

## Khảo sát mức độ đa dạng di truyền của lan Phi Điệp (*Dendrobium anosmum* Lindl.) nhân giống từ hạt

Trần Ngọc Cấn<sup>1,2</sup>, Bùi Minh Sang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Pha<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường THPT Châu Văn Liêm, Cần Thơ

### Genetic diversity of *Dendrobium anosmum* Lindl. micropropagation from seeds

Tran Ngoc Can<sup>1,2</sup>, Bui Minh Sang<sup>1</sup>, Nguyen Thi Pha<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Can Tho University

<sup>2</sup>Chau Van Liem High School, Can Tho

\*Corresponding author: ntpha@ctu.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.12.5.2023.011-017>

#### TÓM TẮT

Lan rừng Việt Nam với hơn 2000 loài đang được khai thác trong đó lan Phi Điệp (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là một trong những loài lan rừng được mọi người ưa chuộng với đặc điểm như hoa to, đẹp, siêng ra hoa và hoa có mùi thơm. Trong nghiên cứu này, môi trường gieo hạt lan Phi Điệp *D. anosmum* Lindl. được khảo sát. Cây lan con gieo hạt được đánh giá đa dạng di truyền so với cây mẹ bằng kỹ thuật ISSR. Kết quả cho thấy môi trường Knudson C Orchid có bổ sung 30 g/L sucrose bổ sung 7 g/L agar, pH môi trường là 5,8 thích hợp cho hạt nảy mầm, đạt tỉ lệ 88,89%. Sau thời gian nuôi cấy *in vitro*, 30 mẫu DNA cây lan Phi Điệp con 6 tháng tuổi và mẫu DNA cây lan mẹ (đối chứng) được đánh giá độ đồng nhất di truyền bằng kỹ thuật ISSR với 6 mồi. Tất cả các mồi tạo ra 35 băng với 15 băng đa hình, số băng trung bình trên mỗi mồi là 5,83. Sự khác biệt của 30 mẫu lan Phi Điệp gieo từ hạt so với mẫu cây lan mẹ có mức độ đa dạng di truyền dao động từ 3% đến 20%. Hệ số PIC trung bình là 0,09, mồi ISSR02 có hệ số PIC cao nhất với giá trị 0,15, mồi ISSR04 có hệ số PIC thấp nhất với giá trị 0,02.

#### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/06/2023

Ngày phân biện: 22/08/2023

Ngày quyết định đăng: 08/9/2023

#### Từ khóa:

*Dendrobium anosmum* Lindl.,  
hạt lan, *in vitro*, ISSR.

#### Keywords:

*Dendrobium anosmum* Lindl., *in vitro*, ISSR, orchid seeds.

#### ABSTRACT

Vietnam forest orchids with more than 2000 species are being exploited, in which *Dendrobium anosmum* Lindl. is one of the most popular wild orchid species with characteristics such as large, beautiful flowers, diligent flowering and flowers with aroma. In this study, the seeding medium of *D. anosmum* Lindl. was surveyed and the assessment of genetic homogeneity of seedlings from seeds was performed. The results showed that Knudson C Orchid medium supplemented with 30 g/L sucrose + 7 g/L agar, pH = 5.8 was suitable for seed germination, reaching the rate of 88.89%. After the *in vitro* culture period, 30 samples of 6-month-old and orchid samples (control) were evaluated for genetic homogeneity by ISSR technique with 6 primers used. All primers produced 35 bands with 15 polymorphic bands, the average number of bands per primer was 5.83. The difference of 30 samples of *Dendrobium* orchids sown from seeds with the same sample of mother orchids as a control had heritability coefficients ranging from 3% to 20%. The average PIC coefficient is 0.09, the ISSR02 primer has the highest PIC coefficient with the value 0.15, the ISSR04 primer has the lowest PIC coefficient with the value 0.02.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan rừng Việt Nam với hơn 2000 loài, một số loài đang được khai thác và có triển vọng phát triển thương mại trong tương lai. Đặc biệt,

lan Phi Điệp (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là một trong những loài lan rừng phân bố rộng rãi trên khắp cả nước và được mọi người ưa chuộng với đặc điểm như hoa to, đẹp, siêng ra hoa và

hoa có mùi thơm. Trong thời gian qua, lan rừng được khai thác với số lượng lớn để cung cấp cho thị trường; việc khai thác quá mức dẫn đến nguy cơ bị cạn kiệt trong tự nhiên. Do đó, công tác bảo tồn nguồn gen tự nhiên của lan rừng là rất cần thiết [1, 2].

Lan Phi Điệp rừng tự nhiên hiện nay rất khan hiếm do bị khai thác quá mức, tại các phòng nuôi cấy mô trong nước ít có đề tài nghiên cứu về nhân giống lan Phi Điệp. Do đó, nguồn cây giống lan Phi Điệp *in vitro* trong nước chưa cung cấp đủ nhu cầu thị trường nên giá thành cây lan giống còn khá cao [2]. Trong tự nhiên, lan sinh sản bằng hình thức nảy chồi là chủ yếu; phương pháp sinh sản này cho hệ số nhân giống thấp và thời gian nhân giống dài. Bên cạnh đó, việc sử dụng các chất kích thích cho lan nảy nhiều chồi cũng ảnh hưởng đến cây mẹ, chất lượng của các chồi cũng không cao. Mặc dù lan có rất nhiều hạt nhưng hạt lại khó nảy mầm vì nội nhũ bị tiêu giảm, hạt lan nảy mầm phải có sự cộng sinh với nấm *Rhizoctonia* [3, 4]. Nhân giống *in vitro* lan Phi Điệp thường dùng cơ quan sinh dưỡng hoặc nhân từ hạt. Mỗi phương pháp đều có ưu và nhược điểm riêng. Phương pháp nhân giống lan Phi Điệp từ cơ quan sinh dưỡng cho thể hệ cây giống đồng nhất về mặt di truyền nhưng quá trình khử trùng mẫu khó, mẫu cây dễ bị nhiễm. Nhân giống lan Phi Điệp từ hạt cho hệ số nhân giống cao, dễ khử trùng mẫu, mẫu cây ít bị nhiễm, nhưng nhược điểm là không đồng nhất di truyền [5]. Ngày nay, với sự phát triển của công nghệ, việc nhân giống *in vitro* lan Phi Điệp bằng hạt cho hệ số nhân giống cao, phù hợp cho việc bảo tồn giống lan rừng đang dần cạn kiệt. Đã có nhiều tác giả nhân giống lan Phi Điệp, các nghiên cứu được thực hiện tại An Giang, Hà Nội, Thái Nguyên [3, 5, 6].

Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) là chỉ thị được nhân bản bằng PCR với một môi hỗ trợ với tiểu vệ tinh (microsatellite) đích. Mỗi băng tương ứng với chuỗi DNA được giới hạn bởi các tiểu vệ tinh đảo ngược. Kết quả dẫn đến đa locus, có sự đa hình cao và tạo ra các chỉ thị trội [7]. ISSR đã trở thành một dấu phân tử tốt để nghiên cứu trên các quần thể của cùng một loài; kỹ thuật này được thiết lập dựa trên PCR [7-9].

Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng chỉ thị ISSR trên lan *Dendrobium*. Nghiên cứu sử dụng dấu phân tử ISSR để đánh giá đa dạng di truyền quần thể hoa lan *Dendrobium officinale* [8]. Nghiên cứu sử dụng ISSR để phân tích 14 giống lan nhằm cung cấp kết quả cho việc phân loại 12 loài thuộc chi *Dendrobium*, 1 loài thuộc chi *Ascocentrum* và 1 loài thuộc chi *Rhynchostylis* [9]. Nghiên cứu về mối quan hệ di truyền của 81 loài thuộc chi *Dendrobium* tại Malaysia [10].

Trong tự nhiên, giống cây trồng nảy mầm từ hạt thường xuất hiện nhiều biến dị tổ hợp, gây khó khăn cho quá trình nhân giống với số lượng lớn. Tuy nhiên, đối với các loài lan rừng, việc nhân giống bằng hạt lại có ưu thế vì cây được tự thụ phấn qua nhiều thế hệ, các thế hệ cây con ít bị lai tạp hơn so với các giống lan lai trên thị trường. Hiện nay, việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền của cây lan Phi Điệp con được nhân từ hạt cũng chưa có nhiều nghiên cứu. Xuất phát từ những cơ sở trên, nghiên cứu thực hiện nhằm đánh giá mức độ đa dạng di truyền của thể hệ lan Phi Điệp được gieo từ hạt. Kết quả nghiên cứu còn phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về nhân giống lan Phi Điệp.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Khảo sát môi trường gieo hạt lan Phi Điệp (*D. anosmum* Lindl.)

- *Bố trí thí nghiệm:* Hạt lan được gieo trên các môi trường khoáng cơ bản gồm NT1: Murashige and Skoog medium (MS), NT2: Knudson C Orchid medium (KC) và NT3: Vacin & Went medium (VW). Mỗi môi trường gieo hạt có bổ sung 30 g/l sucrose và 7 g/l agar, pH 5,8 trước khi khử trùng. Bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 3 bình thủy tinh, mỗi bình chứa 50 ml dung dịch môi trường nuôi cấy.

- *Điều kiện nuôi cấy:* Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong thời gian 20 phút.

- *Khử trùng mẫu:* Quả lan Phi Điệp sau khi thu hoạch được rửa sạch bằng xà phòng và rửa lại bằng nước máy, chuyển mẫu vào tủ cấy vô trùng. Quả lan được rửa lại bằng nước cất vô

trùng 3 – 4 lần, lắc còn 70% trong 1 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 – 4 lần. Ngâm quả lan Phi Điệp trong dung dịch javel thương mại nguyên chất trong thời gian 15 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng. Dùng dao đã khử trùng tách vỏ lan, cấy hạt vào môi trường gieo hạt.

- Chỉ tiêu theo dõi: thời gian xuất hiện màu xanh (đơn vị tính: ngày); thời gian xuất hiện thể chồi (chỉ tiêu ghi nhận khi thể chồi được 01 lá (đơn vị tính: ngày); tỷ lệ bình nảy chồi (đơn vị tính: bình).

- Xử lý kết quả bằng phần mềm Minitab 16.

**2.2. Sử dụng chỉ thị ISSR đánh giá đa dạng di truyền của lan Phi Điệp được gieo từ hạt**

DNA được tách chiết từ cây lan Phi Điệp mẹ và 30 cây lan Phi Điệp con 6 tháng tuổi sau khi nhân từ hạt bằng phương pháp *in vitro*. Sử dụng phương pháp CTAB trong tách chiết DNA [11].

Sản phẩm DNA được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền các mẫu lan Phi Điệp con bằng kỹ thuật ISSR với 6 môi (Bảng 1).

**Bảng 1. Danh sách môi và trình tự môi được sử dụng**

STT	Tên môi	Trình tự môi (5' – 3')	Tm (°C)
1	UBC-810	GAGAGAGAGAGAGAT	50°C
2	ISSR HA	AGAGAGAGAGAGAGAGAGG	61°C
3	ISSR 2	AGAGAGAGAGAGAGAGC	53°C
4	ISSR 3	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	55°C
5	ISSR 4	ACACACACACACACT	50°C
6	ISSR 7	ACACACACACACACC	53°C

Môi ISSR được tổng hợp tại Công ty sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ. Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 15 µl. Thành phần một phản ứng PCR gồm nước cất tiệt trùng 2 lần: 8,8 µl, hỗn hợp myTaq buffer 5X: 3 µl, 1,2 µl môi ISSR nồng độ 10 pmol, 2 µl DNA khuôn nồng độ 50 ng/µl. Phản ứng PCR được tiến hành với chu trình nhiệt: (1) 94°C – 5 phút; (2) 94°C – 45 giây; (3) 50 – 61°C tùy thuộc vào môi (Tm - bảng 1) – 1 phút; (4) 72°C – 2 phút; (5) 72°C – 10 phút; lặp lại 40 lần từ bước (2) đến bước (4).

Điện di kiểm tra sản phẩm ISSR trên gel agarose 2% có bổ sung safeview ở hiệu điện thế 50V với thang DNA chuẩn 100 bp plus của Fermentas, sử dụng dung dịch đệm TBE (Tris-Borate-EDTA). Sau đó quan sát các băng xuất hiện trên gel điện di bằng máy UV BIO - RAD và ghi nhận hình ảnh các băng. Hình ảnh các băng DNA thu được sau khi điện di được mã hóa bằng hệ nhị phân để phân nhóm di truyền

bằng phần mềm NTSYS 2.1 theo phương pháp UPGMA.

Hàm lượng thông tin đa hình (Polymorphism information content: PIC) của mỗi chỉ thị được xác định theo công thức:

$$PIC = 1 - \sum Pi^2$$

Trong đó:  $Pi$  là tần số alen thứ  $i$  của kiểu gen được kiểm tra.

Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn). Nếu chỉ số PIC > 0,5 thì môi được sử dụng cho kết quả đa hình cao, chỉ số PIC nằm trong khoảng  $0,25 \leq PIC \leq 0,5$  cho kết quả đa hình trung bình và với chỉ số PIC < 0,25 thì kết quả đa hình thấp.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Khảo sát môi trường gieo hạt lan Phi Điệp (*D. anosmum* Lindl.)**

Hạt lan Phi Điệp sau khi gieo được theo dõi trong 12 tuần, kết quả quá trình thực nghiệm được trình bày tại Bảng 2 và Hình 2.

**Bảng 2. Kết quả theo dõi quá trình gieo hạt lan Phi Điệp ở các môi trường khác nhau**

NT	Môi trường	Số bình cấy	Số bình nảy mầm	Tỷ lệ (%)	Thời gian xuất hiện màu xanh	Thời gian xuất hiện thể chồi
1	MS	9	6	66,67	7 tuần	12 tuần
2	KC	9	8	88,89	5 tuần	10 tuần
3	VW	9	0	0	-	-



**Hình 1. Hạt lan Phi Điệp sau 12 tuần nuôi cấy**  
(a) môi trường MS, (b) môi trường K, (c) môi trường VW

Quả lan sau khi khử trùng, hạt được cấy vào 3 môi trường dinh dưỡng khác nhau. Tỷ lệ hạt lan nảy mầm ở các nghiệm thức có sự khác nhau rõ rệt. Sau 12 tuần nuôi cấy, môi trường KC đạt tỷ lệ nảy mầm cao nhất với 88,89%. Môi trường MS cho tỷ lệ nảy mầm là 66,67%. Ở môi trường VW hạt không nảy mầm. Ở môi trường KC, thời gian hạt nảy mầm và xuất hiện màu xanh là sớm nhất với 5 tuần sau khi cấy, thời gian xuất hiện thể chồi (protocorm) cũng nhanh nhất sau 10 tuần gieo hạt. Điều này chứng tỏ môi trường KC thích hợp nhất cho hạt lan nảy mầm.

Sau 12 tuần nuôi cấy, hạt lan ở môi trường MS nuôi cấy xuất hiện thể chồi, kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu vi nhân giống lan *D. anosmum* từ hạt thực hiện tại An Giang [3]. Trong nghiên cứu này, môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA và MS bổ 1 mg/l NAA cho kết quả sau 75 ngày nuôi cấy hạt lan nảy chồi thành cây con. Trong một nghiên cứu về sự phát triển cây con từ hạt trong ống nghiệm của loài lan *Nothodoritis zhejiangensis* đã khảo sát 5 môi trường gieo hạt gồm MS, ½ MS (1/2 MS và vi lượng), KC, VW và môi trường gieo hạt phong lan Hyponex N026, các môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Kết quả cho thấy môi trường KC là môi trường nền thích hợp nhất cho sự nảy mầm của hạt lan [12]. Thời gian trung bình hạt nảy mầm ở môi trường KC là 35,3 ngày, ở môi trường MS là 40,3 ngày và ở môi trường VW là 37,7 ngày. Kết quả gieo hạt *in vitro* lan *N. zhejiangensis* ở môi trường KC có thời gian nảy mầm tương tự với kết quả gieo hạt *in vitro* lan Phi Điệp *D. anosmum* Lindl. là 35 ngày sau khi gieo hạt. Trong nghiên cứu này nhằm hạn chế ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng vì có thể làm xuất

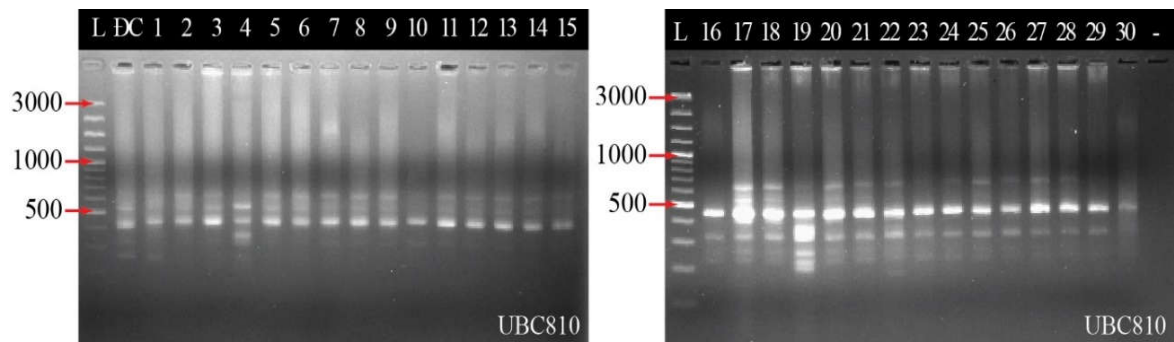
hiện biến dị soma nên môi trường gieo hạt không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Đây có thể là nguyên nhân làm tỷ lệ nảy mầm và sinh trưởng của hạt lan Phi Điệp thấp hơn so với các nghiên cứu trước đó.

### 3.2. Sử dụng chỉ thị ISSR đánh giá đa dạng di truyền của lan Phi Điệp được gieo từ hạt

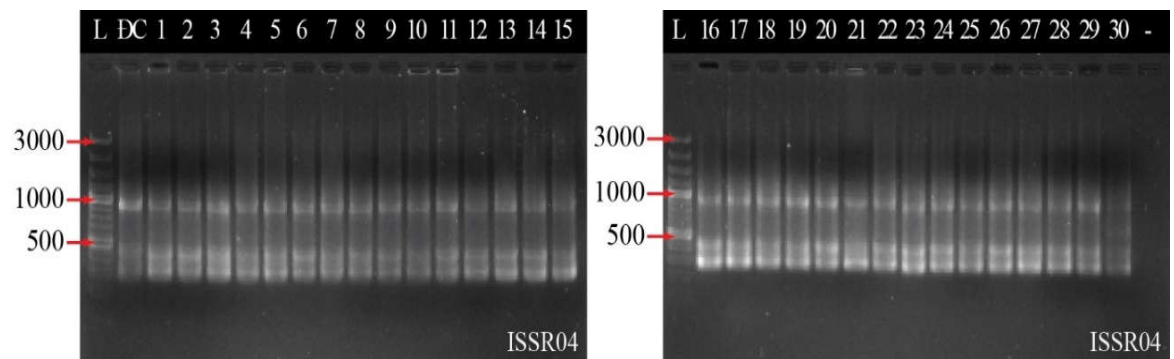
Sáu đoạn mồi được sử dụng để đánh giá độ đồng nhất di truyền của 30 mẫu cây lan Phi Điệp được gieo từ hạt cùng với mẫu cây mẹ. Tổng số băng DNA sau điện di là 35 băng, trong đó có 15 băng đa hình (Bảng 3). Mồi UBC810 và ISSR07 tạo ra 7 băng là nhiều nhất (Hình 2 và Hình 3), mồi ISSR04 có 4 băng là ít nhất (Hình 4). Số băng trung bình trên mỗi mồi là 5,83 băng. Kích thước của các băng dao động từ 200 bp đến 1000 bp. Chỉ số PIC dao động từ 0,02 đến 0,15; PIC trung bình 0,09. Từ kết quả ở Bảng 3, tất cả các mồi đều cho kết quả đa hình thấp ( $PIC \leq 0,25$ ), trong đó mồi ISSR02 có chỉ số PIC cao nhất 0,15, tỉ lệ băng đa hình đạt 33,3%, mồi ISSR04 có chỉ số PIC thấp nhất với giá trị 0,02, tỷ lệ băng đa hình đạt 25%, không có mồi nào cho kết quả đa hình cao. Điều này cho thấy ít có sự khác biệt về di truyền giữa cây mẹ và cây con được tạo thành từ hạt qua sinh sản hữu tính bằng hình thức tự thụ. Kết quả này có thể do lan là loài thích nghi với hình thức sinh sản vô tính, đặc biệt lan rừng độ thuần của cây mẹ cao nên quá trình tự thụ tạo phôi hạt ít tạo ra sai khác về mặt di truyền. Số lượng băng đa hình trong nghiên cứu này thấp hơn với nghiên cứu ứng dụng ISSR đối với 14 giống lan khác nhau tại Malaysia, trong nghiên cứu này dãy băng thu được nằm trong khoảng từ 186-2159 bp [9]. Kết quả này cho thấy hạt lan tự thụ thường có quan hệ di truyền gần nhau hơn.

**Bảng 3. Kết quả 6 môi phân tích 31 mẫu cây lan Phi Điệp *D. anosmun* bằng kỹ thuật ISSR**

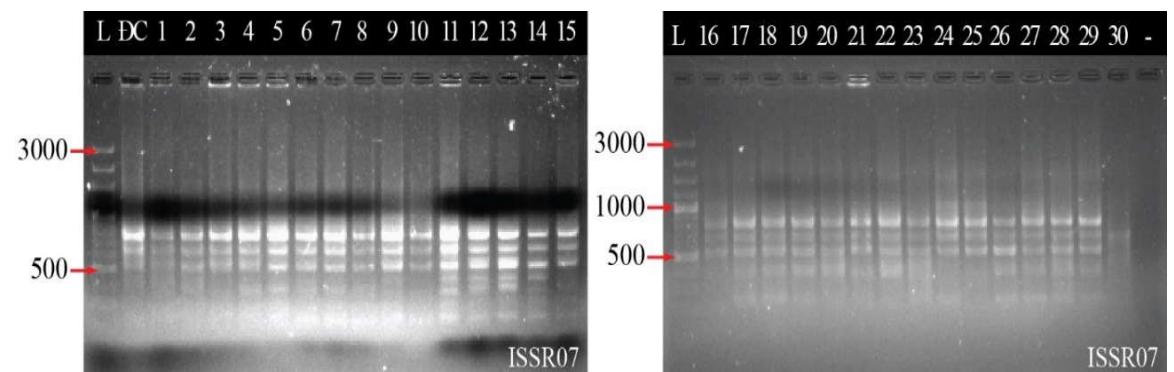
Môi	Số dây băng	Số băng đa hình	Tỷ lệ băng đa hình (%)	PIC
ISSRHA	5	2	40,0%	0,07
ISSR02	6	2	33,3%	0,15
ISSR03	6	2	33,3%	0,06
ISSR04	4	1	25,0%	0,02
ISSR07	7	4	57,1%	0,11
UBC810	7	4	57,1%	0,10
<b>Tổng</b>	<b>35</b>	<b>15</b>		
<b>Trung bình</b>	<b>5,83</b>	<b>2,50</b>	<b>42,9%</b>	<b>0,09</b>
<b>Max</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>57,1%</b>	<b>0,15</b>
<b>Min</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>25,0%</b>	<b>0,02</b>



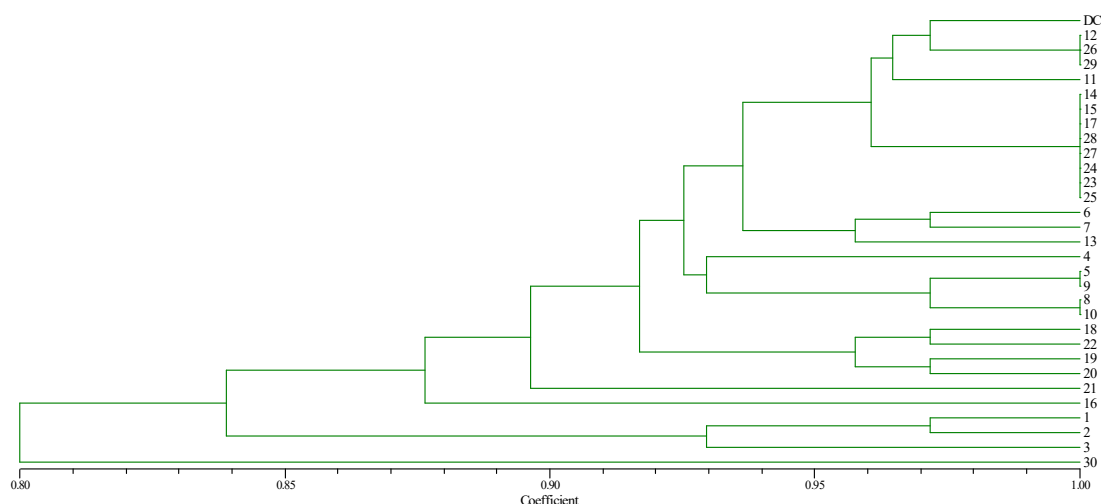
**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi UBC810**  
(L: Thang DNA chuẩn, DC: Đối chứng (cây mẹ), 1 – 30: Các mẫu lan con)



**Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR04**  
(L: Thang DNA chuẩn, DC: Đối chứng (cây mẹ), 1 – 30: Các mẫu lan con)



**Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR07**  
(L: Thang DNA chuẩn, DC: Đối chứng (cây mẹ), 1 – 30: Các mẫu lan con)



**Hình 5. Giản đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền của 30 mẫu lan Phi Diệp gieo từ hạt so với cây lan mẹ (DC: Đối chứng (cây mẹ), 1 – 30: Các mẫu lan con)**

Ở Hình 5, giản đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền được xây dựng dựa trên bảng số liệu phân tích các marker phân tử theo hệ nhị phân. Với phân tích bằng chỉ thị phân tử ISSR, 31 mẫu DNA (bao gồm 30 cây con và 1 cây mẹ) có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 80% đến 97%, tương ứng với mức độ sai khác di truyền từ 3% đến 20%. So với mẫu đối chứng, mẫu 12, 18, 26 và 29 có mức độ tương đồng cao nhất với 97%, mẫu có mức độ tương đồng thấp nhất là mẫu 1 và 3. Khi xét mối quan hệ di truyền giữa 30 mẫu lan Phi Diệp con được gieo từ hạt, mẫu (12, 26, 29); (14, 15, 17, 28, 27, 24, 23, 25); (5, 9) và (8, 10) có mức độ tương đồng di truyền cao nhất với 100%. Như vậy trong 30 cá thể khảo sát khác biệt di truyền cao nhất mức 20%. Sự khác biệt di truyền này có thể là do trong quá trình giảm phân hình thành giao tử ở cây Phi Diệp mẹ có hiện tượng tiếp hợp trao đổi chéo ở các cặp nhiễm sắc thể tương đồng, từ đó làm thay đổi trình tự lặp của vùng locus đang khảo sát, dẫn đến trình tự lặp có thể tăng hoặc giảm, kết quả phân tích dẫn đến sự khác biệt trong di truyền ở các cây khảo sát.

#### 4. KẾT LUẬN

Hạt lan Phi Diệp *D. anosmum* Lindl. nảy mầm tốt trên môi trường KC và MS bổ sung 30 g/l sucrose và 7 gl agar, thời gian nảy mầm và xuất hiện chồi trong 12 tuần sau khi gieo hạt. Kết quả phân tích 30 cây lan Phi Diệp con gieo

từ hạt và cây mẹ bằng kỹ thuật ISSR với 6 đoạn môi cho thấy lan Phi Diệp gieo từ hạt có mức độ đa dạng di truyền từ 3 – 20% khi so với đối chứng tùy cá thể. Việc nhân giống bằng phương pháp *in vitro* hạt Phi Diệp có giá trị bảo tồn nguồn gen và mang lại hiệu quả kinh tế cao vì số lượng hạt lan lớn, nhân được một lượng lớn cây trong thời gian ngắn. Kết quả khảo sát về di truyền cho thấy không có sự khác biệt lớn về di truyền giữa cây con và cây mẹ. Tuy nhiên để biết các sai khác về di truyền có làm thay đổi kiểu hình cây con so với cây mẹ, đặc biệt là kiểu hình hoa cần tiếp tục theo dõi quá trình thuần dưỡng cây lan Phi Diệp *in vitro* ở điều kiện nhà lưới, đặc biệt theo dõi kiểu hình hoa từ đó có những khuyến cáo phù hợp trong nhân giống lan từ hạt.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Trần Hợp (1998). Phong lan Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội. 703.
- [2]. Phan Thúc Huân (2005). Hoa lan nuôi trồng và kinh doanh. Nhà xuất bản Phương Đông, Thành phố Hồ Chí Minh. 228.
- [3]. Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2021). Quy trình vi nhân giống lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*). Tạp chí Khoa học Quốc tế AUG. 27(1): 73-82.
- [4]. Trần Văn Minh & Nguyễn Văn Uyển (2001). Vi nhân giống phong lan nhóm *Dendrobium* trên quy mô công nghiệp, nhân giống *in vitro*. Tạp chí Khoa học Công nghệ. 1: 1-9.
- [5]. Nguyễn Quỳnh Trang, Vũ Thị Huệ & Khuất Thị Hải Ninh (2013). Nhân giống *in vitro* lan Phi Diệp tím

(*Dendrobium anosmum*). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 3(1): 16-21.

[6]. Nguyễn Thị Hải Yến & Nguyễn Thu Hương (2021). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan hoàng thảo phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) phân bố tại Thái Nguyên. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên. 226(10): 39-46.

[7]. 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.

[8]. Jie S. & Dongyang L. Xiaoyu D., GeDing, Jia H., Xuexia L., Feng T. & Bihai C. (2006). Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. Biol Pharm Bull. 29(3): 420-422.

[9]. Piyanan C. Pissamai P., Nattapong S. &

Piyachat W. (2014). DNA finger printing analysis of fourteen species of orchids using ISSR. KRU Research Journal. 19: 210-216.

[10]. Hazlina M.S. N., Wahba L.E. & Fadelah A. & Wickneswari R. (2013). Genetic relationships among 81 *Dendrobium* accessions from Malaysia. Malaysian Applied Biology Journal. 42(1): 35-40.

[11]. Rogers S. O. & Bendich A. J. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. 1-10.

[12]. Song-jun Z., Zhi-lin C., Jian-xia Z. Kun-lin W., Cheng-ke B., Jaime A. T. S. & Jun D. (2011). Asymbiotic seed germination, induction of calli and protocorm-like bodies, and *in vitro* seedling development of the rare and endangered *Nothodoritis zhejiangensis* chinese orchid. Hortscience. 43(3): 460-465.