

TẠO CÁC DÒNG BIẾN DỊ HOA CHUÔNG (*Gloxinia speciosa*) BẰNG TIA GAMMA NGUỒN COBALT 60

Nguyễn Hoàng Quân¹, Dương Hoa Xô¹

TÓM TẮT

Phương pháp gây đột biến nhân tạo bằng bức xạ tia Gamma nguồn Cobalt 60 được thực hiện nhằm đa dạng hóa màu sắc hoa, lá, kiểu hoa và dạng lá của cây hoa chuông. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Liều chiếu xạ gây chết 50% lượng mẫu (LD50) được xác định đối với mô sẹo/chồi non *in vitro* là 97,2 Gy sau 1 tháng; 85 Gy sau 2 tháng, đã xuất hiện nhiều biến dị về màu sắc lá trong giai đoạn *in vitro*. Các dòng biến dị sau khi được chọn lọc *in vitro*, tiếp tục được theo dõi biến dị về kiểu hình hoa ở giai đoạn *ex vitro*. Kết quả đánh giá và sàng lọc *ex vitro* đã phát hiện 6 dòng biến dị có màu sắc và kiểu hình hoa khác biệt so với dòng đối chứng. Kết quả cho thấy cả 6 dòng biến dị đều có khả năng sinh trưởng khỏe, hoa, lá đẹp và thích nghi với điều kiện sản xuất.

Từ khóa: Hoa chuông, *Gloxinia speciosa*, Cobalt 60, chiếu xạ, biến dị

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các nghiên cứu về đột biến do phóng xạ cho thấy trong một giới hạn liều lượng, tần số các đột biến phụ thuộc tuyến tính vào liều lượng chiếu xạ (Vũ Như Ngọc, 2005). Để thu được đột biến mong muốn, người ta cần chiếu xạ ở liều lượng thích hợp để tạo ra nhiều đột biến cho chọn lọc mà không làm chết nhiều cây cũng như làm tăng độ bất thụ của chúng (Lê Xuân Đắc, 2008; Từ Bích Thủy, 1994). Đó là liều lượng tối hạn mà ở mức liều này, số lượng đột biến thu được nhiều nhất, thường được xác định trong khoảng gần liều LD50. Liều LD50 là liều mà khi hấp thụ, 50% số cá thể được xử lý bức xạ bị chết.

Theo công bố chính thức của FAO/IAEA (2012) đã có 3200 giống đột biến trên 214 loài thực vật khác nhau ở 60 quốc gia trên thế giới. Tỷ lệ cây đột biến được công bố nhiều nhất ở châu Á (hơn 60%), trong đó Trung Quốc chiếm hơn 25%. Chiếu xạ trên mô thực vật nuôi cấy *in vitro* giúp khắc phục được các đột biến ở thể khảm khi chiếu xạ hạt giống hoặc cây hoàn chỉnh. Tác giả Đào Thanh Bằng (2006) nghiên cứu chọn giống hoa cúc (Fuji white standard) bằng phương pháp chiếu xạ *in vitro*, thu được 4 loại đột biến khác nhau theo màu sắc và cánh hoa. Lê Văn Hòa (2006) đã ứng dụng công nghệ gây đột biến bằng colchicine và tia gamma trên các mầm phôi tái sinh từ các mô nuôi cấy trong ống nghiệm, nhằm tạo ra các dòng Dendrobium chất lượng cao. Arunee (2007) chiếu xạ tia gamma lên mẫu lá của cây violet, sau đó tái sinh lá được chiếu xạ ở điều kiện tự nhiên và thu được các dòng hoa violet mang biến dị về màu sắc, hình dạng, kích thước hoa, màu sắc lá và độ dày của lá. Lê Quang Luân (2009) đã xác định liều chiếu xạ LD50 của bức xạ gamma Co⁶⁰ đối với mẫu cấy *in vitro* ở cây lan hài và địa lan là 20 - 30 Gy trên PLB cho biến dị nhiều nhất và đã chọn lọc khoảng 100

dòng biến dị tập trung vào 5 dạng sau: Mất sắc tố Chlorophyll, lá ngắn, lá dài, nhiều lá, thay đổi màu bẹ lá (xanh sang tím). Nagatomi khi ứng dụng kỹ thuật chiếu xạ tia gamma đối với cây hoa cúc đã xác định được liều chiếu xạ là 100 Gy đối với ngưỡng gây chết 50% và 150 Gy đối với ngưỡng gây chết hoàn toàn. Số lượng hoa tỷ lệ nghịch với liều lượng chiếu xạ (Nagatomi, 2009).

Cây hoa chuông (*Gloxinia speciosa*) là một trong những loại hoa mới được du nhập vào Việt Nam trong những năm gần đây dùng để trang trí nội thất, văn phòng, khách sạn. Hoa chuông kép được nhiều người tiêu dùng ưa thích do có kích thước lớn, nhiều cánh, lâu tàn, bộ lá to và trái đều. Nghiên cứu "Tạo các dòng biến dị hoa chuông (*Gloxinia speciosa*) bằng tia gamma nguồn Cobalt 60" được tiến hành để chọn, tạo nhiều dòng hoa chuông biến dị có màu sắc đẹp, kiểu hoa mới lạ, hoa lâu tàn, đáp ứng nhu cầu sản xuất và tiêu thụ tại thành phố Hồ Chí Minh và các vùng lân cận.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn mẫu *in vitro*

Cắt đốt thân của cây hoa chuông màu đỏ, mép cánh hoa có viền trắng. Tiến hành khử trùng đốt thân bằng dung dịch Javel theo tỷ lệ 1 Javen (0,5% Cloride): 3 nước, trong thời gian 7 phút. Sau đó cấy mẫu vào môi trường MS trong 2 - 3 tuần để mẫu nảy chồi. Chồi hình thành nhiều lá, cắt lá, gây tổn thương đặt trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L NAA sau 2 tuần để tạo sẹo. Các mô sẹo được chuyển sang môi trường MS để ổn định 3-5 ngày, đảm bảo mẫu vô trùng rồi tiến hành chiếu xạ tia gamma nguồn Cobalt 60.

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

2.1.2. Môi trường nuôi cấy *in vitro*

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) bổ sung 25 g/l sucrose, 7,5 g/l agar, các chất điều sinh trưởng cytokinin (BA), auxin (NAA). Sau đó, hiệu chỉnh pH môi trường từ 5,7 đến 5,8.

2.1.3. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Nhiệt độ phòng nuôi cấy ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng: 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, độ ẩm của phòng nuôi cấy từ 75% đến 80%.

2.1.4. Điều kiện trồng ngoài vườn ươm

Cây con *in vitro* được trồng trên giá thể xơ dừa: tro trấu (với tỷ lệ 1:1), trong điều kiện vườn ươm có hệ thống tưới nhỏ giọt với lượng nước tưới 100 ml/chậu/lần tưới. Chậu có đường kính 12 cm, mỗi chậu trồng một cây. Các chậu được đặt lên giàn và gắn hệ thống tưới nhỏ giọt, ngày tưới 1 - 2 lần. Giai đoạn cây con: Bón NPK 20-10-10, lượng bón 1 kg/1000 lít nước.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định LD50 bằng nguồn chiếu xạ tia Gamma Cobalt 60 lên mô sẹo/ chồi non

Các mẫu mô sẹo/chồi nhỏ mới tái sinh từ mô sẹo được cấy chuyển vào đĩa petri, để ổn định 3 - 5 ngày sau đó tiến hành chiếu xạ tia gamma với các liều xạ khác nhau (30 Gy, 50 Gy, 70 Gy, 90 Gy, 110 Gy, 130 Gy, 150 Gy). Mỗi công thức liều xạ chiếu 350 mẫu. Mỗi liều xạ chiếu 3 lần. Theo dõi tỷ lệ sống chết của mẫu sau chiếu xạ 4 tuần, 8 tuần.

2.2.2. Chọn lọc và nhân dòng cá thể biến dị *in vitro*

Các mẫu mô sẹo/chồi non sau khi chiếu xạ được chuyển vào môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA để

tái sinh cụm chồi. Sau 2 tháng, quan sát và chọn lọc các chồi biến dị kiểu hình lá và tiếp tục nhân nhanh tạo dòng biến dị trong phòng thí nghiệm.

2.2.3. Đánh giá kiểu hình cây hoa chuông biến dị ngoài vườn

Các dòng biến dị *in vitro* đã chọn lọc *in vitro* được nhân dòng, tái sinh, tạo cây hoàn chỉnh và chuyển ra vườn ươm. Mỗi dòng biến dị cho ra 500 cây để đánh giá ngoài vườn ươm. Cây con của dòng biến dị được chuyển ra vườn ươm chăm sóc, trồng vào chậu chứa giá thể xơ dừa: tro trấu (1:1). Giai đoạn từ nụ đến ra hoa: Tiếp tục duy trì lượng dinh dưỡng trên, đồng thời bổ sung thêm phân bón gốc NPK 30-10-10, lượng bón 1g/chậu. Sau khi trồng 65 ngày theo dõi kiểu hình hoa biến dị (Harrison, 1914).

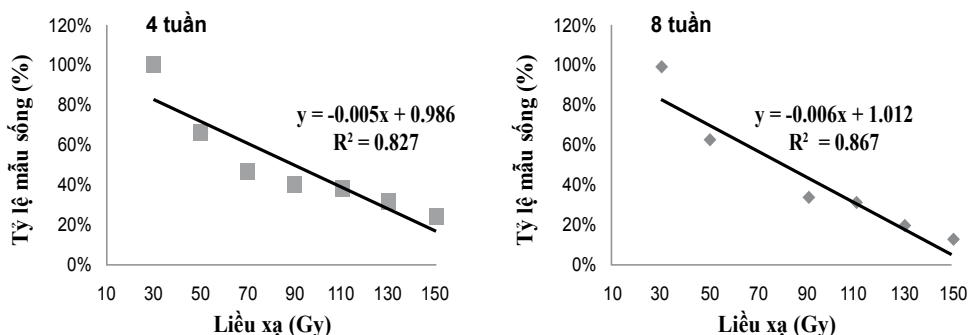
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ 7/2015 đến 8/2016 tại khu nuôi cấy mô và khu nhà màng của Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định LD50 bằng nguồn chiếu xạ tia Gamma Cobalt 60 lên mô sẹo/ chồi non của cây hoa chuông

Kết quả từ đồ thị 1 cho thấy, ở liều xạ 30 Gy không làm ảnh hưởng đến sức sống của mẫu, biểu hiện 100% mẫu sống sau 4 tuần và 8 tuần chiếu xạ. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu sống giảm dần khi liều xạ càng tăng lên, cụ thể: ở liều xạ 97,2 Gy và 85 Gy (dựa theo đồ thị ở hình 1 để xác định LD50) làm cho mẫu chết 50% sau 4 tuần và 8 tuần; ở mức 150 Gy hầu hết mẫu đều bị chết sau 8 tuần chiếu xạ.



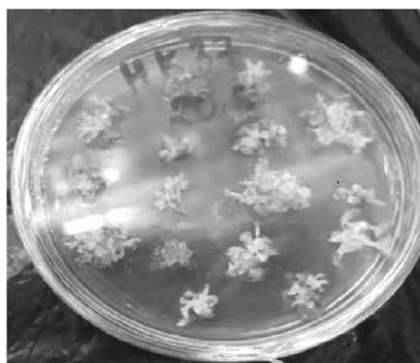
Hình 1. Đồ thị biểu hiện tỷ lệ mẫu sống của giống hoa chuông đỏ viên trắng sau khi chiếu xạ Gamma

3.2. Chọn lọc và nhân dòng biến dị giai đoạn *in vitro*

Khi áp dụng chiếu xạ lên mẫu mô sẹo, tần suất của sự tái sinh chồi từ mô sẹo bị ảnh hưởng rõ rệt nhất, nhiều dạng biến dị hình thái được quan sát

ở thể hệ M1V2 với các đặc tính nghiên cứu (Zhen, 2001b). Đồng thời, số lượng chồi và sự biệt hóa tạo chồi từ mô sẹo ở tất cả liều xạ được sử dụng, việc cảm ứng tạo chồi giảm khi tăng liều xạ tác động

lên mẫu (Zhen, 2001a). Số liệu từ bảng 1 cho thấy, những mẫu hoa chuông qua chiếu xạ đều xuất hiện biến dị. Ở các liều xạ lân cận với LD50, số lượng các biến dị tái sinh xuất hiện nhiều hơn so với các liều xạ còn lại. Ở mẫu đối chứng, các chồi tái sinh không thấy xuất hiện biến dị trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. Đặc biệt, mẫu biểu hiện biến dị mang kiểu hình lá xoắn lại cuộn xuống có tần suất xuất hiện cao nhất đạt 7,7 %₀₀ và mẫu có biến dị mang kiểu hình bạch tạng chỉ xuất hiện 1,04 %₀₀. Dựa vào các biến dị về hình thái đã chọn lọc và nhân nhanh được 6 dòng thể hệ M1V2.



Hình 2. Mẫu đĩa petri hoa chuông chiếu xạ ở 30 Gy

Bảng 1. Các cá thể biến dị ở giai đoạn *in vitro* của hoa chuông đỏ viền trắng

STT	Liều xạ	Số chồi hình thành	Dạng biến dị ở lá	Số cá thể biến dị	Tần suất biến dị (% ₀₀)
1	(ĐC)	850		0	0,000
2	30 Gy	930	Xanh nhạt	3	3,2
			Màu xanh pha hồng	0	0,000
			Xoắn lại, cuộn xuống	3	3,2
			Cuốn tròn	0	0,000
			Bạch tạng	0	0,000
3	50 Gy	950	Xanh nhạt	5	5,260
			Màu xanh pha hồng	2	2,105
			Xoắn lại, cuộn xuống	8	8,42
			Cuốn tròn	1	2,725
			Bạch tạng	0	0,000
4	70 Gy	810	Xanh nhạt	6	7,4
			Màu xanh pha hồng	0	0,000
			Xoắn lại, cuộn xuống	3	3,7
			Cuốn tròn	3	3,7
			Bạch tạng	3	3,7
5	90 Gy	760	Xanh nhạt	2	2,63
			Màu xanh pha hồng	6	7,9
			Xoắn lại, cuộn xuống	7	9,21
			Cuốn tròn	4	5,26
			Bạch tạng	2	2,63
6	110 Gy	550	Xanh nhạt	8	14,5
			Màu xanh pha hồng	2	3,64
			Xoắn lại, cuộn xuống	10	18,2
			Cuốn tròn	2	3,64
			Bạch tạng	0	0,000
7	130 Gy	450	Xanh nhạt	2	4,4
			Màu xanh pha hồng	0	0,000
			Xoắn lại, cuộn xuống	4	8,9
			Cuốn tròn	0	0,000
			Bạch tạng	0	0,000
8	150 Gy	350	Xanh nhạt	2	5,71
			Màu xanh pha hồng	0	0,000
			Xoắn lại, cuộn xuống	2	5,71
			Cuốn tròn	0	0,000
			Bạch tạng	0	0,000

3.3. Khảo sát khả năng sinh trưởng, phát triển và phân lập các dạng biến dị của các cây hoa chuông ở điều kiện vườn ươm

Sau 60 - 65 ngày trồng, cây hoa chuông phát triển thành thực bắt đầu ra hoa đầu tiên. Giai đoạn này

cây có hình dạng và màu sắc của hoa, lá được biểu hiện rõ nhất. Từ đó, căn cứ vào những khác biệt so với cây đối chứng về kiểu hình hoa để chọn lọc các biến dị tốt.

Bảng 2. Đánh giá kiểu hình hoa của các dòng biến dị *ex vitro* của mẫu hoa chuông nghiên cứu

Các biểu hiện biến dị	Số kiểu hình	Kiểu hình
Hoa có màu đỏ nhiều hơn màu trắng, cánh hoa phẳng	2	B,C
Hoa có màu đỏ đậm, trắng rất ít, cánh hoa xoắn xuống	1	D
Hoa có màu trắng và đỏ xen lẫn, có điểm xanh	2	E, F
Hoa có màu trắng xen đều với màu đỏ	2	G,H
Hoa có màu trắng nhiều hơn màu đỏ, màu đỏ tập trung ở giữa	3	I,J
Hoa có màu trắng chiếm tỷ lệ cao hơn màu đỏ, cánh đứng	2	K,L

Với cùng chế độ chăm sóc, lượng phân bón và thời gian chiếu sáng trong nhà màng. Sau thời gian 62 - 65 ngày, các cây hoa chuông bị chiếu xạ và cây đối chứng sẽ xuất hiện hoa nở. Các kiểu hình lá của cá thể biến dị không khác biệt so với đối chứng. Vì vậy, dựa màu sắc và kiểu hình hoa phân lập thành 3 nhóm chính để so sánh, chọn dòng hoa đáp ứng thị hiếu người chơi:

- Nhóm 1: Chủ yếu hoa có màu đỏ, mép cánh hoa có viền nhỏ màu trắng, màu trắng khoảng 10% trong cánh hoa (Hình 3, B, C, D).

- Nhóm 2: Hoa có màu sắc đỏ và trắng pha trộn lẫn nhau (Hình 3, E, F, G, H).

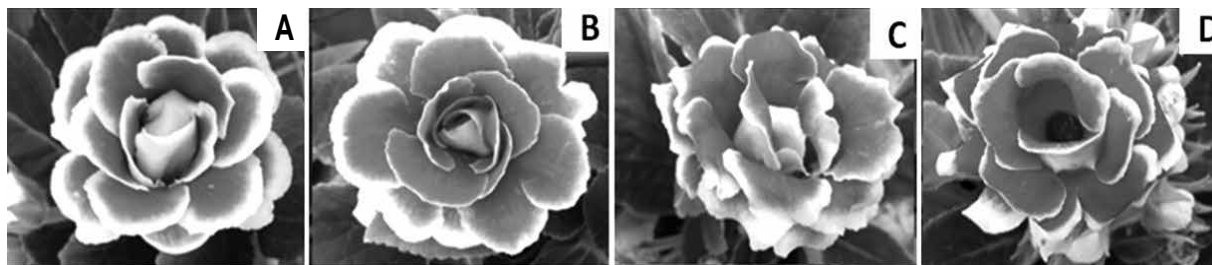
- Nhóm 3: Màu đỏ tập trung ở phần gốc cánh hoa,

phần trên cánh hoa chủ yếu là màu trắng, chiếm gần 90% trên cánh hoa (hình 3, I, J, K, L).

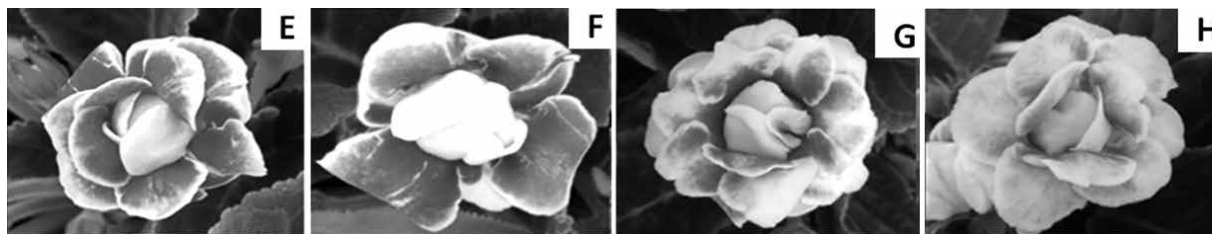
Về kiểu cánh hoa: Dựa trên kiểu hình cánh hoa, cánh hoa phẳng giống mẫu đối chứng, cánh hoa cong và rũ xuống. Cánh hoa có mức độ cong khác nhau giữa các mẫu biến dị và khác biệt so với mẫu không chiếu xạ. Kiểu hình hoa màu đỏ nhạt, không đều giữa màu trắng và đỏ (G, H, I, J) có đường kính hoa thường nhỏ hơn đường kính hoa đối chứng. Kiểu hình hoa viền cánh nhúng và cong xuống (C) và kiểu hình cánh hoa giống hoa đối chứng (B, K, L) cây phát triển tốt, hoa lâu tàn hơn 2 ngày so với đối chứng. Kiểu hình hoa cánh ngoài cùng đốm xanh lá (E, F) có đường kính hoa nhỏ bằng 2/3 so với hoa đối chứng, hoa mau tàn hơn hoa đối chứng.

Bảng 3. Đánh giá về một số tiêu chí của hoa chuông biến dị

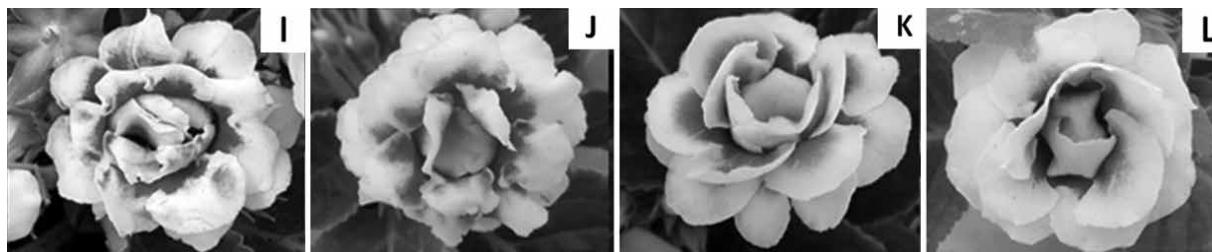
Kiểu hình	Kiểu cánh hoa	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Thời gian ra hoa (ngày)	Độ bền của hoa (ngày)	Đường kính hoa (cm)	Số nụ hoa
A	Đối chứng	65	68	12	7,7	16
B	Giống đối chứng	65	67	14	7,6	15
C	Cong xuống	63	65	11	6,5	14
D	Cong xuống	64	66	12	6,4	15
E	Có đốm xanh lá	66	67	10	5,1	16
F	Có đốm xanh lá	65	68	9	5,2	15
G	Cong xuống	64	68	12	7,3	16
H	Cong xuống	64	68	12	7,2	18
I	Cong xuống, cánh nhỏ, nhiều	66	68	10	7,0	18
J	Cong xuống, cánh nhỏ, nhiều	66	69	11	7,1	17
K	Giống đối chứng	65	68	14	7,8	17
L	Giống đối chứng	65	68	14	7,6	18



Nhóm 1. Cánh hoa có màu đỏ chiếm tỷ lệ nhiều hơn màu trắng (A: đối chứng)



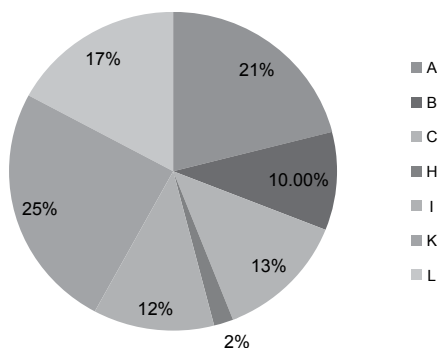
Nhóm 2. Màu đỏ và màu trắng lẫn vào nhau



Nhóm 3. Cánh hoa có màu trắng chiếm tỷ lệ cao hơn màu đỏ

Hình 3. Các dạng biến dị kiểu hình hoa của giống chuông đỏ viền trắng

Dựa vào biến dị kiểu hình hoa, màu sắc cánh hoa, khả năng sinh trưởng của các dòng biến dị được trồng trong điều kiện nhà màng, các dòng này được đánh giá và chọn lọc lại 6 dòng chủ yếu (B, C, H, I, K, L). Các dòng này được khảo sát ý kiến của 100 người yêu thích hoa. Kết quả cho thấy, kiểu hình (K) có số người lựa chọn cao nhất là 25%, tuy nhiên kiểu hình hoa đối chứng vẫn được nhiều người ưa chuộng (21%); Ngoài ra, kiểu hình L cũng được nhiều lựa chọn là 17%.



Hình 4. Tỷ lệ phần trăm yêu thích các kiểu hình biến dị của hoa chuông đỏ viền trắng

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

- Mô sẹo/chồi non hoa chuông đỏ viền trắng *in vitro* sau khi bị chiếu xạ bởi tia gamma nguồn Co⁶⁰ thì liều xạ gây chết 50% sau 1 tháng là 97,2 Gy; sau 2 tháng là 85 Gy.

- Nhiều kiểu hình biến dị *in vitro* xuất hiện ở các liều xạ khác nhau với tần suất khác nhau; trong đó kiểu hình lá xoắn lại, cụp xuống có tần suất cao nhất, cây sinh trưởng tốt ở điều kiện ống nghiệm, còn kiểu hình lá bạch tạng chỉ sống được một khoảng thời gian rồi chết dần.

- Đã đánh giá và chọn lọc được 6 dòng biến dị ngoài vườn sinh trưởng phát triển tốt, hoa lâu tàn, trong đó kiểu hình K phù hợp với thị hiếu của nhiều người chơi hoa. Các biến dị này có kiểu hình cánh hoa, màu sắc hoa khác biệt rất nhiều so với đối chứng, tỷ lệ gam màu đỏ và trắng thay đổi trong cánh hoa của các biến dị, đồng thời cánh hoa có kiểu hình cong, xoắn và cụp xuống.

4.2. Kiến nghị

- Đánh giá về mặt kiểu gene giữa các dòng biến dị bằng chỉ thị sinh học phân tử RAPD, SSR nhằm chọn tạo nguồn gene tốt phục vụ cho công tác lai tạo giống.

- Cần đánh giá và theo dõi các kiểu hình biến dị qua 3 - 4 lần nhân giống vô tính để đảm bảo kiểu hình hoa ổn định về mặt di truyền, không thay đổi qua các thế hệ; từ đó tiến hành công nhận giống hoa chuông mới được tạo ra bằng phương pháp chiếu xạ.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn phòng Thực nghiệm Cây trồng, Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện để thực hiện nghiên cứu này. Xin gửi lời tri ân đến Hội đồng Khoa học của Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã có những góp ý, định hướng để nghiên cứu này được thực hiện chính xác nhất. Đồng thời, cũng xin cảm ơn sự giúp đỡ chân thành và rất nhiệt tình của các bạn sinh viên Trường Đại học Tôn Đức Thắng để hoàn thành tốt các nhiệm vụ thí nghiệm trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đào Thanh Bằng, Nguyễn Phương Đoài**, 2006. Kết quả chọn giống hoa cúc (Fuji white standard) bằng phương pháp chiếu xạ *in vitro*. *Tuyển tập báo cáo Hội nghị Khoa học và công nghệ Hạt nhân toàn quốc lần thứ VI*. NXB khoa học và kỹ thuật: 247- 252.
- Lê Xuân Đắc**, 2008. *Nghiên cứu ứng dụng biện pháp công nghệ sinh học nhằm khắc phục nhược điểm sinh lý cao cây và cảm quang của giống lúa tám*. Luận án tiến sĩ sinh học. Viện Công nghệ Sinh học. Hà Nội.
- Lê Văn Hòa**, 2006. Xác định khả năng gây đột biến giống hoa lan cắt cành (*Dendrobium* sp.) bằng colchicine

và tia gamma. Khoa Nông nghiệp & Sinh học ứng dụng - Trường Đại học Cần Thơ.

- Lê Quang Luân và cộng sự**, 2009. Nghiên cứu tạo dòng hoa địa lan (*Cymbidium*) và lan hài vệ nữ (*Paphiopedilum*) bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp kỹ thuật nhân giống *in vitro*. Trung tâm hạt nhân TP. Hồ Chí Minh.
- Vũ Như Ngọc**, 2005. *Ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong sinh học và nông nghiệp*. Nhà xuất bản Nông nghiệp: 159-174.
- Từ Bích Thủy**, 1994. *Chọn tạo giống đậu nành bằng phương pháp xử lý phóng xạ*. Luận án phó tiến sĩ khoa học nông nghiệp. Đại học Nông lâm TP. HCM.
- Arunee Wongpiyasatid, Tanita Thinnok, Thanya Taychasinpitak, Peeranuch Jompuk, Katarat Chusreeaeom and Siranut Lamseejan**, 2007. Effects of Acute Gamma Irradiation on Adventitious Plantlet Regeneration and Mutation from Leaf Cuttings of African Violet (*Saintpaulia ionantha*). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41: 633- 640.
- Harrison H.C.**, 1914. How to grow tuberous-rooted begonias & Gloxinias.(ed) *Cooperative Extension Publication*.
- Murashige T., Skoog F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol.plant*: 473-497.
- Nagatomi S., Degi K.**, 2009. Mutation Breeding of Chrysanthemum by Gamma Field Irradiation and *In vitro* Culture, Induced Plant Mutations in the Genomics Era. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome, 258-261.
- Zhen H. R.**, 2001a. *In vitro* technique for selection of radiation induced mutants of garlic. *Shanghai Academy of Agricultural Sciences*.
- Zhen H. R.**, 2001b. *In vitro* technique for selection of radiation induced mutants of sweet potato. *Shanghai Academy of Agricultural Sciences*.

Creating mutation lines of bell flower (*Gloxinia speciosa*) by Cobalt-60 gamma ray radiation

Nguyen Hoang Quan, Duong Hoa Xo

Abstract

The application of artificial mutation method by using Cobalt-60 gamma ray radiation was performed to diversify the color of flowers, leaves, flower and leaf style of the bell flower. The results showed that irradiation lethal dose to 50% of samples (LD50) which was determined to callus/ immature buds *in vitro* at 97.2 Gy after one month; 85 Gy after 2 months, appearing much variation in leafy color *in vitro* stage. The variable lines were selected *in vitro* and were continuously observed the flower phenotype *ex vitro* stage. Screening and evaluating results *ex vitro* showed that 6 variable lines had different colour and flower phenotype from that of the control line. Initial results indicated that 6 variable lines had strong growth, beautiful flowers, leaves and were suitable to production condition.

Key words: Bell Flower, *Gloxinia speciosa*, Cobalt-60, irradiation, variation

Ngày nhận bài: 10/6/2017

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Kim Lý

Ngày phản biện: 17/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

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