0	65,3 <sup>a</sup> ± 5,0	50,0
DM13x24	66,7 <sup>bcd</sup> ± 14,4	75,0 <sup>b</sup> ± 5,0	0
DM14x12	83,3 <sup>bcd</sup> ± 14,4	75,7 <sup>b</sup> ± 5,0	0
<b>DM12x13</b>	<b>100,0<sup>d</sup> ± 0,0</b>	<b>80,3<sup>b</sup> ± 5,0</b>	<b>0</b>
DM13x12	83,3 <sup>bcd</sup> ± 14,4	75,7 <sup>b</sup> ± 5,0	0
DM12x14	58,3 <sup>bc</sup> ± 28,9	80,0 <sup>b</sup> ± 5,0	0
DM15x25	25,0 <sup>a</sup> ± 25,0	75,3 <sup>b</sup> ± 5,0	66,7

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Bảng 3.7 cho thấy tỷ lệ đậu quả của các tổ hợp lai dao động từ 25 – 100% tùy từng tổ hợp, trong đó tổ hợp DM15x25 có tỷ lệ đậu quả thấp nhất (25%) và tổ hợp DM12x11, DM12x13 có tỷ lệ đậu quả cao nhất (100%). Theo kết quả của Vendrame (2008) thì tỷ lệ đậu quả đạt từ 60 - 80% ở hai giống lai *Dendrobium* 'Sena Red' và 'Mini WRL'. Theo kết quả lai lan *Phalaenopsis* của Đỗ Khắc Thịnh (2011) thì tỷ lệ đậu quả đạt từ 0 – 100%. So với những nghiên cứu này thì kết quả nghiên cứu của đề tài có tỷ lệ đậu quả từ 25 - 100%, điều này có thể do việc lai trong loài giữa các giống *Dendrobium* thấp cây với nhau ít có rào cản sinh học giữa các cá thể nên tỷ lệ đậu quả của các tổ hợp khá cao.



a. Quả lan ở 40 ngày sau lai

b. Quả lan ở 75 ngày sau lai

**Hình 3.7.** Quả lan lai *Dendrobium* thấp cây của tổ hợp DM12x13

Thời gian thu hoạch quả cũng dao động từ 65 – 80 ngày tùy tổ hợp lai, trong đó thời gian thu hoạch quả sớm nhất (65 ngày sau thụ phấn) được ghi nhận ở các tổ hợp DM01x12, DM10x01, DM24x11, DM11x24, DM24x01 và thời gian thu hoạch quả muộn nhất (80 ngày sau thụ phấn) được ghi nhận ở các tổ hợp DM12x11, DM11x12, DM12x13 và DM12x14.

Trong các tổ hợp lai, hầu hết các tổ hợp lai đều có hạt, chỉ riêng quả của tổ hợp lai DM24x01 và DM15x25 xuất hiện quả không hạt với tỷ lệ tương ứng là 50% và 66,67%. Khi lai lan *Phalaenopsis*, Đỗ Khắc Thịnh (2011) cũng nhận được tỷ lệ quả không hạt từ 14,3 – 100%. Điều này có thể do rào cản về di truyền, sự không phù

hợp về di truyền giữa bố và mẹ nên sự thụ tinh không thể thực hiện được, dẫn đến quả chỉ là sự phát triển của bầu noãn tạo nên quả giả không hạt.

Như vậy, quá trình lai tạo các giống lan *Dendrobium* thấp cây cho thấy thời gian hoa héo hoàn toàn dao động từ 6 - 20 ngày. Trong 20 tổ hợp lai, chỉ có 15 tổ hợp lai đậu quả với tỷ lệ từ 25 – 100% và thời gian thu hoạch quả từ 65 – 80 ngày. Đa số quả của các tổ hợp lai đều có hạt, riêng tổ hợp lai DM24x01 và DM15x25 xuất hiện quả không hạt với tỷ lệ 50% - 66,67% trong tổng số quả thu nhận được.

### **3.2.2. Sự nảy mầm của hạt lan lai trong điều kiện *in vitro***

Hạt lan được xem là nguồn vật liệu nhân giống rất có ý nghĩa vì hạt là nơi mà tác nhân gây bệnh khó có thể tấn công tới, ngay cả các bệnh hại do vi khuẩn hay virus. Do đó, khi nhân giống từ hạt sẽ tạo ra nguồn cây giống *in vitro* tương đối sạch bệnh. Tuy nhiên, việc nhân giống từ hạt cũng có nhiều hạn chế là cây con tạo ra không được xác định chắc chắn về kiểu hình, điều này chính là ưu thế của chọn lọc, lai tạo ra giống mới (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2007).

Sau khi khử trùng, hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây được gieo trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS + saccharose 30 g/L + agar 7 g/L (từ kết quả thí nghiệm 1 về xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây). Ở giai đoạn này, hạt lan được theo dõi về màu sắc, thời gian nảy mầm và tỷ lệ nảy mầm, kết quả được thể hiện qua Bảng 3.8.

Kết quả ghi nhận ở Bảng 3.8 cho thấy màu sắc của hạt lan của các tổ hợp đa số có màu vàng, chỉ một số ít có màu trắng như tổ hợp lai DM24x01 và DM15x25. Thời gian hạt nảy mầm của các tổ hợp khác nhau cũng khác nhau (25– 34 ngày); trong đó đa số có thời gian nảy mầm từ 25 – 26 ngày. Riêng hạt của tổ hợp DM24x01 và DM13x24 có thời gian nảy mầm lâu nhất (31 ngày và 34 ngày, tương ứng). Tỷ lệ hạt nảy mầm của đa số các tổ hợp khá cao (từ 70,00 – 97,33%) ngoại trừ hạt của các tổ hợp DM24x01, DM13x24 và DM15x25 (tỷ lệ 24,67 – 28,33%) và các hạt của các tổ hợp này đều có màu trắng.

**Bảng 3.8.** Đặc điểm sinh lý hạt của 15 tổ hợp đậu quả ở giai đoạn nảy mầm

Tổ hợp lai	Màu sắc hạt	Thời điểm hạt nảy mầm (ngày sau gieo)	Tỷ lệ nảy mầm (%)
DM01x12	vàng	25,3 ± 0,6	80,7 ± 5,1
DM10x01	nt.	25,7 ± 0,6	70,0 ± 5,0
DM11x18	nt.	26,0 ± 1,0	87,7 ± 2,5
DM12x11	nt.	25,3 ± 0,6	97,3 ± 2,1
DM11x12	nt.	25,7 ± 1,2	80,0 ± 5,0
DM13x11	nt.	26,0 ± 1,0	92,3 ± 2,5
DM24x11	nt.	25,3 ± 0,6	63,7 ± 3,2
DM11x24	nt.	26,3 ± 1,2	77,7 ± 8,9
DM14x12	nt.	25,3 ± 0,6	93,3 ± 0,6
DM12x13	nt.	26,0 ± 1,0	94,0 ± 1,0
DM13x12	nt.	25,3 ± 0,6	96,3 ± 0,6
DM12x14	nt.	26,0 ± 1,0	84,0 ± 4,6
DM24x01	trắng	31,3 ± 1,2	28,3 ± 3,5
DM13x24	nt.	34,3 ± 0,6	24,7 ± 2,1
DM15x25	nt.	32,3 ± 1,5	27,3 ± 2,5

Bảng 3.8 cũng cho thấy các tổ hợp lai có hạt màu vàng có khả năng thích ứng với môi trường trong điều kiện *in vitro* cao hơn các tổ hợp lai có hạt trắng. Kết quả cũng tương tự với nghiên cứu của Udomdee và ctv (2013) đối với *Dendrobium nobile* và nhận thấy tỷ lệ nảy mầm của hạt lan lai phụ thuộc vào thời điểm thu hoạch quả. Giữa các thời điểm thu hoạch quả lan lai (2, 3, 4 và 5 tháng sau khi thụ phấn) thì tỷ lệ nảy mầm đạt cao nhất từ quả thu hoạch 4 tháng sau khi thụ phấn và tỷ lệ nảy mầm ở hạt lan lai giống *Den. Lucky Girl* × *Den. Second Love* ‘Kirameki’ đạt 80,03%, của hạt lan lai giống *Den. Lucky Girl* × *Den. Hamana Lake* ‘Kumi’ đạt 83,41% và tỷ lệ nảy mầm của hạt lan tự thụ của giống lan *Den. Second Love* ‘Kirameki’ đạt 90,06%. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2009) trên lan *Dendrobium anosmum* cho thấy tỷ lệ nảy mầm  $\geq 85\%$  ở thời điểm 3 tháng sau khi gieo hạt. Kết quả nghiên cứu của Đỗ Khắc Thịnh (2011) cho thấy tỷ lệ nảy mầm hạt lan lai *Phalaenopsis* từ 81,3 - 92,7%. Tỷ lệ nảy mầm cao có thể giải thích do yếu tố di truyền về sức sống của con lai thể hiện ở giai đoạn hạt nảy mầm và do yếu tố môi trường nuôi cấy phù hợp, thuận lợi cho hạt nảy mầm tốt.

Như vậy, hạt của các tổ hợp lan lai *Dendrobium* thấp cây có màu vàng hoặc màu trắng. Những hạt có màu vàng có thời gian nảy mầm 25 – 26 ngày và tỷ lệ nảy mầm cao 70 – 97%, ngược lại các tổ hợp có hạt màu trắng có thời gian nảy mầm dài 31 – 34 ngày và tỷ lệ nảy mầm thấp 24 – 28%.

### 3.2.3. Đánh giá sự sinh trưởng của các con lai từ 9 tổ hợp lai trong điều kiện *in vitro*

Trong 15 tổ hợp đậu quả ở Bảng 3.8 thì có 9 tổ hợp gồm DM12x11, DM12x13, DM11x12, DM10x01, DM11x18, DM01x12, DM11x24, DM24x11 và DM12x14 có tỷ lệ đậu quả, tỷ lệ hạt nảy mầm cao trong điều kiện *in vitro* được tiếp tục theo dõi và bố trí ở các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 3.9.** Khả năng sinh trưởng chồi và lá của 9 tổ hợp lai lan *Dendrobium* thấp cây tại thời điểm 180 ngày sau cấy trong điều kiện *in vitro*

Tổ hợp lai	Tỷ lệ tạo chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá)
DM01x12	1,7 ± 0,7	6,0 ± 0,8	4,3 ± 1,0
DM10x01	2,6 ± 1,4	5,7 ± 0,9	3,6 ± 1,0
DM11x12	1,0 ± 0,7	8,7 ± 1,2	4,6 ± 0,8
DM11x18	2,0 ± 0,7	6,6 ± 0,6	6,5 ± 0,7
DM11x24	0,1 ± 0,0	6,9 ± 0,9	5,5 ± 0,5
DM12x11	2,0 ± 1,1	9,2 ± 1,0	5,2 ± 1,0
DM12x13	0,8 ± 0,9	7,6 ± 1,0	4,3 ± 1,0
DM12x14	2,0 ± 0,7	6,6 ± 0,6	6,5 ± 0,7
DM24x11	1,1 ± 1,1	6,8 ± 1,1	5,3 ± 1,2

Bảng 3.9 cho thấy sau 180 ngày nuôi cấy, tỷ lệ tạo chồi của 9 tổ hợp dao động từ 0,1 – 2,6 chồi, trong đó các tổ hợp có số chồi từ hai trở lên gồm DM10x01, DM11x18, DM12x11 và DM12x14, các tổ hợp có số chồi nhỏ hơn một gồm DM11x24 và DM12x13. Chiều cao chồi trong giai đoạn 180 ngày sau cấy cũng khác biệt giữa các nghiệm thức, dao động từ 5,7 – 9,2 cm, trong đó tổ hợp DM01x12 có chiều cao chồi thấp nhất và tổ hợp DM12x11 có chiều cao chồi cao nhất.

Hầu hết số lá được ghi nhận ở các tổ hợp DM11x18, DM11x24, DM12x14 có sự chênh lệch không nhiều. Riêng tổ hợp DM10x01 có số lá ít nhất, chỉ 3,6 lá/chồi.

Như vậy có thể thấy sự sinh trưởng của hạt lan từ các tổ hợp lai *Dendrobium* thấp cây nghiên cứu trong điều kiện *in vitro* cũng đã rất khác nhau. Sau 6 tháng nuôi cấy *in vitro*, so với tiêu chuẩn để đưa ra trồng trong điều kiện nhà lưới (cây cao 5 – 6 cm, có 4 – 5 lá) thì cây con của 9 tổ hợp đều đạt tiêu chuẩn.

#### **3.2.4. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển của các con lai trong điều kiện nhà lưới**

Sau giai đoạn nuôi cấy *in vitro*, cây con của các tổ hợp lai nghiên cứu được đưa ra trồng ngoài nhà lưới để khảo sát sinh trưởng và phát triển của các con lai trong điều kiện nhà lưới.

Dựa trên đặc điểm hình thái của các con lai, tiến hành phân nhóm và chọn lọc các cá thể đáp ứng mục tiêu con lai có kiểu hình thấp cây, chiều cao từ 15 - 20 cm, số hoa/phát hoa từ 6 hoa trở lên, màu sắc hoa mới lạ so với bố mẹ của chúng. Trong 9 tổ hợp lai theo dõi, tất cả cá thể của 2 tổ hợp lai DM01x12 và DM24x11 có số hoa/phát hoa dưới 6 hoa, không đáp ứng mục tiêu của con lai nêu trên nên không được phân nhóm. Bảy tổ hợp lai còn lại có cá thể đáp ứng mục tiêu nên được phân nhóm dựa trên đặc điểm hình thái. Sự phân nhóm dựa trên đặc điểm hình thái của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x12, DM11x24 và DM12x11 có 3 cá thể triển vọng được chọn lọc được thể hiện qua Hình 3.8, 3.9 và 3.10.

##### **3.2.4.1. Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x12 dựa trên đặc điểm hình thái**

Hình 3.8 thể hiện giá trị trung bình khoảng cách di truyền của 30 cá thể tổ hợp DM11x12 là 2,92.

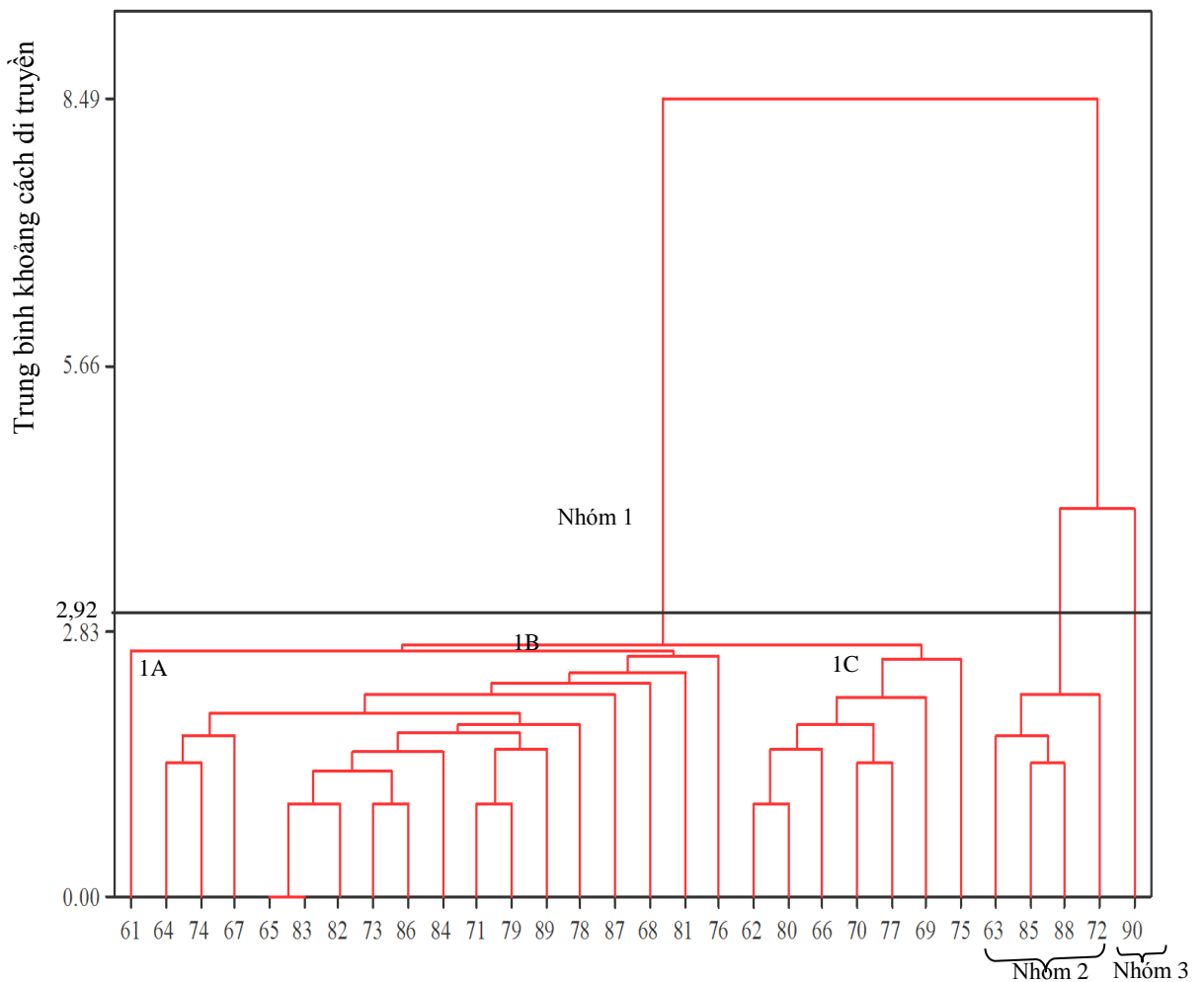
Sự phân nhóm của 30 cá thể tổ hợp DM11x12 được chia làm 3 nhóm chính:

- Nhóm 1 (trung bình khoảng cách di truyền 2,69): gồm 25 cá thể. Đặc điểm chung của nhóm 1 là số lá ít (3 – 5 lá), đường kính từ 2 – 4 cm, số hoa/phát hoa từ 3-6 hoa. Nhóm này được chia làm ba nhóm:

+ Nhóm 1A (trung bình khoảng cách di truyền 2,63): có một cá thể DM11x12:61. Cá thể này có chiều dài phát hoa ngắn nhất. Hoa có màu tím nhạt.

+ Nhóm 1B (trung bình khoảng cách di truyền 2,56): gồm 17 cá thể (DM11x12:64, 65, 67, 68, 71, 73, 74, 76, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 89). Đặc điểm chung của nhóm là hoa có màu tím nhạt.

+ Nhóm 1C (trung bình khoảng cách di truyền 2,54): gồm 7 cá thể (DM11x12:62, 66, 69, 70, 75, 77, 80). Nhóm này bao gồm những cá thể hoa có màu tím nhạt.



**Ghi chú:** cá thể số 90 là cá thể tiềm năng, đáp ứng các tiêu chí chọn lọc; số liệu chi tiết về các chỉ tiêu phát triển của 30 cá thể con lai ở phụ lục 4.

**Hình 3.8.** Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x12 dựa trên đặc điểm hình thái

- Nhóm 2 (trung bình khoảng cách di truyền 2,15): gồm 4 cá thể (DM11x12:63, 72, 85, 88). Các cá thể này có một số đặc điểm tương đồng như số hoa/phát hoa ít (nhỏ hơn 5 hoa) nhưng chiều dài phát hoa dài (15 – 20 cm), hoa có màu tím sọc.



- Nhóm 3 (trung bình khoảng cách di truyền 4,12): gồm 1 cá thể DM11x12:90. Cá thể này có hoa màu tím đậm, số hoa/phát hoa 10 hoa, cao nhất, trong số 30 con lai của tổ hợp này.

Như vậy, trong số 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x12, con lai DM11x12:90 có 10 hoa/phát hoa là cá thể tiềm năng, đáp ứng được các chỉ tiêu đề ra.

### **3.2.4.2. Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x24 dựa trên đặc điểm hình thái**

Hình 3.9 thể hiện giá trị trung bình khoảng cách di truyền của 30 cá thể tổ hợp DM11x24 là 2,72.

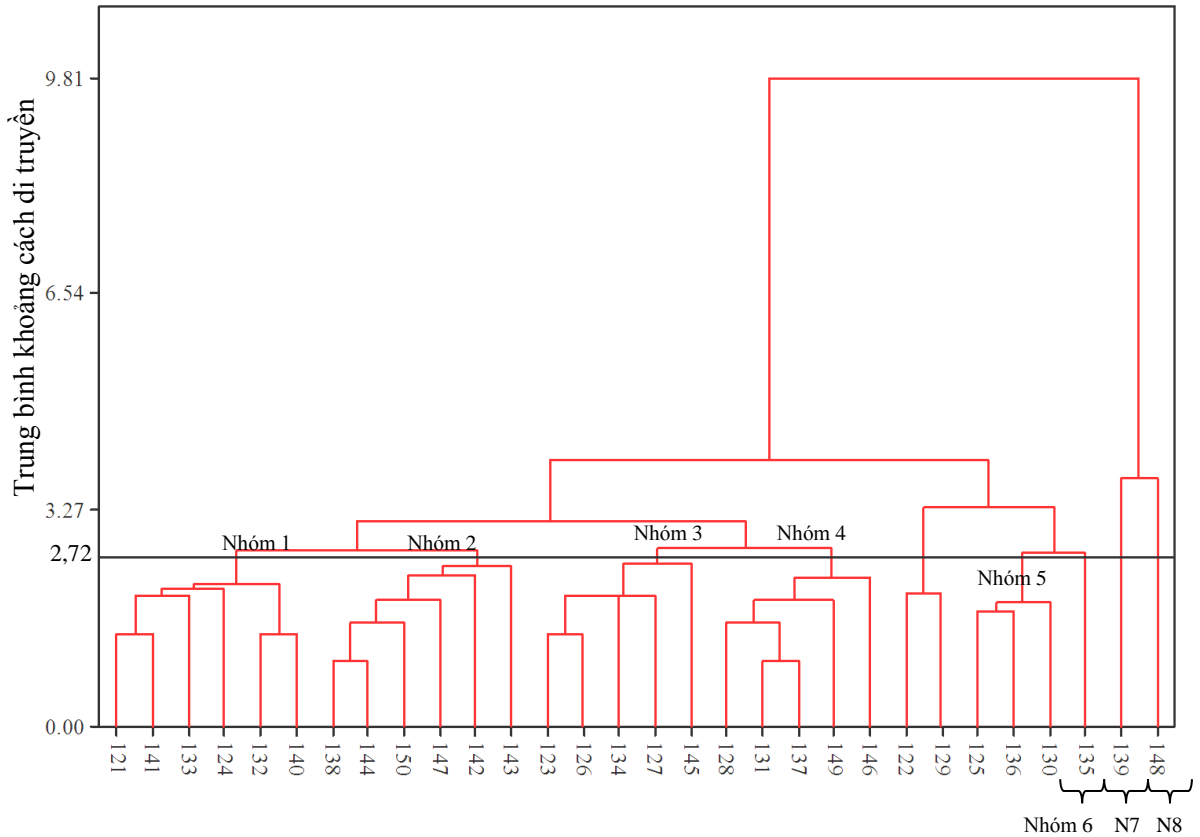
Sự phân nhóm của 30 cá thể tổ hợp DM11x24 được chia thành 9 nhóm chính:

- Nhóm 1 (trung bình khoảng cách di truyền 2,16): gồm 6 cá thể (DM11x24:121, 124, 132, 133, 140, 141). Các cá thể trong nhóm 1 có một số điểm tương đồng như: đường kính giả hành từ 1 cm đến 2 cm, thời gian sinh trưởng từ 8 – 10 tháng, đường kính hoa lớn hơn 5 cm, số hoa/phát hoa từ 3 - 7 hoa, hoa có màu tím nhạt.

- Nhóm 2 (trung bình khoảng cách di truyền 2,43): gồm 6 cá thể (DM11x24:138, 142, 143, 144, 147, 150). Nhóm 2 có đặc điểm chung là đường kính hoa từ 5,0 cm đến 6,0 cm, số hoa/phát hoa từ 3 - 6 hoa, hoa có màu tím nhạt.

- Nhóm 3 (trung bình khoảng cách di truyền 2,44): gồm 5 cá thể (DM11x24:123, 126, 127, 134, 145). Các cá thể trong nhóm 3 có màu tím nhạt như màu hoa của nhóm 1 nhưng có chiều dài phát hoa dài hơn các nhóm khác, số hoa/phát hoa từ 3-6 hoa.

- Nhóm 4 (trung bình khoảng cách di truyền 2,24): gồm 5 cá thể (DM11x24:128, 131, 137, 146, 149). Hoa của nhóm 4 có màu tím nhạt tương tự như màu hoa của nhóm 2 nhưng có chiều dài phát hoa dài hơn chiều dài phát hoa của nhóm 2, số hoa/phát hoa từ 3 - 6 hoa.



**Ghi chú:** cá thể số 139 là cá thể tiềm năng, đáp ứng các tiêu chí chọn lọc; số liệu chi tiết về các chỉ tiêu phát triển của 30 cá thể con lai ở phụ lục 4.

**Hình 3.9.** Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x24 dựa trên đặc điểm hình thái

- Nhóm 5 (trung bình khoảng cách di truyền 2): cá thể (DM11x24:122 và 129). Hai cá thể này có một số điểm tương đồng là có số giả hành và số lá bằng nhau (4 giả hành và 3 lá), hoa có màu tím nhạt, số hoa/phát hoa từ 2 - 4 hoa.

- Nhóm 6 (trung bình khoảng cách di truyền 1,87): gồm 3 cá thể (DM11x24:125, 130 và 136). Nhóm 6 hoa có màu tím nhạt tương tự như màu hoa của nhóm 5 nhưng có chiều dài lá và chiều dài phát hoa dài hơn nhóm 5, số hoa/phát hoa từ 3-5 hoa.

- Nhóm 7 (trung bình khoảng cách di truyền 2,64): có một cá thể DM11x24:135. Cá thể này có số hoa/phát hoa là 6 hoa, hoa có màu trắng môi tím.

- Nhóm 8 (trung bình khoảng cách di truyền 3,74): có một cá thể số 139. Cá thể 139 có hoa màu tím nhạt họng tím đậm, có số hoa/phát hoa là 9 hoa, cao nhất trong tổ hợp DM11x24.

- Nhóm 9 (trung bình khoảng cách di truyền 3,74): có một cá thể DM11x24:148. Cá thể này hoa có màu trắng sọc tím, có số hoa/phát hoa là 4 hoa .

Như vậy, trong số 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM11x24, con lai DM11x24:139 có 9 hoa/phát hoa là cá thể tiềm năng, đáp ứng được các chỉ tiêu đề ra.

### **3.2.4.3. Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM12x11 dựa trên đặc điểm hình thái**

Hình 3.10 thể hiện giá trị trung bình khoảng cách di truyền của 30 cá thể tổ hợp DM12x11 là 4,15.

Sự phân nhóm của 30 cá thể tổ hợp DM12x11 được chia thành 3 nhóm chính:

- Nhóm 1 (trung bình khoảng cách di truyền 3,94): gồm 17 cá thể. Các cá thể trong nhóm này có một số điểm tương đồng là đường kính lá từ 2 – 4 cm, tuổi thọ hoa từ 20 – 30 ngày, đường kính hoa lớn hơn 5 cm, số hoa/phát hoa từ 1 – 7 hoa. Nhóm này được chia thành hai nhóm chính

+ Nhóm 1A (trung bình khoảng cách di truyền 3,66): gồm 15 cá thể (DM12x11:151, 152, 153, 154, 156, 159, 160, 162, 163, 165, 167, 169, 172, 173, 176).

+ Nhóm 1B (trung bình khoảng cách di truyền 2,24): gồm 2 cá thể (DM12x11:158 và 168). Hai cá thể này có chiều dài phát hoa ngắn hơn, đường kính phát hoa nhỏ hơn và thời gian sinh trưởng ngắn hơn (dưới 5 tháng) so với các cá thể trong nhóm 1A.

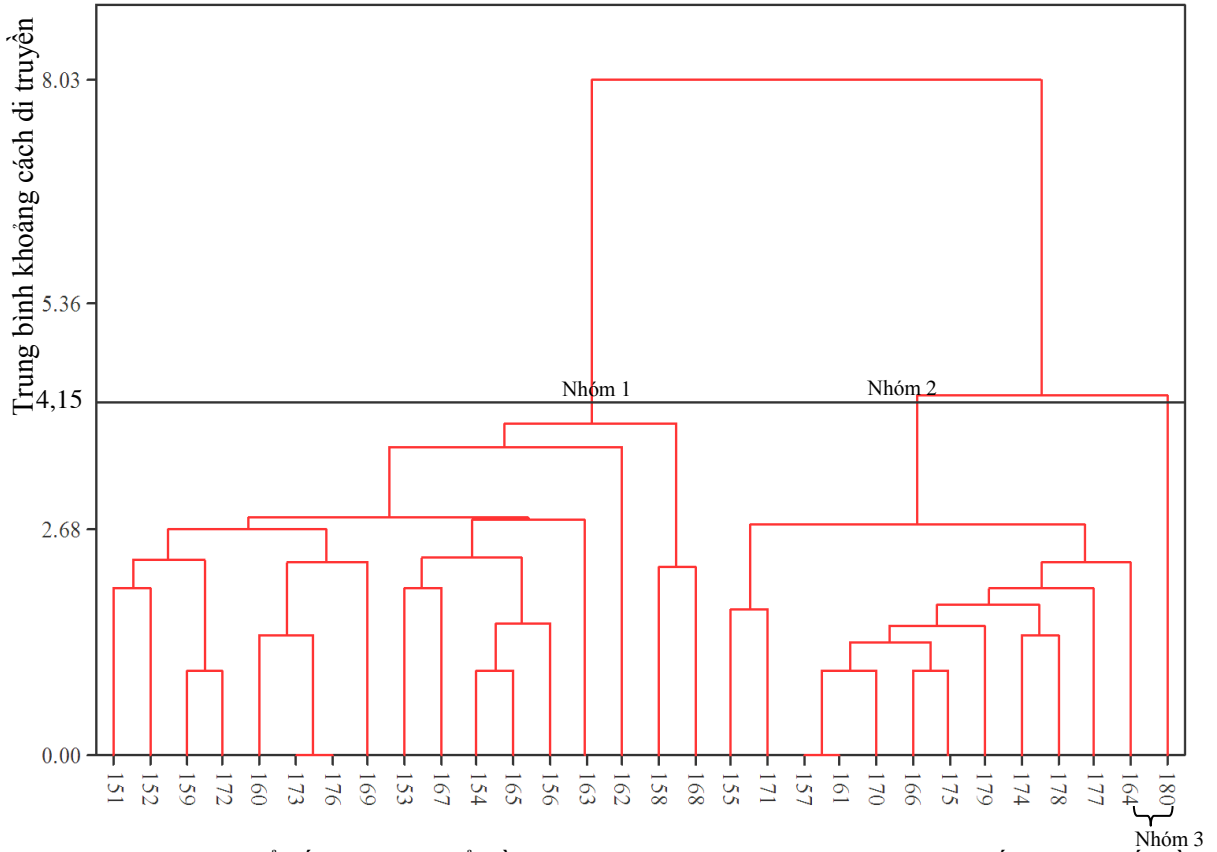
- Nhóm 2 (trung bình khoảng cách di truyền 2,73): gồm 12 cá thể. Các cá thể trong nhóm này có một số điểm tương đồng như số lá từ 3 – 4 lá, số hoa/ phát hoa ít (dưới 5 hoa. Nhóm này được chia thành hai nhóm chính

+ Nhóm 2A (trung bình khoảng cách di truyền 1,73): gồm 2 cá thể (DM12x11:155 và 171).

+ Nhóm 2B (trung bình khoảng cách di truyền 2,29): gồm 10 cá thể (DM12x11:157, 161, 164, 166, 170, 174, 175, 177, 178, 179).

Hai cá thể nhóm 2A hoa có màu tím phớt, nhóm 2B hoa có màu tím sọc

- Nhóm 3 (trung bình khoảng cách di truyền 4,27): có một cá thể DM12x11:180. Các thể này có màu trắng sọc tím, số hoa/phát hoa là 10 hoa, số hoa/phát hoa, cao nhất trong tổ hợp DM12x11.



**Ghi chú:** cá thể số 180 là cá thể tiềm năng, đáp ứng các tiêu chí chọn lọc; số liệu chi tiết về các chỉ tiêu phát triển của 30 cá thể con lai ở phụ lục 4.

**Hình 3.10.** Sự phân nhóm của 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM12x11 dựa trên đặc điểm hình thái

Như vậy, trong số 30 cá thể con lai thuộc tổ hợp DM12x11, con lai DM12x11:180 có 10 hoa/phát hoa là cá thể tiềm năng, đáp ứng được các chỉ tiêu đề ra. Sự phân nhóm dựa trên đặc điểm hình thái của 30 cá thể con lai thuộc 4 tổ hợp lai còn lại đã xác định 5 cá thể tiềm năng (DM10x01:51, DM11x18:111, DM12x13:184, DM12x13:186 và DM12x14:229) được thể hiện ở phụ lục 4. Đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 8 cá thể lai có tiềm năng được thể hiện qua Bảng 3.10.

**Bảng 3.10.** Đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 8 cá thể lai có tiềm năng





Cá thể	Số giả hành	Chiều cao giả hành (cm)	Chiều cao cây (cm)	Đường kính giả hành (cm)	Số lá (lá)	Dài lá (cm)	Rộng lá (cm)	Thời gian sinh trưởng (tháng)	Chiều dài phát hoa (cm)	Số hoa/phát hoa (hoa)	Đường kính hoa (cm)	Thời gian nở hoa (ngày)	Tuổi thọ hoa (ngày)
DM10x01:51	2	14,2	20,0	1,49	6	11,8	2,5	8	35,7	17	4,1	31	32
<b>DM11x12:90</b>	<b>3</b>	<b>10,1</b>	<b>18,0</b>	<b>1,5</b>	<b>5</b>	<b>10,5</b>	<b>1,9</b>	<b>10</b>	<b>33,1</b>	<b>10</b>	<b>6,5</b>	<b>30</b>	<b>35</b>
DM11x18:111	5	9,5	18,0	1,52	5	7,5	1,9	9	18	6	6,5	27	27
<b>DM11x24:139</b>	<b>3</b>	<b>8,6</b>	<b>17,0</b>	<b>2,17</b>	<b>4</b>	<b>10,3</b>	<b>1,9</b>	<b>8</b>	<b>28,5</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>30</b>	<b>37</b>
<b>DM12x11:180</b>	<b>3</b>	<b>8,2</b>	<b>19,0</b>	<b>2,56</b>	<b>6</b>	<b>13,9</b>	<b>3,2</b>	<b>8</b>	<b>36,9</b>	<b>10</b>	<b>5,8</b>	<b>32</b>	<b>40</b>
DM12x13:184	2	10,2	17,0	1,81	4	12,2	2,1	8	24,5	7	6,3	32	33
DM12x13:186	3	8,2	18,0	1,51	4	8,8	2,1	8	26,5	8	5,8	32	29
DM12x14:229	5	10,2	15,0	1,57	4	10,7	1,9	8	21,5	7	6,3	29	31









Bảng 3.10 cho thấy 8 cá thể có tiềm năng đều có thời gian sinh trưởng từ 8 – 10 tháng (thời gian từ khi trồng cây con trong nhà lưới cho đến khi cây xuất hiện phát hoa), hết thời gian sinh trưởng cây bắt đầu ra hoa. So với thời gian 14 - 15 tháng bắt đầu ra hoa sau khi trồng ngoài nhà lưới của 6 dòng lan lai *Dendrobium* mới được bảo hộ năm 2018 của Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM (Phan Diễm Quỳnh và ctv, 2019) hoặc thời gian sinh trưởng 19 - 24 tháng của 06 giống lan thuộc chi *Dendrobium* nhập nội từ Thái Lan được trồng ở khu vực đồng bằng Bắc Bộ (Hoàng Xuân Lam, 2014) thì 8 dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây từ kết quả của đề tài có thời gian ra hoa sớm hơn 6 - 11 tháng. Căn cứ vào các chỉ tiêu chính như số hoa/phát hoa, chiều dài phát hoa, đường kính hoa và tuổi thọ hoa thì 3 cá thể 90, 139 và 180 vượt trội nhất đáp ứng mục tiêu của đề tài được tiếp tục nhân giống vô tính để tạo thành 3 dòng lai DM11x12:90, DM11x24:139 và DM12x11:180 có triển vọng.

#### 3.2.4.4. Đặc điểm hình thái của 3 dòng lai *Dendrobium* thấp cây có triển vọng được chọn lọc

Đặc điểm của 3 dòng lai *Dendrobium* thấp cây có triển vọng được chọn lọc được thể hiện qua Bảng 3.11.

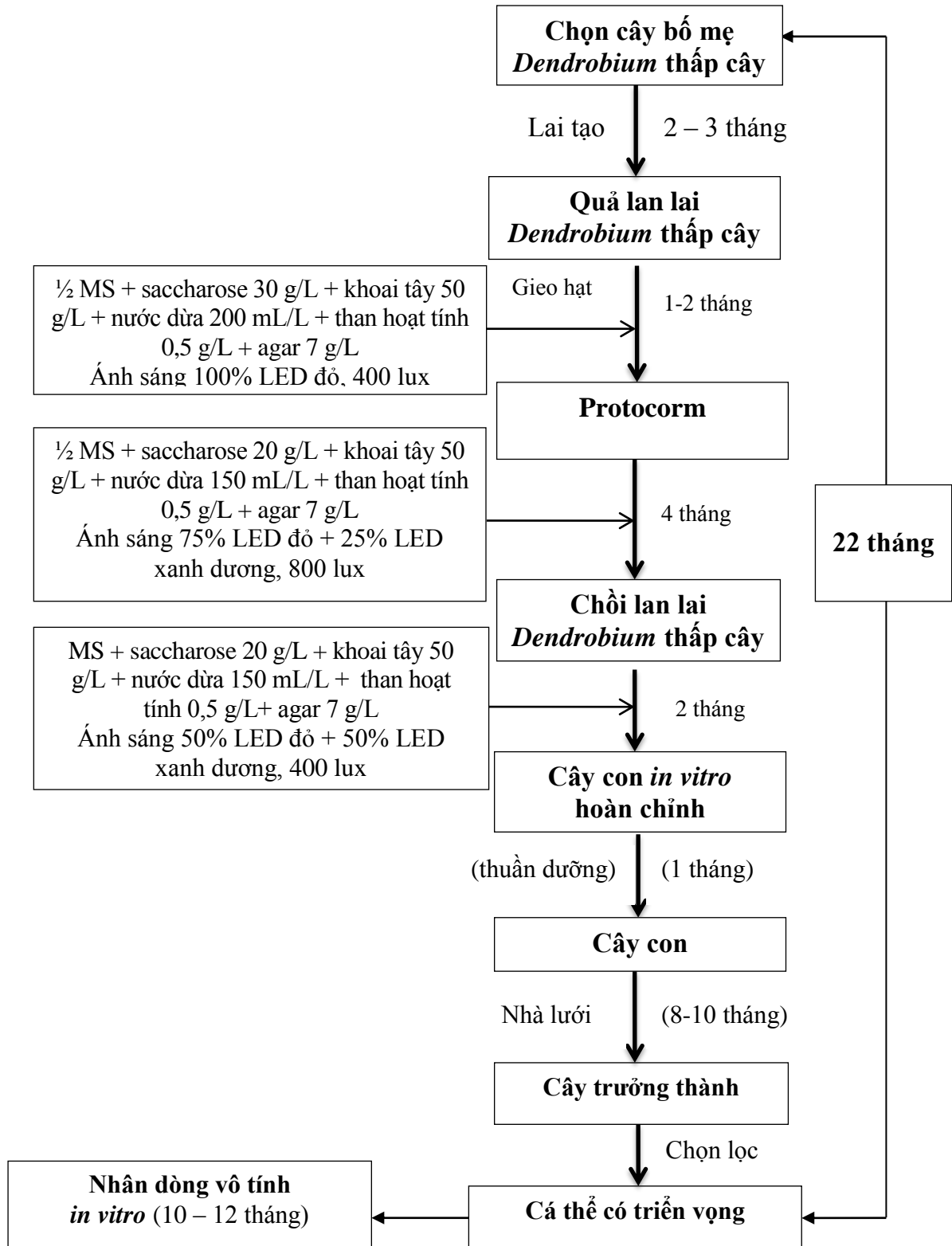
**Bảng 3.11.** Đặc điểm của 3 dòng lai *Dendrobium* có triển vọng được chọn lọc

Tổ hợp lai		Con lai	Hình dạng cây
Mẹ	Bố		
 <p>Mẹ DM11 Đường kính hoa: 6,43 cm; số hoa: 9 hoa; chiều dài phát hoa: 28,93 cm; chiều cao giả hành: 17,43 cm; số giả hành: 4; số lá: 5 lá</p>	 <p>Bố DM12 Đường kính hoa: 6,33 cm; số hoa: 8,67 hoa; chiều dài phát hoa: 21,77 cm; chiều cao giả hành: 12,30 cm; số giả hành: 4; số lá: 5 lá</p>	 <p>Con lai 1 Dòng DM11x12:90 Đường kính hoa: 6,5 cm; số hoa: 10 hoa; chiều dài phát hoa: 33,1cm ; chiều cao giả hành: 10,1 cm; số giả hành: 3; số lá: 4 lá. Chiều cao cây: 18 cm. Tuổi thọ hoa 35 ngày.</p>	 <p>Dòng DM11x12:90</p>

			
<p>Mẹ DM11 Đường kính hoa: 6,43 cm; số hoa: 9 hoa; chiều dài phát hoa: 28,93 cm; chiều cao giả hành: 17,43 cm; số giả hành: 4; số lá: 5 lá</p>	<p>Bố DM24 Đường kính hoa: 4,87 cm; số hoa: 12,67 hoa; chiều dài phát hoa: 28,67 cm; chiều cao giả hành: 8,53 cm; số giả hành: 6; số lá: 4 lá</p>	<p>Con lai 4 Dòng DM11x24:139 Đường kính hoa: 6 cm; số hoa: 9 hoa; chiều dài phát hoa: 28,5 cm; chiều cao giả hành: 8,6 cm; số giả hành: 3; số lá: 4 lá. Chiều cao cây: 17 cm. Tuổi thọ hoa 37 ngày.</p>	<p>Dòng DM11x24:139</p>
			
<p>Mẹ DM12 Đường kính hoa: 6,33 cm; số hoa: 8,67 hoa; chiều dài phát hoa: 21,77 cm; chiều cao giả hành: 12,30 cm; số giả hành: 4; số lá: 5 lá</p>	<p>Bố DM11 Đường kính hoa: 6,43 cm; số hoa: 9 hoa; chiều dài phát hoa: 28,93 cm; chiều cao giả hành: 17,43 cm; số giả hành: 4; số lá: 5 lá</p>	<p>Con lai 5 Dòng DM12x11:180 Đường kính hoa: 5,8 cm; số hoa: 10 hoa; chiều dài phát hoa: 36,9 cm; chiều cao giả hành: 8,2 cm; số giả hành: 3; số lá: 6 lá. Chiều cao cây: 19 cm. Tuổi thọ hoa 40 ngày.</p>	<p>Dòng DM12x11:180</p>

### 3.2.5. Quy trình tạo dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây

Từ kết quả nghiên cứu ở nội dung 1 về xác định một số điều kiện cho sự phát triển thích hợp của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây và nội dung 2 về lai tạo hoa lan *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc các dòng lai có triển vọng có thể đưa ra quy trình tạo dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây thông qua lai tạo, thể hiện qua Hình 3.11.



**Hình 3.11.** Quy trình tạo dòng lan lai *Dendrobium thắp cây*

Chi tiết về quy trình tạo dòng lan lai *Dendrobium thắp cây* được thể hiện trong Phụ lục 5.



### 3.3. Chiếu xạ gây đột biến *in vitro* protocorm lan *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng

Trước khi tiến hành xử lý chiếu xạ gây đột biến giống trên quy mô lớn, việc thử nghiệm và xác định khả năng gây chết cho giống dưới tác động của liều xạ là yếu tố được quan tâm hàng đầu. Sự khác nhau về độ nhạy cảm của tia phóng xạ ở các giống là khác nhau. Sự khác nhau về độ nhạy cảm tia phóng xạ còn biểu hiện ở các giai đoạn sinh trưởng và còn tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác, nên rất khó dự đoán được tác động của các liều chiếu (Đỗ Khắc Thịnh, 2011).

Thí nghiệm này được tiến hành nhằm mục đích xác định được liều gây chết 50% mẫu ( $LD_{50}$ ) của tổ hợp lai DM12x13 trong điều kiện *in vitro*, trên cơ sở đó có thể xác định các liều xạ có khả năng gây biến dị phù hợp nhất.

#### 3.3.1. Xác định liều $LD_{50}$

Trong các tổ hợp lai nghiên cứu thì tổ hợp lai DM12x13 có tỷ lệ đậu quả, số quả/cây và tỷ lệ nảy mầm là tốt nhất, đủ số lượng quả để bố trí các thí nghiệm nên trong nội dung chiếu xạ gây đột biến chọn tổ hợp lai DM12x13 để thực hiện.

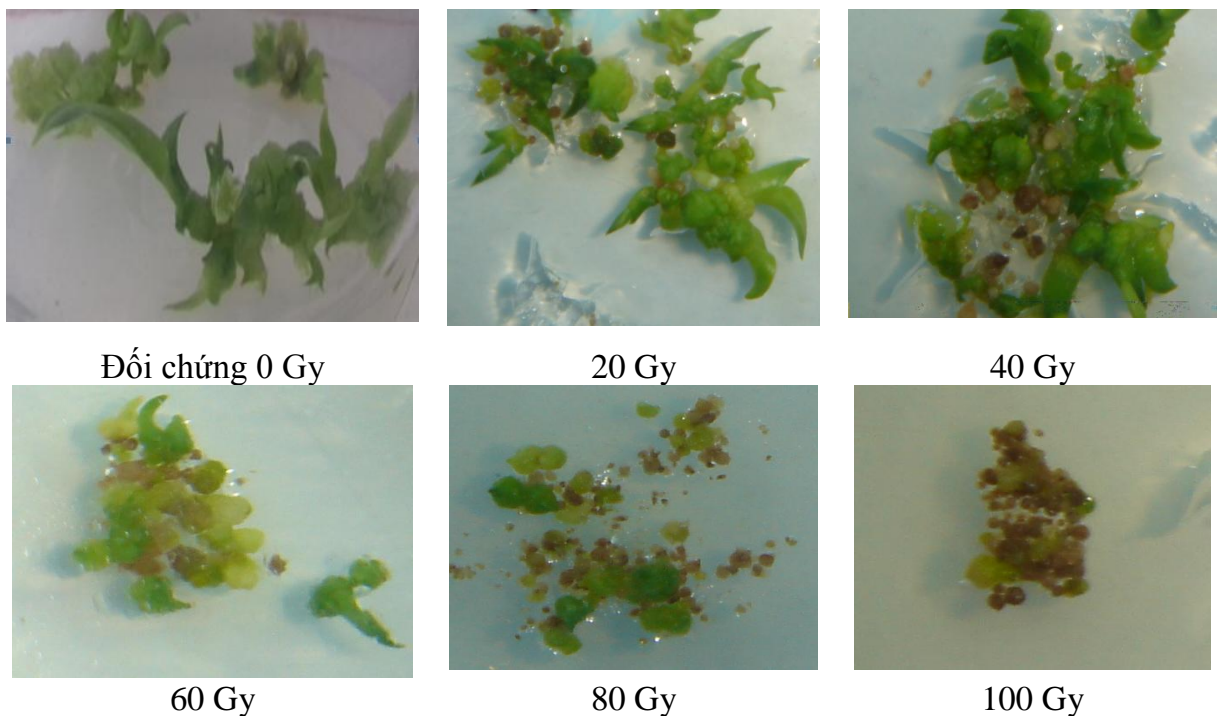
Tỷ lệ chết của tổ hợp lai DM12x13 sau chiếu xạ theo thời gian được thể hiện qua Bảng 3.12.

**Bảng 3.12.** Tỷ lệ chết của tổ hợp lai DM12x13 sau chiếu xạ ở 3 thời điểm khác nhau

Liều xạ (Gy)	Tỷ lệ chết (%)		
	3 tháng	5 tháng	7 tháng
ĐC (0Gy)	1	2	5
20	3	7	8,5
40	4	12	12,2
60	17	38	41,3
80	21	59	61,3
100	28	68	83,9

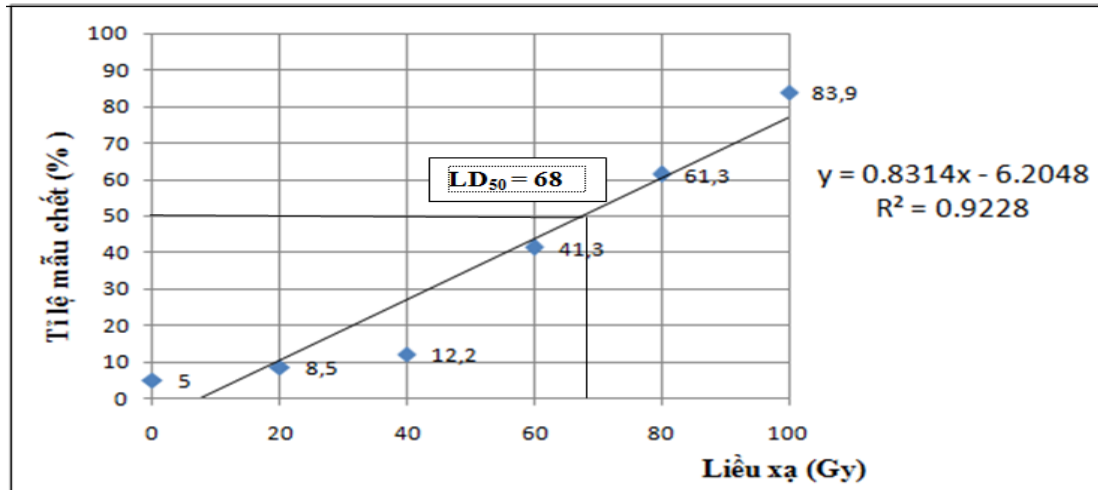
Bảng 3.12 cho thấy liều chiếu xạ đã ảnh hưởng đến sức sống của tổ hợp nghiên cứu. Liều chiếu càng cao và thời gian theo dõi càng lâu thì tỷ lệ chết càng cao. Tỷ lệ chết sau 7 tháng theo dõi từ 5 đến 83,9% và cao nhất ở liều chiếu xạ 100 Gy. Lê Văn Hòa và ctv (2007) nhận thấy khi chiếu xạ chồi *Dendrobium* ở liều xạ 10

Gy (hệ số nhân = 1,23) cao hơn đối chứng (hệ số nhân = 1,17). Kết quả tương tự trong nghiên cứu của Arunyanart và Soontronyatane (2002) trên protocorm *Dendrobium* và *Vanda*. Theo báo cáo của Chitrapan và ctv (2010), trong thí nghiệm xử lý đột biến tia Gamma  $^{60}\text{Co}$  với các liều 0 – 20 – 60 – 80 – 110 và 130 Gy trên 8 loài lan, mức độ phản ứng của từng nhóm giống và loài có sự khác nhau. Loài lan *Grammatophyllum speciosum* có tỷ lệ sống sót 98-100% trên tất cả các liều, trong khi loài lan *Calanthe ruben* có tỷ lệ sống sót 0% ở tất cả các liều.



**Hình 3.12.** Ảnh hưởng của tia Gamma  $^{60}\text{Co}$  đến sức sống của protocorm tổ hợp lai DM12x13 sau 3 tháng chiếu xạ

Liều xạ 80 Gy và 100 Gy có tỷ lệ chết cao, tương tự kết quả nghiên cứu của Thammasiri (1996) khi nghiên cứu ảnh hưởng bức xạ tia gamma với các liều 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 Gy đối với cây con 2 lá của một số giống lan, kết quả cho thấy liều trên 70 Gy có tỷ lệ chết rất cao, tương tự nhận xét của Yamaguchi và ctv (2008) trong nghiên cứu ảnh hưởng của tia gamma các mức 15 – 30 – 60 Gy chiếu xạ lên cây *Chrysanthemum morifolium*, tỷ lệ tái sinh của cây càng giảm khi tăng liều chiếu xạ. Sự tương quan giữa tỷ lệ chết và liều xạ của tổ hợp nghiên cứu được thể hiện qua Hình 3.13.

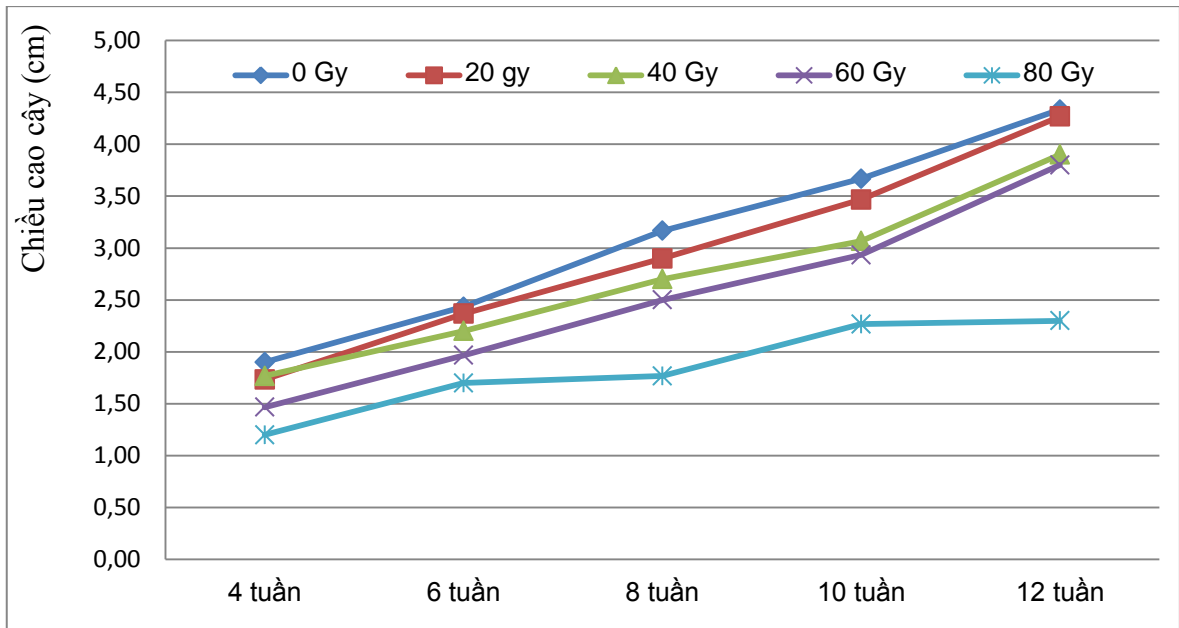


**Hình 3.13.** Sự tương quan giữa tỷ lệ chết và liều xạ của tổ hợp lai DM12x13

Hình 3.13 cho thấy mối tương quan thuận ( $R^2 = 0,9228$ ) giữa liều chiếu xạ và tỷ lệ mẫu chết. Khi tăng liều xạ thì tỷ lệ sống sót của các mẫu ở tổ hợp lai DM12x13 giảm đi. Những tổn thương về mặt sinh lý khi gia tăng liều chiếu và khả năng gây chết 100% là ngưỡng cao nhất. Chính vì lý do này nên yêu cầu đặt ra đối với những tác nhân gây đột biến được sử dụng đó là ít làm tổn thương ở thực vật nhưng phải có ảnh hưởng lớn đến di truyền. Hai chỉ số  $LD_{30}$  (liều gây chết 30%) là  $LD_{50}$  (liều gây chết 50%) thường được sử dụng để dự đoán mức độ tổn thương của giống và cũng là hai chỉ số thông dụng trong xử lý đột biến.  $LD_{30}$  là ngưỡng giúp xác định liều có tác dụng gây kích thích sinh trưởng và  $LD_{50}$  là ngưỡng mà ở đó tác nhân gây đột biến có thể tạo ra những biến đổi trong bộ máy di truyền của thực vật (Đỗ Khắc Thịnh, 2011). Dựa vào tỷ lệ chết của các liều xạ được sử dụng để tính tương quan và hồi quy và đạt được phương trình  $y = 0,8314x - 6,2048$ ,  $R^2 = 0,9228$ . Trên cơ sở phương trình này, liều gây chết 50%  $LD_{50}$  ở 68 Gy. Việc tìm ra liều  $LD_{50}$  có ý nghĩa thiết thực cho việc xác định liều gây tạo đột biến một cách hiệu quả nhất.

### 3.3.2. Chiếu xạ gây đột biến *in vitro* protocorm tổ hợp DM12x13

Nhìn chung, tốc độ tăng trưởng chiều cao của các tổ hợp giảm dần theo liều xạ. Lê Văn Hòa và cộng sự (2007) đã kết luận việc tăng liều chiếu xạ đã làm giảm chiều cao chồi *Dendrobium*. Hiện tượng này cũng tương tự nhận xét của Yamaguchi và ctv (2008) trong nghiên cứu ảnh hưởng của liều tia gamma chiếu xạ lên cây *Chrysanthemum morifolium*.



**Hình 3.14.** Ảnh hưởng của liều xạ đến tốc độ tăng trưởng chiều cao cây con *in vitro* của tổ hợp lai DM12x13 theo thời gian

Hình 3.14 cho thấy ở liều chiếu 0 Gy (đối chứng), liều xạ 20 Gy và 40 Gy, tốc độ tăng trưởng chiều cao không khác biệt hoặc khác biệt rất nhỏ. Tốc độ tăng trưởng chiều cao ở liều xạ 80 Gy chậm đáng kể so với đối chứng và gần như không tăng trưởng. Amano (2004) đã lý giải sự kém phát triển của các đối tượng được chiếu xạ do ion hóa đã gây trở ngại đến quá trình phân chia bình thường của tế bào. Các tác động này ảnh hưởng trực tiếp lên các vật chất di truyền, gây ức chế sự phân chia tế bào.

### 3.3.2.1. Chọn lọc, quan sát hình thái các dòng biến dị đột biến trong điều kiện *in vitro*

Tần số xuất hiện kiểu biến dị về hình dạng và màu sắc lá, hình dạng và màu sắc giả hành sau khi chiếu xạ ở tổ hợp lai DM12x13 được thể hiện qua các Bảng 3.13, 3.14 và 3.15.

Kết quả thí nghiệm trình bày ở Bảng 3.13, 3.14 và 3.15 cho thấy sau 7 tháng chiếu xạ, cây con đã có những biểu hiện biến dị về lá và thân xuất hiện ở tất cả các liều từ 0 -80 Gy. Qua quan sát ghi nhận đó là những sai khác về hình dạng thân, lá giữa các cây chiếu xạ và giữa cây đối chứng với cây chiếu xạ như: viền mép các lá xẻ thùy nhiều, mép lá gợn sóng (răng cưa), lá dài, lá tròn, lá ống, lá to, lá dính, lá nhiều gân. Tần suất biến dị hình thái lá khi xử lý chiếu xạ cây *in vitro* là tương đối

cao. Cũng như biến dị trong nuôi cấy mô, biến dị xuất hiện phổ biến sau chiếu xạ là các dạng cây thấp cây, cây bị ức chế không sinh trưởng, các biến dị hình dạng lá (viền lá hình răng cưa, phiến lá biến dạng thành ống) và hình dạng thân (nhiều giả hành, dạng củ hành thấp cây, thân chia mấu, thấp cây) (Nguyễn Thị Mỹ Duyên, 2009). Từ việc thống kê các dạng kiểu hình xuất hiện của các mẫu chiếu xạ và không chiếu xạ thấy rằng: màu sắc lá dễ mẫn cảm với tia phóng xạ gamma ( $\gamma$ ). Các biến dị diệp lục phát sinh nhiều trong dãy liều xạ 20-80Gy. Dựa vào sự biến đổi màu sắc lá và một số tính trạng có thể phân thành các dạng đặc trưng: bạch tạng, màu vàng, vàng + xanh đã trình bày trong các bảng trên. Ở các dạng này các cây sau đó bị chết dần và đó là những biến dị đột biến gây chết. Những dạng cây có lá dị hình + lá xen màu vàng nhạt, hay lá có màu trắng + xanh hay dạng vàng + xanh ở các dạng này cây có khả năng hồi phục lại sự sống, đây là những biến dị không gây chết và có thể bao gồm: biến dị có lợi, biến dị trung tính. Ở những dạng này, cây không chết nhưng sinh trưởng và phát triển chậm. Như vậy đã có sự tác động của tia phóng xạ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng không bình thường của cây con. Điều này có thể do các liều lượng phóng xạ đã gây ra các rối loạn của NST, DNA hay hoạt tính của các hợp chất trong thành phần cấu trúc của tế bào nhưng chưa đủ gây chết cho cây. Do hiện tượng đột biến gen làm phá vỡ cấu trúc hóa học của các gen, phá vỡ sự cân bằng về sinh lý sinh hóa của cây, gây nên những tác hại thể hiện thông qua các hiện tượng dị hình, bất dục.

Mọi dạng bức xạ ion hóa đều có hiệu ứng gây chết và gây đột biến cho mọi tế bào và nhiều ý kiến cho rằng bức xạ ion hóa trước hết làm tổn thương DNA, nhưng ở một số sinh vật, có hệ thống tự sửa chữa, nhưng sự sửa chữa này thường dẫn đến đảo đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn và mất đoạn đã gây nên các kết quả rất khác nhau ở trên.

Chọn lọc hình thái các cây con từ các tổ hợp lai là việc làm cần thiết. Dưới tác dụng của tia gamma, vật chất di truyền bị thay đổi thể hiện ban đầu của chúng là những biến đổi hình thái thể quan sát được. Từ việc quan sát các kiểu hình xuất hiện, xác định cây có kiểu hình biến dị đột biến và sự duy trì biến dị đó qua đó nhận xét được việc chiếu xạ đã tác động lên các mẫu lai tạo như thế nào.

**Bảng 3.13.** Ảnh hưởng của liều xạ đến biến dị về màu sắc lá của các con lai sau 7 tháng chiếu xạ thuộc tổ hợp DM12x13 ở thế hệ M1V1

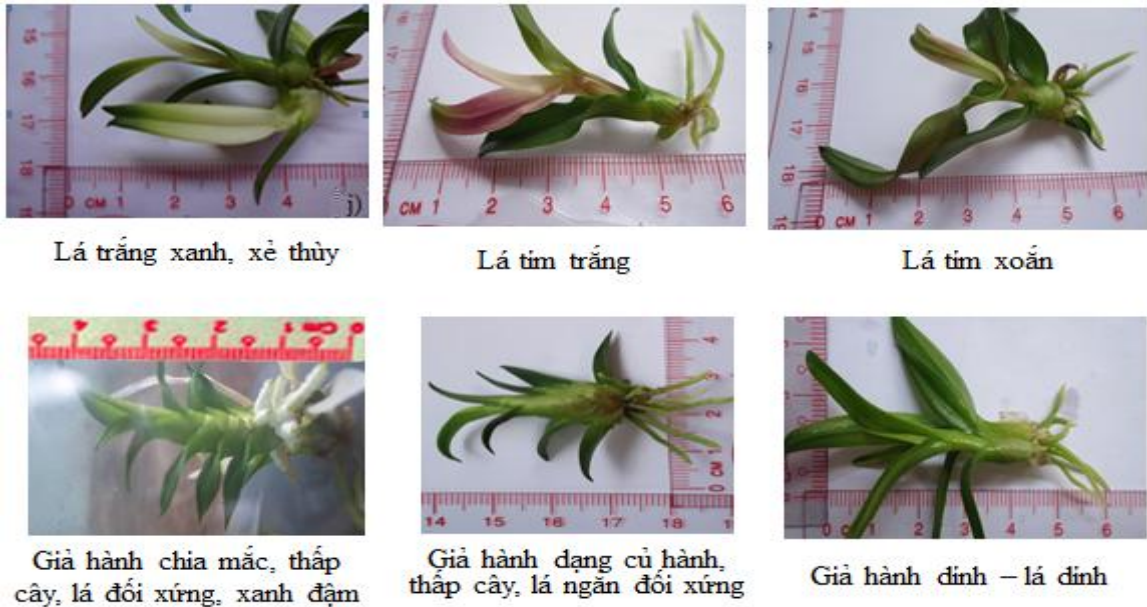
Liều xạ (Gy)	Số protocorm chiếu xạ (protocorm)	Số protocorm sống (protocorm)	Số cây thu được (cây)	Số cây biến dị (cây)	Tần số xuất hiện kiểu biến dị về màu sắc lá (%)					
					Lá tím	Lá trắng xanh	Lá xanh đậm	Lá tím- trắng	Lá vàng- xanh	Lá xanh nhạt
0 (ĐC)	300	285	690	18	0,39	0,39	1,16	-	-	-
20	300	275	1343	495	41,70	0,77	-	-	-	-
40	300	263	775	340	36,29	-	-	-	0,19	-
60	300	176	684	98	4,63	0,77	1,93	0,12	0,15	0,39
80	300	116	1901	140	7,72	-	0,77	-	-	-

**Bảng 3.14.** Ảnh hưởng của liều xạ đến biến dị về dạng lá của các con lai sau 7 tháng chiếu xạ thuộc tổ hợp DM12x13 ở thế hệ M1V1

Liều xạ (Gy)	Số cây thu được (cây)	Số cây biến dị (cây)	Tần số xuất hiện (%)										
			Lá xoắn	Lá dày	Lá dài	Lá tròn	Lá răng cưa	Lá ống	Lá xẻ thùy	Lá đối xứng	Lá to	Lá dính	Lá nhiều gân
0 (ĐC)	690	18	1,40	1,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	1343	495	5,26	-	14,39	1,40	2,46	0,18	-	-	-	-	-
40	775	340	9,82	-	13,33	3,68	-	0,35	-	-	-	-	-
60	684	98	10,35	0,53	-	-	-	0,53	2,63	0,53	0,70	-	0,18
80	1901	140	19,12	0,18	-	-	-	0,70	2,98	0,18	0,70	0,18	-

**Bảng 3.15.** Ảnh hưởng của liều xạ đến biến dị về hình dạng và màu sắc giả hành của các con lai sau 7 tháng chiếu xạ thuộc tổ hợp DM12x13 ở thế hệ M1V1

Liều xạ (Gy)	Số cây thu được (cây)	Số cây biến dị (cây)	Tần số xuất hiện (%)									
			Hình dạng giả hành				Màu sắc giả hành					
			Chia mắc (thấp cây)	To (thấp cây)	Nhiều giả hành (thấp cây)	Dạng củ hành (thấp cây)	Dính	Giả hành chính nảy chồi	Xanh nhạt	Xanh đậm	Tím	
0 (ĐC)	690	18	-	0,68	-	-	-	-	-	0,74	-	-
20	1343	495	53,81	-	0,54	-	1,09	-	-	-	41,04	19,26
40	775	340	34,47	1,09	-	0,15	0,14	0,17	-	-	21,33	16,74
60	684	98	0,14	-	1,63	-	-	-	-	-	0,15	-
80	1901	140	1,09	-	3,81	-	-	-	-	-	0,74	-



**Hình 3.15.** Một số biến dị tổ hợp DM12x13 tại thời điểm sau chiếu xạ 6 tháng

Gây tạo đột biến thực vật bằng bức xạ ion hóa nói chung và bức xạ gamma nói riêng đã chứng minh từ thực nghiệm tần số đột biến tăng dần theo liều xạ áp dụng. Tuy nhiên theo nghiên cứu từ trước tới nay nhận thấy rằng khi tăng liều xạ thì các hiệu ứng không mong muốn như tỷ lệ mẫu chết và những đột biến có hại cũng tăng theo. Trên đối tượng *Citrus grandis* L. Osbeck, khi sử dụng nguồn gamma  $Co^{60}$  làm tác nhân phóng xạ đối với mẫu mắt mầm và mẫu đốt thân, liều phù hợp để gây tạo đột biến tương đương liều 20 – 30 Gy, ở suất liều 19,22 - 22,1 rad/s (Phạm Thành Hồ, 2006).

### 3.3.2.2. Một số kiểu biến dị lạ được ghi nhận sau khi chiếu xạ protocorm tổ hợp lai DM12x13

#### a. Sự biến đổi về màu sắc lá (diệp lục) và hình thái cây (không tạo rễ) trong điều kiện *in vitro*

Trong các kiểu biến dị lạ được ghi nhận sau khi chiếu xạ protocorm tổ hợp lai DM12x13 có biến dị biến đổi về màu sắc lá (diệp lục) và hình thái cây (không tạo rễ). Từ khi được tách riêng và nuôi cấy *in vitro*, cây liên tục tăng trưởng, ban đầu chỉ có hai cá thể, sau 7 tháng cây đã nhân ra được rất nhiều chồi. Mỗi chồi con sinh ra đều có những thay đổi về màu sắc và hình dạng nhưng vẫn duy trì sự bất ổn định về màu sắc lá (Hình 3.16).



Từ tháng thứ nhất cây chỉ là một cụm chồi có một số lá có sọc trắng. Sau hai tháng những lá mới sinh ra xuất hiện thêm những sọc trắng ngà to hơn, xen kẽ sọc xanh, xuất hiện một chồi có lá bạch tạng. Cây không xuất hiện rễ và bắt đầu tự chết sau 7 tháng nuôi cấy.

Theo Lê Tiến Dũng (2002), các biến dị dạng bạch tạng, dạng màu vàng, dạng khảm vàng + xanh là những dạng biến dị có thể gây chết. Điều này phù hợp với quy luật gây ra bởi đột biến nhân tạo vì các liều xạ sử dụng đã gây nên những ảnh hưởng nhất định đến cấu trúc NST, trạng thái hoạt động của các gen tế bào chất do đó làm thay đổi tính trạng quyết định bởi gen trong lục lạp, có thể biến gen trội thành gen lặn làm cho kiểu gen ở trạng thái đồng hợp tử lặn hình thành các dạng biến dị mất màu sắc. Ngoài ra, hàm lượng các chất trong tế bào (protein, hợp chất thứ cấp) cũng có thể là nguyên nhân gây ra các hiện tượng trên.



Sau 2 tháng



Sau 3 tháng



Sau 4 tháng



Sau 5 tháng



Sau 6 tháng



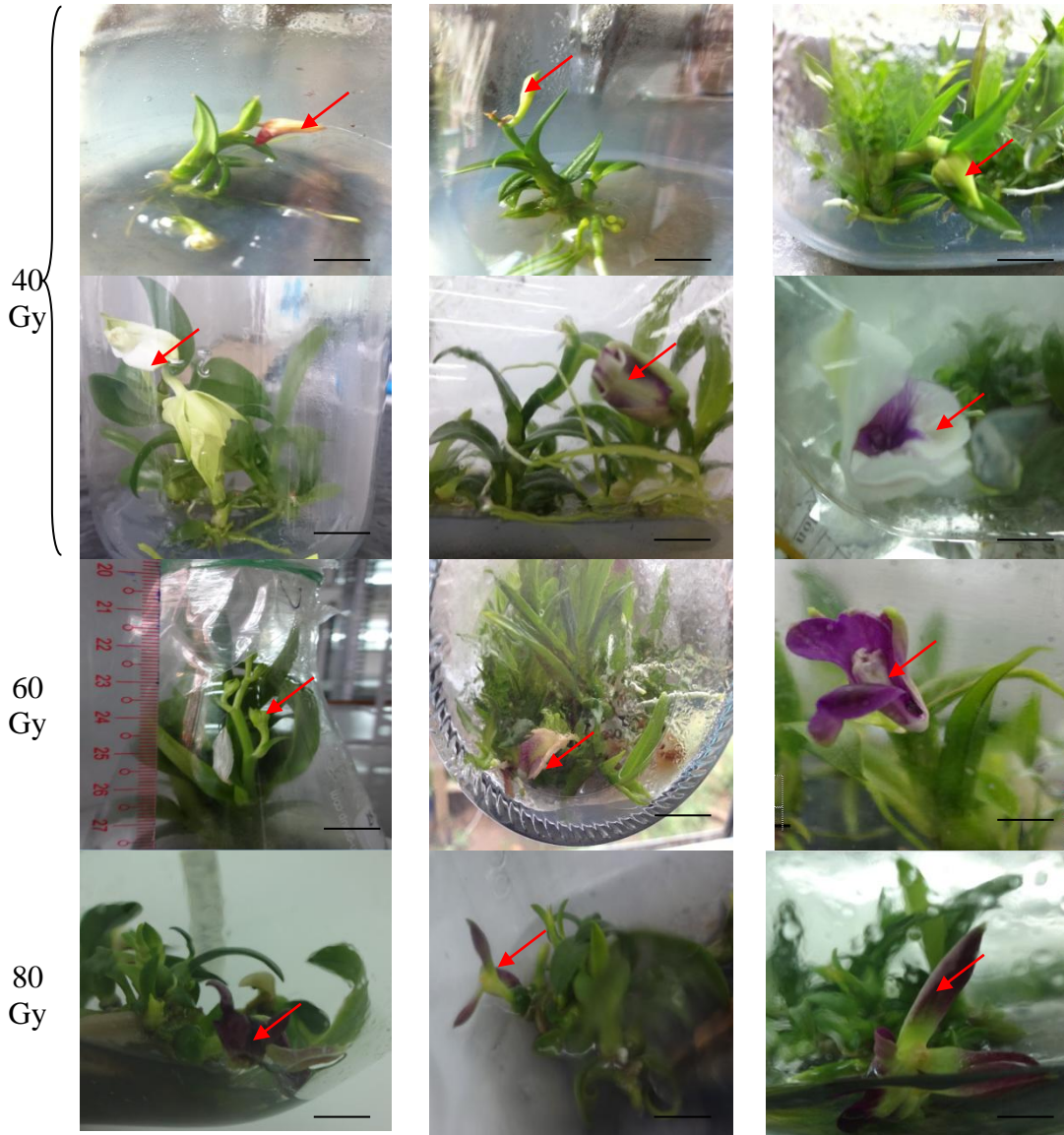
Sau 7 tháng

**Hình 3.16.** Sự biến đổi hình thái theo thời gian của biến dị biến đổi về màu sắc lá (diệp lục) và hình thái cây (không tạo rễ) trong điều kiện *in vitro* của tổ hợp lai DM12x13 ở liều xạ 60 Gy

#### **b. Cây biến dị có khả năng tạo hoa sớm *in vitro***

Trong quá trình quan sát biến dị *in vitro* sau 8 tháng chiếu xạ đã phát hiện được một số cá thể có hiện tượng ra hoa sớm. Sự ra hoa chỉ xuất hiện ở những dòng biến dị được chiếu xạ do sự kích thích của các tác nhân phóng xạ. Tổ hợp lai DM12x13 ra hoa ở liều 20, 40 và 60 Gy có thể do tác nhân phóng xạ đã ảnh hưởng đến gen điều khiển sự ra hoa ở cây. Phần lớn cây chỉ hình thành phát hoa, một số

hoa nở được trong điều kiện *in vitro* thì đều là hoa dị dạng. Thời gian hoa nở từ 12-18 ngày, màu sắc hoa khác biệt so với cây bố mẹ. Các cây con ra hoa trong điều kiện *in vitro* được thể hiện qua Hình 3.17.



**Hình 3.17.** Cây con tổ hợp lai chiếu xạ DM12×DM13 ra hoa trong ống nghiệm.

Mũi tên chỉ vị trí phát hoa/hoa, thanh ngang có kích thước 1 cm.

### 3.3.2.3. Nhận xét chung đối với tổ hợp DM12x13 sau khi được chiếu xạ

Các Bảng 3.13, 3.14 và 3.15 cho thấy tỷ lệ biến dị về hình thái của tổ hợp DM12x13 ở các công thức có xử lý chiếu xạ cao hơn nhiều so với công thức không chiếu xạ. Sau 5 tháng xử lý, cây con đã biểu hiện những biến dị về lá ở các liều 20 Gy, 40 Gy và 60 Gy. Ở liều lượng 80 Gy, cây con có biểu hiện chậm phát triển, các lá đầu rụng đi, cây còi cọc, chiều cao hạn chế. Ở nghiệm thức đối chứng, các con lai không đồng nhất về kiểu gen dẫn đến xuất hiện biến dị về kiểu hình nhưng biểu

hiện biến dị không cao. Theo quan sát ghi nhận, đã có những sai khác về hình dạng lá của cây chiếu xạ so với cây đối chứng như: viền mép các lá chẻ thùy nhiều, lá có màu tím, lá xoắn, hai lá dính nhau, bề mặt lá dày mỏng khác nhau, nhiều giả hành, thân dính. Trong thí nghiệm đa phần các biến dị đặc trưng về màu sắc lá, lá trắng xuất hiện nhiều nhất. Điều này có thể giải thích rằng ty thể và lục lạp là hai cơ quan dễ bị tác động bởi bức xạ do chúng có độ mẫn cảm phóng xạ cao. Sau khi xử lý tia gamma, bộ máy di truyền có sự biến đổi, đặc biệt là lục lạp bị thương tổn nặng nhất (IAEA, 1990; Nguyễn Hữu Đống, 1997). Theo Lê Văn Hòa, 2007, tần suất biến dị hình thái lá khi xử lý chiếu xạ cây *in vitro* là tương đối cao. Hiện tượng biến dị xuất hiện phổ biến sau chiếu xạ là các dạng thấp cây, cây bị ức chế sinh trưởng, các biến dị về hình dạng lá (viền lá hình răng cưa, phiến lá biến dị, lá tím) và hình dạng thân.

Việc chiếu xạ gây đột biến đối với tổ hợp lan lai DM12x13 đã ghi nhận được một số biến dị *in vitro*: biến dị cấu trúc, màu sắc thân (thân chia mấu (thấp cây), thân to (thấp cây), nhiều giả hành (thấp cây), giả hành dạng củ hành (thấp cây), thân dính, thân chính nảy chồi, thân xanh nhạt, thân xanh đậm, thân tím); biến dị cấu trúc lá (lá xoắn, lá dày, lá dài, lá tròn, lá răng cưa, lá ống, lá xẻ thùy, lá đối xứng, lá to, lá dính, lá nhiều gân); biến dị màu sắc lá (lá tím, lá trắng xanh, lá xanh đậm, lá trắng – xanh, lá vàng- xanh, lá xanh nhạt). Ngoài ra, khi theo dõi tổ hợp lai chiếu xạ DM12x13 còn ghi nhận một số biến dị lạ: biến đổi về màu sắc lá (diệp lục) và hình thái cây (không tạo rễ), biến dị ra hoa sớm trong điều kiện *in vitro*.

Tại thời điểm bảy tháng sau chiếu xạ, số biến dị ghi nhận cao nhất ở liều 20 Gy (495 dòng biến dị), tiếp theo ở liều 40 Gy (340 dòng biến dị) so với đối chứng (18 dòng biến dị). Tỷ lệ chết 50% (LD<sub>50</sub>) của tổ hợp lai chiếu xạ DM12x13 ghi nhận là 68 Gy. Như vậy, chiếu xạ tia gamma <sup>60</sup>Co ở liều lượng 20, 40, 60 Gy thích hợp tạo phổ biến dị rộng, đa dạng, có ảnh hưởng khác biệt đến đặc điểm sinh trưởng, biến dị hình thái và màu sắc của các bộ phận của cây như thân, lá.

### **3.3.3. Sự sinh trưởng và phát triển các cá thể đột biến trong điều kiện nhà lưới**

#### **3.3.3.1. Số lá của 177 cá thể chiếu xạ từ protocorm *Dendrobium* thấp cây**

Số lá trên giả hành của 177 cá thể lan lai *Dendrobium* thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng đưa cây con ra nhà lưới được phân nhóm và được thể hiện qua Bảng 3.16.

**Bảng 3.16.** Sự phân nhóm theo số lá trên giả hành của 177 cá thể lan lai *Dendrobium* thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới

Định hướng chọn giống	Số lá/ giả hành	Tên các cá thể	Tổng số cá thể
	2 - 3	DM12x13-0Gy:13,14,15;	3
		DM12x13-20Gy:47,48,49;	3
		DM12x13-40Gy:65,72,85,100,101;	5
		DM12x13-60Gy:107,110,112, 123, 127, 139,141;	7
		DM12x13-80Gy:164,165, 171,173,176.	5
	4	DM12x13-0Gy:3,7,8,19,20,25,26,28,29,30;	10
		DM12x13-20Gy:31,32,33,35,38,41,45,50,52,53,54,56, 57;	13
		DM12x13-40Gy:59,60,61,62,68,69, 77,84,90,91,97,99;	12
		DM12x13-60Gy:102,103,106,114,116,117,120,121, 122,125,127,128,129,130,133,142,144,146,152,154,158;	21
		DM12x13-80Gy:160,161,166, 175.	4
Số lá/ giả hành từ 4 – 6 lá	5	DM12x13-0Gy:2,4,6,9,11,12,16,18,24,27;	10
		DM12x13-20Gy:34,36,37,39,40,42,43,46;	8
		DM12x13-40Gy:63,64,67,74,78,79,80,81,82,83,86,87, 88,89,92,93,94,95,96,98;	20
		DM12x13-60Gy:104,105,108,109,118,119,124,126,131, 132,135,137,140,143,145,147,148,149,151,156,159;	21
		DM12x13-80Gy:163,167,170,172.	4
6 - 7		DM12x13-0Gy:1,5,10,17,21,22,23;	7
		DM12x13-20Gy:44,51,55,58;	4
		DM12x13-40Gy:66,70,71,73,75, <b>76</b> ;	6
		DM12x13-60Gy:111,113,115,134,136,138,150,153,155;	9
		DM12x13-80Gy:162,168,169,174,177.	5

Bảng 3.16 cho thấy số lá trên giả hành của 177 cá thể thu nhận có thể chia làm 4 nhóm. Tuy nhiên phần lớn các cá thể có từ 4 đến 5 lá, trong đó nhiều nhất là số cá thể có 5 lá với 63 cá thể. Số cá thể mà giả hành có 4 lá là 60 cá thể. Số cá thể mà giả hành có 6 - 7 lá là 31 cá thể. Số cá thể mà giả hành có 2 - 3 lá là 23 cá thể.

### 3.3.3.2. Số giả hành của 177 cá thể chiếu xạ từ protocorm *Dendrobium* thấp cây nảy mầm

Số giả hành của 177 cá thể lan lai *Dendrobium* thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng đưa cây con ra nhà lưới được phân nhóm và được thể hiện qua Bảng 3.17.

**Bảng 3.17.** Sự phân nhóm theo số giả hành của 177 cá thể lan lai *Dendrobium* thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới

Định hướng chọn giống	Số giả hành	Tên các cá thể	Tổng số cá thể	
Số giả hành từ 3 – 6 giả hành	1 - 2	DM12x13-60Gy:116, 141;	2	
		DM12x13-8Gy:164.	1	
	3 - 6	DM12x13-0Gy:1,2,4,5,7,12,14,15,16,17,18,21, 25,26,28;	15	
		DM12x13-20Gy:31,32,33,34,37, <b>38</b> ,39,42,43, 44,45,48,49,50,52,57;	16	
		DM12x13-40Gy:58,59,60,61,64,65,66,67,69, 71,72,73, <b>76</b> , 78,79,80,81,82,83,88,89,90,92,93, 94,95,96,98,99,100,101;	31	
		DM12x13-60Gy:104,105,106,107,111,112, 113,114, 117, 121,123,124,125,126,129,131, 134,137,139, <b>142</b> ,146,147,148,149,150,151,152, 154,155,156,157,158,159;	33	
		DM12x13-80Gy: 160,161,162,165,168, 169, 170,173,174,176,177.	11	
		7 - 15	DM12x13-0Gy:3,6 8,9,10,11,13,19,20,22,23, 24,27,29,30;	15
			DM12x13-20Gy:35,36,40,41,46,47,48,51,53, 54,55,56;	12
			DM12x13-40Gy:62,63,68,70,74,75,77,84, 85, 86,87, 91,97;	13
			DM12x13-60Gy:102,103,108,109,110,115, 118,119,120,122,127,128,130,132,133,135,136, 138,140,143,144,145,153;	22
			DM12x13-80Gy:163,166,167,171,172,175.	6

Bảng 3.17 cho thấy số giả hành của 177 cá thể trong quần thể con lai thể hiện sự phân ly rất lớn về số giả hành. Số giả hành ghi nhận được dao động từ 1 đến 15 giả hành/chậu. Tuy nhiên phần lớn các cây có 3 - 6 giả hành (106 cá thể), kể đến là 7 - 15 giả hành (68 cá thể) và chỉ có 3 cá thể có số giả hành từ 1 - 2.

### 3.3.3.3. Chiều cao giả hành của 177 cá thể chiếu xạ từ protocorm *Dendrobium* thấp cây

Chiều cao cây của 177 cá thể lan lai *Dendrobium* thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng đưa cây con ra nhà lưới được phân nhóm và được thể hiện qua Bảng 3.18.

**Bảng 3.18.** Sự phân nhóm theo chiều cao cây của 177 cá thể lan lai *Dendrobium* thấp cây đã được xử lý chiếu xạ sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới

Định hướng chọn giống	Chiều cao cây (cm)	Tên các cá thể	Tổng số cá thể
Chiều cao cây từ 15 – 20 cm	< 15	DM12x13-0Gy:6,7,8,16,19,24,25,26,30;	9
		DM12x13-20Gy:31,33,39,42,45,47,49,54,57,58;	10
		DM12x13-40Gy:61,64,65,68,69,77,78,79,85,86,88,90,91,92,93,94,95,96,98,99,101;	21
		DM12x13-60Gy:102,104,106,107,109,112,116,117,120,121,127,128,130,140,141,152;	16
		DM12x13-80Gy:161,164,165,166,167.	5
		DM12x13-0Gy:1,2,3,4,5,9,10,11,12,13,14,15,17,18,20,22,23,27,28,29;	20
	15 - 20	DM12x13-20Gy:32,34,35,36,37,38,40,41,43,44,46,48,50,51,52,53,55,56;	18
		DM12x13-40Gy:59,60,62,66,67,70,71,72,73,74,75,76,80,81,83,84,87,89,97,100;	20
		DM12x13-60Gy:103,105,108,110,114,118,119,122,123,124,125,126,129,131,132,133,136,138,139,142,143,144,145,146,147,148,149,151,153,154,156,158,159;	33
		DM12x13-80Gy:160,162,163,168,170,171,173,175,176	9
		DM12x13-0Gy:21;	1
		DM12x13-40Gy:63,82;	2
	>20	DM12x13-60Gy:111,113,115,134,135,137,150,155,157;	9
		DM12x13-80Gy:169,172,174,177	4

Bảng 3.18 cho thấy chiều cao cây của 177 cá thể trong quần thể con lai chiếu xạ có sự khác biệt lớn. Phần lớn các cây có chiều cao 15 - 20 cm (100 cá thể). Số cá thể có chiều cao cây dưới 15 cm là 61 cá thể, chỉ có 16 cá thể có chiều cao cây lớn hơn 20 cm.

### 3.3.3.4. Sự sinh trưởng của tổ hợp lan lai DM12x13 được chiếu xạ bằng nguồn $^{60}\text{Co}$

Thông số các chỉ tiêu sinh trưởng của tổ hợp lan lai *Dendrobium* tháp cây DM12x13 được chiếu xạ bằng nguồn  $^{60}\text{Co}$  sau 12 tháng đưa cây con ra nhà lưới được thể hiện qua Bảng 3.19.

**Bảng 3.19.** Thông số các chỉ tiêu sinh trưởng của tổ hợp lan lai *Dendrobium* tháp cây DM12x13 được chiếu xạ bằng nguồn  $^{60}\text{Co}$  sau 12 tháng được trồng ra nhà lưới

Liều chiếu xạ (Gy)	Số giả hành (giả hành)	Chiều cao giả hành (cm)	Đường kính giả hành (cm)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)
0	9,4 ± 4,2	4,8 ± 2,4	1,2 ± 0,3	14,20 ± 3,7	3,8 ± 1,2	9,4 ± 2,6	2,9 ± 0,7
20	8,1 ± 3,2	4,7 ± 2,2	1,2 ± 0,3	13,98 ± 3,3	3,5 ± 1,3	8,9 ± 3,6	2,6 ± 0,7
40	8,6 ± 3,5	4,4 ± 2,3	1,1 ± 0,2	9,88 ± 2,6	3,6 ± 1,5	8,8 ± 2,9	2,5 ± 0,8
60	8,4 ± 2,9	5,1 ± 3,3	1,1 ± 0,3	10,70 ± 2,9	3,7 ± 1,4	9,1 ± 3,0	2,5 ± 0,8
80	6,6 ± 2,6	3,6 ± 2,5	0,9 ± 0,4	8,54 ± 2,3	2,8 ± 1,4	6,0 ± 3,0	2,1 ± 0,9

Bảng 3.19 cho thấy đối với quần thể con lai của tổ hợp DM12x13, liều chiếu từ 20 – 40 Gy ít có tác động đến các chỉ tiêu sinh trưởng so với liều chiếu cao (60 – 80 Gy). Khi chiếu xạ ở liều cao (60 – 80 Gy) đã tác động lên các chỉ tiêu sinh trưởng như đường kính giả hành, chiều cao cây, chiều dài lá và chiều rộng lá; riêng chỉ tiêu số giả hành và số lá ít bị tác động khi chiếu xạ liều cao từ 60 - 80 Gy. Theo Lapade (2002) thì việc chiếu xạ có thể tác động đến cấu trúc, màu sắc, thân, lá, hoa; các tính trạng về giảm chiều cao (dạng thấp cây – dwarf), đột biến ảnh hưởng đến thành phần diệp lục tố, tăng cường độ quang hợp, kháng sâu bệnh và chín sớm. Qua kết quả từ hình 3.31 và Bảng 3.19 cho thấy kết quả chiếu xạ của đề tài đã ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh trưởng, đặc biệt thể hiện rõ nét nhất đến tính trạng giảm chiều cao (dạng thấp cây – dwarf): chiều cao cây của quần thể con lai bị chiếu xạ thấp hơn đối chứng từ 0,28 – 5,66 cm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng không chiếu xạ.

### 3.3.3.5. Sự hình thành, phát triển và đặc điểm của hoa

Tại thời điểm 12 tháng kể từ khi bắt đầu đưa ra nhà lưới, tỷ lệ ra hoa của các cây chiếu xạ đạt từ 5,6 – 45,7% so với đối chứng (từ 18,1 – 54,4%). Các đặc điểm cơ bản về hoa được thể hiện qua Bảng 3.20.

**Bảng 3.20.** Ảnh hưởng của liều chiếu xạ đến một số đặc điểm chính của hoa các con lai được chiếu xạ của tổ hợp DM12x13 tại thời điểm 12 tháng được trồng ra nhà lưới

Liều chiếu xạ (Gy)	Chiều dài phát hoa (cm)	Số hoa/ phát hoa	Thời gian xuất hiện phát hoa đầu tiên (ngày sau trồng)	Thời gian hoa tàn (ngày)	Tỷ lệ cây ra hoa (%)
0	22,0±5,8	5,5±3,0	278,8±26,1	32,3±3,1	42,3
20	15,8±0,0	5,0±0,0	302,0±0,0	35,0±0,0	34,2
40	17,4±3,0	5,2±2,2	247,2±42,4	30,4±12,3	42,4
60	18,1±5,5	3,3±1,3	304,8±4,5	30,3±11,8	37,4
80	18,1±4,1	5,0±2,8	290,5±17,7	23,0±2,8	15,6

Bảng 3.20 cho thấy các thông số như chiều dài phát hoa, số hoa/phát hoa, thời gian ra hoa đã bị ảnh hưởng bởi liều chiếu xạ. Các con lai có chiều dài phát hoa và số hoa/phát hoa có xu hướng tỷ lệ nghịch với liều chiếu: liều chiếu cao thì chiều dài phát hoa ngắn, số hoa/phát hoa thấp. Thời gian ra hoa của các con lai cũng bị ảnh hưởng bởi liều chiếu: liều 40 Gy có các cá thể ra hoa sớm hơn so với đối chứng, trong khi liều chiếu 20, 60 và 80



Gy lại làm cho các cá thể con lai ra hoa trễ hơn so với đối chứng. Tuổi thọ hoa của các con lai ở liều chiếu càng cao thì càng ngắn so với đối chứng, ngoại trừ liều chiếu 20 Gy làm cho tuổi thọ hoa tăng hơn đối chứng trung bình 3 ngày.















Đặc điểm hoa của các cá thể con lai chiếu xạ được thể hiện qua (Phụ lục 7) và các cây lai không chiếu xạ có cấu trúc hoa bình thường, không có hiện tượng biến dạng. Các liều xạ từ 20 – 80 Gy đã ảnh hưởng đến cấu trúc, màu sắc hoa của các cá thể bị chiếu xạ. Tuy nhiên, ở các mức liều xạ từ 20 - 40 Gy, cấu trúc hoa ít khác biệt so với các cá thể không chiếu xạ và các cá thể ở liều xạ này là các biến dị đột biến có thể chọn lọc được. Khi tăng liều chiếu xạ lên 60 - 80 Gy, sự biến dạng của cấu trúc hoa thể hiện rõ so với các cá thể không chiếu xạ và hoa của các cá thể này cũng tàn sớm hơn so với các cá thể được chiếu xạ ở liều thấp hoặc không bị chiếu xạ. Đối với liều xạ 80 Gy, đa số cấu trúc hoa bị biến dạng. Sự chiếu xạ đã tạo ra cấu trúc, màu sắc hoa đa dạng và phong phú hơn so với các cá thể không bị chiếu xạ.

Như vậy, các cá thể bị chiếu xạ đã qua chọn lọc kiểu hình khác nhau trong điều kiện *in vitro* nên khi ra hoa, hầu hết các cá thể này rất khác biệt về cấu trúc cũng như màu sắc hoa. Các cá thể lai không chiếu xạ của tổ hợp lai ít có sự biến dạng về cấu trúc hoa. Tuy nhiên, mức độ biến dạng ở các cá thể của từng tổ hợp lai sau chiếu xạ rất khác nhau và mức độ biến dạng càng tăng khi liều chiếu xạ càng cao. Các biến dị đột biến chọn lọc có triển vọng xuất hiện ở liều xạ 20, 40 và 60 Gy.

#### **3.3.3.6. Chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng**

Từ các cá thể đã ra hoa của tổ hợp lai chiếu xạ nghiên cứu, căn cứ tiêu chí chọn dòng lai *Dendrobium* thấp cây triển vọng theo định hướng: có chiều cao cây từ 15 - 20 cm, số giả hành từ 3 – 6 giả hành, số lá từ 4 – 6 lá, số hoa/phát hoa từ 6 hoa trở lên, đường kính hoa từ 4,5 cm trở lên, có màu sắc hoa khác với bố mẹ, có thể chọn các dòng đột biến triển vọng bao gồm:

**Bảng 3.21.** Hình dạng, màu sắc hoa của cây bố mẹ, các dòng con lai và các dòng đột biến triển vọng của tổ hợp lai DM12x13

Dòng/ giống	Hình dạng, màu sắc hoa			
Bố mẹ	 <p data-bbox="432 680 587 719">Mẹ DM12</p>	 <p data-bbox="839 680 987 719">Bố DM13</p>		
Dòng con lai (đôi chúng)	 <p data-bbox="411 994 608 1032">DM12x13:01</p>	 <p data-bbox="815 994 1011 1032">DM12x13:02</p>	 <p data-bbox="1187 994 1383 1032">DM12x13:03</p>	
	 <p data-bbox="411 1294 608 1332">DM12x13:04</p>	 <p data-bbox="815 1294 1011 1332">DM12x13:05</p>	 <p data-bbox="1187 1294 1383 1332">DM12x13:06</p>	
	 <p data-bbox="368 1601 651 1639">Dòng DM12x13:07</p>	 <p data-bbox="815 1601 1011 1639">DM12x13:08</p>	 <p data-bbox="1187 1601 1383 1639">DM12x13:09</p>	
	Dòng đột biến triển vọng	 <p data-bbox="368 1980 651 2018">DM12x13-20Gy:38</p>	 <p data-bbox="772 1980 1054 2018">DM12x13-40Gy:76</p>	 <p data-bbox="1134 1980 1417 2018">DM12x13-60Gy:142</p>

## 1/ Dòng DM12x13-20Gy:38

- Thời gian bắt đầu ra hoa kể từ thời điểm đưa ra nhà lưới: 12 tháng

- Đặc điểm hoa: hoa màu trắng phớt tím nhạt, ở giữa phía trong môi hoa có màu tím đậm, cánh hoa xếp chồng lên nhau. các cánh hoa thẳng, không có lông, phát hoa có dạng chùy, kiểu phát hoa mọc ở đỉnh chồi, số phát hoa/giả hành: 1; chiều dài phát hoa: 15 cm; chiều dài đoạn mang hoa: 7 cm; đường kính hoa: 6,8 cm; số hoa/phát hoa: 6 hoa; độ bền của hoa: 32 ngày.

- Đặc điểm thân lá: có 4 lá, lá dày, màu xanh đậm, hình mũi mác, bản rộng, kích thước lá 12,5 x 2,4 cm; 3 giả hành, giả hành chắc khỏe, hình củ hành thấp cây, có chiều cao 8,5 cm, đường kính 2,8 cm. Cây cao 17 cm.



Dòng DM12x13-20Gy:38

## 2/ Dòng DM12x13-40Gy:76

- Thời gian bắt đầu ra hoa kể từ thời điểm đưa ra nhà lưới: 12 tháng

- Đặc điểm hoa: hoa màu trắng, ở giữa phía trong môi hoa có màu tím sọc, cánh hoa xếp chồng lên nhau. Cánh hoa hơi cong về phía sau, có lông, phát hoa uốn cong hình chữ s, kiểu phát hoa mọc ở đỉnh chồi, môi hoa hướng lên trên. số phát hoa/giả hành: 1; chiều dài phát hoa: 20 cm; chiều dài đoạn mang hoa: 14 cm; đường kính hoa: 4 cm; số hoa/phát hoa: 7; độ bền của hoa: 28 ngày.

- Đặc điểm thân lá: có 6 lá, lá mỏng, màu xanh nhạt, mũi lá nhọn, kích thước lá 9,5 x 2,4 cm; 6 giả hành, giả hành cao 11 cm, đường kính 1,6 cm. Cây cao 18 cm.



Dòng DM12x13-40Gy:76

## 3/ Dòng DM12x13-60Gy:142

- Thời gian bắt đầu ra hoa kể từ thời điểm đưa ra nhà lưới: 12 tháng

- Đặc điểm hoa: hoa màu trắng xanh, phía trong môi hoa có màu xanh, cánh hoa xếp chồng lên nhau. Các cánh hoa cong về phía sau, không có lông, phát hoa có dạng chùm, kiểu phát hoa mọc ở đỉnh chồi; số phát hoa/giả hành: 1; chiều dài phát hoa: 21 cm; chiều dài đoạn mang hoa: 11 cm; đường kính hoa: 5,5 cm; số hoa/phát hoa: 6; độ bền của hoa: 45 ngày.

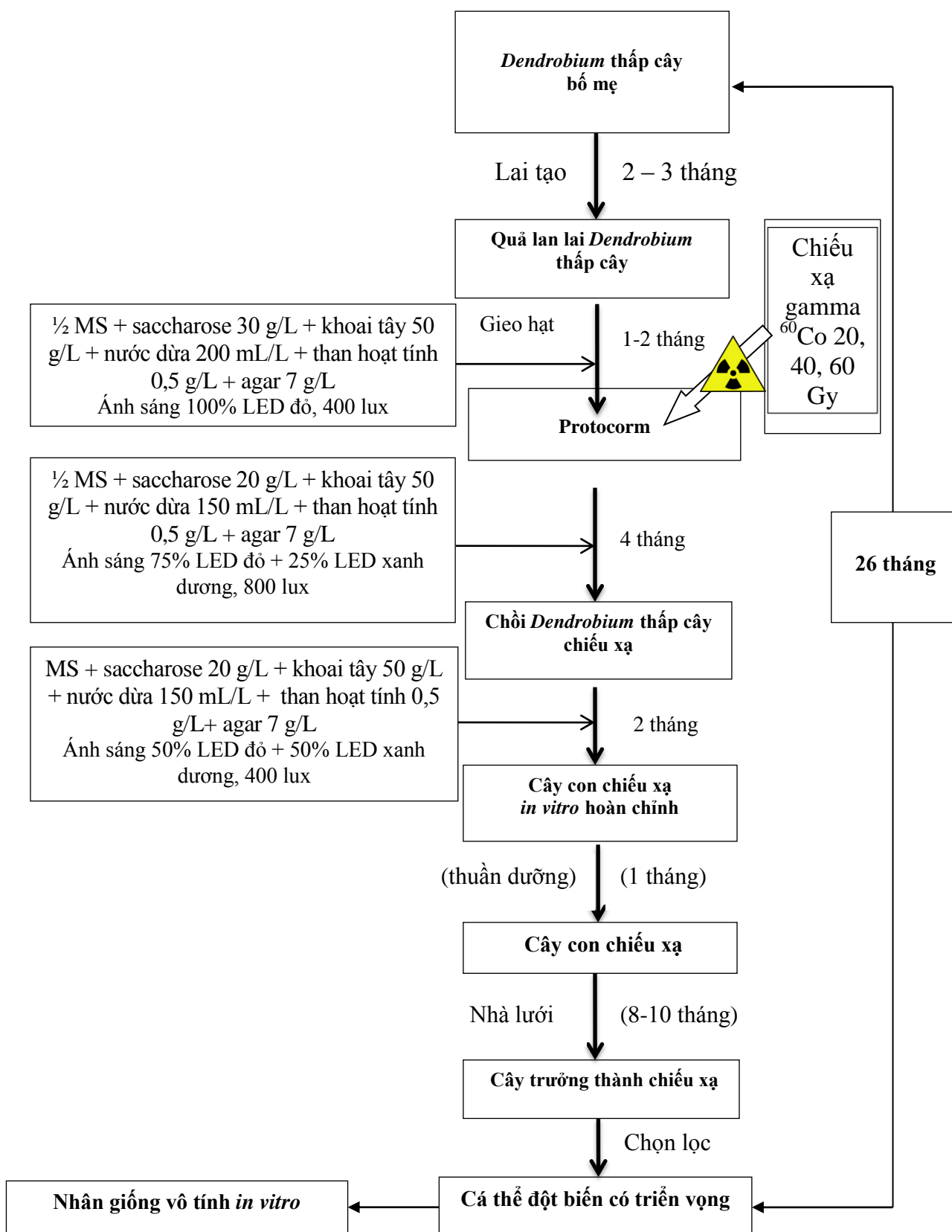
- Đặc điểm thân lá: có 4 lá, lá dày, màu xanh đậm, mũi lá nhọn, kích thước lá 10,5 x 1,8 cm; 03 giả hành, giả hành to và thấp cây, có chiều cao 8,2 cm, đường kính 2,8 cm. Cây cao 15 cm.



Dòng DM12x13-60Gy:142

### 3.3.4. Quy trình tạo dòng lan *Dendrobium* thấp cây đột biến

Từ kết quả nghiên cứu ở nội dung 1 về xác định một số điều kiện cho sự phát triển thích hợp của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây và nội dung 3 về chiếu xạ gây đột biến *in vitro* protocorm *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng có thể rút ra quy trình tạo dòng lan *Dendrobium* thấp cây đột biến và được thể hiện qua Hình 3.18.



**Hình 3.18.** Quy trình tạo dòng lan *Dendrobium* thấp cây đột biến

Chi tiết về quy trình tạo dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây đột biến được thể hiện tại Phụ lục 8.

### 3.4. Đánh giá sự khác biệt di truyền và nhân giống một số dòng lai, dòng đột biến có triển vọng

#### 3.4.1. Kết quả khuếch đại DNA với 10 primer RAPD

10 primer RAPD đã được tiến hành phản ứng PCR với 19 mẫu (gồm 8 giống lan *Dendrobium* thấp cây bố mẹ, 8 cá thể con lai tiềm năng, 3 cá thể đột biến có triển vọng) sau đó điện di trên gel agarose 1,5%. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen dựa trên cơ sở điện di được trình bày trong Bảng 3.25. Kết quả cho thấy số băng khuếch đại được từ mỗi primer dao động trong khoảng 9 – 20 băng, tỷ lệ băng đa hình của từng primer dao động trong khoảng 90,0% - 100%. Theo Bảng 3.25 thì tổng số băng thu được sau phản ứng PCR là 148 băng, số băng đa hình là 145 băng, chiếm 97,3%. Zha và ctv (2009) ứng dụng kỹ thuật RAPD để dự đoán mối quan hệ di truyền của 9 loài lan *Dendrobium* thảo dược cũng đã thu được 323 băng đa hình từ 16 primer ngẫu nhiên, trung bình 20 băng đa hình mỗi primer. Như vậy trên đối tượng khác nhau sẽ thu được số băng đa hình khác nhau.

Kết quả phân tích sản phẩm khi khuếch đại 10 primer cho thấy có bốn primer A2, A4, A5 và A18 cho kết quả đa hình rõ nhất. Chính vì vậy, bốn primer này được chọn để phân tích sự khác biệt về di truyền đối với các cá thể đột biến so với cá thể con lai và bố mẹ của chúng.

Bảng 3.22 cho thấy đối với primer A2, số băng đa hình là 12 băng, đạt tỷ lệ 100%, trong đó số băng đa hình đối với cá thể đột biến ĐB1 (DM12x13-20Gy:38) là 3 băng, ĐB2 (DM12x13-40Gy:76) là 2 băng và ĐB3 (DM12x13-60Gy:142) là 5 băng. Đối với primer A4, số băng đa hình là 19 băng, đạt tỷ lệ 100%, trong đó cá thể đột biến ĐB1 (DM12x13-20Gy:38) và ĐB2 (DM12x13-40Gy:76) là 4 băng và ĐB3 (DM12x13-60Gy:142) là 6 băng. Đối với primer A5, số băng đa hình là 17 băng, đạt tỷ lệ 100%, trong đó cá thể đột biến ĐB1 (DM12x13-20Gy:38) là 2 băng, ĐB2 (DM12x13-40Gy:76) là 1 băng và ĐB3 (DM12x13-60Gy:142) là 9 băng. Đối với primer A18, số băng đa hình là 18 băng, đạt tỷ lệ 100%, trong đó cá thể đột biến ĐB1 (DM12x13-20Gy:38) là 3 băng, ĐB2 (DM12x13-40Gy:76) là 7 băng và ĐB3 (DM12x13-60Gy:142) là 6 băng.

**Bảng 3.22.** Số sản phẩm khuếch đại, số băng đa hình và tỷ lệ băng đa hình tạo ra từ mỗi primer của 19 mẫu lan *Dendrobium*

Mẫu	Primer										Tổng	Trung bình
	OPA1	OPA2	OPA3	OPA4	OPA5	OPA9	OPA11	OPA13	OPA17	OPA18		
DM01	5	2	2	0	5	4	7	6	4	4	39	3.9
DM10	5	3	2	4	4	3	5	8	2	4	40	4
DM11	3	2	2	2	3	1	7	7	5	6	38	3.8
<b>DM12</b>	5	<b>3</b>	7	3	2	6	3	5	3	5	42	4.2
<b>DM13</b>	8	<b>6</b>	5	5	4	5	4	5	2	6	50	5
DM14	2	<b>5</b>	2	0	1	5	0	7	2	4	28	2.8
DM18	13	<b>3</b>	6	7	6	3	10	8	5	4	65	6.5
DM24	11	4	6	6	5	5	4	9	3	6	59	5.9
DM10x01:51	5	2	3	3	2	2	5	8	4	4	38	3.8
DM11x12:90	9	3	6	3	5	1	4	6	4	3	44	4.4
DM11x18:111	2	3	2	2	3	4	3	4	4	4	31	3.1
DM11x24:139	10	<b>5</b>	6	7	7	6	6	7	7	6	67	6.7
DM12x11:180	7	4	2	2	3	3	3	4	4	4	36	3.6
<b>DM12x13:184</b>	8	6	7	5	7	7	6	6	7	5	64	6.4
<b>DM12x13:186</b>	3	2	5	1	3	4	4	6	3	2	33	3.3
DM12x14:229	4	<b>3</b>	4	2	2	4	4	5	4	4	36	3.6
<b>DM12x13-20Gy:38</b>	4	<b>3</b>	2	<b>4</b>	<b>2</b>	5	3	5	5	<b>3</b>	36	3.6
<b>DM12x13-40Gy:76</b>	9	<b>2</b>	3	<b>4</b>	<b>1</b>	5	6	5	7	<b>7</b>	49	4.9
<b>DM12x13-60Gy:142</b>	13	<b>5</b>	2	<b>6</b>	<b>9</b>	4	5	8	2	<b>6</b>	60	6
Số băng khuếch đại	20	12	10	19	17	11	15	12	14	18	148	14.8
Số băng đa hình	20	12	9	19	17	10	15	11	14	18	145	14.5
% băng đa hình	100,0	100	90,0	100,0	100,0	90,9	100,0	91,7	100,0	100	972,6	<b>97,3</b>

**Bảng 3.23.** Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA2

Mẫu	Ký hiệu	Kích thước băng đa hình (bp)											Tổng số băng (băng)	
		500	550	600	700	750	800	900	1000	1500	1600	1800		2000
DM01	BM1	+					+							2
DM10	BM2		+				+		+					3
DM11	BM3		+				+							2
<b>DM12</b>	<b>BM4</b>		+					+	+					<b>3</b>
<b>DM13</b>	<b>BM5</b>		+					+	+	+	+		+	<b>6</b>
DM14	BM6		+			+		+			+	+		5
DM18	BM7		+				+		+					3
DM24	BM8		+						+	+	+			4
DM10x01:51	CL1		+				+							2
DM11x12:90	CL2		+				+				+			3
DM11x18:111	CL3		+		+		+							3
DM11x24:139	CL4		+		+		+		+		+			5
DM12x11:180	CL5		+	+				+	+					4
<b>DM12x13:184</b>	<b>CL6</b>		+		+		+		+		+		+	<b>6</b>
<b>DM12x13:186</b>	<b>CL7</b>		+				+							<b>2</b>
DM12x14:229	CL8		+				+	+						3
<b>DM12x13-20Gy:38</b>	<b>ĐB1</b>		+					+			+			<b>3</b>
<b>DM12x13-40Gy:76</b>	<b>ĐB2</b>						+		+					<b>2</b>
<b>DM12x13-60Gy:142</b>	<b>ĐB3</b>		+					+	+	+	+			<b>5</b>

Ghi chú: Hình điện di sản phẩm RAPD-PCR với primer OPA2 được thể hiện ở phụ lục 10.



Bảng 3.23 cho thấy con lai DM11x12:90 xuất hiện 3 băng ở kích thước 550, 800, 1600bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 2 băng kích thước 550 và 800bp) và khác với bố DM12 (xuất hiện 3 băng kích thước 550, 900, 1000bp).

Con lai DM11x24:139 xuất hiện 5 băng ở kích thước 550, 700, 800, 1000, 1600bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 2 băng kích thước 550 và 800bp) và khác với bố DM24 (xuất hiện 4 băng kích thước 550, 1000, 1500, 1600bp).

Con lai DM12x11:180 xuất hiện 4 băng ở kích thước 550, 600, 900, 1000bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 3 băng kích thước 550, 900, 1000bp) và khác với bố DM11 (xuất hiện 2 băng kích thước 550 và 800bp).

Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 xuất hiện 3 băng ở kích thước 550, 900, 1600bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 3 băng kích thước 550, 900, 1000bp) và khác với bố DM13 (xuất hiện 6 băng kích thước 550, 900, 1000, 1500, 1600 và 2000bp). Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 cũng khác với con lai DM12x13:184 (xuất hiện 6 băng kích thước 550, 700, 800, 1000, 1600, 2000bp) và khác con lai DM12x13:186 (xuất hiện 2 băng kích thước 550, 800bp) có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 xuất hiện 2 băng ở kích thước 800, 1000bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-60Gy:142 xuất hiện 5 băng ở kích thước 550, 900, 1000, 1500, 1600bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Như vậy, dùng primer OPA2 đã xác định được 3 cá thể con lai DM11x12:90 có kích thước 550, 800, 1600bp; con lai DM11x24:139 có kích thước 550, 700, 800, 1000, 1600bp; con lai DM12x11:180 có kích thước 550, 600, 900, 1000bp, khác với kích thước băng của bố mẹ. 3 cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 có kích thước 550, 900, 1600bp; DM12x13-40Gy:76 có kích thước 800, 1000bp; DM12x13-60Gy:142 có kích thước 550, 900, 1000, 1500, 1600bp khác với kích thước băng của bố mẹ và con lai đối chứng.

Kích thước có xuất hiện sản phẩm của các giống bố mẹ, cá thể con lai và các cá thể đột biến khi dùng primer OPA4 được thể hiện Bảng 3.24.

**Bảng 3.24. Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA4**

Mẫu	Ký hiệu	Kích thước băng đa hình (bp)																			Tổng số băng (băng)
		380	400	500	550	600	700	800	950	1000	1500	1600	1700	1800	1900	2000	2200	2500	2900	3000	
DM01	BM1																				0
DM10	BM2			+		+						+				+					4
DM11	BM3					+	+														2
<b>DM12</b>	<b>BM4</b>								+			+	+								<b>3</b>
<b>DM13</b>	<b>BM5</b>									+		+	+			+			+		<b>5</b>
DM14	BM6																				0
DM18	BM7					+				+	+			+		+		+		+	7
DM24	BM8					+		+		+						+		+		+	6
DM10x01:51	CL1					+				+			+	+							3
DM11x12:90	CL2		+			+				+											3
DM11x18:111	CL3					+				+											2
DM11x24:139	CL4						+			+	+		+	+			+			+	7
DM12x11:180	CL5		+			+															2
<b>DM12x13:184</b>	<b>CL6</b>					+						+			+	+	+				<b>5</b>
<b>DM12x13:186</b>	<b>CL7</b>				+																<b>1</b>
DM12x14:229	CL8				+					+											2
<b>DM12x13-20Gy:38</b>	<b>ĐB1</b>	+			+					+	+										<b>4</b>
<b>DM12x13-40Gy:76</b>	<b>ĐB2</b>					+				+					+	+					<b>4</b>
<b>DM12x13-60Gy:142</b>	<b>ĐB3</b>					+				+				+	+		+			+	<b>6</b>

Ghi chú: Hình điện di sản phẩm RAPD-PCR với primer OPA4 được thể hiện ở phụ lục 10.

Bảng 3.24 cho thấy con lai DM11x12:90 xuất hiện 3 băng ở kích thước 400, 600, 1000bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 2 băng kích thước 600 và 700bp) và khác với bố DM12 (xuất hiện 5 băng kích thước 1000, 1600, 1700, 2000, 2900bp).

Con lai DM11x24:139 xuất hiện 7 băng ở kích thước 700, 1000, 1500, 1700, 1800, 2700, 3000bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 2 băng kích thước 600 và 700bp) và khác với bố DM24 (xuất hiện 6 băng kích thước 600, 800, 1000, 2000, 2500, 3000bp).

Con lai DM12x11:180 xuất hiện 2 băng ở kích thước 400, 600bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 5 băng kích thước 1000, 1600, 1700, 2000, 2900bp) và khác với bố DM11 (xuất hiện 2 băng kích thước 600 và 700bp).

Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 xuất hiện 4 băng ở kích thước 380, 550, 1500, 1600bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 5 băng kích thước 1000, 1600, 1700, 2000, 2900bp) và khác với bố DM13 (xuất hiện 5 băng kích thước 1000, 1600, 1700, 2000 và 2900bp). Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 cũng khác với con lai DM12x13:184 (xuất hiện 5 băng kích thước 600, 1600, 1900, 2000, 2200bp) và khác con lai DM12x13:186 (xuất hiện 1 băng kích thước 550bp) có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 xuất hiện 4 băng ở kích thước 600, 1500, 1900, 2000bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-60Gy:142 xuất hiện 6 băng ở kích thước 600, 1000, 1800, 2000, 2500, 3000bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Như vậy, dùng primer OPA4 đã xác định được 3 cá thể con lai DM11x12:90 có kích thước 400, 600, 1000bp; con lai DM11x24:139 có kích thước 700, 1000, 1500, 1700, 1800, 2700, 3000bp; con lai DM12x11:180 có kích thước 400, 600bp, khác với kích thước băng của bố mẹ. 3 cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 có kích thước 380, 550, 1500, 1600bp; DM12x13-40Gy:76 có kích thước 600, 1500, 1900, 2000bp; DM12x13-60Gy:142 có kích thước 600, 1000, 1800, 2000, 2500, 3000bp khác với kích thước băng của bố mẹ và con lai đối chứng.

Kích thước có xuất hiện sản phẩm của các giống bố mẹ, các cá thể con lai và các cá thể đột biến khi dùng primer OPA5 được thể hiện Bảng 3.25.

**Bảng 3.25.** Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA5

Mẫu	Ký hiệu	Kích thước băng đa hình (bp)																	Tổng số băng (băng)
		500	550	600	700	750	800	900	1000	1500	1600	1700	1800	2000	2100	2200	2300	2500	
DM01	BM1	+				+			+			+				+			5
DM10	BM2	+				+								+		+			4
DM11	BM3	+				+					+								3
<b>DM12</b>	<b>BM4</b>					+							+						<b>2</b>
<b>DM13</b>	<b>BM5</b>				+					+			+			+			<b>4</b>
DM14	BM6															+			1
DM18	BM7					+		+		+		+		+			+		6
DM24	BM8	+				+		+						+		+			5
DM10x01:51	CL1	+				+													2
DM11x12:90	CL2	+	+			+				+					+				5
DM11x18:111	CL3				+						+			+					3
DM11x24:139	CL4					+		+		+		+		+			+	+	7
DM12x11:180	CL5	+		+		+													3
<b>DM12x13:184</b>	<b>CL6</b>	+				+		+	+			+		+			+		<b>7</b>
<b>DM12x13:186</b>	<b>CL7</b>					+								+		+			<b>3</b>
DM12x14:229	CL8				+									+					2
<b>DM12x13-20Gy:38</b>	<b>ĐB1</b>					+					+								<b>2</b>
<b>DM12x13-40Gy:76</b>	<b>ĐB2</b>					+													<b>1</b>
<b>DM12x13-60Gy:142</b>	<b>ĐB3</b>	+				+	+	+	+	+				+		+	+		<b>9</b>

Ghi chú: Hình điện di sản phẩm RAPD-PCR với primer OPA5 được thể hiện ở phụ lục 10.

Bảng 3.25 cho thấy con lai DM11x12:90 xuất hiện 5 băng ở kích thước 500, 550, 750, 1500, 2100bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 3 băng kích thước 500, 750 và 1600bp) và khác với bố DM12 (xuất hiện 2 băng kích thước 750, 1800bp).

Con lai DM11x24:139 xuất hiện 7 băng ở kích thước 750, 900, 1500, 1700, 2000, 2300, 2500bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 3 băng kích thước 500, 750 và 1600bp) và khác với bố DM24 (xuất hiện 5 băng kích thước 500, 750, 900, 2000, 2200bp).

Con lai DM12x11:180 xuất hiện 3 băng ở kích thước 500, 600, 750bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 2 băng kích thước 750, 1800bp) và khác với bố DM11 (xuất hiện 3 băng kích thước 500, 750 và 1600bp).

Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 xuất hiện 2 băng ở kích thước 750, 1600bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 2 băng kích thước 750, 1800bp) và khác với bố DM13 (xuất hiện 4 băng kích thước 700, 1500, 1800, 2200bp). Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 cũng khác với con lai DM12x13:184 (xuất hiện 7 băng kích thước 500, 750, 900, 1000, 1700, 2000, 2300bp) và khác con lai DM12x13:186 (xuất hiện 3 băng kích thước 750, 2000, 2200bp) có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 xuất hiện 1 băng ở kích thước 750bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-60Gy:142 xuất hiện 9 băng ở kích thước 500, 750, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2200, 2300bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Như vậy, dùng primer OPA5 đã xác định được 3 cá thể con lai DM11x12:90 có kích thước 500, 550, 750, 1500, 2100bp; con lai DM11x24:139 có kích thước 750, 900, 1500, 1700, 2000, 2300, 2500bp; con lai DM12x11:180 có kích thước 500, 600, 750bp, khác với kích thước băng của bố mẹ. 3 cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 có kích thước 750, 1600bp; DM12x13-40Gy:76 có kích thước 750bp; DM12x13-60Gy:142 có kích thước 500, 750, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2200, 2300bp, khác với kích thước băng của bố mẹ và con lai đối chứng.

Kích thước có xuất hiện sản phẩm của các giống bố mẹ, các cá thể con lai và các cá thể đột biến khi dùng primer OPA18 được thể hiện Bảng 3.26.

**Bảng 3.26.** Số băng đa hình ở các kích thước khác nhau trong phân tích 19 mẫu lan với primer OPA18

Mẫu	Ký hiệu	Kích thước băng đa hình (bp)																		Tổng số băng (băng)
		600	650	700	750	800	850	900	950	1000	1200	1300	1500	1550	1600	1700	1800	1900	2000	
DM01	BM1			+		+				+			+							4
DM10	BM2				+	+				+			+							4
DM11	BM3			+		+			+	+			+			+				6
<b>DM12</b>	<b>BM4</b>		+	+				+				+								<b>5</b>
<b>DM13</b>	<b>BM5</b>			+	+	+						+							+	<b>6</b>
DM14	BM6							+					+		+			+		4
DM18	BM7					+						+			+					4
DM24	BM8					+			+		+		+		+					6
DM10x01:51	CL1			+		+					+			+						4
DM11x12:90	CL2	+						+												3
DM11x18:111	CL3				+	+				+					+					4
DM11x24:139	CL4					+					+	+		+		+	+			6
DM12x11:180	CL5	+											+					+	+	4
<b>DM12x13:184</b>	<b>CL6</b>	+						+					+			+	+			<b>5</b>
<b>DM12x13:186</b>	<b>CL7</b>				+			+												<b>2</b>
DM12x14:229	CL8		+		+	+							+							4
<b>DM12x13-20Gy:38</b>	<b>ĐB1</b>							+				+		+						<b>3</b>
<b>DM12x13-40Gy:76</b>	<b>ĐB2</b>			+		+					+		+		+	+	+			<b>7</b>
<b>DM12x13-60Gy:142</b>	<b>ĐB3</b>	+				+					+		+				+		+	<b>6</b>

Ghi chú: Hình điện di sản phẩm RAPD-PCR với primer OPA18 được thể hiện ở phụ lục 10.

Bảng 3.26 cho thấy con lai DM11x12:90 xuất hiện 3 băng ở kích thước 600, 800, 2000bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 6 băng kích thước 700, 800, 900,950, 1500 và 1700bp) và khác với bố DM12 (xuất hiện 5 băng kích thước 650, 700, 850, 1000, 1500bp).

Con lai DM11x24:139 xuất hiện 6 băng ở kích thước 800, 1000, 1200, 1500, 1700, 1800bp, khác với mẹ DM11 (xuất hiện 6 băng kích thước 700, 800, 900,950, 1500 và 1700bp) và khác với bố DM24 (xuất hiện 6 băng kích thước 800, 900, 1000, 1500, 1600, 2000bp).

Con lai DM12x11:180 xuất hiện 4 băng ở kích thước 600, 1500, 1900, 2000bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 5 băng kích thước 650, 700, 850, 1000, 1500bp) và khác với bố DM11 (xuất hiện 6 băng kích thước 700, 800, 900,950, 1500 và 1700bp).

Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 xuất hiện 3 băng ở kích thước 850, 1300, 1550bp, khác với mẹ DM12 (xuất hiện 5 băng kích thước 650, 700, 850, 1000, 1500bp) và khác với bố DM13 (xuất hiện 6 băng kích thước 700, 750, 800, 1000, 1500, 1800bp). Cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 cũng khác với con lai DM12x13:184 (xuất hiện 5 băng kích thước 600, 800, 1500, 1700, 1800bp) và khác con lai DM12x13:186 (xuất hiện 2 băng kích thước 750, 850bp) có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 xuất hiện 7 băng ở kích thước 700, 800, 1000, 1500, 1600, 1700, 1800bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Cá thể đột biến DM12x13-60Gy:142 xuất hiện 6 băng ở kích thước 600, 800, 1000, 1500, 1800, 2000bp, khác với mẹ DM12 và khác với bố DM13. Cá thể đột biến DM12x13-60Gy:76 cũng khác với con lai DM12x13:184 và khác con lai DM12x13:186 có cùng bố mẹ.

Như vậy, dùng primer OPA18 đã xác định được 3 cá thể con lai DM11x12:90 có kích thước 600, 800, 2000bp; con lai DM11x24:139 có kích thước 800, 1000, 1200, 1500, 1700, 1800bp; con lai DM12x11:180 có kích thước 600, 1500, 1900, 2000bp, khác với kích thước băng của bố mẹ. 3 cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38 có kích thước 850, 1300, 1550bp; DM12x13-40Gy:76 có kích thước 700, 800, 1000, 1500, 1600, 1700, 1800bp; DM12x13-60Gy:142 có kích thước 600, 800, 1000, 1500, 1800, 2000bp, khác với kích thước băng của bố mẹ và con lai đối chứng.

### 3.4.2. Phân tích mối quan hệ di truyền 8 dòng lan *Dendrobium* thấp cây bố mẹ với 8 cá thể lai tiềm năng và 3 cá thể đột biến triển vọng

Hệ số tương đồng di truyền phản ánh quan hệ về nguồn gốc di truyền giữa các giống/dòng với nhau. Các giống và dòng càng gần nhau về mặt di truyền thì hệ số tương đồng di truyền giữa chúng càng cao và ngược lại các giống có mối quan hệ di truyền nếu khác nhau thì hệ số tương đồng di truyền giữa chúng sẽ thấp, chúng phản ánh khoảng cách di truyền giữa các giống/dòng. Tỷ lệ tương đồng giữa 8 dòng lan *Dendrobium* thấp cây bố mẹ với 8 cá thể lai tiềm năng và 3 cá thể đột biến triển vọng dựa trên hệ số tương ứng đơn giản (SM Coefficient) được thể hiện qua Bảng 3.28. Bảng 3.28 cho thấy có 171 cặp được tạo nên từ 8 dòng lan *Dendrobium* thấp cây bố mẹ với 8 cá thể lai tiềm năng và 3 cá thể đột biến triển vọng, với hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm trong khoảng 0,48 – 0,86, khác với hệ số tương đồng di truyền của 32 giống lan Hoàng Thảo bản địa của Việt Nam (dao động trong khoảng từ 0,23 - 1) trong nghiên cứu của Trần Duy Dương (2015). Như vậy, trên đối tượng khác nhau với đặc điểm mẫu khác nhau sẽ cho kết quả về hệ số tương đồng di truyền khác nhau.

Bảng 3.27 cho thấy cặp mẫu ĐB2 (tương ứng cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76) và BM7 (tương ứng với giống bố mẹ DM18) là cặp có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất (0,48), kế đến là cặp mẫu ĐB1 (tương ứng cá thể đột biến DM12x13-20Gy:38) và BM7 (tương ứng với giống bố mẹ DM18) (0,49). Cặp mẫu ĐB3 (tương ứng cá thể đột biến DM12x13-60Gy:142) và BM7 (tương ứng với giống bố mẹ DM18) có hệ số tương đồng di truyền 0,68. Cặp mẫu CL6 (tương ứng với cá thể con lai DM12x13:184, là con lai từ cặp lai bố mẹ DM12x13) và CL7 tương ứng với cá thể con lai DM12x13:186, cũng là con lai từ cặp lai bố mẹ DM12x13) là cặp có hệ số tương đồng di truyền cao nhất (0,86) (Bảng 3.27).

Như vậy, đánh giá sự khác biệt di truyền giữa 8 cá thể con lai, 3 cá thể đột biến và 8 giống bố mẹ bằng chỉ thị phân tử RAPD cho thấy, 3 cá thể đột biến có sự khác biệt về mặt di truyền so với 8 cá thể con lai và 8 giống bố mẹ. Trong đó cá thể đột biến DM12x13-40Gy:76 có sự khác biệt di truyền lớn nhất (hệ số tương đồng di truyền DM12x13-40Gy:76 - DM18 là 0,48) và sự khác biệt di truyền thấp nhất là cá thể con lai DM12x13:184 (hệ số tương đồng di truyền con lai DM12x13:184 - con lai DM12x13:186 là 0,86).



**Bảng 3.27.** Tỷ lệ tương đồng giữa 8 dòng lan *Dendrobium* thấp cây bố mẹ với 8 cá thể lai tiềm năng và 3 cá thể đột biến triển vọng dựa trên hệ số tương ứng đơn giản (SM Coefficient)

	BM1	CL3	CL6	CL7	BM7	CL1	BM3	BM2	BM8	ĐB3	CL2	CL5	ĐB2	BM5	CL8	CL4	BM4	BM6	ĐB1
BM1	1																		
CL3	0,78	1																	
CL6	0,68	0,76	1																
CL7	0,67	0,74	<b>0,86</b>	1															
BM7	0,60	0,69	0,80	0,84	1														
CL1	0,78	0,69	0,68	0,64	0,64	1													
BM3	0,79	0,69	0,61	0,57	0,61	0,81	1												
BM2	0,76	0,71	0,61	0,59	0,61	0,79	0,77	1											
BM8	0,51	0,56	0,64	0,66	0,68	0,56	0,56	0,65	1										
ĐB3	0,58	0,64	0,63	0,66	<b>0,68</b>	0,58	0,57	0,69	0,75	1									
CL2	0,69	0,62	0,59	0,58	0,57	0,68	0,65	0,73	0,58	0,63	1								
CL5	0,67	0,67	0,51	0,49	0,49	0,69	0,67	0,72	0,55	0,61	0,76	1							
ĐB2	0,71	0,66	0,56	0,51	<b>0,48</b>	0,67	0,71	0,69	0,52	0,56	0,73	0,72	1						
BM5	0,64	0,71	0,67	0,64	0,61	0,66	0,60	0,71	0,65	0,69	0,60	0,59	0,59	1					
CL8	0,69	0,70	0,61	0,56	0,55	0,67	0,67	0,74	0,52	0,55	0,69	0,68	0,75	0,72	1				
CL4	0,74	0,70	0,60	0,58	0,52	0,69	0,70	0,71	0,55	0,58	0,70	0,71	0,78	0,69	0,85	1			
BM4	0,63	0,67	0,66	0,61	0,58	0,67	0,58	0,72	0,62	0,59	0,66	0,68	0,59	0,78	0,75	0,72	1		
BM6	0,66	0,65	0,61	0,53	0,51	0,66	0,68	0,70	0,58	0,61	0,62	0,67	0,77	0,71	0,74	0,74	0,74	1	
ĐB1	0,67	0,67	0,58	0,56	<b>0,49</b>	0,76	0,66	0,72	0,55	0,61	0,63	0,64	0,69	0,71	0,75	0,74	0,76	0,74	1

### 3.4.3. Nhân dòng vô tính và khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng lai có triển vọng trong điều kiện *in vitro*

Ba dòng lai có triển vọng được nhân dòng *in vitro* bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào gồm dòng DM11x12:90, DM11x24:139 và DM12x11:180. Lát mỏng tế bào được cấy lên môi trường cơ bản  $\frac{1}{2}$  MS có bổ sung BA 3 mg/L kết hợp với NAA 0,5 mg/L để phát sinh protocorm like body (PLBs) từ tTCL. Sau 2 tháng nuôi cấy, những PLBs thu được có sức sống tốt, được tách thành cụm nhỏ có kích thước 0,3×0,3 cm với khoảng 4 - 6 PLBs, Các cụm PLBs có kích thước 0,3×0,3 cm với khoảng 4 - 6 PLBs, được cấy lên môi trường cơ bản MS có bổ sung BA 1 mg/L và NAA 1 mg/L (phụ lục 11).



DM11x12:90

DM11x24:139

DM12x11:180

**Hình 3.19.** PLBs phát sinh từ lát mỏng của 3 dòng lai sau 8 tuần nuôi cấy

Sau 6 tuần nuôi cấy, Các cụm PLBs được cấy chuyển qua môi trường  $\frac{1}{2}$  MS + nước dừa 150 mL/L + saccharose 20 g/L + agar 7 g/L + khoai tây 50 g/L + than hoạt tính 0,5 g/L để hình thành chồi. Số lượng chồi, và chiều cao của từng dòng sau 6 tuần nuôi cấy được thể hiện qua Bảng 3.28.

**Bảng 3.28.** Số chồi và chiều cao chồi của 3 dòng lai có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy

Dòng	Số lượng chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
DM11x12:90	8,6 <sup>b</sup>	2,19 <sup>b</sup>
DM11x24:139	14,47 <sup>a</sup>	2,31 <sup>ab</sup>
DM12x11:180	10,7 <sup>ab</sup>	2,46 <sup>a</sup>

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Tái sinh chồi từ PLBs là một trong những giai đoạn quan trọng trong quy trình nhân giống *in vitro*. Chồi không chỉ ảnh hưởng trực tiếp đến sản lượng cây giống mà nó còn ảnh hưởng đến chất lượng cây giống cũng như chất lượng hoa sau này. Tác dụng kích thích tạo chồi đạt được chủ yếu vào việc nuôi cấy các mẫu trên môi trường bổ sung nồng độ cytokinin cao. Cytokinin có tác dụng kích thích tạo chồi nhưng nếu sử dụng nồng độ quá cao sẽ làm giảm sự phát sinh và sinh trưởng của chồi, hình dạng của chồi bị thay đổi và biến dị soma tăng. Sau khi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/L và NAA 1 mg/L, các PLBs đã tái sinh chồi sau 6 tuần nuôi cấy. Trong 3 dòng lai có triển vọng thì dòng DM11x24:139 cho số lượng chồi đạt cao nhất (14,47 chồi) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại. Tuy nhiên, chiều cao chồi của dòng DM12x11:180 lại cao nhất (2,46 cm) và khác biệt với 2 dòng còn lại. Các chồi tái sinh từ PLBs của 3 dòng nghiên cứu đều có từ 2- 4 lá và chưa xuất hiện rễ.



DM11x12:90

DM11x24:139

DM12x11:180

**Hình 3.20.** Cụm chồi 03 dòng lai sau 6 tuần cấy trên môi trường tạo chồi

Để có thể tạo cây hoàn chỉnh, chồi của các dòng lai có triển vọng được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ (môi trường MS có bổ sung saccharose 30 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 200 mL/L + agar 8 g/L + than hoạt tính 0,5 g/L + chất điều hòa sinh trưởng NAA với nồng độ 2 mg/L (phụ lục 11). Số rễ và chiều dài rễ của 3 dòng lai có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy được thể hiện qua Bảng 3.29.

Bảng 3.29 cho thấy sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo rễ, các chồi từ các dòng lai có triển vọng đã tạo rễ với số lượng rễ từ 6,87 – 8,13 (rễ/cây) tùy từng dòng. Trong 3 dòng nghiên cứu thì dòng DM11x12:90 có số lượng rễ lớn nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại. Tuy nhiên, chiều dài rễ của dòng này lại không dài, chỉ 1,79 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Ngược lại, tuy có số rễ ít hơn dòng DM11x12:90 nhưng dòng DM11x24:139 lại có chiều dài rễ vượt trội và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại, chiều dài rễ đạt 3,11 cm sau 6 tuần nuôi cấy.

**Bảng 3.29.** Số rễ và chiều dài rễ của 3 dòng lai có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy

Dòng	Số lượng rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
DM11x12:90	8,13 <sup>a</sup>	1,79 <sup>b</sup>
DM11x24:139	7,70 <sup>ab</sup>	3,11 <sup>a</sup>
DM12x11:180	6,87 <sup>b</sup>	1,36 <sup>b</sup>

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Kết quả đã nhân giống *in vitro* được 300 cây con mỗi dòng lai có triển vọng để đưa ra nhà lưới khảo sát sinh trưởng, phát triển.

#### 3.4.4. Khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng lai có triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Sau 2 tháng từ khi xử lý tạo rễ, 300 cây con của từng dòng lai có triển vọng có chiều cao đồng đều (3 – 4 cm, có từ 4 – 5 lá) được chọn để đem ra vườn ươm để ươm khoảng 3 - 4 tuần. Cây lan con được trồng trong chậu, mỗi chậu một cây, giá thể là dứa miếng. Sau 8 tháng trồng, các cá thể thuộc 3 dòng lai có triển vọng bắt đầu ra hoa. Sự sinh trưởng của các cá thể thuộc 3 dòng này được thể hiện qua Bảng 3.30.

**Bảng 3.30.** Thông số chỉ tiêu sinh trưởng của 3 dòng lai có triển vọng ở thời điểm 8 tháng sau trồng

Dòng	Chiều cao cây (cm)	Chiều cao giả hành (cm)	Số giả hành (giả hành)	Đường kính giả hành (cm)	Số lá (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)
DM11x12:90	18,2 <sup>b</sup>	9,8 <sup>a</sup>	4,1 <sup>a</sup>	1,5 <sup>c</sup>	4,7 <sup>b</sup>	10,6 <sup>b</sup>	1,96 <sup>b</sup>
DM11x24:139	17,3 <sup>b</sup>	8,8 <sup>b</sup>	3,5 <sup>b</sup>	2,0 <sup>b</sup>	3,9 <sup>c</sup>	10,4 <sup>c</sup>	2,02 <sup>b</sup>
DM12x11:180	19,4 <sup>a</sup>	8,4 <sup>b</sup>	3,6 <sup>b</sup>	2,4 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a</sup>	13,1 <sup>a</sup>	3,09 <sup>a</sup>

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Bảng 3.30 cho thấy tại thời điểm ra hoa, chiều cao cây của 3 dòng lai có triển vọng giao động từ 17,3 – 19,4 cm, trong đó dòng DM11x12:180 có chiều cao cây cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê với 2 dòng còn lại. Trong khi đó, chiều cao giả hành của

dòng DM11x12:90 là cao nhất, tuy nhiên đường kính giả hành của dòng DM11x12:90 lại nhỏ nhất. Số giả hành của 3 dòng lai có triển vọng giao động từ 3,5 - 4,1 giả hành, trong đó dòng DM11x12:90 có số giả hành cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Số lá trung bình của các cây thuộc 3 dòng cũng khác nhau, trong đó dòng DM12x11:180 có số lá cao nhất, đạt 5,7 lá/giả hành. Lá của dòng DM12x11:180 cũng dài và rộng hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại.

Ngoài theo dõi các đặc điểm sinh trưởng, đặc điểm hoa của 3 dòng lai có triển vọng cũng được theo dõi và được thể hiện qua Bảng 3.31.

**Bảng 3.31.** Thông số chỉ tiêu về hoa của 3 dòng lai có triển vọng sau 10 tháng trồng nhà lưới

Dòng	Chiều dài phát hoa (cm)	Số hoa (hoa)	Đường kính hoa (cm)	Tỷ lệ cây ra hoa (%)
DM11x12:90	31,5 <sup>b</sup>	9,5 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	31 <sup>b</sup>
DM11x24:139	29,0 <sup>c</sup>	9,4 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>	45 <sup>ab</sup>
DM12x11:180	34,4 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>	5,9 <sup>b</sup>	52 <sup>a</sup>
Trung bình				42,67

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Bảng 3.31 cho thấy chiều dài phát hoa của các cá thể thuộc 3 dòng lai có triển vọng từ 29 – 34,4 cm, trong đó dòng DM12x11:180 có chiều dài phát hoa dài nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại. Tuy nhiên, số hoa của 3 dòng lai không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Số hoa của 3 dòng lai có triển vọng dao động từ 9,4-9,7 hoa/phát hoa. Trong 3 dòng lai có triển vọng thì đường kính hoa của dòng DM11x12:90 to nhất, đạt trung bình 6,3 cm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại.

Tỷ lệ cây ra hoa tại thời điểm 10 tháng sau khi trồng trong nhà lưới của các dòng chọn lọc khác nhau cũng khác nhau, trong đó dòng DM12x11:180 có tỷ lệ cây ra hoa cao nhất, đạt 52% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại. Dòng DM11x24:139 có tỷ lệ cây ra hoa đạt 45% và dòng DM11x12:90 có tỷ lệ cây ra hoa đạt thấp nhất là 31% tại thời điểm 10 tháng sau khi trồng trong nhà lưới.

Như vậy, từ 300 cây con tạo ra từ nhân giống *in vitro* của mỗi dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây (DM11x12:90, DM11x24:139, DM12x11:180), sau 10 tháng trồng trong nhà lưới thì tỷ lệ cây ra hoa trung bình 42,67%.



**Hình 3.21.** Các cá thể ra hoa thuộc dòng DM12x11:180

### 3.4.5. Nhân dòng vô tính và khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng đột biến có triển vọng trong điều kiện *in vitro*

Ba cá thể đột biến có triển vọng được nhân dòng *in vitro* bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào gồm dòng DM12x13-20Gy:38, DM12x13-40Gy:76 và DM12x13-60Gy:142. Số lượng chồi, chiều cao và đặc điểm chồi của từng dòng sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/L và NAA 1 mg/L được thể hiện qua Bảng 3.32.

**Bảng 3.32.** Thông số chỉ tiêu sinh trưởng của 3 dòng đột biến có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy

Dòng	Số lượng chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
DM12x13-20Gy:38	7,4 <sup>a</sup>	1,8 <sup>b</sup>
DM12x13-40Gy:76	6,1 <sup>a</sup>	2,0 <sup>ab</sup>
DM12x13-60Gy:142	7,2 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Sau khi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/L và NAA 1 mg/L, các PLBs đã tái sinh chồi sau 6 tuần nuôi cấy. Trong 3 dòng đột biến có triển vọng thì dòng DM12x13-20Gy:38 cho số lượng chồi đạt cao nhất (7,4 chồi) nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại. Tuy nhiên, chiều cao chồi của dòng

DM12x13-60Gy:142 lại cao nhất (2,2 cm), khác biệt với dòng DM12x13-20Gy:38 nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê với dòng DM12x13-40Gy:76.



DM12x13-20Gy:38

DM12x13-40Gy:76

DM12x13-60Gy:142

**Hình 3.22.** Cụm chồi 03 dòng đột biến sau 6 tuần cấy trên môi trường tạo chồi

Để có thể tạo cây hoàn chỉnh, chồi của các dòng đột biến có triển vọng được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ (môi trường MS có bổ sung saccharose 30 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 200 mL/L + agar 8 g/L + than hoạt tính 0,5 g/L + chất điều hòa sinh trưởng NAA với nồng độ 2 mg/L (phụ lục 11)). Số rễ và chiều dài rễ sau 6 tuần nuôi cấy được theo dõi và được thể hiện qua Bảng 3.33.

**Bảng 3.33.** Số rễ và chiều dài rễ của 3 dòng đột biến có triển vọng sau 6 tuần nuôi cấy

Dòng	Số lượng rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
DM12x13-20Gy:38	6,9 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>
DM12x13-40Gy:76	6,5 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>
DM12x13-60Gy:142	5,8 <sup>a</sup>	1,4 <sup>b</sup>

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Bảng 3.33 cho thấy sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo rễ, các chồi từ các dòng đột biến có triển vọng đã ra rễ với số lượng rễ từ 5,8 – 6,9 tùy từng dòng. Trong 3 dòng nghiên cứu thì dòng DM12x13-20Gy:38 có số lượng rễ lớn nhất nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại. Tuy nhiên, chiều dài rễ của dòng này lại không dài, chỉ 1,5 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Ngược lại, tuy có số rễ ít hơn dòng DM12x13-20Gy:38 nhưng dòng DM12x13-40Gy:76 lại có chiều dài rễ vượt trội và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại, chiều dài rễ đạt 2,0 cm sau 6 tuần nuôi cấy.

Kết quả đã nhân giống *in vitro* được 300 cây con mỗi dòng đột biến có triển vọng để đưa ra nhà lưới khảo sát sinh trưởng, phát triển.



DM12x13-20Gy:38

DM12x13-40Gy:76

DM12x13-60Gy:142

**Hình 3.23.** Cây con của 03 dòng đột biến sau 6 tuần cấy chuyển trên môi trường tạo rễ

**3.4.6. Khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng đột biến có triển vọng trong điều kiện nhà lưới**

Sau 2 tháng từ khi xử lý tạo rễ, 300 cây con của từng dòng đột biến có triển vọng có chiều cao đồng đều (3 – 4 cm, có từ 4 – 5 lá) được chọn để đem ra vườn ươm để ươm khoảng 3 - 4 tuần. Cây lan con được trồng trong chậu, mỗi chậu một cây, giá thể là dứa miếng. Sau 8 tháng trồng, các cá thể thuộc 3 dòng đột biến có triển vọng bắt đầu ra hoa. Sự sinh trưởng của các cá thể thuộc 3 dòng này tiếp tục được theo dõi và được thể hiện qua Bảng 3.34.

**Bảng 3.34.** Thông số chỉ tiêu sinh trưởng của 3 dòng đột biến có triển vọng ở thời điểm 8 tháng sau trồng

Dòng	Chiều cao cây (cm)	Chiều cao giả hành (cm)	Số giả hành (giả hành)	Đường kính giả hành (cm)	Số lá (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)
DM12x13-20GY:38	16,9 <sup>b</sup>	8,6 <sup>b</sup>	3,2 <sup>b</sup>	2,8 <sup>a</sup>	4,0 <sup>b</sup>	12,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>
DM12x13-40Gy:76	18,3 <sup>a</sup>	11,1 <sup>a</sup>	5,1 <sup>a</sup>	1,7 <sup>b</sup>	6,0 <sup>a</sup>	9,6 <sup>c</sup>	,5 <sup>a</sup>
DM12x13-60Gy:142	15,8 <sup>b</sup>	8,3 <sup>b</sup>	3,1 <sup>b</sup>	2,7 <sup>a</sup>	4,1 <sup>b</sup>	10,6 <sup>b</sup>	1,8 <sup>b</sup>

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Bảng 3.34 cho thấy tại thời điểm ra hoa, chiều cao cây của 3 dòng chọn lọc giao động từ 15,8 – 18,3 cm, trong đó dòng DM12x13-40Gy:76 có chiều cao cao hơn 2 dòng còn lại và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Chiều cao giả hành của dòng DM12x13-40Gy:76 cũng cao hơn 2 dòng còn lại, tuy nhiên đường kính giả hành của dòng này lại nhỏ nhất. Số giả hành của 3 dòng chọn lọc giao động từ 3,1 - 5,1 giả hành, trong đó dòng



DM12x13-40Gy:76 có số giả hành cao hơn 2 dòng còn lại và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Số lá trung bình của các cây thuộc 3 dòng khác nhau cũng khác nhau, trong đó dòng DM12x13-40Gy:76 có số lá cao nhất, đạt 6,0 lá/giả hành, tuy nhiên lá của dòng này lại ngắn hơn nhưng lại rộng hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại.

Ngoài theo dõi các đặc điểm sinh trưởng, đặc điểm hoa của 3 dòng chọn lọc cũng được theo dõi và được thể hiện qua Bảng 3.35.

**Bảng 3.35.** Thông số chỉ tiêu về hoa của 3 dòng đột biến có triển vọng sau 10 tháng trồng trong nhà lưới

Dòng	Chiều dài phát hoa (cm)	Số hoa (hoa)	Đường kính hoa (cm)	Tỷ lệ cây ra hoa (%)
DM12x13-20Gy:38	15,7 <sup>b</sup>	6,2 <sup>b</sup>	6,8 <sup>a</sup>	34,8 <sup>b</sup>
DM12x13-40Gy:76	20,5 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>	4,0 <sup>c</sup>	44,8 <sup>a</sup>
DM12x13-60Gy:142	21,0 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>	5,5 <sup>b</sup>	42,0 <sup>ab</sup>
	Trung bình			41,99

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $P \leq 0.05$ .

Bảng 3.35 cho thấy chiều dài phát hoa của các cá thể thuộc 3 dòng chọn lọc từ 15,7 – 21,0 cm, trong đó dòng DM12x13-60Gy:142 có chiều dài phát hoa dài nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với dòng DM12x13-20Gy:38 nhưng không khác biệt với dòng DM12x13-40Gy:76. Số hoa của dòng DM12x13-40Gy:76 lại cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê với 2 dòng còn lại. Trong 3 dòng chọn lọc thì đường kính hoa của dòng DM12x13-20Gy:38 là to nhất, đạt trung bình 6,8 cm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại. Tỷ lệ cây ra hoa tại thời điểm 10 tháng sau khi trồng trong nhà lưới của các dòng chọn lọc khác nhau cũng khác nhau, trong đó dòng DM12x13-40Gy:76 có tỷ lệ cây ra hoa cao nhất, đạt 44,8% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với với dòng DM12x13-20Gy:38 nhưng không khác biệt với dòng DM12x13-60Gy:142. Dòng DM12x13-60Gy:142 có tỷ lệ cây ra hoa đạt 42% và dòng DM12x13-20Gy:38 có tỷ lệ cây ra hoa đạt thấp nhất là 34,8% tại thời điểm 10 tháng sau khi trồng trong nhà lưới.

Như vậy, từ 300 cây con tạo ra từ nhân giống *in vitro* của mỗi dòng lan đột biến *Dendrobium* thấp cây (DM12x13-20Gy:38, DM12x13-40Gy:76, DM12x13-60Gy:142), sau 10 tháng trồng trong nhà lưới thì tỷ lệ cây ra hoa trung bình 41,99%.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### Kết luận

Đã xác định được môi trường nuôi cấy *in vitro*, tỷ lệ ánh sáng dùng đèn LED đỏ và LED xanh dương, cường độ chiếu sáng tốt nhất cho sự nảy mầm: ½ MS + saccharose 30 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 200 mL/L + than hoạt tính 0,5 g/L + agar 7 g/L ở điều kiện ánh sáng (100Đ, 400 lux); nhân chồi: ½ MS + saccharose 20 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 150 mL/L + than hoạt tính 0,5 g/L + agar 7 g/L ở chế độ chiếu sáng (75Đ: 25X, 800 lux); tạo rễ: MS + saccharose 20 g/L + khoai tây 50 g/L + nước dừa 150 mL/L + than hoạt tính 0,5 g/L + agar 7 g/L ở chế độ chiếu sáng (50Đ: 50X, 400 lux). Môi trường nuôi cấy và chế độ chiếu sáng tối ưu này đã được sử dụng cho việc nuôi cấy hạt lan lai của các tổ hợp lai và protocorm sau khi chiếu xạ với tia gamma <sup>60</sup>Co.

Trong 20 cặp lai lan *Dendrobium* thấp cây nghiên cứu, đã có 15 tổ hợp lai đậu quả với tỷ lệ đậu quả trong khoảng từ 25 – 100%. Trong 15 tổ hợp đậu quả chỉ có 9 tổ hợp cho hạt hữu thụ với tỷ lệ đậu quả từ 58,3 – 100% và tỷ lệ hạt nảy mầm từ 63,7 – 97,3%. Từ các so sánh, đánh giá sinh trưởng và ra hoa của các tổ hợp này trong điều kiện *in vitro* và ngoài nhà lưới đã chọn được 3 dòng lai DM11x12:90, DM11x24:139, DM12x11:180 có triển vọng.

Đã xây dựng được quy trình để chọn tạo dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây có triển vọng bằng phương pháp lai tạo gồm 7 bước cơ bản trong thời gian 22 tháng.

Đã xác định được liều gây chết 50% (LD<sub>50</sub>) là 68 Gy đối với protocorm của tổ hợp DM12x13. Khi chiếu xạ tia gamma <sup>60</sup>Co trên protocorm, các liều 20, 40 và 60 Gy đều có tác dụng tăng tần suất biến dị với phổ biến dị rộng, đa dạng về cấu trúc hoa, màu sắc hoa, thân, lá và các tính trạng về giảm chiều cao, ra hoa sớm trong điều kiện *in vitro*. Kết quả so sánh, sàng lọc trong điều kiện nhà lưới đã chọn được 3 dòng đột biến có triển vọng DM12x13-20Gy:38, DM12x13-40Gy:76 và DM12x13-60G:142.

Đã xây dựng được quy trình chọn tạo dòng lan *Dendrobium* đột biến thấp cây có triển vọng bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma mẫu protocorm với 10 bước cơ bản trong thời gian 26 tháng.

Sau khi sàng lọc, đã xác định 4 primer phù hợp nhất là OPA2, OPA4, OPA5 và OPA18 để đánh giá sự khác biệt di truyền giữa 8 giống bố mẹ, 8 dòng con lai và 3 dòng đột biến. Dòng đột biến DM12x13-40Gy:76 có sự khác biệt di truyền lớn nhất so với giống mẹ DM12 và các dòng con lai (hệ số tương đồng di truyền là 0,48 - 0,86). Đã nhân vô tính cả 3 dòng *Dendrobium* thấp cây lai, 3 dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến có triển vọng có chiều cao từ 15 – 20 cm với 6 hoa/ phát hoa trở lên, đường kính hoa từ 4,5 cm trở lên, màu sắc hoa khác với bố mẹ.

### **Đề nghị**

Cần tiếp tục theo dõi các dòng lai và dòng đột biến triển vọng để phát triển thành giống mới.

Nghiên cứu quy trình trồng, chăm sóc các dòng lan lai *Dendrobium* và các dòng *Dendrobium* đột biến thấp cây.

Theo dõi, đánh giá 5 dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây tiềm năng để tiếp tục chọn lọc.

Theo dõi tất cả các tổ hợp lai; tìm hiểu quy luật phân ly tính trạng của các tổ hợp lai.

Dùng các phương thức tiếp cận mới để phân tích, đánh giá di truyền và đặc điểm phân ly của các tổ hợp lai.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

### Bài báo khoa học

1. Nguyễn Văn Vinh, Trần Hồng Anh, Bùi Minh Trí, Bùi Văn Lê, 2017. Đánh giá khả năng hữu thụ của hai mươi tổ hợp lai của lan *Dendrobium* thấp cây. *Tạp chí Nông nghiệp & PTNT*, chuyên đề Sinh lý thực vật ứng dụng trong nông nghiệp công nghệ cao tháng 12 năm 2017, 197-203.
2. Nguyễn Văn Vinh, Nguyễn Quỳnh Như Anh, Bùi Minh Trí, 2017. Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ - xanh dương và cường độ chiếu sáng từ đèn Led đơn sắc đến sự hình thành và phát triển của chồi và rễ lan *Dendrobium* thấp cây. Hội thảo khoa học Sinh Lý Thực Vật toàn quốc, chuyên đề Sinh lý Thực vật ứng dụng trong Nông nghiệp công nghệ cao lần thứ 2 năm 2017. *Nhà xuất bản Nông nghiệp*, 170-176. ISBN: 978-604-60-2664-8.
3. Nguyễn Văn Vinh, Bùi Văn Lê, Bùi Minh Trí, 2017. Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đỏ - xanh dương và cường độ chiếu sáng từ đèn Led đơn sắc đến sự hình thành và phát triển của hạt lan *Dendrobium* thấp cây. Hội thảo khoa học Sinh Lý Thực Vật toàn quốc, chuyên đề Sinh lý Thực vật ứng dụng trong Nông nghiệp công nghệ cao lần thứ 2 năm 2017. *Nhà xuất bản Nông nghiệp*, 177-183. ISBN: 978-604-60-2664-8.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdullah T.L., Endan J., Nazir B.M., 2009. Changes in flower development, chlorophyll mutation and alteration in plant morphology of *Curcuma alismatifolia* by gamma irradiation. *American Journal of Applied Sciences*, 6(7):1436-1439.
2. Ahloowalia B. and Maluszynski M., 2001. Mutation inductions – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118, 167-173.
3. Aktar S., Nasiruddin K.M. and Hossain K., 2008. Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* orchid. *School of Agriculture and Rural development*, 6: 69 – 74.
4. Amano E., 2004. Practical suggestions for mutation breeding mutation breeding. Mutation breeding Manual. *Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA)*.
5. Ancora G. and Sonnino A., 1995. *In vitro* induction of mutation in potato. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Bajaj Y.P.S. (Ed.). *Springer*. Frances, 3:408-424.
6. Arunyanart and Chaitrayagun, 2002. Mutation induction by  $\gamma$  and X-ray irradiation in tissue cultured lotus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 70:119-1221.
7. Badr D.R.H. and Jean B.Z., 1995. *In vitro* culture and plant regeneration of larger flowered purslane. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 41: 281-283.
8. Baird E., Cooper-Bland S., Waugh R., DeMaine M., Powell W., 1992. Molecular characterisation of inter and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular and General Genetics MGG*, 233(3): 469-475.
9. Bechtel H., Phillip Cobb, Edmund Launert, 1981. *The Manual of Cultivated Orchid Species*, Hardcover – 1981.
10. Benjamin E. Goulet, Federico Roda, Robin Hopkins, 2017. Hybridization in plants: old ideas, new techniques. *Plant Physiol.*, 173(1): 65–78.
11. Bhagwat S. and Ducan E.J., 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa acuminata*, AAA) for tolerance *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense using chemical mutagens. *Scientia Horticulturae*, 73:11-22.
12. Billorea V., Shriram J. Mirajkarb, Penna Suprasannab, Monica Jain, 2019. Gamma irradiation induced effects on *in vitro* shoot cultures and influence of monochromatic light regimes on irradiated shoot cultures of *Dendrobium sonia* orchid. *Biotechnology Reports*, 24: 1-7.
13. Billore V., M. Jain, P. Suprasanna, 2017. Monochromic radiation through lightemitting diode (LED) positively augments *in vitro* shoot regeneration in Orchid (*Dendrobium sonia*), *Can. J. Biotech.*, 1 (2): 50–58.
14. Breen A.P. and Murphy J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology and Medicine*, 18(6): 1033-1077.
15. Brown C.S., Schuerger A.C., Sager J.C., 1995. Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red lightemitting diodes with supplemental blue or far - red lighting. *J Am Soc Hortic Sci*, 120: 808 – 813.

16. Bùi Chí Bửu, NguyễnThị Lang, 2007. *Chọn giống cây trồng – phương pháp truyền thống và phân tử*. Nxb Nông Nghiệp, 502 trang.
17. Chakrabarty D., Datta S.K., 2010. Application of RAPD markers for characterization of  $\gamma$ -ray-induced rose mutants and assessment of genetic diversity. *Plant Biotechnology Reports*, 4(3): 237-242.
18. Chattopadhyay P., Nirmalya B., and Bhupendra C., 2012. Genetic characterization of selected medicinal *Dendrobium* (*Orchidaceae*) species using molecular marker. *Research Journal of Biology*, 2 (4): 117-125.
19. Chinone S., Hanaoka Y., Nakatsubo K., Amano M., Hase Y., Tanaka A., Narumi I., 2005. Mutation induction on hybrid Liliium “Moon light” using ion beam. *IAEAReview*, 42:90.
20. Datta S., Chakrabarty K.D., Mandal A.K.A., 2001. Gamma ray-induced genetic manipulations in flower colour and shape in *Dendranthema grandiflorum* and their management through tissue culture. *Plant Breeding*, 120:91-92.
21. Datta S.K., Mishra P. and Manda K.A., 2005. *In vitro* mutagenesis – a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. *Current Science*, 88: 155-158.
22. Dehgahi R. and Joniyasa A., 2017. Gamma irradiation induced variation in *Dendrobium* Sonia-28 Orchid Protocom- Like bodies (PLBs). *Fung. Gen. Bio.*, 7 (2): 151.
23. Devarumath R.M., Nandy S., Rani V., Marimuthu S., Muraleedharan N., Raina S.N., 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Reporters*, 21:166-173.
24. Ding Ge, Jie Shen, Xiao-yu Ding, Feng Tang, 2005. Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD. *Acta pharmaceutica Sinica*, 40(11):1028-32.
25. Dowrick G.J. and Bayoumi A., 1966. The induction of mutations in chrysanthemum using X- and gamma radiation. *Euphytica*, 15(2): 204-210.
26. Du Puy D. and Cribb P., 2007. The Genus *Cymbidium*, 2nd Edition. *Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew*.
27. Duong Hoa Xo, Le Quang Luan, 2017. *In vitro* mutagenesis of *Cymbidium* La bell “Anna Belle” by  $\gamma$ -rays irradiation and oligochitosan interaction. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology* (IJEAB), Vol-2, Issue-4, 1540 – 1550.
28. Dương Hoa Xô, 2011. Suu tập, nhập nội, chọn tạo và nhân nhanh các giống hoa lan phục vụ nội tiêu và xuất khẩu. *Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.HCM*.
29. Dương Tấn Nhựt, 2017. Ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống cây trồng. *Hội thảo khoa học sinh lý thực vật toàn quốc – Sinh lý thực vật ứng dụng trong nông nghiệp công nghệ cao*. Nxb Nông nghiệp, trang 16-27.

30. Đào Thanh Vân, Đặng Thị Tố Nga, 2008. *Giáo trình hoa lan*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
31. Đặng Văn Khải, Nguyễn Thị Nhã, Vũ Thị Huyền Trang, 2017. Lựa chọn, thiết kế, thử nghiệm và ứng dụng một số primer nhằm khuếch đại các vùng trình tự tiềm năng để nhận diện các loài lan hài (*Paphiopedilum*) Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, Chuyên đề “Sinh lý thực vật ứng dụng trong nông nghiệp công nghệ cao”*, tháng 12/2017, trang 113-118.
32. Đoàn Phạm Ngọc Nga, 2007. Ứng dụng phương pháp chiếu xạ tạo giống mè (*Sesamum indicum* L.) đột biến. *TT Phát triển khoa học và Công nghệ trẻ*.
33. Đỗ Hữu Át, 1996. Nghiên cứu hiệu quả gây đột biến của tia Gamma (Co) ở các thời điểm khác nhau của chu kỳ gián phân đầu tiên trên hạt nảy mầm của một số giống lúa đặc sản Việt Nam. *Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*.
34. Đỗ Khắc Thịnh, 2011. Nghiên cứu chọn tạo giống lan Hồ điệp (*Phalaenopsis*) thích nghi với khí hậu thành phố Hồ Chí Minh. *Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam*.
35. Edwin F. George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk, 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Volume 1. The Background*. Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands, 503p.
36. Fouly H. M., Wilkinson H. T., Domier L. L., 1996. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of *Gaeumannomyces* species. *Soil Biol. Biochem.*, 28(6): 703-710.
37. Gericke A. and Knuth M., 1979. Induction of mutations with gamma rays and colchicine in ornamental woody perennials. *Archiv für züchtungsforschung*, 9: 353-362.
38. Giridharan M.P. and Balakrishnan S., 1992. Gamma ray induced variability in vegetative and floral characters of ginger. *Indian Cocoa, Arecanut and Spices Journal*, 15:68-72.
39. Hà Thị Loan, Phan Diễm Quỳnh, Huỳnh Hữu Đức, Dương Hoa Xô, 2018. Một số kết quả nghiên cứu và phát triển giống cây cấy mô tại Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM. *Hội thảo ‘Tình hình sản xuất và cung ứng cây giống cấy mô’*, Sở NN và PTNT TP.HCM, 28/9/2018.
40. Habiba S. U., Shimasaki Kazuhiko, Md. Monjurul Ahasanand Md. Meskatul Alam, 2014. Effects of different light quality on growth and development of protocorm-like bodies (PLBs) in *Dendrobium kingianum* cultured *in vitro*. *Bangladesh Research Publications Journal*, Volume: 10, Issue: 2: 223-227.
41. Hansen M., Halldén C., and Säll T., 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Mol. Biol. Rep.*, (16): 139–146.
42. Harten A. M., 1998. Mutation breeding: theory and practical applications. *Cambridge University Press*, 353 pp.
43. Haruyuki Kamemoto, Teresita D. Amore, Adelhei R. Kuehnle, 1999. *Breeding Dendrobium Orchids in Hawaii*.

44. Hedge, R.V., 2006. Studies on induced mutagenesis and *in vitro* regeneration in turmeric (*Curcuma longa* L.), Ph.D. Thesis, University of Agricultural Science, Dhaward, India.
45. Hoàng Trọng Phán và Trương Thị Bích Phượng, 2008. Đa bội thể và phát sinh đột biến trong chọn giống thực vật. *Giáo trình cơ sở di truyền chọn giống thực vật*. Nxb Đại học Huế, 214:131-156.
46. Hoàng Xuân Lam, 2014. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng, nghiên cứu khả năng sinh trưởng, phát triển và biện pháp kỹ thuật nhằm tăng năng suất, chất lượng một số giống hoa phong lan nhập nội (*Cattleya*, *Dendrobium*, *Oncidium*) cho Miền Bắc Việt Nam. Luận án tiến sĩ ngành Khoa học cây trồng, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
47. Hoenecke M.E., Bula R.J., Tibbitts T.W., 1992. Importance of “Blue” Photon Levels for Lettuce Seedlings Grown under Red-Light-Emitting Diodes. *Hortscience*, 27(5):427-430.
48. Hopkins K.L., Hilton A.C, 2001. Use of multiple primers in RAPD analysis of clonal organisms provides limited improvement in discrimination. *BioTechniques*, (30), 1262–1267.
49. Hồ Viết Thế, Bùi Nguyễn Quỳnh Trâm, Nguyễn Thị Yên Nhi, 2017. Đánh giá đa dạng di truyền cho một số giống cúc (*Chrysanthemum* spp.) ở miền Nam. *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm*, 13 (1): 74-83.
50. Hunt G.J. and Page R. E., 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular marker reveal novel types of polymorphism in the honeybee”, *Theor. Appl. Gent*, (85): 15–20.
51. IAEA (International Atomic Energy Agency), Vienna (Austria), 1986. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (Italy); *Proceedings series*, 529 p; ISBN 92-0-010086-4; Worldcat.
52. IAEA (International Atomic Energy Agency), Vienna, 1995. Manual on mutation breeding, second edition. *Joint FAO/IAEA division of atomic energy in food and agriculture*, Technical reports series No. 119.
53. Jayachandran B.K. and Mohankumar N., 1992. Effect of gamma ray irradiation on ginger. *South Indian Horticulture*, 40:283-288.
54. Joseph R., Yeoh H.H., Loh C.S., 2004. Mutation induction in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. *Plant Cell Rep*, 23(1–2):91–98.
55. Kong Q., Yuan S.Y., Végvári G.Y., 2007. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rehb.f. *Int. J. Horti.Sci*, 13: 61-64.
56. Krasaechai A., 1992. Effect of gamma radiation on tuberose (*Polyanthes tuberosa*). *Kasetsart journal*, v. 26(1): 6-11.
57. Kumar, B., S. Kumar and M. Thakur, 2012. *In vitro* mutation induction and selection of *Chrysanthemum* (*Dendratherma Grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria obesa* Syd. *International Journal of plant research*, 2(4): 103-107.
58. Khan A., Awan S., Sadia B., Rana R. M., Khan I. A., 2010. Genetic diversity study among coloured cotton genotypes by using RAPD markers. *Pak. J. Bot.*, 42(1): 71-77.



59. Lagoda P.J.L., 2009. To our readers. *Plant Breeding & Genetic Newsletter*, 23:1-2.
60. Lamseejan S., Jompuk P., Wongpiyasatid A., Deeseepan S., Kwanthammachart P., 2000. Gamma-rays induced morphological changes in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Kasetsart Journal Natural Science*, 34: 417-422.
61. Lapade, A.G., 2002. Status of Mutation Breeding in the Philippines. *Paper presented in the Formulation Meeting MRP-1 Drought Tolerance of Sorghum and Soybean*, Jakarta, Indonesia.
62. Lapins K.O., Bailey C.H., Hough L.F., 1969. Effects of gamma rays on apple and peach leaf buds at different stages of development II. Injury of apical and axillary meristems and regeneration of shoot apices. *Radiat Bot*, 10:59–68.
63. Le Quang Luan, Nguyen Huynh Phuong Uyen, Vo Thi Thu Ha, 2012. *In vitro* mutation breeding of *Paphiopedilum* by ionization radiation. *Scientia Horticulturae*, 144: 1–9.
64. Lerceteau E., Robert T., Pétiard V., and Crouzillat D., 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among Theorem cacao accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Gent*, (95): 10-19.
65. Lê Duy Thành, 2000. *Cơ sở di truyền chọn giống thực vật*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 160 trang.
66. Lê Duy Thành, Tạ Toàn, Đỗ Lê Thăng và Trần Văn Diễn, 1995. *Di truyền học*. Nxb Nông nghiệp, Hà nội.
67. Lê Tiến Dũng, 2002. Ứng dụng đột biến thực nghiệm tia gamma ( $\gamma$ ) tạo nguồn vật liệu khởi đầu, phục vụ công tác chọn tạo giống lạc mới, phù hợp điều kiện sinh thái ở Thừa Thiên Huế. *Luận văn tiến sĩ, Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam*.
68. Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nghị và Lê Thị Muội, 1997. *Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội, 188 trang.
69. Lê Văn Hòa, 2007. *Khả năng gây đột biến nhân tạo hoa lan cắt cành Dendrobium bằng tia gamma*. Nxb Nông Nghiệp, 175-188.
70. Lê Văn Hoàng, 2008. *Nuôi Cây Mô Tế Bào Thực Vật*. Giáo Trình Đại Học Đà Nẵng, 308 trang.
71. Li M. D., Qing-sheng Y.E. and Zhu G., 2007. Analysis of the germplasm resources and genetic relationships among hybrid *Cymbidium* cultivars and native species with RAPD markers. *Agricultural Sciences in China*, 6(8), 922-929.
72. Lin Y., Li J., Li B., He T., Chun Z., 2011. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 105: 329–335.
73. Ling A. C. K., 1999. Effects of gamma irradiation on *in vitro* cultures of selected orchid hybrids. *Masters thesis, Universiti Putra Malaysia*, 114p.
74. Maluszynski M., Nichterlien K., Van Zanten L. and Ahloowalia S., 2000. Officially released mutant varieties – The FAO/IAEA database. *Mutation Breeding Review*, 12: 1-84.

75. Mba C., 2013. Mutation inductions Unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*, 3(1), 200-231.
76. Mchatton R., 2011. Orchid Pollination: Exploring a fascinating world. *Orchids*: 338 - 349. <https://staugorchidsociety.org/PDF/OrchidPollinationbyRonMcHatton.pdf>
77. Moghanddam S.S., Jaafar H., Ibrahim R., Rahmat A., Aziz M.A. and Philip E., 2011. Effect of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella asiatica*. *Molecules*, 16: 4991-5007.
78. Mohanty D.C., and Panda B.S., 1988. Variability in rhizome of *Zingiber officinale* Rosc. by mutagenesis and comparison of gamma radiation and ethyl methane sulphonate (EMS) in production of morphological mutants. *In: Proceedings of National seminar in Chillies, Gingers and Tumeric*. Andhra Pradesh Agricultural University, 74-78.
79. Mullainathan L. and Umavathi S., 2014. Induced mutagenesis in *Cicer arietinum*. *International Letters of Natural Sciences*, 12: 1-4.
80. Mullis K. B., Faloona F., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:350-355.
81. Murashige T. và Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15, 473-497.
82. Nagatomi, S.; Miyahira, E. and Degi, K., 2000. Induction of flower mutation comparing with chronic and acute gamma irradiation using tissue techniques in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Acta Hort.*, 508:69-74.
83. Nasiruddin K.M., Begun R., and Yasmin S., 2003. Protocorm like Bodies and Plantlet Regeneration from *Dendrobium formosum* Leaf Callus. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2 (13): 955 - 957.
84. Nei M. and W H Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(10): 5269-5273.
85. Novak F.J., Afza R., Van Duren M. and Omar M.S., 1990. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa cvs*). *Tropical Agriculture*, 67, 21-26.
86. Nguyễn Công Nghiệp, 2004. *Trồng hoa lan – In lần ba*. Nxb Trẻ, TP. Hồ Chí Minh, 283 trang.
87. Nguyễn Đức Thành, 2014. Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. *Tạp chí Sinh học*, 36(3):265-294.
88. Nguyễn Hữu Đồng, 1997. *Đột biến: cơ sở lý luận và ứng dụng*. Nxb Nông Nghiệp.
89. Nguyễn Tiến Bản, 1990. *Tuyển tập các công trình nghiên cứu sinh thái và tài nguyên sinh vật*. Nxb Nông nghiệp – Hà Nội.
90. Nguyễn Tiến Thịnh và Lê Văn Thức, 2006. Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong phân lập đột biến ở cây trồng nhân giống sinh dưỡng. *Hội nghị khoa học – Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa*, Nxb Nông nghiệp, trang 155-160.
91. Nguyễn Thanh Tùng, Lê Văn Điệp, Nguyễn Minh Trung, Trương Thị Bích Phượng, 2010. Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân

- giống *in vitro* cây lan hoàng thảo thân gãy (*Dendrobium aduncum*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(3): 361-367.
92. Nguyễn Thị Mỹ Duyên, 2009. Nhân giống lan *Dendrobium anosmum*, *Dendrobium* thấp cây bằng phương pháp nuôi cấy mô. Nghiên cứu các loại giá thể trồng lan *Dendrobium* thấp cây thích hợp và cho hiệu quả cao. *Đề tài nghiên cứu Khoa học cấp trường – Trường Đại học An Giang*.
  93. Nguyễn Thiện Tịch, Đoàn Thị Hoa, Trần Sỹ Dũng, Huỳnh Thị Ngọc Nhân, 2006. *Kỹ Thuật nuôi trồng hoa lan*. Nxb Nông nghiệp TP. HCM, 270 trang.
  94. Nguyễn Trường Giang, Dương Hoa Xô, Huỳnh Hữu Đức, 2017. Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị DNA Barcode để xác định loài lan thạch hộc tía (*Dendrobium officinale*). *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, Chuyên đề “Sinh lý thực vật ứng dụng trong nông nghiệp công nghệ cao”*, tháng 12/2017, trang 204-110.
  95. Nguyễn Văn Tới, 2002. Một số kết quả bước đầu về lai tạo giống lan địa phương Đà Lạt-Lâm Đồng. *TT Khoa học và Công nghệ (Lâm Đồng)*, số 1, trang 13-15.
  96. Nguyễn Xuân Dũng, Dương Hoa Xô, Chu Hoàng Hà, 2014. Tối ưu hóa sự chuyển nạp gen ở lan *Dendrobium sonia* qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Sinh học*, 2014: 257-265.
  97. Nguyễn Xuân Linh, 2002. *Kỹ thuật trồng hoa cây cảnh*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 92 - 108.
  98. Obara-Okeyo P., S. Kako, 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 99(2), 95–101.
  99. Ojiewo C.O., Kenji M., Peter W. M., Stephen G. A., 2007. Mutation breeding of African nightshade (*Solanum* section *Solanum*). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 1(1), 39-52.
  100. Panjan S., Kamnoon K., 2011. Efficient direct protocorm-like bodies induction of dwarf *Dendrobium* using thidiazuron. *Not Sci Biol*, 3(4):88-92.
  101. Patil S.H. and Chandra M., 1978. Selection of extreme form of fastigiata with high productivity in groundnut. *Indian J. agric. Sci.*, 48: 351-58.
  102. Piluek C., Lamseejan S., 2002. Orchid improvement through mutation induction by Gamma ray. *In FNCA joint workshop on Mutation Breeding and Biofertilizer held at Beijing, China, From 20-23 August 2002*.
  103. Piluek C., Lamseejan. S., 2006. Orchid Improvement through Mutation Induction by Gamma ray. *Department of horticulture, faculty of Agriculture Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*.
  104. Piluek Chitrapan and Arunee Wongpiyasatid, 2010. Part 3. Thailand. Achievement Sub-Project on insect resistance in Orchid (2003-2009). *Mutation breeding project forum for nuclear cooperation in Asia (FNCA)*, pp 33-63.
  105. Pochooa D., 2005. *In vitro* mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation. *International Journal of Agriculture and Biology.*, 7(1):11- 20.

106. Poudel, P.R., Kataoka, I., & Mochioka, R., 2008. Effect of red - and blue – light -emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 92,147 – 153.
107. Phạm Hoàng Hộ, 1999. *Cây cỏ Việt Nam*. Nxb Trẻ Thành phố Hồ Chí Minh, 1027 trang.
108. Phạm Thành Hồ, 2006. Di Truyền Học. Nxb Giáo Dục Việt Nam, 618 trang.
109. Phan Diễm Quỳnh, Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Xuân Dũng, Hà Thị Loan, 2019. Một số kết quả đạt được trong nghiên cứu lai tạo các giống lan mới tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.HCM. *Kỷ yếu Hội thảo Ứng dụng công nghệ cao trong lai tạo và sản xuất giống hoa lan*. Sở NN và PTNT TP.HCM ngày 26/4/2019.
110. Phan Thanh Kiêm, 2016. *Nguyên lý chọn giống cây trồng*. Nxb Nông Nghiệp, 431 trang.
111. Phan Trọng Dũng, 2007. Nghiên cứu lai tạo tuyển chọn giống mới, ứng dụng công nghệ sinh học trong công tác nhân giống hoa phong lan phục vụ nông nghiệp. *Hội thi sáng tạo khoa học kỹ thuật tỉnh Đắk Lắk lần thứ IX*.
112. Rajkumar Kishor P.S., Sha V. K., Sharma G.J., 2006. Hybridization and *in vitro* culture of an orchid hybrid Ascocenda ‘Kangla’. *Scientia Horticulturae*, 108, 66–73.
113. Randhawa M.A., 2009. Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 21(3): 184-185.
114. Ryu Jaihyunk, Chang-Hyu Bae, 2012. Genetic Diversity and Relationship Analysis of Genus *Taraxacum* Accessions Collected in Korea. *Korean J. Plant Res*, 25(3):329-338.
115. Shangguo F., Hongyan Z., Jiangjie L., Junjun L., Shen B and Huizhong W, 2013. Preliminary gentic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme*. *Journal of Genetics*, 92(2), 110-115.
116. Sherpa R., Devadas R., Suprasanna P., Pamarthi R. K., 2018. Effect of gamma radiation on asymbiotic seed germination of scented orchid *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay. *Conference: International Conference on Climate Change, Biodiversity and Sustainable Agriculture (ICCBSA-2018) at AAU, Jorhat 785013, Assam, India (Dec 13-16, 2018), At Assam Agricultural University, Jorhat 785013, Assam, India*.
117. Sở NN và PTNT TP.HCM, 2018. Báo cáo tham luận về sản xuất, cung ứng cây giống cây mô. *Hội thảo ‘Tình hình sản xuất và cung ứng cây giống cây mô’*, ngày 28/9/2018.
118. Sở NN và PTNT TP.HCM, 2019. Một số thành tựu trong ứng dụng công nghệ cao lai tạo và sản xuất giống hoa lan tại TP.HCM. *Kỷ yếu Hội thảo Ứng dụng công nghệ cao trong lai tạo và sản xuất giống hoa lan*, ngày 26/4/2019.
119. Sparrow A. H., Underbrink A. G., and Rhoda C. S., 1967. Chromosomes and Cellular Radiosensitivity: I. The Relationship of  $D_0$  to Chromosome Volume and Complexity in Seventy-Nine Different Organisms. *Radiation Research*, Vol. 32, No. 4, pp. 915-945.

120. Sparrow A. H., Susan S. Schwemmer, Anne F. Rogers, 1968. Radiosensitivity studies with woody plants — I acute gamma irradiation survival data for 28 species and predictions for 190 species. *Radiation Botany*, 8(2):149-174.
121. Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H., and Lewontin R.C., 1989. An Introduction to Genetic Analysis. 4th ed. *W H Freeman Company publishers, San Francisco*.
122. Talukder S.K., Nasiruddin K.M., Yasmin S., Hassan L., and Begum R., 2003. *Shoot Proliferation of Dendrobium Orchid with BAP and NAA. Journal of Biological Sciences*, 3 (11): 1058 - 1062.
123. Thammasiri K., 1996. Effect of gamma irradiation on protocorm-like bodies of *Cattleya* alliances. *Proc. 15th World Orchid Conference, Surat Thani, Thailand*, pp.403–409.
124. Thana K., Piluek C., Tachasinpitak T. and Wongpiyasatid A., 2005. Effects of *in vitro* gamma irradiation on seedling growth of *Dendrobium Sonia* “Earsakul”. *Agricultural Sci. J.*, 36 5-6 (Suppl): 669-672.
125. Trần Duy Dương, 2015. Nghiên cứu đa dạng di truyền và xác định chỉ thị nhận dạng một số nguồn gen hoa lan hoàng thảo (*Dendrobium*) bản địa của Việt Nam. *Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*.
126. Trần Hợp, 1998. *Phong lan Việt Nam*. Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp, 703 trang.
127. Trần Thanh Tuyền, 2010. Xác định đặc tính sinh trưởng và ra hoa trên Lan *Dendrobium udomsri* với 5 liều lượng chiếu xạ tia gamma. *Sở Khoa học và Công nghệ Cần Thơ*.
128. Trần Thị Dung, 2010. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền của giống lan rừng *Dendrobium* bằng marker phân tử simple sequence repeats (SSRs). *Sở Khoa học và Công nghệ TP.HCM*.
129. Trần Thượng Tuấn, 1992. *Chọn giống và công tác giống cây trồng*. Trường Đại học Cần Thơ, 121 trang.
130. Trung tâm tư vấn và Hỗ trợ nông nghiệp, 2019. Đánh giá tiềm năng sản xuất và xu hướng thị trường hoa lan hiện nay tại thành phố Hồ Chí Minh, *Hội thảo “Tiềm năng và phát triển hoa lan tại TP.HCM”*, Sở NN và PTNT TP.HCM, ngày 24/4/2019.
131. Udomdee W., Chen Yu Lee, Wen Pei Jung, S. W. Chin, 2013. Effect of sucrose concentration and seed maturity on *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* hybrids. *Plant Growth Regulation*, 72(3).
132. Vacin E.F. and Went E.W., 1949. Bot.Gaz 110, 605. *DUCHEFA Biochemicals Plant Cell and Tissue Culture*, Catalogue 2003-2005. 78
133. Van der Pijl L. and Dodson C.H. 1966. Orchid Flowers: Their Pollination and Evolution. *University of Miami Press, Coral Gables*.
134. Vendrame W.A., Carvalho V.S., Dias J.M., Maguire M., 2008. Pollination of *Dendrobium* Hybrids Using Cryopreserved Pollen. *Hortscience*, 43(1):264–267.
135. Vũ Đình Hòa, Vũ Văn Liếc và Nguyễn Văn Hoan, 2005. *Giáo trình chọn giống cây trồng*. Trường ĐH Nông nghiệp Hà Nội, 120-121.

136. Vũ Ngọc Lan, 2013. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* không sử dụng chất điều tiết sinh trưởng và một số biện pháp kỹ thuật nuôi trồng 2 loài lan bản địa (*Dendrobium nobile* Lindl, *Dendrobium chrysanthum* Lindl) tại Hà Nội. *Luận án tiến sỹ nông nghiệp Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*.
137. Xu K., Yi Tang, Jia Lai, Ze-Sheng Yan, Qian Luo and Huan-Xiu Li, 2013. Artificial Pollination and Seed Germination of *Dendrobium candidum* Wall. ex indl. *Journal of Life Sciences*, 7(4): 395-399.
138. Xue D. W., Feng S. G., Zhao H. Y., Jiang H., Shen B., and Shi N. N., 2010. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers. *J. Gent. Geno*, (37): 197–204.
139. Yamaguchi H., Shimizu A., Degi K., Morishita T., 2008. Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. *Breeding Science*, 58: 331-335.
140. Yang H. and Schmidt H., 1994. Selection of mutants from adventitious shoots formed in X-ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. *Euphytica*, 77:89-92.
141. Zagaja, S.W., A. Przybyla and B. Machnik. 1982. Development of compact mutants in apple and sour cherry. *In: Mutation inductions in Vegetatively Propagated Plants*, 2: 37-47. Vienna:IAEA.
142. Zha X., Jianping Luo, Junhui Wang, Zhaojun Wei and Shaotong Jiang, 2009. Genetic characterization of the nine medicinal *Dendrobium* species using RAPD. *African Journal of Biotechnology*, 8 (10): 2064-2068.
143. Zhao P., Wang W., Feng F.S., Wu F., Yang Z.Q., Wang W.J., 2007. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90:131-139.
144. <http://www.orchidboard.com/community/dendrobium-alliance/43494-denthomas-warne.html>.
145. <https://myfirstorchid.com/2016/07/04/monopodial-and-sympodial-orchids/>
146. <https://www.iaea.org/topics/mutation-breeding> (truy cập ngày 24/10/2018).