

SỬ DỤNG CHỈ THỊ ISSR TRONG VIỆC ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC DÒNG/GIỐNG HOA HUỆ (*Polianthes tuberosa* L.) NUÔI CẤY MÔ DO XỬ LÝ ĐỘT BIẾN BẰNG TIA GAMMA

Đào Thị Tuyết Thanh¹, Nguyễn Bảo Toàn²

TÓM TẮT

Nghiên cứu sử dụng 14 mối ISSR để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của giống hoa huệ đơn, kép và hai dòng đột biến có 22 và 36 cánh hoa được tạo ra từ giống gốc 12 cánh do xử lý đột biến *in vitro* bằng tia gamma. Kết quả cho thấy 4 mối có thể sử dụng để đánh giá sự đa dạng của các dòng/giống hoa, cho tổng số là 84 băng với trung bình $21,0 \pm 5,89$ băng/mối. Trong đó có 100% băng đa hình, với số lượng dao động từ 13 đến 27 băng và có kích thước trong khoảng 150 - 3000 bp. Đặc biệt hai dòng hoa huệ đột biến có sự xuất hiện băng mới hoặc mất băng ADN so với giống gốc. Cây phân loại dựa trên hệ số tương đồng cho thấy hệ số này dao động trong khoảng 0,375 - 0,786. Trong đó, giống hoa huệ gốc 12 cánh và dòng hoa huệ đột biến 22 cánh có sự khác biệt nhau về khoảng cách di truyền, giống hoa 6 cánh và dòng đột biến 36 cánh thể hiện mối quan hệ di truyền gần nhau nhất. Kết quả này là thông tin hữu ích, tạo tiền đề cho việc chọn tạo giống hoa huệ.

Từ khóa: Cánh hoa, ADN, đột biến, gamma, hoa huệ, ISSR, tương đồng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hoa huệ (*Polianthes tuberosa*) là một trong những loại hoa cắt cành phổ biến và có giá trị kinh tế cao. Có hai giống hoa huệ được canh tác phổ biến là giống hoa huệ đơn và giống hoa huệ kép. Hoa huệ kép thường được sử dụng để cắt cành vì phát hoa dài và hoa lâu tàn, giống huệ đơn ngoài mục đích làm hoa cắt cành còn được sử dụng để ly trích tinh dầu và có giá trị cao trong công nghiệp nước hoa, mỹ phẩm và dược phẩm (Rodrigo *et al.*, 2012; Jitendriya và Mohammad, 2013). Hiện nay, chỉ có hai giống hoa huệ với một tràng hoa gồm 6 cánh hoặc với hai tràng hoa gồm 12 cánh được canh tác phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Trong quá trình chọn tạo giống hoa huệ bằng xử lý đột biến tia gamma kết hợp kỹ thuật nuôi cấy mô đã chọn được hai dòng hoa huệ đột biến với số lượng cánh hoa trung bình khoảng 22 cánh và 36 cánh với kích thước hoa to và có mùi thơm (Đào Thị Tuyết Thanh, Nguyễn Bảo Toàn, 2014; Đào Thị Tuyết Thanh và *ctv.*, 2017). Đây là hai dòng hoa có tiềm năng có thể đưa vào sản xuất. Kiểu hình về dạng hoa và số lượng cánh hoa khác nhau là thông tin hữu ích để nghiên cứu nhận dạng bằng chỉ thị phân tử, nhằm xác định sự khác biệt về kiểu gen của các dòng hoa huệ đột biến so với giống đối chứng. Kỹ thuật thường được sử dụng là phân tích ISSR (Kỹ thuật chuỗi lặp lại đơn giản giữa - Inter Simple Sequence Repeat) (Khandagale, 2014; Bharti *et al.*, 2012; Kameswari *et al.*, 2014). Nghiên cứu này được thực hiện để xác định sự khác biệt về

mặt di truyền của ADN hai giống huệ địa phương với các dòng hoa huệ đột biến.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá của hai giống hoa huệ đối chứng từ An Giang và hai dòng hoa huệ đột biến (Hình 1). Hai dòng hoa huệ đột biến có 22 và 36 cánh được hình thành từ nuôi cấy mô kết hợp với xử lý đột biến bằng tia gamma ⁶⁰Co ở liều chiếu xạ 20 Gy với suất liều 1,58 kGy/giờ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá sự đa dạng di truyền bằng phương pháp đánh dấu phân tử ISSR - PCR.

- Quy trình tách chiết ADN tổng số: Mẫu lá của từng giống được thu thập riêng rẽ và tách chiết ADN theo mô tả bởi Rogers và Bendich (1988) có thay đổi nhỏ, sử dụng 2% dung dịch trích đệm CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Trần Nhân Dũng, 2011).

- Công thức của mỗi phản ứng PCR gồm: H₂O: 16,25 µl; Buffer: 2,5 µl; dNTP_s: 2 µl; mỗi ngược và xuôi: 1 µl; Taq: 0,25 µl; 3 µl ADN mẫu. Tổng cộng: 25 µl/phản ứng.

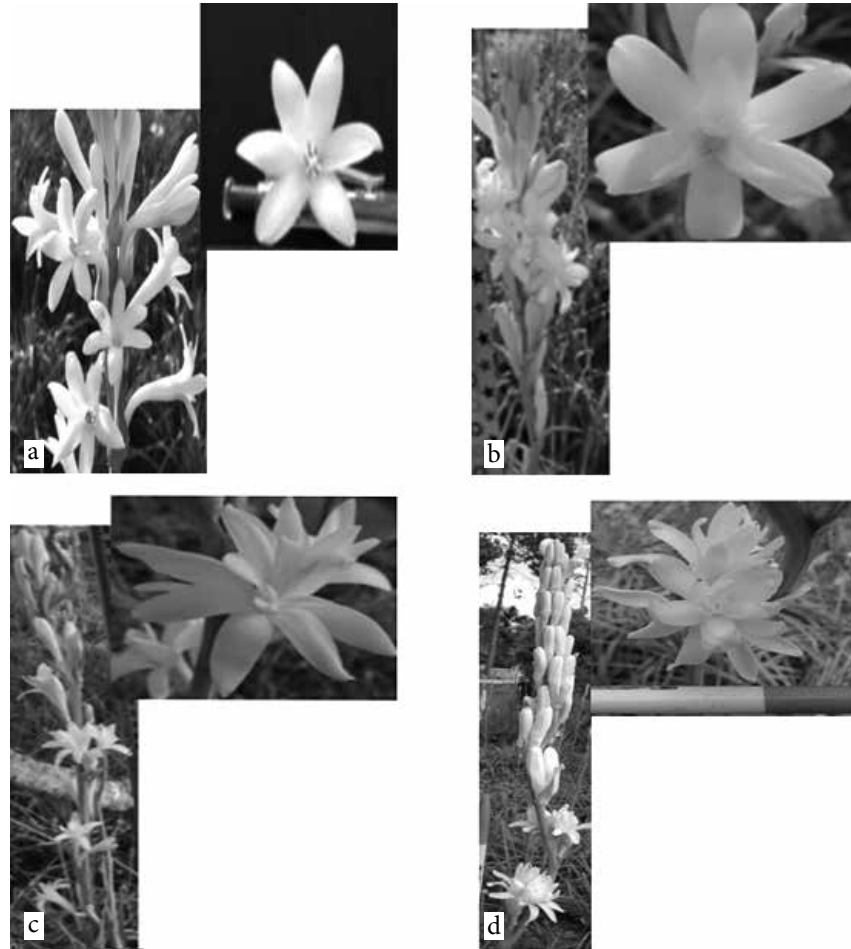
- Sử dụng 14 mối ISSR (Mengli *et al.*, 2012; Khandagale *et al.*, 2014) được Công ty TNHH Sinh Hóa Phù Sa (Phusa Biochem) sản xuất và cung cấp (Bảng 1).

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

- Chạy PCR: Các phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 92°C (5 phút), 92°C (1 phút), 35°C (30 giây), 72°C (1 phút) và kết thúc ở 72°C (5 phút). Thực hiện 45 chu kỳ và trữ ở 4°C. Kết quả sản phẩm phản ứng PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

- Các đoạn ADN khuếch đại là đa hình sẽ được ghi nhận và xác định vị trí các băng ADN xuất hiện mới hoặc mất đi (tính bằng bp) của 2 dòng huệ đột biến so với đối chứng (giống hoa huệ 12 cánh).



Hình 1. Các giống hoa huệ địa phương và dòng hoa huệ đột biến

Ghi chú: a) Giống hoa có 6 cánh; b) giống hoa có 12 cánh; c) dòng hoa đột biến 22 cánh; d) dòng hoa đột biến có 36 cánh.

Bảng 1. Thông tin về các môi ISSR sử dụng cho đánh giá đa dạng di truyền các dòng hoa huệ đột biến

STT	Tên môi	Trình tự (5' - 3')	STT	Tên môi	Trình tự (5' - 3')
1	3A01	(GA)8TC	8	808	(AG) ₈ C
2	3A07	(AG)7CTT	9	836	(AG) ₈ YA
3	3A21	(TG)7ACC	10	840	(AG) ₈ YT
4	3A39	(CA)7GTA	11	842	(AG) ₈ YG
5	3A42	(GACA)4C	12	855	(AC) ₈ YT
6	3A62	(TG)7ACT	13	857	(AC) ₈ YG
7	UBC873	GACAGACAGACAGACA	14	P23SR1	GGCTGCTTCTAAGCCAAC

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu ISSR được ghi nhận dựa vào thang chuẩn 100 bp sự có mặt hoặc không có mặt của một băng nào đó trên gel sẽ được ghi nhận là 1 và 0 cho mỗi cá thể. Sau khi ghi nhận tất cả các băng trên mỗi mẫu cây, số liệu thu thập được lưu trữ trong phần mềm Excel. Đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các giống cũng dựa trên ma trận hệ số tương đồng (Similarity coefficient) và phân tích sơ đồ hình nhánh (Cluster) bằng phần mềm NTSYSpc v2.1 (Rohlf, 2000).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích sự đa hình chỉ thị ISSR sử dụng trong đánh giá đa dạng di truyền các dòng/giống hoa huệ nghiên cứu

Trong nghiên cứu này đã sử dụng 14 mỗi ISSR để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của các dòng/giống hoa huệ. Kết quả thu được 4 mỗi có khuếch đại rõ và cho tổng số là 84 phân đoạn được nhân lên với trung bình $21,0 \pm 5,89$ băng/đoạn mỗi. Trong đó có 84 phân đoạn đa hình chiếm tỷ lệ 100%. Số lượng băng đa hình dao động từ 13 (đoạn mỗi 808) đến 27 băng (đoạn mỗi 3A39). Kích thước các mỗi dao động trong khoảng 150 - 3.000 bp (Bảng 2).

Theo nghiên cứu của Khandagale *et al.*, (2014), việc khuếch đại ADN của 10 giống hoa huệ được thực hiện với 20 mỗi ISSR. Trong số 132 băng được khuếch đại, 95 là đa hình, chiếm (73,53%) và phần trăm đa hình là 100% (mỗi UBC - 829, 852, 850) đến 33,3% (UBC - 817); kích thước từ 250 bp đến 2.300 bp.

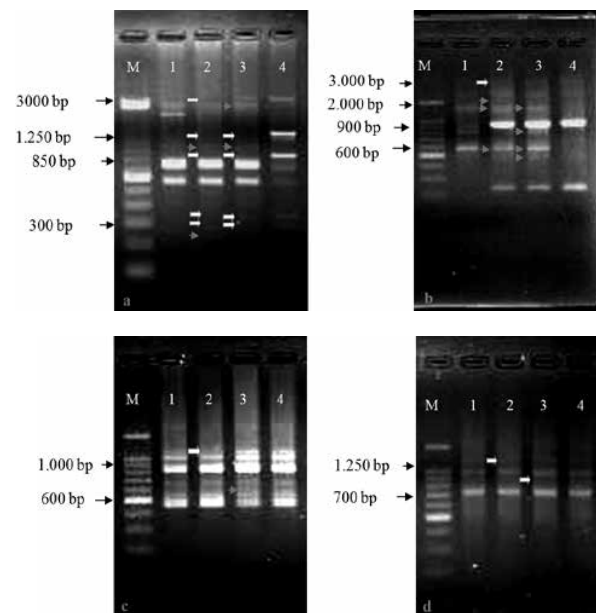
Bảng 2. Sự đa hình của chỉ thị ISSR ở các dòng/giống hoa huệ nghiên cứu

Mỗi	Tổng số băng	Băng đa hình	Tỉ lệ đa hình (%)	Kích thước mỗi (bp)
UBC873	23	23	100	250 - 3.000
P23SR1	21	21	100	150 - 3.000
3A39	27	27	100	400 - 1.500
808	13	13	100	700 - 1.500
Tổng	84	84		
Trung bình \pm SD	$21,0 \pm 5,89$	$21,0 \pm 5,89$	100	

3.2. Đánh giá đa dạng di truyền của các dòng/giống hoa huệ nghiên cứu bằng sự khác biệt vị trí các băng ADN

Ở hoa ly (*Lilium longiflorum*) và cà chua (*Solanum lycopersicum*), dấu phân tử ISSR đã được dùng để

đánh giá các dòng đột biến sau khi xử lý đột biến bằng tia gamma hoặc với chất gây đột biến EMS (Mengli *et al.*, 2012; Aswandy *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, phân tích ISSR với mỗi UBC 873 cho sản phẩm khuếch đại 23 băng ADN có kích thước phân tử trong khoảng 200 đến 3.000 bp (Hình 2). Các mẫu phân tích đều thể hiện sự đa hình nhiều hơn các mỗi còn lại. Trong đó, dễ dàng nhận ra sự khác nhau giữa hai cây hoa huệ 6 cánh và 12 cánh (giống 1 và 4) với 2 dòng hoa huệ đột biến (giống 2 và 3). Cây hoa huệ đột biến với 22 cánh xuất hiện thêm băng ADN ở hai vị trí 250 bp và 1.000 bp, trong khi đó băng ADN mất đi ở vị trí 300; 350; 850; 1.250 và 3.000 bp so với giống hoa huệ gốc có 12 cánh. Đối với dòng hoa huệ đột biến có 36 cánh, băng ADN bị mất đi ở vị trí 300; 350; 850 và 1.250 bp còn ở các vị trí 1.000 và 2.750 bp lại xuất hiện băng ADN mới so với giống gốc. Trong khi đó, với mỗi P23SR1, sự xuất hiện các băng ADN mới ở cả hai dòng hoa huệ đột biến ở các vị trí 500; 600; 800; 1.750 và 2.000 bp so với giống gốc. Đồng thời 2 dòng đột biến này cũng có vị trí các băng ADN khác biệt nhau nên có thể phân biệt với nhau. Hai mỗi 3A39 và 808 cho sản phẩm khuếch đại cũng có sự xuất hiện mới và mất đi băng ADN nhưng với số lượng ít hơn chỉ với 1 băng khác biệt so với giống đối chứng.



Hình 2. Ảnh điện di của các mỗi ISSR

đối với các dòng/giống hoa huệ nghiên cứu

Ghi chú: a) Mỗi UBC 873; b) mỗi P23SR1; c) Mỗi 3A39; d) Mỗi 808. 1: giống hoa huệ đơn 6 cánh, 2: dòng hoa huệ 22 cánh, 3: dòng hoa huệ 36 cánh, 4: giống hoa huệ kép 12 cánh, M: Thang chuẩn 100 bp; +: băng ADN mới, -: băng ADN mất đi

3.3. Kết quả về mối quan hệ di truyền giữa các dòng/giống hoa huệ nghiên cứu

Kết quả hệ số tương đồng di truyền về kiểu gen của các dòng/giống hoa huệ nghiên cứu, dựa trên cơ sở phân tích 4 mỗi ISSR đa hình được trình bày ở bảng 3. Hệ số này biến thiên trong khoảng 0,375 đến 0,786. Trong những kiểu gen nghiên cứu, chỉ số

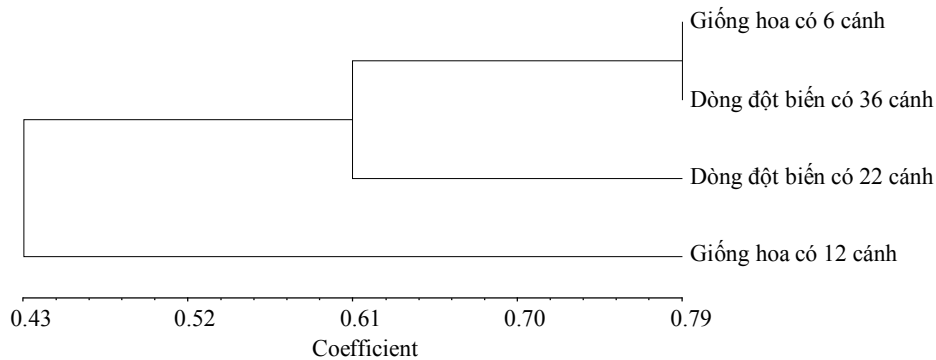
tương đồng thấp nhất là 0,375 được ghi nhận giữa giống hoa huệ gốc 12 cánh và dòng hoa huệ đột biến có 22 cánh. Vì vậy hai dòng/giống này thể hiện sự khác biệt lớn về mặt di truyền. Kiểu gen hoa có 6 cánh và dòng đột biến có 36 cánh cho thấy có mối quan hệ di truyền gần nhau vì có chỉ số tương đồng cao nhất (0,786).

Bảng 3. Hệ số tương đồng di truyền của các dòng/giống hoa huệ nghiên cứu với 4 cặp mỗi ISSR

Giống hoa	Giống hoa có 6 cánh	Dòng đột biến có 22 cánh	Dòng đột biến có 36 cánh	Giống hoa có 12 cánh
Giống hoa có 6 cánh	1,000			
Dòng đột biến có 22 cánh	0,643	1,000		
Dòng đột biến có 36 cánh	0,786	0,571	1,000	
Giống hoa có 12 cánh	0,429	0,375	0,500	1,000

Sơ đồ nhánh dựa trên sự phân tích đa hình các môi ISSR đã chia 4 kiểu gen hoa huệ thành hai nhóm chính với chỉ số tương đồng 0,43% (Hình 3). Nhóm thứ nhất gồm 3 kiểu gen với hoa 6; 22 và 36 cánh. Nhóm thứ hai chỉ có giống có hoa 12 cánh. Điều này cho thấy, mặc dù hai dòng hoa huệ đột biến phát sinh từ việc xử lý đột biến giống hoa huệ gốc có 12 cánh nhưng lại có mối quan hệ di truyền gần gũi với giống hoa huệ 6 cánh hơn. Kết quả này cũng tương

tự như nghiên cứu của Kameswari *et al.* (2014) về phân tích đa dạng di truyền ở 7 kiểu gen gồm các giống hoa huệ đơn và kép ở Ấn Độ cho kết quả 62 băng, 53 băng là đa hình chiếm 85,48%. Sơ đồ nhánh cũng chia các giống hoa huệ thành hai nhóm chính trong đó có giống hoa huệ đơn và giống hoa huệ kép cùng thuộc một nhóm với hệ số tương đồng cao nhất khoảng 0,706.



Hình 3. Sơ đồ hình nhánh về mối quan hệ di truyền giữa các kiểu gen hoa huệ dựa trên dữ liệu ISSR

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong nghiên cứu này, 4 chỉ thị ISSR gồm UBC 873, P23SR1, 3A39 và 808 có thể sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa các dòng/giống hoa huệ đột biến. Sự đa dạng được thể hiện các giống hoa huệ cấy mô được xử lý đột biến cho kết quả 100% băng ADN đa hình. Đồng thời có sự khác biệt về vị trí xuất hiện băng ADN giữa hai giống đối chứng với nhau và giữa hai dòng hoa huệ đột biến với giống gốc có 12 cánh. Phân tích hệ số tương đồng và sơ đồ nhánh cho thấy có thể chia 4 kiểu gen hoa huệ thành

2 nhóm và kiểu gen của 2 dòng hoa huệ đột biến lại có mối quan hệ di truyền khác biệt nhau so với giống gốc. Kết quả cho thấy đây là phương pháp rà soát đột biến giai đoạn đầu rất hiệu quả để xác định giống mới.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục theo dõi đặc điểm nông học của giống hoa huệ đột biến mới để đánh giá tính ổn định giống về tình trạng đột biến ở số lượng cánh hoa đi kèm với đặc điểm hoa to hơn và phát hoa dài. Sau đó, nhân nhanh số lượng cây để ứng dụng cho sản xuất và thương mại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trần Nhân Dũng**, 2011. *Sổ tay thực hành sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, 169 trang.
- Nguyễn Thị Thanh Nga và Đinh Đoàn Long**, 2012. *Đánh giá đa dạng di truyền một số loài cây dược liệu Việt Nam thuộc chi Đàng Sâm (Codonopsis sp.) bằng kỹ thuật AND mã vạch*. Luận văn Thạc sỹ ngành Di truyền học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
- Đào Thị Tuyết Thanh và Nguyễn Bảo Toàn**, 2016. Hiệu quả của liều lượng tia gamma ^{60}Co trên sự sinh trưởng của cụm chồi hoa huệ (*Polianthes tuberosa* L.) *in vitro*, sự xuất hiện các cấu trúc bất thường và xác định LD_{50} . *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 45: 25-32.
- Đào Thị Tuyết Thanh, Lê Thị Ngọc Quý và Nguyễn Bảo Toàn**, 2017. Nghiên cứu đa dạng về sinh trưởng và dạng hoa của các dòng huệ đơn cánh (*Polianthes tuberosa* L.) nuôi cấy mô được xử lý bằng tia gamma ^{60}Co . *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 2(75): 47-52.
- Bharti, H., K.P. Singh, R. Singh, R. Kumar and M.C. Singh**, 2012. Genetic diversity and relationship study of single and double petal tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cultivars based on RAPD and ISSR markers. *Indian J. Hort*, 73(2): 238-244.
- Jitendriya P. and S. L. S. Mohammad**, 2013. *In vitro* propagation of *Polianthes tuberosa* L. cultivars (Calcutta single). *International journal of plant, animal and environmental sciences*, 3(3): 76-79.
- Kameswari, P.L., A. Girwani and K. RadhaRani**, 2014. Genetic diversity in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) using morphological and ISSR markers. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 5(1): 52-57.
- Khandagale K., B. Padmakar, D.C.L. Reddy, A. Sane and C. Aswath**, 2014. Genetic diversity analysis and barcoding in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cultivars using RAPD and ISSR markers. *Journal of Horticultural Sciences*, 9(1): 5-11.
- Mengli, X., L. Sun, S. Qui J. Liu, J. Xu and J. Shi.**, 2012. *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Reports*, 31: 1043-1051.
- Rodrigo B. G., M. R. D. José, C. C. S. Ma, R. Aaron, M. V. T. Jaap and T. C. Ernesto**, 2012. Mexican Geophytes I. The Genus *Polianthes*. Floriculture and Ornamental Biotechnology. *Global Science Books*, 6(1): 122-128.
- Rogers, S.O. and A.J.B. Bendich**, 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Belgium, 4(6): 1-10.
- Rohlf, F.J.**, 2000. *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.1 Exceter Software, New York, USA.

Study on genetic diversity of tissue cultured tuberose lines (*Polianthes tuberosa*) irradiating with Co^{60} by using ISSR marker

Dao Thi Tuyet Thanh, Nguyen Bao Toan

In this study, 14 ISSR primers were used to evaluate the genetic diversity of single and double - flower petal of tuberose varieties and two mutant lines with 22 and 36 petals that were irradiated by gamma from original variety with 12 petals. The results showed that four among 14 primers could be use for evaluation of tuberose line genetic diversity. A total of 84 amplified bands were polymorphic with an average of 21.0 ± 5.89 bands per primer. The polymorphism ratio was 100%, the number of scorable bands ranged from 13 - 27 bands and band size was varied from 150 - 3.000 bp. In particular, there were some new bands or absent bands in both mutation lines. The phylogenic tree based on genetic similarity varied from 0.375 - 0.786. The results indicated that a pair of cultivars 12 flower petals and 22 flower petals showed the highest genetic diversity. A pair of cultivars with 6 flower petals and mutant line with 36 flower petals showed most genetic similarity. Our results can provide the useful information for further research on tuberose breeding.

Key words: DNA, gamma, ISSR, mutation, petal, similarity, tuberose

Ngày nhận bài: 15/6/2017

Người phản biện: TS. Vũ Thị Thu Hiền

Ngày phản biện: 20/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

NHÂN GIỐNG CÂY LAN ĐUÔI CHỖN [*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume] BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ

Bùi Văn Thắng¹, Nguyễn Thị Hồng Gấm¹

TÓM TẮT

Một quy trình nhân nhanh giống Lan đuôi chồn bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được nghiên cứu thành công, với hệ số nhân giống cao: Hạt non từ quả lan chín sinh lý được nuôi trên môi trường Knops + 100 ml/l dịch chiết khoai tây (PH), 100 ml/l nước dừa (CW) và 20 g/l sucrose, cho tỷ lệ hạt nảy mầm 95% sau 6 tuần nuôi cấy. Nhân nhanh protocorm trên môi trường Knops + 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 0,3 mg/l Kinetin, 100 ml/l PH, 100 ml/l CW và 30 g/l sucrose, cho hệ số nhân 16,09 lần/chu kỳ nhân sau 5 tuần nuôi cấy. Môi trường Knops + 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA, 0,3 mg/l GA3, 100 ml/l PH, 100 ml/l CW và 30 g/l sucrose, cho tỷ lệ protocorm tái sinh chồi 97,55% và 8,82 chồi/cụm sau 6 tuần nuôi cấy. Nuôi cấy chồi trên môi trường Knops + 0,3 mg/l IBA, 100 ml/l PH và 20 g/l sucrose, cho tỷ lệ chồi ra rễ 100% và 6,5 rễ/chồi sau 4 tuần nuôi cấy. Cây con hoàn chỉnh được trồng trên giá thể dớn khô và xơ dừa (1:1), cho tỷ lệ sống 90% sau 8 tuần ra ngôi. Quy trình này có thể áp dụng để sản xuất một lượng lớn cây giống chất lượng tốt đáp ứng nhu cầu thương mại.

Từ khóa: Lan đuôi chồn, nhân giống, nuôi cấy *in vitro*, thể chồi

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan đuôi chồn [*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume] là loài lan rừng, có hoa rất đẹp và hương thơm được thị trường trong nước, cũng như quốc tế ưa chuộng nên có giá trị kinh tế cao. Rất nhiều loài lan thuộc chi *Rhynchostylis* có giá trị thương mại quan trọng trong ngành công nghiệp hoa trồng chậu. Lan *R. retusa* thường được tìm thấy trong các khu rừng có độ cao 1200 m so với mực nước biển, phân bố chủ yếu ở Việt Nam, Lào, Campuchia, Indonesia, Malaysia, Thái Lan, Nepal, Philipin, Singapore, Sri Lanka, Bangladesh, Benin, Miến Điện, Trung Quốc và Ấn Độ (Chowdhury *et al.*, 2014). Ngoài giá trị làm cảnh, loài lan *R. retusa* còn có giá trị dược liệu rất lớn; toàn bộ các bộ phận của cây được sử dụng để làm thuốc điều trị bệnh thấp khớp, lao phổi, động kinh, rối loạn kinh, bệnh gút, hen và bệnh ngoài da (Shanavaskhan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2012). Rễ được sử dụng để chữa bệnh sốt rét (Tiwari *et al.*, 2012, Radhika *et al.*, 2013). Hoa khô được sử dụng làm thuốc chống côn trùng và để gây nôn (Subedi *et al.*, 2013). Dịch chiết từ các bộ phận của loài lan này cho thấy có tính kháng khuẩn mạnh đối với *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli* (Hossain, 2011).

Do có giá trị lớn nên loài lan rừng *R. retusa* ở Việt Nam đang bị khai thác một cách quá mức, có nguy cơ cạn kiệt trong rừng tự nhiên. Vì vậy, việc nghiên cứu một quy trình nhân nhanh giống, có khả năng đáp ứng nguồn cấy giống cho mục đích thương mại hiện nay là cần thiết. Phương pháp nhân giống *in vitro* không những góp phần bảo tồn hữu hiệu nguồn gen, mà còn góp phần phát triển thương mại loài hoa lan quý này hiệu quả. Nghiên cứu nhân giống loài lan *R. retusa* từ vật liệu là phôi hạt non, đoạn

nốt đỉnh thân thông qua tạo mô sẹo, protocorm, tái sinh chồi cũng đã được một vài công trình báo cáo (Pinaki and Miskat, 2012; Parab and Krishnan, 2012; Bakul and Shahinul, 2015). Tuy nhiên, các báo cáo cho thấy nhân giống của loài lan *R. retusa* có xuất xứ từ các quốc gia khác nhau (kiểu gen khác nhau) thì hiệu suất nhân giống khác nhau. Do đó, đối với mỗi giống cần xác định được quy trình nhân giống phù hợp mới đem lại hiệu quả. Trong công trình này, thông báo kết quả nghiên cứu nhân nhanh giống thành công cho loài Lan đuôi chồn Việt Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, đạt hiệu suất cao.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là hạt non từ quả chín sinh lý của cây lan rừng (cây không bị sâu bệnh, kiểu dáng hoa đẹp, có hương thơm) thuộc loài Lan đuôi chồn (*R. retusa*) trồng tại Vườn lan rừng của Trung tâm Phát triển Lâm nghiệp Hà Nội.

Môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản Knops, (Knops, 1865).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tạo mẫu sạch *in vitro*: Quả lan được rửa sạch bằng nước máy, ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng 10 phút và rửa sạch xà phòng. Sau đó, mẫu được cho vào các bình nút vụn và đưa vào tủ cấy vô trùng; khử trùng bề mặt bằng dung dịch cồn 70% trong 1 phút; tiếp theo khử trùng mẫu bằng dung dịch 0,1% HgCl₂ trong 8 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng (3 lần) và thấm khô bằng giấy thấm. Quả lan sau khi khử trùng được cắt dọc quả bằng lưỡi dao, tách lấy hạt non và cấy lên môi trường

¹ Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp