

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid đến sự phát sinh biến dị trên lan Cẩm Cù (*Hoya kerrii*)

Ngô Minh Trí¹, Trần Lê Nguyên¹, Trần Thị Mỹ Tiên¹, Lâm Ngọc Kim Trúc¹, Phùng Hoàng Yến¹,
Dương Nguyễn Mai Anh¹, Phùng Thị Hằng², Nguyễn Thị Pha^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/7/2022; ngày chuyển phản biện 12/7/2022; ngày nhận phản biện 2/8/2022; ngày chấp nhận đăng 5/8/2022

Tóm tắt:

Lan Cẩm Cù (*Hoya kerrii*) được nhiều người ưa chuộng vì sự phong phú về hình dạng lá, màu sắc và hương thơm của hoa. Để gia tăng sự đa dạng, phong phú cho lan Cẩm Cù, mẫu lá được cấy vào môi trường MS bổ sung 2,4-D và α -naphthylacetic acid (NAA) (nồng độ 4-7 mg/l) nhằm khảo sát khả năng cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh biến dị. Tỷ lệ tạo sẹo (100%) sau 15 ngày nuôi cấy ở tất cả các nghiệm thức (NT) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, trong khi NT đối chứng không cho thấy sự hình thành mô sẹo. Kết quả nhân nhanh mô sẹo cho thấy, mẫu lá ở NT 5 mg/l 2,4-D cho kích thước mô sẹo lớn nhất (2,98 cm). Các mô sẹo 45 ngày tuổi được chuyển sang môi trường tái sinh MS + 1 mg/l IBA + 3,5 mg/l BAP, thời điểm chồi xuất hiện đối với mẫu mô sẹo xử lý bằng NAA là 95 ngày sau khi cấy chuyển với tỷ lệ tái sinh cao nhất (66,67%) và sớm hơn so với mô sẹo xử lý 2,4-D (225 ngày, tỷ lệ tái sinh 50%). Kết quả phân tích sự khác biệt di truyền bằng chỉ thị RAPD ghi nhận tổng số băng DNA là 330, kích thước phân tử dao động 170-2700 bp. Chỉ số PIC trong phạm vi 0,23-0,40. Mẫu xử lý với 5 mg/l NAA có hệ số tương đồng thấp nhất 0,455; các chỉ tiêu sinh trưởng như đường kính cuống lá, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ ghi nhận được ở mẫu xử lý với 5 mg/l NAA vượt trội hơn so với đối chứng.

Từ khóa: α -naphthylacetic acid, biến dị, *Hoya kerrii*, Polymorphism information content, 2,4-D.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Lan Cẩm Cù là một trong những loại cây cảnh được nhiều người ưa chuộng vì có hình dạng lá, màu sắc hoa đa dạng và hương thơm đặc trưng. Lan Cẩm Cù nuôi cấy mô được xem là nguồn cây giống ổn định có thể đáp ứng số lượng lớn cho người trồng. Bên cạnh đó, việc tạo thêm nhiều dòng hoa lan Cẩm Cù mới sẽ góp phần làm gia tăng sự đa dạng của loài cây này, đáp ứng nhu cầu người trồng. Theo một số nghiên cứu cho thấy, auxin có mối liên hệ trực tiếp đến việc phát sinh biến dị khi sử dụng ở nồng độ cao, làm thay đổi sinh lý của thực vật và làm phát sinh biến dị. Auxin là thuật ngữ chung đại diện cho nhóm những chất điều hòa sinh trưởng thực vật tạo ra sự vươn dài của tế bào chồi trong vùng gần đỉnh sinh trưởng [1, 2]. Các chất đại diện cho nhóm này gồm Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), NAA; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)... Trong số đó, 2 chất điều hòa sinh trưởng được tổng hợp nhân tạo là NAA và 2,4-D có tác dụng lên cây trồng tương tự các chất hormone sinh trưởng thực vật như kích thích sự kéo dài và tăng trưởng của rễ [1-3]. Hệ gen của tế bào thực vật bị tác động mạnh mẽ bởi NAA, 2,4-D như một tác nhân ảnh hưởng đến sự phát sinh đột biến hóa học. Tác động gây biến dị của NAA và 2,4-D là làm ảnh hưởng đến hoạt động phân bào, những thay đổi trong cấu trúc nhiễm sắc thể và chất nhiễm sắc cũng như làm thay đổi chu kỳ phân bào. Trong tế bào thực vật, NAA và 2,4-D gây ra các bất thường về nguyên phân và giảm phân, cả ở *in vivo* lẫn *in vitro* [2, 3]. Các chất này được ứng dụng vào môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm kích

thích sự tăng trưởng, khả năng kéo dài tế bào và khởi đầu sự phân chia tế bào [1].

Chỉ thị phân tử RAPD được xem là hữu hiệu để xác định các biến dị di truyền của các dòng đột biến khi so với các dòng hoang dại. Phương pháp này đã được sử dụng hiệu quả để phân tích các biến dị di truyền của hoa cúc sau xử lý tia gamma [4]. Vì thế, nghiên cứu sự ảnh hưởng của 2,4D và NAA đến sự phát sinh đột biến trên cây lan Cẩm Cù được đề xuất thực hiện.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giống lan Cẩm Cù 1 năm tuổi được trồng tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ (hình 1).



Hình 1. Cây lan Cẩm Cù. (A) Lá và thân lan; (B) Hoa lan Cẩm Cù.

*Tác giả liên hệ: Email: ntpa@ctu.edu.vn

Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid on the variant formation of Valentine Hoya (*Hoya kerrii*)

Minh Tri Ngo¹, Le Nguyen Tran¹, Thi Mỹ Tien Tran¹,
Ngoc Kim Truc Lam¹, Hoang Yen Phung¹,
Nguyen Mai Anh Duong¹, Thi Hang Phung², Thi Pha Nguyen^{1*}

¹Institute of Biotechnology Research and Development, Can Tho University,
Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

²School of Education, Can Tho University,
Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 8 July 2022; revised 2 August 2022; accepted 5 August 2022

Abstract:

Valentine Hoya (*Hoya kerrii*) is favoured by many people for its richness in leaf shape, colour and flower fragrance. To increase the diversity and abundance of Hoya, leaf samples were transplanted into MS medium supplemented with 2,4-D and α -naphthylacetic acid (NAA) (concentration 4-7 mg/l) to create callus and induce mutations. Calli formation rate was observed at 100% after 15 days of culture in all treatments supplemented with growth regulators, while the control treatment showed no callus formation. The results of rapid callus multiplication showed that the callus-forming leaf sample obtained from the treatment of 5 mg/l 2,4-D gave the largest callus size (2.98 cm). The 45-day-old calli were transferred to MS + 1 mg/l IBA + 3.5 mg/l BAP regeneration medium, the time of shoot appearance for callus samples treated with NAA was 95 days after subculture with the highest regeneration rate of 66.67%, earlier than 2,4-D treated calli (225 days, 50% regeneration rate). The results of genetic divergence analysis using RAPD markers recorded a total of 330 DNA bands with molecular sizes ranging from 170 to 2700 bp. The polymorphism information content index was calculated in the 0.23-0.40 range. Samples treated with 5 mg/l NAA had the lowest similarity coefficient of 0.455, growth parameters such as petiole diameter, dermal tissue thickness, vascular bundle area, and a number of wood bundles recorded in samples treated with 5 mg/l NAA were superior to those of the control.

Keywords: α -naphthylacetic acid, *Hoya kerrii*, polymorphism information content, variation, 2,4-D.

Classification number: 4.6

2.2. Hóa chất

Môi trường nuôi cấy MS (Murashige và Skoog) + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar, pH 5,7-5,8). Một số hóa chất khác như: 2,4-D, NAA, BAP (6-Benzylaminopurine), Taq DNA Polymerase (Meridian Biocience), môi RAPD (Phusa Biochem) (bảng 1), các hóa chất thực hiện ly trích DNA và phản ứng PCR.

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

Số thứ tự	Tên môi	Trình tự môi
1	OPF - 01	5' - ACGGATCCTG - 3'
2	OPF - 04	5' - GGTGATCAGG - 3'
3	OPF - 03	5' - CCTGATCACC - 3'
4	OPF - 02	5' - GAGGATCCCT - 3'
5	OPF - 05	5' - CCGAATTCCC - 3'
6	OPD - 05	5' - TGAGCGGACA - 3'
7	OPA - 14	5' - TCTGTGCTGG - 3'
8	OPS - 11	5' - AGTCGGGTGG - 3'
9	OPG - 04	5' - AGCGTGTCTG - 3'
10	OPR - 07	5' - ACTGGCCTGA - 3'
11	OPB - 11	5' - GTAGACCCGT - 3'
12	OPK - 14	5' - CCCGCTACAC - 3'
13	OPJ - 13	5' - CCACACTACC - 3'
14	OPT - 05	5' - GGGTTTGGA - 3'
15	OPC - 05	5' - GATGACCGCC - 3'

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA lên khả năng cảm ứng mô sẹo và phát sinh biến dị: Lá lan Cẩm Cù bánh tẻ có kích thước 4x7 cm được rửa dưới vòi nước chảy trong 5 phút, khử trùng bề mặt với cồn 70° trong 30 giây và rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu sau đó được ngâm trong dung dịch NaClO 5% bổ sung 3 giọt nước rửa chén trong 15 phút, rửa với nước cất vô trùng 3-5 lần. Sau đó, các mẫu lá được cắt thành các mảnh hình vuông (kích thước 1x1 cm) và cấy vào bình 250 ml chứa 50 ml môi trường MS bổ sung 2,4-D, NAA với các nồng độ 0, 4, 5, 6 và 7 mg/l. Thí nghiệm 2 nhân tố gồm loại chất cảm ứng và nồng độ chất cảm ứng, lặp lại 3 lần mỗi lần 5 bình, mỗi bình cấy 3 mảnh lá. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ phần trăm mẫu hình thành mô sẹo.

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA khi cảm ứng tạo mô sẹo lên khả năng nhân nhanh mô sẹo: Mẫu mô sẹo sau 15 ngày nuôi cấy được chuyển vào môi trường nhân nhanh mô sẹo MS + 1 mg/l NAA + 1 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP [5] để đánh giá sự gia tăng kích thước của mô sẹo thu được từ các NT cảm ứng tạo mô sẹo. Thí nghiệm 2 nhân tố được lặp lại 3 lần, mỗi lần cấy 3 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi là kích thước mô sẹo.

Khảo sát khả năng tái sinh chồi của các mô sẹo xử lý với 2,4-D, NAA sau khi nhân nhanh: Các mô sẹo sau khi nhân nhanh được tái sinh chồi trên môi trường MS + 1 mg/l IBA + 3,5 mg/l BAP. Thí nghiệm 1 nhân tố được lặp lại 3 lần, mỗi lần cấy 10 mô sẹo. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ và thời điểm mô sẹo tái sinh chồi.

Khảo sát, đánh giá sự phát sinh biến dị bằng kỹ thuật RAPD-PCR: Các mô sẹo sau khi tái sinh chồi và mẫu lá cây đối chứng được ly trích DNA theo quy trình CTAB [6]. Đánh giá sự khác biệt di truyền bằng kỹ thuật RAPD-PCR với tổng 15 môi (bảng 1), phản ứng được lặp lại 2 lần/mẫu. Thành phần của một phản ứng gồm: 8,96 μ l BiH_2O , 3 μ l Buffer (5X), 1,2 μ l môi (10 pmol), 0,15 μ l *Taq* DNA Polymerase (5 unit/ μ l), 2 μ l DNA khuôn (30 μ g/ μ l) và chu kỳ nhiệt 94°C: 5 phút; lặp lại 45 chu kỳ: 94°C/20 giây, 35°C/15 giây, 72°C/80 giây và kết thúc bằng 72°C/10 phút. Điện di sản phẩm RAPD-PCR trên gel agarose 2% có bổ sung safeview ở hiệu điện thế 50 V trong 1 giờ với thang chuẩn 100 bp của Fermentas. Sử dụng phần mềm GelAnalyzer v2019 [7] để đọc và ghi nhận kích thước các băng DNA để so sánh với sự khác biệt về hình thái. Hình ảnh các băng DNA được mã hóa bằng hệ nhị phân và được phân tích bằng phần mềm NTSYS 2.1 theo phương pháp UPGMA. Chỉ số PIC được tính theo công thức sau:

$$\text{PICi} = 2f_i \times (1-f_i)$$

trong đó i là thứ tự locus được tính; f_i là tần số alen xuất hiện; $(1-f_i)$ là tần số alen không xuất hiện [8].

Đánh giá sự khác biệt về hình thái bằng phương pháp giải phẫu: Dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 có sự khác biệt di truyền lớn nhất so với mẫu đối chứng thông qua chỉ thị RAPD sẽ được thực hiện giải phẫu để so sánh sự khác biệt về hình thái mô. Vi phẫu lát cắt mỏng (bằng tay) được nhuộm kép bằng carmin aluné - vert d'iod theo thiết diện ngang của cuống lá có độ tuổi bằng nhau và cùng vị trí (lá thứ 2 từ phần đỉnh chồi). Vi mẫu được chụp dưới kính hiển vi quang học có camera (Olympus CX23). Đo mẫu bằng trắc vi vật kính (E4, E10) và trắc vi thị kính (E15). Thí nghiệm một nhân tố được lặp lại 3 lần, mỗi lần một cuống lá, mỗi cuống lấy 3 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi là đường kính cuống lá, số lượng oxalat canxi, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ.

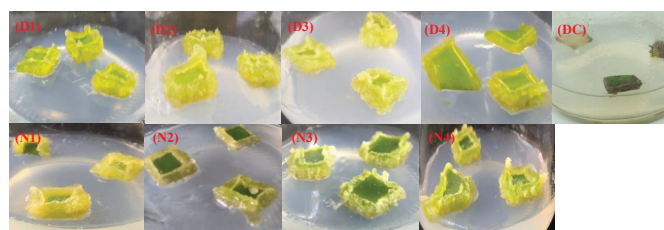
Điều kiện nuôi cấy: Các mẫu được nuôi ở nhiệt độ 24°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Phương pháp xử lý số liệu và điều kiện: Các số liệu sau khi thu thập được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 và phân tích bằng phần mềm Minitab 16, GelAnalyzer v2019 [7], NTSYS 2.1 và ToupView [8].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA lên khả năng cảm ứng mô sẹo và phát sinh biến dị

Sau 15 ngày nuôi cấy, các NT trên môi trường có bổ sung NAA và 2,4-D ở cả 4 nồng độ 4, 5, 6 và 7 mg/l đều có khả năng cảm ứng tạo mô sẹo tốt trong nuôi cấy *in vitro* lan Cẩm Cù, với tỷ lệ 100%, riêng NT đối chứng không ghi nhận sự hình thành mô sẹo tại vết cắt. Trên môi trường chứa 2,4-D, mô sẹo có màu sắc xanh hơn mô sẹo trên môi trường chứa NAA, riêng ở NT chứa 4 mg/l NAA, mô sẹo có màu sắc tương đồng với các NT xử lý 2,4-D (hình 2). Tuy nhiên, sự khác nhau về màu sắc của mô sẹo ở các NT không ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo mô sẹo. Biến dị phát sinh được theo dõi và đánh giá sau khi tái sinh thành cây hoàn chỉnh và phân tích kiểu gen.



Hình 2. Sự phát sinh mô sẹo lan Cẩm Cù sau 15 ngày nuôi cấy *in vitro*. (D1) 4 mg/l 2,4-D; (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (D4) 7 mg/l 2,4-D; (N1) 4 mg/l NAA; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA; (N4) 7 mg/l NAA; (ĐC) Đối chứng.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA khi cảm ứng tạo mô sẹo lên khả năng nhân nhanh mô sẹo

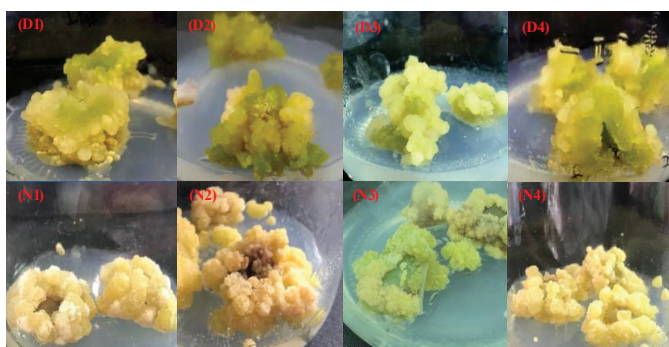
Mô sẹo sau 15 ngày nuôi cấy được chuyển sang môi trường MS + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA + 1,5 mg/l BAP. Kết quả ghi nhận kích thước của các mô sẹo ở thời điểm 45 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 2. Nhìn chung, ở thời điểm 45 ngày, tất cả các NT gây cảm ứng mô sẹo đều cho kích thước sẹo tăng so với thời điểm 15 ngày nuôi cấy. Xét về nhân tố nồng độ gây cảm ứng mô sẹo, kích thước mô sẹo tăng từ nồng độ 4 đến 5 mg/l và bắt đầu giảm dần từ nồng độ 5 đến 7 mg/l. Đối với nhân tố là chất cảm ứng đột biến, 2,4-D cho kích thước mô sẹo lớn hơn NAA. NT 5 và 6 mg/l 2,4-D có kích thước sẹo trung bình cao nhất lần lượt là 2,980 và 2,770 cm, NT bổ sung 4 mg/l NAA ghi nhận kích thước mô sẹo thấp nhất là 1,435 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các NT còn lại.

Bảng 2. Kích thước mô sẹo (cm) lan Cẩm Cù cảm ứng bởi NAA và 2,4-D sau 45 ngày nuôi cấy.

Nồng độ (mg/l)	Auxin		Trung bình
	NAA	2,4-D	
4	1,435 ^a	2,285 ^b	1,860 ^D
5	2,255 ^{bc}	2,980 ^a	2,618 ^A
6	1,880 ^d	2,770 ^a	2,325 ^B
7	1,925 ^{cd}	2,245 ^{bc}	2,085 ^C
Trung bình	1,874 ^B	2,570 ^A	
P (nồng độ)	0,00		
P (chất cảm ứng đột biến)	0,00		
P (tương tác)	0,00		
CV (%)	10,6		

Số liệu này đã được mã hoá $(x+y)/2$ khi phân tích thống kê, với x là chiều dài mô sẹo, y là chiều rộng mô sẹo. Trên cùng một cột hay một hàng, các số trung bình của từng nhân tố đi theo cùng ký tự viết hoa là khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. Các số trung bình của từng NT (kết hợp chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ) có cùng ký tự viết thường theo hàng hoặc cột là khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Quan sát màu sắc mô sẹo 45 ngày tuổi cho thấy, mô sẹo ở các NT xử lý 2,4-D có màu vàng nhạt hơn so với các NT xử lý NAA có màu vàng đậm hơn và tất cả mô sẹo không có hiện tượng hóa nâu (hình 3).



Hình 3. Mô sẹo trên các mẫu thời điểm 45 ngày nuôi cấy. (D1) 4 mg/l 2,4-D; (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (D4) 7 mg/l 2,4-D; (N1) 4 mg/l NAA; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA; (N4) 7 mg/l NAA.

3.3. Khả năng tái sinh chồi của các mô sẹo xử lý 2,4-D, NAA sau khi nhân nhanh

Mô sẹo 45 ngày được tái sinh chồi trên môi trường MS + 1 mg/l IBA + 3,5 mg/l BAP, tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi được thể hiện ở bảng 3. Nhìn chung, ở thời điểm 95 và 225 ngày tuổi các mô sẹo bị cảm ứng bởi chất xử lý lần lượt là NAA và 2,4-D, nồng độ xử lý tăng thì tỷ lệ tái sinh chồi càng tăng, nhưng nồng độ quá cao lại ức chế sự tái sinh chồi của mô sẹo. Cụ thể, ở thời điểm 95 ngày đối với mô sẹo xử lý bằng NAA, tỷ lệ tái sinh chồi khi tăng nồng độ xử lý từ 4 lên 5 mg/l. Kết quả này tương tự đối với mô sẹo xử lý 2,4-D ở thời điểm 225 ngày (bảng 3). Với chất cảm ứng là NAA, mô sẹo có thời gian tái sinh nhanh hơn so với mô sẹo xử lý 2,4-D khi ở cùng một nồng độ.

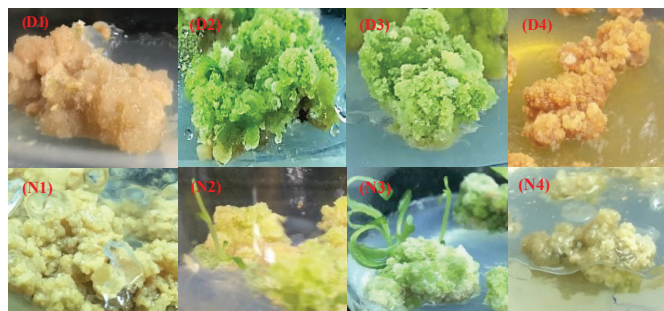
Bảng 3. Khả năng tái sinh chồi lan Cẩm Cù thời điểm 95 và 225 ngày nuôi cấy.

NT	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ mô tái sinh chồi (%)	
			95 ngày nuôi cấy	225 ngày nuôi cấy
1	2,4-D	4	0 ^c	0 ^c
2		5	0 ^c	50,00 ^a
3		6	0 ^c	33,33 ^b
4		7	0 ^c	0 ^c
5	NAA	4	0 ^c	0 ^c
6		5	66,67 ^a	-
7		6	30,00 ^b	-
8		7	0 ^c	0 ^c
p-value			0,00	0,00
CV (%)			16,90	16,97

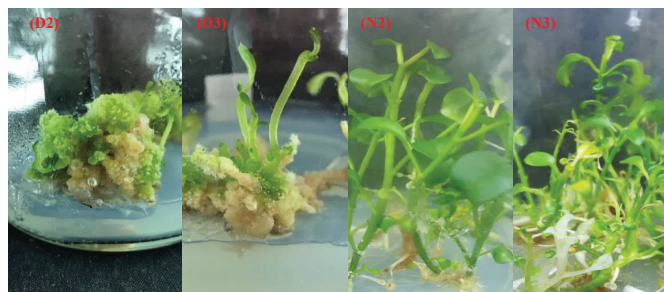
Trên cùng một cột, các số trung bình có cùng ký tự là không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Ở thời điểm 95 ngày, mô sẹo ở NT6 và NT7 (5 và 6 mg/l NAA) bắt đầu phát triển thành chồi, tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 66,67% ở NT6 và 30,0% ở NT7, kết quả này khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các NT còn lại (0%). Đến thời điểm 225 ngày tuổi, NT2 và NT3 xử lý 2,4-D ở nồng độ 5 và 6 mg/l ghi nhận sự hình thành chồi từ mô sẹo với tỷ lệ tái sinh cao nhất ghi nhận ở NT2 là 50,0%, tiếp theo là 33,33% ở NT3 và ghi nhận không có khả năng tái sinh của các mô sẹo ở các NT còn lại.

Về màu sắc mô sẹo và chồi ở thời điểm 95 ngày nuôi cấy, NT6 (5 mg/l NAA) và NT7 (6 mg/l NAA) mô sẹo có màu xanh và xuất hiện chồi. NT5 và NT8 (4 và 7 mg/l NAA) mô sẹo dần chuyển sang màu vàng, không xuất hiện chồi. Đối với mô sẹo xử lý 2,4-D, NT2 và NT3 (5 và 6 mg/l 2,4-D) mô sẹo có màu xanh, chưa xuất hiện chồi. Mô sẹo NT1 và NT4 (4 và 7 mg/l 2,4-D) dần chuyển sang màu vàng sậm tương tự NT5 và NT8 và chưa xuất hiện chồi (hình 4). Ở thời điểm 225 ngày nuôi cấy, mô sẹo ở NT2 và NT3 có màu xanh, nhưng một phần bị chuyển sang màu vàng sậm, các chồi nhỏ bắt đầu xuất hiện tại các phần sẹo có màu xanh (hình 5). Mô sẹo ở các NT còn lại có màu vàng sậm, không còn khả năng sống sót.



Hình 4. Các mẫu mô sẹo thời điểm 95 ngày nuôi cấy. (D1) 4 mg/l 2,4-D; (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (D4) 7 mg/l 2,4-D; (N1) 4 mg/l NAA; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA; (N4) 7 mg/l NAA.



Hình 5. Các mẫu chồi thời điểm 225 ngày nuôi cấy. (D2) 5 mg/l 2,4-D; (D3) 6 mg/l 2,4-D; (N2) 5 mg/l NAA; (N3) 6 mg/l NAA.

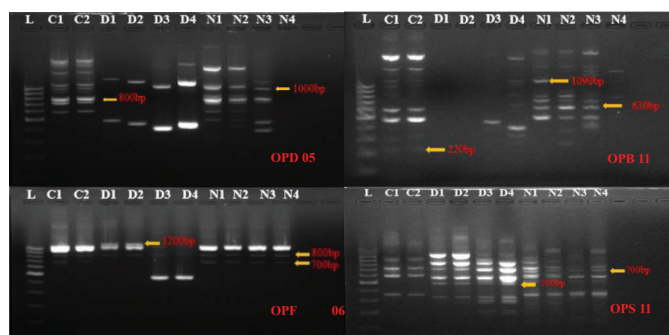
3.4. Đánh giá sự phát sinh biến dị dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 bằng chỉ thị RAPD

Từ kết quả xử lý 2,4-D và NAA ở các nồng độ khác nhau ghi nhận được 4 NT có chồi tái sinh [NT2 và NT3 (5 và 6 mg/l 2,4-D); NT6 và NT7 (5 và 6 mg/l NAA)]. DNA từ mẫu chồi tái sinh ở 4 NT và mẫu đối chứng được đánh giá sự phát sinh biến dị bằng kỹ thuật RAPD-PCR. Kết quả PCR trên mẫu đối chứng đều cho kiểu băng giống nhau và ổn định sau 2 lần lặp lại. Kết quả khảo sát với 15 môi có 13 môi khuếch đại cho băng DNA (mỗi OPR 07, OPJ 13 không khuếch đại băng DNA ở tất cả các mẫu) (bảng 4 và hình 6). Tổng số băng DNA (đa hình và đơn hình) ghi nhận ở 5 mẫu là 330, kích thước phân tử dao động từ 170 đến 2700 bp. Trong tổng số 330 băng, ghi nhận 326 băng đa hình và 4 băng đơn hình được khuếch đại ở mỗi OPF - 05 (2 băng), OPT - 05 (1 băng), OPC - 05 (1 băng). Từ các băng DNA đa hình cho thấy sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu chồi ở 4 NT xử lý đột biến và mẫu đối chứng.

Trong 13 môi có khả năng khuếch đại trên 5 mẫu, mỗi OPS - 11 ghi nhận số băng DNA cao nhất là 41 băng, mỗi OPF - 4 ghi nhận số băng thấp nhất là 8 băng, trung bình 25,4 băng/môi. Giá trị thông tin đa hình PIC trong phạm vi từ 0,23 đến 0,40, giá trị PIC cao nhất ở mỗi OPS - 11 và OPF - 02, đạt thấp nhất ở mỗi OPG - 04 và trung bình là 0,34. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu đã công bố khi tỷ lệ đa hình các sản phẩm DNA khuếch đại bởi 4 chỉ thị RAPD từ genomic DNA của các mô sẹo cây cọ (*Phoenix dactylifera* L.) cảm ứng bởi 2,4-D 50 mg/l, 2,4-D 100 mg/l, Dicamba 10 mg/l và NAA 30 mg/l là từ 0,476 đến 0,571 [9].

Bảng 4. Kết quả khuếch đại của 15 đoạn môi.

Số thứ tự	Môi	Số băng mỗi NT					Kích thước phân tử (bp)	Chỉ số PIC
		ĐC	NT1	NT2	NT3	NT4		
1	OPF - 01	6	7	8	4	4	300-1370	0,37
2	OPF - 04	8	0	0	0	0	400-1600	0,32
3	OPF - 03	7	7	0	0	0	250-1340	0,36
4	OPF - 02	3	6	0	0	0	250-1000	0,40
5	OPF - 05	7	9	7	8	6	170-1450	0,31
6	OPD - 05	10	3	3	10	6	300-1500	0,36
7	OPA - 14	8	0	1	0	0	260-1300	0,32
8	OPS - 11	7	9	12	7	6	200-1350	0,40
9	OPG - 04	0	1	0	5	3	430-1010	0,23
10	OPG - 07	-	-	-	-	-	-	-
11	OPB - 11	9	0	11	10	8	220-2700	0,35
12	OPK - 14	15	5	8	10	0	340-1990	0,34
13	OPJ - 13	-	-	-	-	-	-	-
14	OPT - 05	9	8	7	8	7	210-2100	0,36
15	OPC - 05	4	4	5	5	9	430-2000	0,32



Hình 6. Hình ảnh điện di mỗi OPD - 05, OPB - 11, OPF - 06, OPS - 11. L: thang chuẩn (DNA Ladder 1000 bp); C1 và C2: đối chứng; D1 và D2: 5 mg/l 2,4-D; D3 và D4: 6 mg/l 2,4-D; N1 và N2: 5 mg/l NAA; N3 và N4: 6 mg/l NAA.

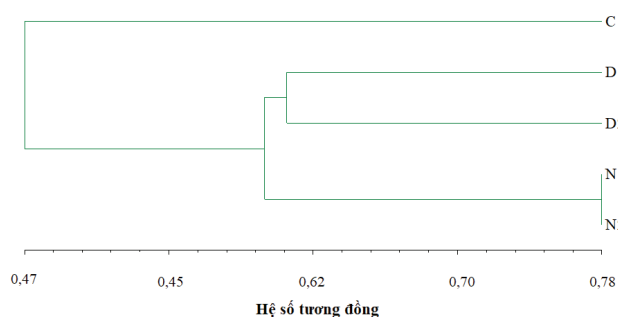
Kỹ thuật RAPD được sử dụng đánh giá sự sai khác ở mức độ phân tử của các thể đột biến được tạo ra từ giống cũ ban đầu, qua phân tích PCR chứng tỏ hiệu quả của phương pháp này có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử DNA để phân biệt giống gốc và các thể biến dị [4]. Kết quả phân tích 10 mẫu hoa hồng triển vọng bằng chỉ thị RAPD của N.M. Thom (2009) [10] cho thấy mức độ

đa hình hay hệ số tương đồng dao động từ 0,52 đến 0,81, chỉ thị RAPD cũng được sử dụng trong xác định độ đa hình và tần số đột biến trên cây ngô [11]. Qua đó cho thấy, kỹ thuật này rất hiệu quả trong phân tích các biến dị di truyền có thể xảy ra trên thực vật sau xử lý đột biến *in vitro* bằng các tác nhân đột biến [4, 9-11]. Với kết quả trong nghiên cứu này, một lần nữa khẳng định chỉ thị RAPD có thể được sử dụng trong việc phát hiện các biến đổi trên thực vật nói chung và trên loài lan Cẩm Cù nói riêng về kiểu hình và kiểu gen.

Từ kết quả bảng 5 và hình 7 cho thấy, các chồi tái sinh từ các NT xử lý 2,4-D 5 mg/l, 2,4-D 6 mg/l, NAA 5 mg/l và NAA 6 mg/l có hệ số tương đồng di truyền khi phân tích bằng 13 chỉ thị RAPD giao động từ 0,455 đến 0,775. Ở mức tương đồng là 0,60, sơ đồ phả hệ có thể chia thành 3 nhóm: nhóm 1 (mẫu đối chứng), nhóm 2 (mẫu xử lý 2,4-D ở nồng độ 5 và 6 mg/l), nhóm 3 (mẫu xử lý NAA ở nồng độ 5 và 6 mg/l). Nhìn chung, các mẫu xử lý cùng tác nhân auxin có hệ số tương đồng cao hơn so với các mẫu còn lại. Đối với NT 5 mg/l NAA, ghi nhận tỷ lệ hệ số tương đồng thấp nhất khi so với mẫu đối chứng là 0,455 (bảng 5). Sự khác biệt này có thể do nhiều điểm đột biến ở vùng không mang gen, gần tâm động hay các đầu mút nhiễm sắc thể. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu về hệ số tương đồng của các mô sẹo cây cọ (*Phoenix dactylifera* L.) cảm ứng bởi 2,4-D 50 và 100 mg/l, Dicamba 10 mg/l, NAA 30 mg/l là từ 0,290 đến 0,900 khi phân tích bằng 4 chỉ thị RAPD [9].

Bảng 5. Hệ số tương quan di truyền của 5 dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 .

	C	D1	D2	N1	N2
C	1,000				
D1	0,474	1,000			
D2	0,469	0,610	1,000		
N1	0,455	0,568	0,582	1,000	
N2	0,493	0,643	0,600	0,775	1,000



Hình 7. Sơ đồ hình cây phả hệ của lan Cẩm Cù xử lý 2,4-D và NAA so với mẫu đối chứng. (C) Đối chứng; (D1) 5 mg/l 2,4-D; (D2) 6 mg/l 2,4-D; (N1) 5 mg/l NAA; (N2) 6 mg/l NAA.

3.5. Đánh giá sự khác biệt của dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 về hình thái bằng phương pháp giải phẫu

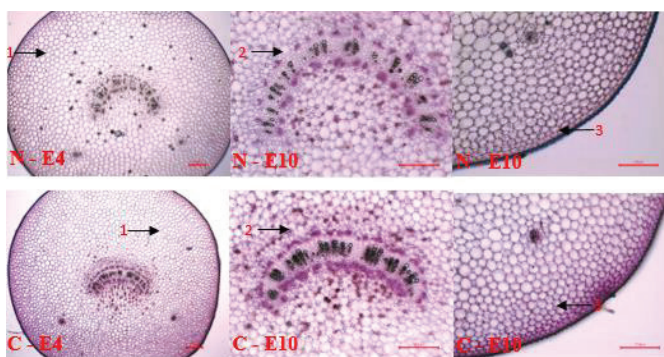
Khảo sát hình thái giải phẫu cuống lá cho thấy có sự khác biệt đường kính cuống lá, số lượng oxalat canxi, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ có sự khác biệt giữa mẫu xử lý đột biến NAA nồng độ 5 mg/l so với mẫu đối chứng (bảng 6). Mẫu xử

lý đột biến NAA nồng độ 5 mg/l cho các chỉ tiêu lớn hơn so với mẫu đối chứng, khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê. Riêng số lượng tinh thể oxalat canxi ghi nhận ở mẫu đối chứng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Sự khác biệt về mặt di truyền thông qua chỉ thị phân tử RAPD và hình thái mô thông qua phương pháp giải phẫu của mẫu NAA nồng độ 5 mg/l so với mẫu đối chứng, chứng tỏ NAA ở nồng độ này hữu hiệu trong chọn và tạo giống lan Cẩm Cù.

Bảng 6. Các chỉ tiêu hình thái giải phẫu cuống lá của các dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 .

NT	Trung bình				
	Đường kính (μm)	Oxalat canxi	Mô bì (μm)	Diện tích bó mạch (μm^2)	Số bó gỗ
C	2299 ^a	57,3 ^a	38,4 ^b	100225 ^a	19,9 ^b
N1	3118 ^a	42,6 ^b	48,2 ^a	261492 ^b	23 ^a
p-value	0,00				
CV (%)	16,6	16,25	12,5	4,95	1,26

C: đối chứng; N1: 5 mg/l NAA. Trên cùng một cột, các số trung bình có cùng ký tự là không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 8. Hình thái giải phẫu cuống lá của các dòng lan Cẩm Cù thể hệ T_0 . (C-E4) Đối chứng vật kính X:4; (C-E10) Đối chứng vật kính X:10; (N-E4) Mẫu xử lý 5 mg/l NAA vật kính X:4; (N-E10) Mẫu xử lý 5 mg/l NAA vật kính X:10; 1: hạt oxalat canxi; 2: bó mạch; 3: mô che chở.

Kết luận

Khảo sát ảnh hưởng của auxin đến khả năng tái sinh chồi trên lan Cẩm Cù ghi nhận tỷ lệ cảm ứng tạo sẹo đạt 100% và kích thước mô sẹo lớn nhất sau khi nhân nhanh là 2,98 cm ở NT bổ sung 5 mg/l 2,4-D. Tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất ở NT 5 mg/l NAA ở thời điểm 95 ngày nuôi cấy và NT 5 mg/l 2,4-D ở thời điểm 225 ngày nuôi cấy. Đồng thời, ở NT 5 mg/l NAA cho kết quả khác biệt lớn nhất với tỷ lệ hệ số tương đồng thấp nhất so với mẫu đối chứng là

0,455. Đường kính cuống lá, chiều dày mô bì, diện tích bó mạch, số lượng bó gỗ ở NT 5 mg/l NAA vượt trội so với NT đối chứng. Riêng số lượng tinh thể oxalat canxi thấp hơn.

Kiến nghị tiếp tục theo dõi các kiểu hình và kiểu gen về hoa và lá trên các mẫu xử lý auxin ở các thể hệ T1, T2, T3... trong điều kiện vườn ươm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G.L.B. Gomes, K.C. Scortecci (2021), "Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms", *Plant Biology*, **23**(6), pp.894-904, DOI: 10.1111/plb.13303.
- [2] A.C. de Castro Marcato, C.P. de Souza, C.S. Fontanetti (2017), "Herbicide 2,4-D: A review of toxicity on non-target organisms", *Water Air Soil Pollut.*, **228**, DOI 10.1007/s11270-017-3301-0.
- [3] N.M. Chon (2004), *Textbook of Plant Growth Regulators*, Can Tho University Publishing House, 21-22pp (in Vietnamese).
- [4] S. Kumar, K.V. Prasad, M.L. Choudhary (2006), "Detection of genetic variability among *Chrysanthemum radimutants* using RAPD markers", *Curr. Sci.*, **90**(8), pp.1108-1113, DOI: 10.13128/ahs-12775.
- [5] S.R. Lakshmi, J.H.F. Benjamin, T.S. Kumar, et al. (2013), "Organogenesis from *in vitro* - derived leaf and internode explants of *Hoya wightii* ssp. *palniensis* - A vulnerable species of Western Ghats", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**(3), pp.421-430, DOI: 10.1590/S1516-89132013000300010.
- [6] S.O. Rogers, A.J. Bendich (1988), "Extraction of DNA from plant tissues", *Plant Molecular Biology Manual*, **6**(1), pp.1-10, DOI: 10.12345/67890.
- [7] N.E. Ahmed (2021), "EgyGene GelAnalyzer4: A powerful image analysis software for one-dimensional gel electrophoresis", *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **19**(18), DOI: 10.1186/s43141-020-00114-x.
- [8] E.J. Rohlf (2000), *NTSYSpc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (version 2.1)*, Exeter Software.
- [9] A. Modi, B. Gajera, N. Subhash, et al. (2017), "Evaluation of clonal fidelity of micropropagated date palm by Random amplified polymorphic DNA (RAPD)", *Methods in Molecular Biology*, **1638**(2), pp.81-89, DOI: 10.1007/978-1-4939-7159-6_8.
- [10] N.M. Thom (2009), *Research on Selecting and Breeding Rose Plants (*Rosa* spp. L.) with High Productivity and Quality for Some Northern Provinces of Vietnam*, Doctoral Thesis in Agriculture, Study Vietnam Institute of Agriculture (in Vietnamese).
- [11] T.T.Thuy, D.T.N. Nga, N.T. Loan, et al. (2020), "Building molecular markers RAPD and ISJ to determine polymorphism and mutation frequency in maize", *Journal Vietnam Agricultural Science and Technology*, **1**(110), pp.46-50 (in Vietnamese).