

NGHIÊN CỨU XỬ LÝ ĐỘT BIẾN *IN VITRO* GIỐNG HOA CÚC TÍM NHẬT BẰNG TIA GAMMA

Lê Nguyễn Lan Thanh,
Nguyễn Thị Hương Lan, Nguyễn Văn Sơn

SUMMARY

In vitro mutagenesis study on *Chrysanthemum morifolium* 'Tim Nhat' variety

Flowers of *Chrysanthemum morifolium* 'Tim Nhat' variety are purple colour and florets are flat spoon shape. Young flower buds cultured on Murashige and Skoog's medium supplement with 0.5 mg/l benzyladenine for shoot formation. *In vitro* internodes with buds were irradiated by γ -radiation (at 5, 10, 15, 20 and 30 Gy). Rooting shoots from γ -irradiated treatments were hardening in the greenhouse and transplanted in the shadehouse for selection. Mutants were obtained at all dose treatments. The mutants have colours from light to dark purple and red-purple, some having flat spoon shaped ray florets similar to the original cultivar, but the different were ray floret structures and size of flowers. Promising mutants were 11 lines (1,5kTN5; 3k59; 3kTN14; 1,5k84; 3k32-1; 1k27-07; 3 kTN12; 0,5k74; 1,5k66; 2k5 and 0,5k89) with new colour and shape different from the original cultivar. Mutation in flower colour was detected from 10 Gy treatment in M1V1 and M1V2 generations. Gamma ray induced flower colour mutant of 1k27-07 line was very attractive colour (light mauve).

Keywords: *In vitro*, 'Tim Nhat'

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo FAO/IAEA (1992), trên thế giới có 523 giống đột biến được tạo ra, trong đó hoa cúc có 187 giống đột biến và chiếm số lượng lớn nhất (Ibrahim, 1999). Phương pháp xử lý đột biến kết hợp nuôi cây *in vitro* đã và đang là phương pháp được áp dụng rộng rãi, mở ra triển vọng to lớn trong cải tạo giống cây trồng, đặc biệt là trên đối tượng hoa và cây cảnh. Nhiều nghiên cứu gần đây có liên quan đến việc nghiên cứu tạo giống hoa cúc đột biến như Datta *et al.* (2005); Datta *et al.* (2001); DaeHoe *et al.* (2003). Ở nước ta, phương pháp chiếu xạ *in vitro* đã được thực hiện; không những tạo được những biến dị quan trọng là vật liệu ban đầu cho quá trình chọn tạo giống (Đỗ Quang Minh và Nguyễn Xuân Linh, 2003; Nguyễn Tiến Thịnh và Lê Văn Thức, 2007) mà còn tạo được các dòng hoa cúc đột biến có triển vọng, bước đầu rất được thị trường ưa chuộng (Đào Văn Bằng và ctv., 2007). Đề tài này được thực hiện nhằm mục đích

tạo giống hoa cúc mới lạ có màu sắc đẹp và thích hợp với điều kiện khí hậu vùng Đồng bằng sông Cửu Long - nơi mà giống hoa cúc được sử dụng trong sản xuất hoa vẫn còn chưa đa dạng về màu sắc, chủ yếu là màu vàng.

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu thí nghiệm

Nụ hoa non của giống cúc Tím Nhật (giống được trồng rất nhiều năm ở làng hoa ven thành phố Mỹ Tho, Tiền Giang) được nuôi cây trên môi trường Murashige and Skoog (MS) có bổ sung 5mg/l BA để kích tạo chồi mới. Sau đó, các chồi này được nhân lên đủ số lượng để làm vật liệu cho thí nghiệm xử lý đột biến. Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 3/2007 đến 12/2008, tại phòng Nuôi cây mô, nhà kính và nhà bóng râm - Bộ môn Nghiên cứu Hoa & Cây cảnh, Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam.

2. Phương pháp thí nghiệm

Bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại đối với thí nghiệm 1 và 2, thí nghiệm 3 áp dụng phương pháp chọn lọc cá thể.

Thí nghiệm 1- Xác định khả năng đột biến trong điều kiện *in vitro*

Thí nghiệm 2- Xác định khả năng đột biến trong điều kiện vườn ươm

Thí nghiệm 3- Chọn lọc cá thể hoa cúc tím Nhật đột biến

Chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây, số lá ở các thời điểm khảo sát, đặc tính hình thái, đặc tính nông học của các cá thể cúc đột biến được chọn lọc.

Các số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình IRRISTAT 3.1

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thí nghiệm 1: Xác định khả năng đột biến trong điều kiện *in vitro*

Ở thời điểm 50, 70 và 100 ngày sau xử lý (NSXL) chiếu xạ, khi liều xử lý chiếu xạ càng cao thì sự gia tăng của chiều cao chồi càng giảm. Ở những giai đoạn sau thì mối tương quan này thể hiện càng rõ (Bảng 1). Ở 100 NSXL, chiều cao chồi cúc *in vitro* đã bị ảnh hưởng khá rõ sau khi xử lý chiếu xạ, chiều cao thấp nhất là nghiệm thức 30 Gy (2,85 cm) so với đối chứng (6,14 cm) và các nghiệm thức còn lại (từ 4,18-5,58 cm).

Bảng 1: Khả năng phát triển của các mẫu cúc *in vitro* đã xử lý đột biến.

TT	Nghiệm thức	50 NSXL		70 NSXL		100 NSXL	
		Cao cây (cm)	Số lá (lá)	Cao cây (cm)	Số lá (lá)	Cao cây (cm)	Số lá (lá)
1	0 Gy (ĐC)	2,00b	5,91b	3,57bc	7,65c	6,13e	12,6a
2	5 Gy	2,73a	7,37a	4,13c	9,45bc	5,58d	13,8ab
3	10 Gy	2,03b	7,14a	3,68bc	9,9abc	4,89c	13,7ab
4	15 Gy	1,72bc	7,54a	3,08b	10,6ab	4,18b	14,3bc
5	20 Gy	1,40bc	7,17a	3,16b	10,3abc	4,27b	15,6c
6	30 Gy	1,18d	6,83a	2,07a	12,4a	2,85a	13,3ab
	CV (%)	19,2	12,5	14,2	12,4	10,9	9,1

Trong cùng một cột, các trị số khác mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan.

Sự gia tăng về số lá trên chồi cũng có khác biệt nhau qua các nghiệm thức xử lý. Tuy nhiên, sự phản ứng rất mạnh mẽ của các chồi cúc khi xử lý chiếu xạ liều cao cho các biểu hiện biến dị như lá nhỏ và đốt khít

hoặc đốt thưa ở mỗi giai đoạn sinh trưởng khác nhau (Bảng 2). Điều này cũng có nghĩa là sự khác biệt về số lá trên cây giữa các nghiệm thức cũng không tuân theo quy luật nào.

Bảng 2: Hình thái và sự sinh trưởng của các cây bị biến dị ở các chiếu xạ

Nghiệm thức	Hình thái và sự sinh trưởng
0 Gy (ĐC)	Cây sinh trưởng bình thường.
5 Gy	Cây chậm sinh trưởng.
10 Gy	Cây chậm sinh trưởng, đốt khít, lá nhỏ.
15 Gy	Cây chậm sinh trưởng, đốt khít, lá nhỏ hơn.
20 Gy	Cây chậm sinh trưởng, đốt khít, lá nhỏ TB, ít dị dạng, xuất hiện khảm ít
30 Gy	Cây rất chậm sinh trưởng, đốt rất khít, lá nhỏ dị dạng, xuất hiện khảm nhiều

Thí nghiệm 2: Xác định khả năng đột biến trong điều kiện vườn ươm

Các cá thể sau xử lý chiếu xạ ở thời điểm 70 ngày sau khi trồng (NSKT), nghiệm thức xử lý với liều chiếu xạ cao là 20 và 30 Gy cho sự gia tăng về chiều cao

cây và số lá trên cây thấp hơn so với đối chứng và các nghiệm thức chiếu xạ khác. Điều này chứng tỏ xử lý với liều chiếu xạ 20 và 30 Gy có ảnh hưởng mạnh đến sự sinh trưởng và phát triển của các cá thể cúc được xử lý chiếu xạ.

Bảng 3: Khả năng sinh trưởng của các cá thể cúc sau khi chiếu xạ ở điều kiện nhà lưới

STT	Nghiệm thức	40 NSKT		70 NSKT	
		Cao cây (cm)	Số lá (lá)	Cao cây (cm)	Số lá (lá)
1	0 Gy (ĐC)	2,85 ^{ab}	8,2 ^a	8,7 ^c	16,5 ^{ab}
2	5 Gy	2,85 ^{ab}	8,1 ^a	5,8 ^{abc}	15,3 ^a
3	10 Gy	3,66 ^b	9,7 ^b	7,9 ^{bc}	18,5 ^b
4	15 Gy	1,74 ^a	7,5 ^a	7,5 ^{bc}	15,1 ^a
5	20 Gy	1,94 ^a	8,5 ^b	4,8 ^{ab}	17,4 ^{ab}
6	30 Gy	2,98 ^{ab}	8,2 ^a	4,1 ^a	15,4 ^a
CV (%)		29,5	10,9	36,7	10,8

Trong cùng một cột, các trị số khác mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan.

Về hình thái, ở liều chiếu xạ 30 Gy được ghi nhận có nhiều phổ biến dị thể hiện rõ rệt qua màu sắc lá (xanh đậm, xanh nhạt, xanh, xanh vàng), lá rộng hoặc hẹp, xẻ thùy nhiều hoặc ít, đặc biệt, có lá với nhiều thể khảm. Trong quá trình quan sát cho thấy, một số thể khảm trên lá tự mất đi khi cây phát triển hoàn thiện.

Thí nghiệm 3: Chọn lọc cá thể đột biến

Sau khi xử lý chiếu xạ với các liều khác nhau, các mẫu cây sống sót được cấy chuyên và nhân nhanh, toàn bộ cây con được chuyển vào môi trường ra rễ trước khi đưa ra vườn ươm để theo dõi sinh trưởng và phát hiện đột biến.

Các liều xử lý chiếu xạ đều tạo ra các biến dị, trong đó xử lý chiếu xạ ở liều 15

Gy và 30 Gy cho thấy có hiệu quả tốt nhất vì đã tạo ra nhiều cá thể biến dị về màu sắc, số lượng cánh hoa và cấu trúc hoa. Trong quần thể cúc với liều xử lý chiếu xạ 15 Gy có các cá thể ưu tú như cá thể 1,5kTN5 có hoa màu tím đỏ, tâm vàng, có sọc trắng, cánh 2 màu; cá thể 1,5k66 có hoa tím đỏ, lá xanh vàng và cá thể 1,5k84 có hoa tím nhạt, hoa to, tâm vàng, cánh to hình muỗng thẳng. Ở quần thể xử lý chiếu xạ liều 30 Gy, các cá thể ưu tú là 3kTN12 với hoa màu tím trung bình, tâm không rõ, cánh hoa có nhiều sọc; cá thể 3kTN14 hoa màu tím đậm, cánh nhiều sọc trắng; cá thể 3k32-1 cho hoa màu tím nhạt, cánh xếp tròn đều, tâm vàng to, lá xanh nhạt và cá thể 3k59 có hoa màu tím hồng tươi, hoa nhỏ, tâm vàng to, cánh không sọc.



Hình 1. Một số dòng đột biến ưu tú

Tuy nhiên, các quần thể cúc ở liều xử lý chiếu xạ 10 Gy và 20 Gy cho phổ biến dị hẹp nhưng mức độ đột biến về cấu trúc, màu sắc hoa thì xuất hiện phổ biến. Sự khác biệt rõ rệt này được ghi nhận giữa cá thể đột biến (cá thể 1k27-07 có hoa màu hoa cà nhạt xen sọc trắng, cá thể 2k5 với hoa có hình dạng cúc thọ, cánh hình muỗng cong xuống, màu tím hồng, trong tím đậm) so với giống gốc. Liều xử lý 5 Gy cũng tạo được thể đột biến nhưng phổ biến dị hẹp, hình dạng và màu sắc hoa ít hấp dẫn. Hầu hết các cá thể đột biến đều có tâm, từ tâm không rõ đến tâm rõ to, màu vàng đậm hoặc vàng xanh (Hình 1).

Như vậy, việc chiếu xạ in vitro đã tạo ra phổ biến dị rất phong phú, nhiều nhất là

biến dị về màu sắc cánh hoa, số lượng cánh hoa và cấu trúc hoa. Về màu sắc, có các màu như tím hoa cà, tím nhạt, tím tươi, tím trung bình, tím đậm, tím đỏ, tím hồng, tím đậm ở viền cánh hay tím hoa cà nhạt và có sọc trắng. Số lượng cánh hoa và hình dạng cánh hoa cũng có sự thay đổi rất lớn, số lượng cánh ít đi, cánh dài hoặc ngắn hơn, cánh thẳng hoặc cong, cánh xếp chặt hoặc xếp thưa.

Trong phạm vi thí nghiệm, các thể đột biến đều được quan sát ở thể hệ M1V1, chỉ có dòng 1k27-07 đã được quan sát qua 2 thế hệ, kết quả cho thấy mặc dù được trồng ở 2 điều kiện không giống nhau nhưng màu sắc và cấu trúc hoa của dòng này vẫn không

thay đổi. Do vậy, đột biến màu sắc và cấu trúc hoa của dòng 1k27-07 là đột biến có tính bền vững nhưng mức độ bền vững này cũng cần khẳng định một cách chắc chắn ở các thế hệ vô tính xa hơn vì theo Nguyễn Tiến Thịnh và Lê Văn Thức (2007) các dạng đột biến bền vững của hoa cúc là ở M1V4; theo Đào Thanh Bằng và ctv. (2007) cho rằng thế hệ M1V8 còn phân ly với tỷ lệ 1% và đến thế hệ M1V12 phát triển thành dòng đột biến thuần về màu sắc hoa.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Giống cúc Tím Nhật đã tạo ra phổ biến bị phong phú về hình dạng, màu sắc thân, lá và hoa qua các liều chiếu xạ tia gamma. Các cá thể cúc đột biến có hình dạng lạ và màu sắc hoa đẹp khác biệt giống gốc được chọn là 11 dòng gồm 1,5kTN5; 3k59; 3kTN14; 1,5k84; 3k32-1; 1k27-07; 3kTN12; 0,5k74; 1,5k66; 2k5; 0,5k89. Dòng 1k27-07 có hoa lạ và đẹp với màu tím hoa cà nhạt hấp dẫn đã được theo dõi qua 2 thế hệ M1V1 và M1V2 vẫn giữ đúng đặc tính của dòng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. DaeHoe, G., Y. ByeongWoo, S. Hisup, P. InSook, H. BongHee, Y. HeeJu, 2003. *Color change in chrysanthemum flower by gamma ray irradiation*. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 44 (6), 1006-1009
2. Datta, S. K., P. Misra and A. K. A. Mandal, 2005. *In vitro mutagenesis - a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum*. Current Science, Vol. 88, No. 1, 155-158
3. Datta, S.K., D. Chakrabarty, A.K.A. Mandal, 2001. *Gamma ray-induced genetic manipulations in flower colour and shape in Dendranthema grandiflorum and their management through tissue culture*. Plant Breeding 120, 91-92
4. Ibrahim, R., 1999. *In vitro mutagenesis in roses*. PhD. Thesis in Applied Biological Sciences-Cell and Gene Biotechnology, University Gent, Belgium.
5. Đỗ Quang Minh và Nguyễn Xuân Linh, 2003. *Kết quả tạo nguồn vật liệu khởi đầu cho chọn tạo giống cúc bằng đột biến thực nghiệm*. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2003. NXB Khoa học & Kỹ thuật Hà Nội, 915-918
6. Đào Thanh Bằng, Phạm Thị Liên, Nguyễn Kim Lý, Lê Thị Liễu, Nguyễn Phương Đoài, Vũ Thị Hằng, Nguyễn Thị Hồng Nhung, 2007. *Nghiên cứu chọn giống ở một số loài hoa thông qua chiếu xạ in vitro*. Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa. NXB Nông nghiệp, 165-174
7. Nguyễn Tiến Thịnh và Lê Văn Thức, 2007. *Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy in vitro trong phân lập đột biến ở cây trồng nhân giống sinh dưỡng*. Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa. NXB Nông nghiệp, 155-163

Ngày nhận bài: 15/3/2012

Người phản biện: GS.TS. Bùi Chí Bửu,
ngày 31/5/2012

Ngày duyệt đăng: 3/12/2012