

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***

Chuyên ngành: Khoa học cây trồng

Mã số: 9.62.01.10

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH NÔNG NGHIỆP

TP.HCM - 2019

Công trình được hoàn thành tại:

- 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.

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Bùi Văn Lệ
2. TS. Bùi Minh Trí

Người phản biện:

1.
2.

Luận án được bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp trường

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- 1.....
- 2.....
- 3.....

Luận án “**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 từ tháng 10/2012 đến tháng 12/2017 tại 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.

Tính cấp thiết của luận án

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 Kiếm, 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

- 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}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 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 ⁶⁰Co để gây tạo đột biến.

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

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

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, 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 Tịch, 2006).

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 phần 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

Vật liệu thí nghiệm

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 theo dõi sinh trưởng, phát triển tại thời điểm cây 16 - 18 tháng tuổi.

Hạt lan của tổ hợp DM12xDM13.

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

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

Quả lan 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 ± 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, hấp khử trùng ở 121°C; 1 atm trong 20 phút. 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. Chọn những chồi có chiều cao khoảng 0,5 cm cấy sang môi trường nhân chồi đã chuẩn bị sẵn và theo dõi các chỉ tiêu sinh

trưởng của chồi lan. Chọn những chồi có chiều cao khoảng 1 – 1,2 cm và có 2 - 3 lá cây sang môi trường tạo rễ đã chuẩn bị sẵn, theo dõi các chỉ tiêu phát triển của rễ lan.

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

Phương pháp khử trùng quả lan và gieo hạt tương tự thí nghiệm 1. Đèn LED đỏ (bước sóng 660 nm), đèn LED xanh dương (bước sóng 460 nm) được sử dụng trong thí nghiệm. Các nghiệm thức chiếu sáng gồm các tỷ lệ đèn: 100% đèn LED đỏ/0% đèn LED xanh dương (R1); 75% đèn LED đỏ/25% đèn LED xanh dương (R2) và 50% đèn LED đỏ/50% đèn LED xanh dương (R3); Các cường độ chiếu sáng bao gồm cường độ 200 lux; 400 lux; 600 lux và 800 lux. Nghiệm thức đối chứng được chiếu với đèn huỳnh quang (40 W, Rạng Đông – Việt Nam). 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 cây (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. Protocorm 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* thấp cây *in vitro* sau 4 tuần cấy chuyển. Chọn những chồi khỏe, 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.

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

Dựa trên cơ sở của phương pháp lai hữu tính Đỗ Khắc Thịnh (2011) đã thực hiện trên lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis*):

- *Bước 1- Khử đực*: Dùng que tăm lấy bỏ túi phấn trên hoa mẹ, tránh không để hạt phấn rơi vào vòi nhụy (để ngăn ngừa tự thụ).

- *Bước 2*: Dùng que tăm đã khử trùng để lấy túi phấn hoa bố. Túi phấn hoa bố được đưa vào đĩa petri hay tờ giấy sạch.

- *Bước 3*: Đưa đầu tăm vào vòi nhụy cái cho chất nhầy bám vào đầu tăm, sau đó làm dính túi phấn của hoa bố vào đầu tăm và đưa vào nhụy cái của hoa mẹ.

- *Bước 4*: Buộc thẻ ghi chú vào hoa vừa thụ phấn. Trên thẻ ghi ngày thụ phấn, phép lai giữa hai giống bố mẹ và người thực hiện. Các phép lai được thực hiện trong nhà lưới, cách ly với khu vực sản xuất để tránh sự xâm nhập của côn trùng và ngăn ngừa sự giao phấn tự do.

- *Bước 5*: Cắt bỏ các hoa và nụ không được thụ phấn trên phát hoa để cây tập trung chất dinh dưỡng cho quá trình thụ tinh và nuôi quả đậu sau lai. Buộc thẻ ghi chú vào hoa vừa thụ phấn. Trên thẻ ghi ngày thụ phấn, phép lai giữa hai giống bố mẹ và người thực hiện.

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.

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

Phương pháp khử trùng và gieo hạt: tương tự thí nghiệm 1. 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

Sau 6 tháng nuôi cây *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). Theo dõi, đánh giá đặc điểm sinh trưởng, ra hoa và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng.

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

2.3.1. Thí nghiệm 6A. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ gamma ^{60}Co đến tỷ lệ chết và xác định LD_{50} của tổ hợp lai *Dendrobium* thấp cây DM12x13

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 với các liều xạ 0, 20, 40, 60, 80, 100 Gy. 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. Xác định liều lượng chiếu xạ gây chết LD_{50} (Sensitive dose) theo mô tả của Randhawa (2009).

2.3.2. Thí nghiệm 6B. Ảnh hưởng của liều xạ gamma ^{60}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*

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 với các liều xạ 0, 20, 40, 60, 80 Gy. 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 đột biến và mô tả sự biểu hiện qua kiểu hình lá, màu sắc lá, kiểu hình thân, màu sắc thân, các biến dị lạ.

2.3.3. Thí nghiệm 7. Đánh giá sự sinh trưởng, phát triển, đặc điểm hoa và chọn lọc một số cá thể biến dị có triển vọng

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. Tiến hành theo dõi, đánh giá và chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng.

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

Kế thừa phương pháp tách DNA có sử dụng CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) của Obara-Okeyo và Kako (1998), sử dụng 10 primer 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). Phân tích kết quả di truyền bằng phần mềm NTSYSpc. 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).

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*

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 ½ 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 $0,3 \times 0,3$ 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 $0,3 \times 0,3$ 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.

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

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 dừa miếng. Quy trình trồng và chăm sóc lan tương tự thí nghiệm 5. Theo dõi sinh trưởng và ra hoa của các dòng lai triển vọng.

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*

Cách thức thực hiện: 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

Cách thức thực hiện: tương tự thí nghiệm 10

2.4.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được phân tích và xử lý bằng phần mềm 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 (thí nghiệm 2). Phân tích đa dạng hình thái và phân nhóm cá thể sử dụng phần mềm Minitab 15, phân tích kết quả di truyền bằng phần mềm NTSYSpc (thí nghiệm 8). Các thí nghiệm còn lại sử dụng phần mềm SPSS phiên bản 19.0 để xử lý số liệu.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định một số điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây

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: $\frac{1}{2}$ 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 ở điều kiện ánh sáng (100Đ, 400 lux); nhân chồi: $\frac{1}{2}$ 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 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 ^{60}Co .

3.2 Lai tạo hoa lan *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng


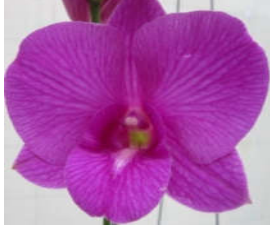






Trong 20 cặp lai lan *Dendrobium* thấp cây nghiên cứu, đã có 15 tổ hợp lai đậu quả với tỷ lệ đậu quả trong khoảng từ 25 – 100%. Trong 15 tổ hợp đậu quả chỉ có 9 tổ hợp cho hạt hữu thụ bao gồm: DM01x12, DM10x01, DM11x12, DM11x18, DM11x24, DM12x11, DM12x13, DM12x14 và DM24x11 với tỷ lệ đậu quả từ 58,3 – 100% và tỷ lệ hạt nảy mầm từ 63,7 – 97,3%.





3.2.1. Phân nhóm và chọn lọc dòng lai *Dendrobium* thấp cây triển vọng

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.

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.

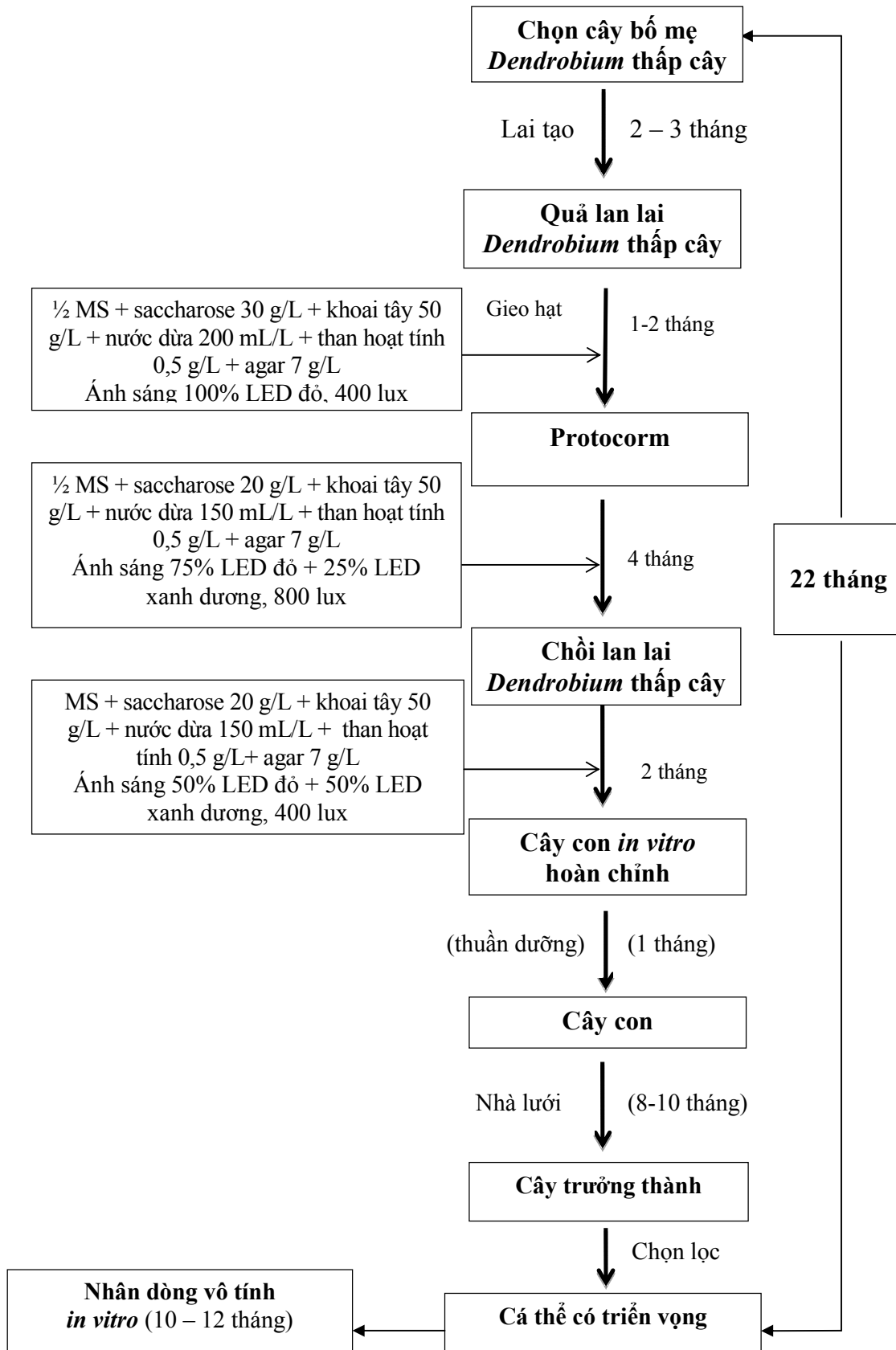
3.2.2. Đặc điểm hình thái của 3 dòng lai *Dendrobium* thấp cây có triển vọng được chọn lọc

Tổ hợp lai		Con lai	Hình dạng cây
Mẹ	Bố		
 <p>Mẹ DM11</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>Dòng DM11x12:90</p> <p>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</p> <p>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;</p>	 <p>Bố DM24</p> <p>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;</p>	 <p>Con lai 4</p> <p>Dòng DM11x24:139</p> <p>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.</p>	 <p>Dòng DM11x24:139</p>

số lá: 5 lá	số lá: 4 lá	Chiều cao cây: 17 cm. Tuổi thọ hoa 37 ngày.	
			
Mẹ DM12	Bố DM11	Con lai 5	Dòng DM12x11:180
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	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	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: 2; số lá: 6 lá. Chiều cao cây: 19 cm. Tuổi thọ hoa 40 ngày.	

3.2.3. 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 tối ưu của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây và nội dung 2 về lai tạo hoa lan *Dendrobium* thấp cây và chọn lọc một số dòng lai có triển vọng đã xây dựng được quy trình tạo dòng lan lai *Dendrobium* thấp cây thông qua lai tạo được thể hiện qua Hình 3.11.



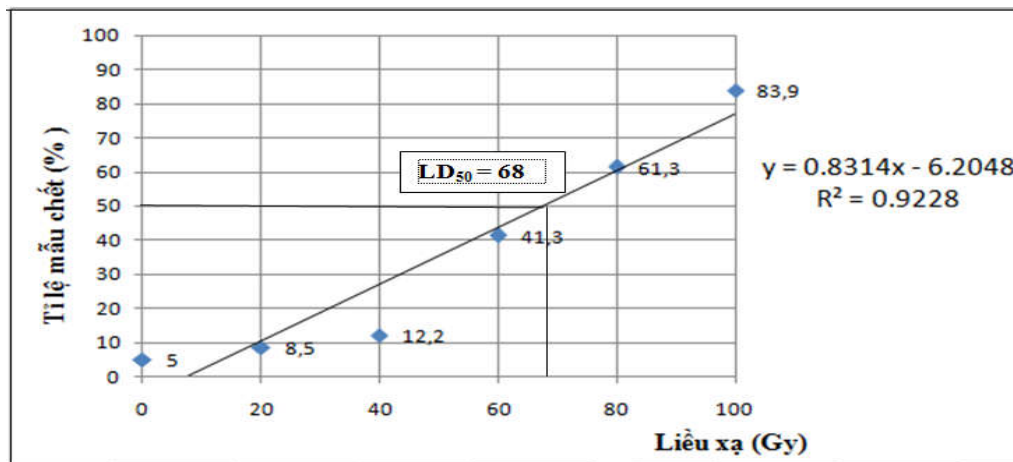
Hình 3.11. Quy trình tạo dòng lan lai *Dendrobium thapsa*

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

3.3.1. Xác định liều LD₅₀

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 DM12xDM13 lan *Dendrobium* thấp cây sau chiếu xạ phụ thuộc vào liều chiếu xạ và thời gian theo dõi: liều chiếu càng cao và thời gian theo dõi càng lâu thì tỷ lệ chết càng cao: tỷ lệ chết sau 7 tháng ở liều chiếu xạ 100 Gy là 83,9.



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

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% LD₅₀ ở 68 Gy. Việc tìm ra liều LD₅₀ 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

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.

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. Màu sắc lá dễ mất cảm với tia phóng xạ gamma (γ), các biến dị diệp lục phát sinh nhiều trong dãy liều xạ 20-80Gy.

Việc chiếu xạ gây đột biến đối với tổ hợp lan lai DM12xDM13 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 DM12xDM13 còn ghi nhận một số biến dị lạ: dị 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*.

Chiếu xạ tia gamma ^{60}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. Chọn lọc một số dòng đột biến có triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Từ các cá thể đã ra hoa của tổ hợp lai chiếu xạ nghiên cứu, dựa vào 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, đã chọn được 3 dòng *Dendrobium* thấp cây đột biến triển vọng bao gồm:

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: Lá dày, màu xanh đậm, hình mũi mác, bản rộng, kích thước lá 12,5 x 2,4 cm. Giả hành chắc khỏe, hình củ hành lùn, 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: Lá mỏng, màu xanh nhạt, mũi lá nhọn, kích thước lá 9,5 x 2,4 cm. Nhiều giả hành, giả hành cao 11 cm, đường kính 1,6 cm. Cây cao 18 cm.



Dòng DM12x13-40Gy:76

3/ Dòng DM12x13-40Gy:142

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

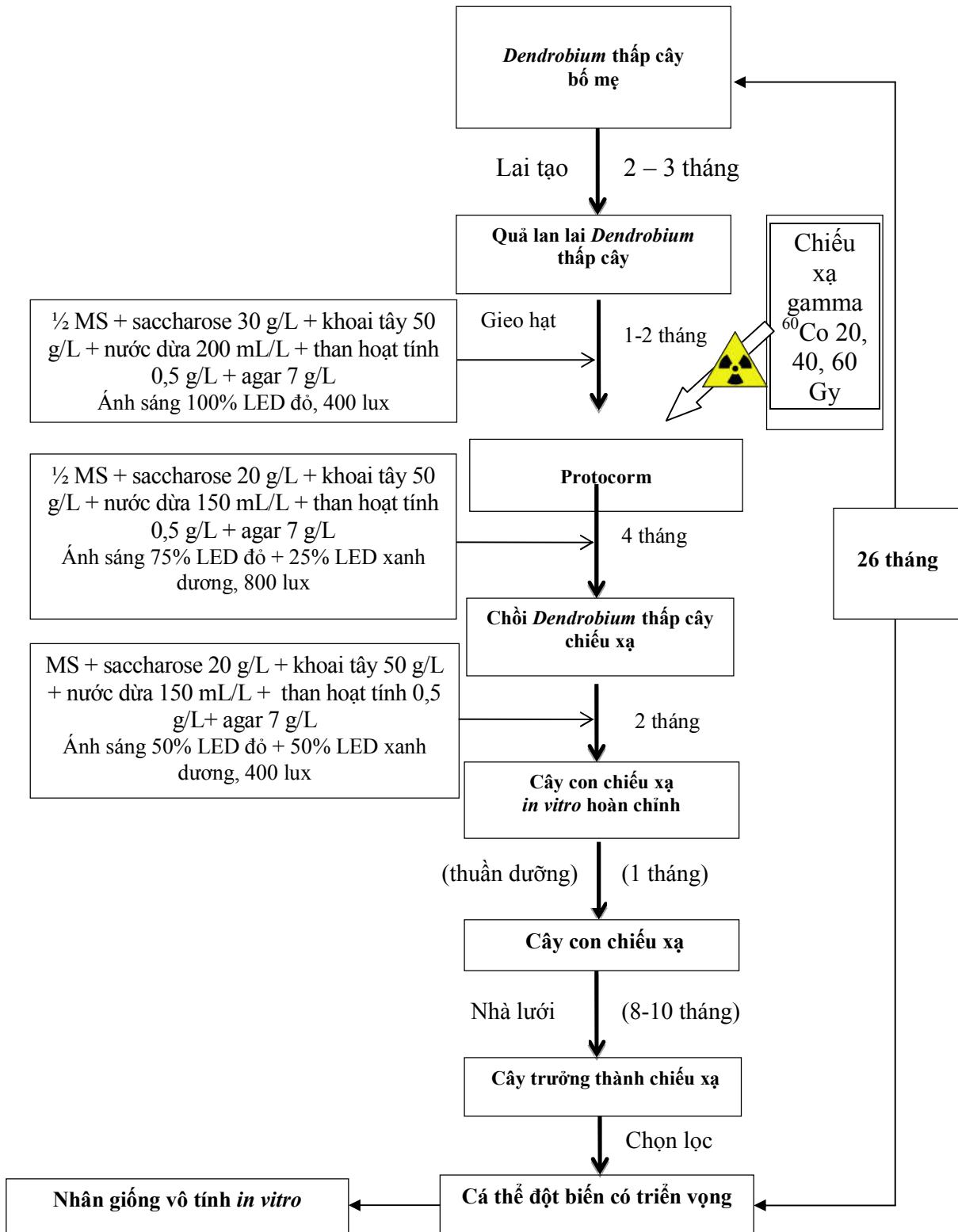
- Đặc điểm hoa: hoa màu trắng xanh, phía trong môi hoa có màu xanh. Các cánh hoa cong về phía sau, không có lông, phát hoa có dạng chùm, kiểu phát hoa mọc ở đỉnh chồi; số phát hoa/giả hành: 1; chiều dài phát hoa: 21 cm; chiều dài đoạn mang hoa: 11 cm; đường kính hoa: 5,5 cm; số hoa/phát hoa: 6; độ bền của hoa: 45 ngày. Đặc điểm thân lá: Lá dày, màu xanh đậm, mũi lá nhọn, kích thước lá 10,5 x 1,8 cm. Giả hành to và lùn, có chiều cao 8,2 cm, đường kính 2,8 cm. Cây cao 15 cm.



Dòng DM12x13-40Gy: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 tối ưu của hạt lan lai *Dendrobium* thấp cây và nội dung 3 về chiếu xạ gây đột biến *in vitro* hạt *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

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. Đánh giá sự khác biệt di truyền giữa 8 dòng lan *Dendrobium* thấp cây bố mẹ với 8 dòng con lai và 3 dòng đột biến triển vọng.

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 tốt 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.

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.

Đánh giá sự khác biệt di truyền 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).

3.4.2. Nhân dòng vô tính và khảo sát sinh trưởng, phát triển 3 dòng lai, 3 dòng đột biến 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. Ba dòng 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, DM12x13-60Gy:142.

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

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

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.

Kết quả ghi nhận tỷ lệ cây ra hoa của các dòng đột biến chọn lọc đạt từ 34,8 % - 44,8 % tại thời điểm 10 tháng sau khi trồng trong nhà lưới.

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: $\frac{1}{2}$ 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 ở điều kiện ánh sáng (100Đ, 400 lux); nhân chồi: $\frac{1}{2}$ 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 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 ^{60}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_{50}) là 68 Gy đối với protocorm của tổ hợp DM12x13. Khi chiếu xạ tia gamma ^{60}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 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.