

TẠO DÒNG CẨM CHƯỚNG GẮM (*Dianthus chinensis*) ĐA BỘI BẰNG XỬ LÝ COLCHICINE *IN VITRO*

Nguyễn Thị Lý Anh*, Nguyễn Thị Thanh Phương, Hồ Thị Thu Thanh,
Lê Hải Hà, Nguyễn Thị Hân

Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: ntlanh@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 16.10.2014

Ngày chấp nhận: 24.11.2014

TÓM TẮT

Colchicine đã được sử dụng thành công để tạo đa bội ở nhiều loài thực vật và đạt hiệu quả cao khi xử lý trong điều kiện *in vitro*. Nghiên cứu này sử dụng colchicine nhằm tạo dòng cẩm chương gắm (*Dianthus chinensis*) đa bội phục vụ công tác chọn tạo giống hoa ở Việt nam. Các thí nghiệm được tiến hành trên giống cẩm chương gắm Tím viên trắng. Vật liệu thí nghiệm là đoạn thân mang mắt ngủ của cây *in vitro* và được xử lý tạo đột biến bằng dung dịch colchicine ở nồng độ từ 0; 0,01; 0,05; 0,1% trong thời gian 24, 48 và 72 giờ. Các dạng đột biến sau xử lý được phân lập theo đặc điểm hình thái trong cả điều kiện *in vitro* và điều kiện vườn trồng. Kết quả cho thấy: Khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,05; 0,1% trong 24 hoặc 48 giờ và ở nồng độ colchicine 0,01, 0,05% trong 72 giờ cho tỷ lệ mẫu đột biến từ 0,87- 12,85% và hiệu quả gây đột biến tạo ra các dạng biến dị có chất lượng cây tốt nhất khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,05 và 0,1% trong 48 giờ. Khi trồng các cây thu được sau xử lý ở điều kiện tự nhiên đã thu được 8 dạng đột biến khác dạng cây đối chứng. Trong đó, hai dạng đột biến D7 và dạng D9 được xác định là hai dạng cẩm chương đột biến đa bội mới ($2n = 4x$) có ưu điểm về hình thái (chiều cao cây, kích thước lá, đường kính hoa, độ bền hoa, độ đậm màu sắc hoa). Hai dạng đột biến đa bội này đã được nhân nhanh *in vitro* để tạo dòng, đánh giá ổn định di truyền trong vụ trồng tiếp theo và đều có ưu thế hơn giống gốc về sinh trưởng, năng suất, chất lượng hoa và tính chống chịu sâu bệnh.

Từ khóa: Cẩm chương gắm, Colchicine, đa bội, đột biến, giống Tím viên trắng.

Development of China Pink (*Dianthus chinensis*) Polyploid Lines via *In Vitro* Treatment with Colchicine

ABSTRACT

Colchicine has been successfully used for *in vitro* treatment for induction of polyploids in many plants with high efficiency. The aim of this study was to generate new polyploid lines of China pink for breeding and selection in Vietnam. The experiments were carried out on the cultivar Tim Vien Trang of China pink (*Dianthus chinensis*). *In vitro* nodal stems were used for treatment with colchicine solution at concentration of 0, 0.01%, 0.05% and 0.1% for 24 hours, 48 hours and 72 hours. The mutant types were isolated based on morphological characteristics in *in vitro* and *in vivo* conditions. The results showed that the ploidy mutation rate was in a range of 0.87% to 12.85% when the explants were treated in 0.05% and 0.1% of colchicine solution for 24 hours and 48 hours and in 0.01% and 0.05% of colchicine solution for 72 hours. The mutants had highest quality from the treatments of 0.05% and 0.1% of colchicine concentration for 48 hours. Among eight different mutant types, the mutant types D7 and D9 carried several superior morphological features such as the plant height, leaf size, flower diameter, flower longevity and color intensity in comparison with original cultivar. These two polyploid lines were cloned *in vitro* for further evaluation of genetic stability.

Keywords: *Dianthus chinensis*, Tim Vien Trang cultivar, colchicine treatment, polyploidy, mutations.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cẩm chướng gấm (*Dianthus chinensis*) có nguồn gốc từ Trung Quốc, được du nhập vào nước ta từ những năm đầu thế kỉ 20. Cây cẩm chướng gấm có thể thích nghi với điều kiện nóng ẩm, sinh trưởng tốt vào mùa hè, màu sắc đa dạng và được trồng trong chậu làm cây cảnh hay trong các bồn hoa lớn trang trí ở những nơi công cộng. Tuy nhiên, cây hoa cẩm chướng gấm có nhược điểm là cây thân bụi, nhỏ yếu rất dễ gãy, hoa bé, cánh mỏng,... nên chưa được phổ biến rộng rãi và giá trị kinh tế không cao. Với phương pháp truyền thống, các vấn đề cải tiến di truyền thường cần rất nhiều thời gian, công sức. Do đó, việc áp dụng các biện pháp công nghệ sinh học để tạo giống cây trồng đang là một công cụ hữu ích cho các nhà chọn tạo giống.

Colchicine đã được sử dụng thành công để tạo ra đa bội trong nhiều loài thực vật và đạt hiệu quả cao khi xử lý trong điều kiện *in vitro* (Watrous & Wimber, 1988; Ali et al., 1992; Ishizaka & Uematsu, 1994; Ganga & Chezhiyan, 2002; Thao, N.T.P. et al., 2003; Hasan & Munqez, 2014). Hướng nghiên cứu này đã được triển khai ở Việt Nam và mới thu được một số kết quả bước đầu đối với cây có múi và cây dưa hấu (Trần Thị Hạnh và cs., 2003; Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Kim Hằng, 2010; Nguyễn Thị Ngọc Trâm và cs., 2012), nhưng phương pháp xử lý đa bội *in vitro* trong chọn tạo giống các cây hoa chưa được quan tâm. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm xác định nồng độ colchicine và thời gian xử lý thích hợp để tạo được dòng cẩm chướng gấm đa bội có triển vọng, phục vụ công tác chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới ở nước ta.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được tiến hành trên giống cẩm chướng gấm (*Dianthus chinensis*) có hoa tím viền trắng. Sử dụng đoạn thân mang mắt ngủ của cây nuôi cấy mô 3 tuần tuổi, có độ dài 0,5 - 0,7cm làm vật liệu thí nghiệm.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nuôi cấy mô tế bào thực vật

Thí nghiệm sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật hiện hành (Gamborg & Phillips, 1995). Môi trường nền là môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962): 6,2 g/l agar, 30 g/l saccarose và 100 mg/l inositol, pH môi trường là 5,8. Môi trường nhân nhanh chồi: MS + 0,5ppm BA + 1,0ppm Ki, môi trường tạo rễ: MS + 0,25ppm αNAA. Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút áp suất 1atm.

Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 25±2°C, ẩm độ 70%, cường độ chiếu sáng 2000lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

2.2.2. Xử lý đột biến bằng colchicine

Ngâm mẫu vào trong môi trường nuôi cấy lỏng có chứa colchicine ở các nồng độ 0; 0,01; 0,05 và 0,1%. Bình ngâm mẫu được đặt trên máy lắc với tốc độ lắc 60 vòng/phút trong khoảng thời gian 24, 48 và 72 giờ. Sau khi lắc tiến hành rửa mẫu 4 lần liên tục bằng nước cất vô trùng trong buồng cấy, mỗi lần rửa mẫu trong thời gian 1 phút. Mẫu cấy sau xử lý được nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh để đánh giá khả năng sống, khả năng tái sinh chồi và sự biến dị hình thái.

2.2.3. Chọn lọc cá thể đột biến sau xử lý

a. Quan sát đặc điểm hình thái

Các mẫu sau xử lý đột biến *in vitro* được nhân nhanh bằng nuôi cấy mô, sau đó đem trồng ngoài điều kiện tự nhiên trong vụ Xuân 2011, 2012 tại nhà lưới (Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam). Sự sinh trưởng phát triển của các dòng cẩm chướng đột biến được đánh giá thông qua các chỉ tiêu: Tỷ lệ sống, chiều cao cây, số lá, số chồi, đường kính thân, đường kính hoa... So sánh các chỉ số thu được của các dòng đột biến với giống gốc để chọn lọc ra những dạng đột biến có triển vọng.

b. Xác định độ bội

- Phương pháp quan sát khí khổng: Lấy lá của các dạng đột biến trồng ở ngoài điều kiện tự nhiên, sau đó tách lấy một lớp biểu bì phía mặt

sau của lá. Đặt lớp mỏng tế bào lên lam kính, nhỏ một giọt nước, đẩy lamên. Đặt lam kính lên kính hiển vi quan sát và chụp ảnh khi khổng ở vật kính có độ phóng đại 100 lần. Làm tương tự với lá của cây đối chứng và so sánh.

- Phương pháp đo diện tích lá: Sử dụng máy đo diện tích lá CI -202 AREA METER. Đo diện tích của tất cả các lá trên cây và tính diện tích trung bình/lá.

- Phương pháp xác định độ bội bằng Flow cytometer: trên máy Partec Ploidy Analyser PA-I, theo Doležel và cs. (1989) có cải tiến: Sử dụng 50mg lá của cây nghiên cứu, đặt trong đĩa petri để trên đá. Thêm 1ml dung dịch A (14,3 mL MgSO₄ lạnh, 15mg dithiothreitol, 300 µL PI stock, 375 µL Triton X100 stock) vào đĩa sau đó cắt nát mẫu bằng lưới dao sắc. Mẫu được lọc qua màng lọc có kích thước 33µm. Ly tâm 15 000 vòng/phút trong 15 đến 20 giây và loại bỏ phần dịch phía trên. Tiếp theo đó, hòa tan lại cặn trong 200µL dung dịch B (3ml dung dịch A, 7,5 µL RNase, 3.0 CRBC) và ủ 15 phút ở 37°C sau đó chạy mẫu trên máy.

2.2.4. Bố trí và theo dõi thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30

mẫu. Các chỉ tiêu đo đếm được tiến hành định kỳ 1 - 2 tuần một lần tùy từng thí nghiệm và giai đoạn phát triển của cây.

2.2.5. Phân tích số liệu

Số liệu thực nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel 2003 và IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá ảnh hưởng của colchicine đến khả năng sống và biến dị của giống cảm chương Trắng viên tím trong điều kiện *in vitro*

Kết quả về tác động của xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian khác nhau đến mẫu cảm chương gắm *in vitro* được trình bày ở bảng 1.

Trong cùng thời gian xử lý, tỷ lệ mẫu sống, tạo chồi giảm dần theo sự gia tăng của nồng độ colchicine. Ở công thức không xử lý và xử lý colchicine 0,01% trong 24 giờ (CT1, CT2, CT5 và CT9), hai chỉ tiêu nêu trên đạt 100%. Trong khi đó, ở các công thức thí nghiệm còn lại đều ghi nhận sự giảm đáng kể khả năng sống và khả năng tạo chồi của mẫu sau xử lý. Hơn thế, khi xử lý trong thời gian dài và nồng độ cao của

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý colchicine *in vitro* đến khả năng sống và biến dị của mẫu sau 4 tuần xử lý

Công thức thí nghiệm	Thời gian xử lý	Nồng độ colchicine (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu biến dị hình thái (%)
CT1	24 giờ	0	100	100	0
CT2		0,01	100	100	0
CT3		0,05	83,33	83,33	20,00
CT4		0,1	66,67	66,67	23,33
CT5		0	100	100	0
CT6	48 giờ	0,01	76,67	76,67	10,00
CT7		0,05	70,00	56,67	16,67
CT8		0,1	63,33	46,66	20,00
CT9		0	100	100	0
CT10		0,01	80,00	63,34	33,33
CT11	72 giờ	0,05	56,67	40,00	23,33
CT12		0,1	46,67	20,00	13,34

Ghi chú: Tỷ lệ mẫu sống, mẫu tạo chồi, mẫu biến dị (%) = (Số mẫu sống, mẫu tạo chồi, mẫu biến dị/tổng số mẫu xử lý) x 100.

colchicine không phải tất cả các mẫu sống đều có thể tạo chồi. Đặc biệt, xử lý colchicine ở nồng độ 0,1% trong 72 giờ (CT12) chỉ còn khoảng 40% số mẫu sống có khả năng tạo chồi. Đồng thời với sự giảm khả năng sống và tạo chồi, ở các công thức thí nghiệm này đều xuất hiện các chồi biến dị. Khi thời gian xử lý là 72 giờ ở tất cả các nồng độ colchicine, tỷ lệ tạo chồi biến dị đạt trên 50% tổng số chồi tái sinh. Nồng độ colchicine 0,01% xử lý trong 72 giờ gây biến dị với tỷ lệ cao nhất (đạt 33,33% số mẫu xử lý), tiếp đến là xử lý ở nồng độ 0,05% trong 72 giờ và 0,1% trong 24 giờ (đều đạt 23,33% mẫu xử lý). Điều đó cho thấy rõ ràng là hiệu quả gây đột biến cho giống cẩm chương gấm Trắng viên tím khi được xử lý colchicine ở nồng độ thấp trong thời gian dài hoặc nồng độ cao trong thời gian ngắn. Theo Lê Duy Thành (2001), phạm vi nồng độ gây hiệu quả của colchicine là 0,1-1,0%, nồng độ thông dụng nhất cho nhiều loại cây trồng là 0,2% và xử lý ở nồng độ cao thời gian ngắn cho hiệu quả hơn khi xử lý ở nồng độ thấp thời gian dài. Điều này đã được Beyene và cộng sự (2013) ghi nhận khi nghiên cứu tạo giống chuối 'Namwa' đa bội thông qua xử lý phôi soma bằng colchicine ở nồng độ (0; 0,3; 0,5; 1,0%) trong thời gian 48, 72 và 96 giờ. Tuy nhiên, trong nghiên cứu xử lý

colchicine *in vitro* cho các cây trồng khác, một số tác giả đạt hiệu quả tạo cây đa bội cao khi sử dụng nồng độ colchicine thấp và xử lý thời gian dài như: xử lý colchicine nồng độ 0,025% trong thời gian 6 ngày cho tỷ lệ cây dưa hấu tứ bội cao nhất là 10% (Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Kim Hằng, 2010); tạo cỏ Brachiaria tứ bội đạt 3,9% khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,1% trong 48 giờ (Carine and Cacilda, 2009). Như vậy, sự đáp ứng khác nhau của các đối tượng nghiên cứu với nồng độ và thời gian xử lý colchicine có thể được quyết định bởi kiểu di truyền của mỗi loại cây.

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của colchicine đến khả năng sống, sinh trưởng, phát triển và biến dị ở điều kiện tự nhiên của giống cẩm chương gấm Trắng viên tím

Tất cả các dạng chồi thu được trong thí nghiệm nêu trên đều được nhân lên qua 3 chu kỳ và đưa sang môi trường tạo rễ. Các cây *in vitro* thế hệ M1V4 sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường ra rễ được đưa ra thích ứng với điều kiện tự nhiên bằng phương pháp thủy canh, sau đó trồng trong nhà lưới có mái che để phân lập các thể biến dị và đánh giá về khả năng sinh trưởng của chúng (Bảng 2 và 3).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý colchicine *in vitro* đến khả năng sống và biến dị của giống cẩm chương gấm Trắng viên tím ngoài tự nhiên (sau trồng 70 ngày)

Công thức thí nghiệm	Thời gian xử lý	Nồng độ col. (%)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ biến dị (%)	Tỷ lệ các dạng cây (%)								
					D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
CT1	24 giờ	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
CT2		0,01	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
CT3		0,05	7,08	92,92	92,92	5,23	0	0	0	0	0	1,85	0
CT4		0,1	1,66	98,34	98,34	0	1,66	0	0	0	0	0	0
CT5	48 giờ	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
CT6		0,01	81,82	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
CT7		0,05	86,36	0,87	99,13	0	0	0	0	0	0	0	0,87
CT8		0,1	81,82	9,85	90,15	0	0	0	0	0,56	9,29	0	0
CT9	72 giờ	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
CT10		0,01	78,33	8,02	91,98	0	0	0	8,02	0	0	0	0
CT11		0,05	75,21	12,85	87,15	0	0	12,85	0	0	0	0	0
CT12		0,1	68,74	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 3. Sinh trưởng và phát triển của các dòng cảm chương gắm thu được sau xử lý colchicine (sau trồng 70 ngày)

Dạng cây	Chiều cao cây (cm)	Số cặp lá/cây (cặp lá)	Số chồi/cây (chồi)	Đường kính thân (cm)	Đường kính hoa (cm)	Đặc điểm biến dị
D1 (ĐC)	19,26	12,57	10,02	0,13	2,49	Không có biến dị
D2	18,50	10,35	8,9	0,15	2,54	Đường kính hoa lớn
D3	19,05	11,29	9,8	0,17	2,31	Cây ít phân chồi, hoa nhỏ, đậm màu, viền trắng rộng
D4	18,74	11,76	11,30	0,18	2,59	Hoa to, màu trắng hoặc tím pha trắng
D5	21,19	11,87	10,80	0,13	2,13	Thân tằm, phân nhánh ít, đường kính hoa nhỏ
D6	18,85	11,05	10,85	0,15	2,20	Nhiều chồi, viền và chân cánh màu trắng, 1/2 cánh ở giữa màu tím đậm
D7	21,60	12,49	9,86	0,20	2,96	Đường kính hoa lớn và màu sắc hoa đậm
D8	19,50	11,50	9,20	0,18	2,65	Ít chồi, thân mập, lá xanh thẫm, hoa to, đậm màu
D9	22,44	12,09	10,50	0,24	3,70	Thân cao, mập, phân chồi ít, hoa rất to, màu sắc hoa đậm

Số liệu ở bảng 2 và 3 cho thấy: Các dạng cây *in vitro* thích ứng tốt với điều kiện tự nhiên, tỷ lệ cây sống rất cao từ 68,74-100%. Theo Ganga và Chezhiyan (2002), hiệu quả của colchicine trong việc tạo ra cây đột biến phụ thuộc vào nhiều yếu tố như môi trường nuôi cấy, loại cây, thời gian và nồng độ xử lý. Trong nghiên cứu này, ở điều kiện tự nhiên, các dạng cây đột biến xuất hiện khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,05; 0,1% trong 24 và 48 giờ hoặc xử lý 72 giờ ở nồng độ colchicine 0,01% và 0,05%. Tỷ lệ mẫu đột biến đạt cao nhất là 12,85% ở công thức xử lý 0,05% colchicine trong 72 giờ và thấp nhất là 0,87% ở công thức xử lý 0,1% colchicine trong 24 giờ. Điểm đáng chú ý là ở các công thức xử lý đã thấy xuất hiện 8 dạng cây (D2 đến D9) mang những đặc điểm biến dị hình thái như màu sắc hoa nhạt hoặc đậm hơn, kích thước hoa lớn hơn, một số dạng thân nhỏ, nhiều nhánh...

Các dạng cây biến dị có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt và có những đặc điểm hình thái khác biệt với cây đối chứng. Trong đó, hai dạng D7, D9 có nhiều đặc điểm hình thái (chiều cao cây, đường kính thân, đường kính hoa) vượt hơn dạng đối chứng và các dạng biến dị khác. Bên cạnh đó, màu sắc hoa của hai dạng D7 và D9 cũng đậm màu hơn dạng đối chứng.

Do đó, hai dạng D7 và D9 được chúng tôi tập trung đánh giá sâu hơn về mức độ bội thể.

3.3. Đánh giá khả năng đa bội của các dòng cảm chương D7, D9

Tiến hành đo diện tích lá và quan sát đặc điểm khí khổng của cây (Bảng 4) cho thấy: Diện tích lá ở cây D1 (đối chứng) là thấp nhất (6,24 cm²/lá), ở cây D7 là 8,3 cm²/lá và diện tích lá ở cây D9 là cao nhất (12,80cm²/lá). Khí khổng ở cây D1 và cây D7 có dạng hình trứng phân bố rải rác, còn cây D9 có dạng hình cầu xếp xít nhau và kích thước khá lớn. Phương pháp kiểm tra sơ bộ dựa trên đặc điểm khí khổng được đánh giá là rất hiệu quả trong việc xác định thể đa bội (Motonobu et al., 1997, Kim & Kim, 2003, Vichiato, 2004) tuy nhiên không nên chỉ sử dụng phương pháp này để kiểm tra mức độ đa bội (Souza and Queiroz, 2004; Madon et al., 2005). Các nghiên cứu về nhiễm sắc thể tăng gấp đôi trong cây *Hedychium muluense* sau xử lý colchicine và oryzalin chứng minh rằng phân tích sự đa bội thông qua phương pháp đo độ bội bằng máy Flow cytometry kết hợp với đếm nhiễm sắc thể là đáng tin cậy hơn so với phương pháp đo đếm khí khổng (Sakhanokho et al., 2009). Phương pháp đo độ bội có thể xử lý một

số lượng lớn mẫu (hàng trăm mẫu) mỗi ngày với kết quả đáng tin cậy do thành phần DNA không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố bên ngoài (Xing et al., 2011). Phương pháp này đã được ứng dụng trên cây cỏ Brachiaria (Pinheiro et al., 2000), Triticum (Kubalakova et al., 2002), Malus (Hofer & Meister, 2010), Jatropha

(Kaewpoo & Te-Chato, 2010), Banana (Pio et al., 2014) và cho kết quả chính xác khi xác định thể đa bội.

Ứng dụng phương pháp đo độ bội bằng máy Flow cytometry cho hai dạng D7 và D9, kết quả cho thấy dạng D9 và D7 đều là các dạng đột biến tứ bội ($2n = 4x$) (Bảng 4 và hình 1).

Bảng 4. Một số chỉ tiêu đánh giá khả năng đa bội của hai dòng D7 và D9

Dạng cây	Diện tích lá TB (cm ² /lá)	Đặc điểm khí khổng	Chỉ số hàm lượng DNA (đo bằng Flow cytometry)
D1 (ĐC)	6,24	Dạng hình trứng, phân bố rải rác.	50
D7	8,30	Dạng hình trứng, phân bố rải rác.	101
D9	12,80	Dạng hình cầu, xếp xít nhau.	102



Cây đối chứng Cây đột biến (0,05% Col - 48h)

Cây dòng D7

Cây dòng D9



Hoa đối chứng

Hoa dòng D9

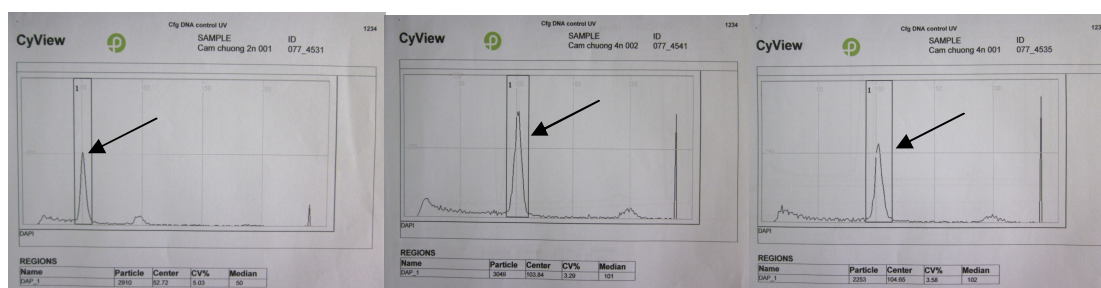
Lá đối chứng

Lá dòng D7

Lá dòng D9

Khí khổng đối chứng

Khí khổng dòng D9



Biểu đồ chỉ số DNA của cây

Biểu đồ chỉ số DNA của cây

Biểu đồ chỉ số DNA của cây

Hình 1. Phân lập và xác định độ bội của hai dòng cẩm chương gắm đột biến D7, D9

3.4. Đánh giá sự ổn định di truyền của các dòng cảm chương đa bội

Các dạng D7 và D9, sau khi được xác định là thể tứ bội được đưa trở lại nuôi cấy *in vitro* để nhân nhanh, tạo dòng với số lượng lớn cá thể và tiếp tục đưa ra trồng vụ tiếp theo ở điều kiện tự nhiên để đánh giá đặc tính sinh trưởng, phát triển và sự ổn định di truyền của các dòng cảm chương gấm đa bội mới này. Kết quả được trình bày ở bảng 5 và 6.

Hai dòng cảm chương D7 và D9 đã có sự khác biệt rõ rệt so với giống đối chứng hoa Tím viên trắng. Các dòng D7, D9 có tất cả các chỉ tiêu theo dõi cao hơn dòng đối chứng từ 1,17-1,75 lần và dòng D7 có sự vượt trội hơn cả về chiều cao cây, số lá trên cây, số lượng chồi, đường kính tán, còn dòng D9 có đường kính thân và kích thước lá lớn nhất. Trong cùng một thời gian theo dõi, dòng đa bội D9 có

số hoa cao nhất (với số lượng hoa đạt 15,33 hoa/đợt/cây, so với D7 là 13,87 hoa và đối chứng là 12,13 hoa) và chất lượng hoa tốt nhất (đường kính hoa, độ bền hoa và độ đậm màu của hoa cao nhất). Sâu bệnh hại trên các dòng cảm chương nghiên cứu chủ yếu là sâu khoang (*Spodoptera litura*) và nấm gây héo vàng (*Fusarium oxysporum*). Theo quan sát và đánh giá, giống đối chứng có tỉ lệ sâu và bệnh hại xuất hiện nhiều nhất, kể đến là dòng D7 và ít nhất là dòng D9. Điều này cũng chứng tỏ dòng cảm chương đã qua xử lý đa bội có sức chống chịu tốt hơn đối với sâu, bệnh hại. Những đặc điểm về sinh trưởng, phát triển và chống chịu bệnh nêu trên của hai dòng D7 và D9 hoàn toàn phù hợp với các đặc trưng điển hình của cây đa bội (Trần Duy Quý, 1997; Lê Duy Thành, 2001) và chứng tỏ sự ổn định di truyền của chúng qua các vụ trồng khác nhau.

Bảng 5. Một số chỉ tiêu sinh trưởng của dòng cảm chương D7 và D9 (sau trồng 70 ngày)

Dòng cây	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/cây)	Dài lá (cm)	Rộng lá (cm)	Số chồi (chồi)	Đường kính thân (cm)	Đường kính tán (cm)
D1 (ĐC)	12,05	8,33	4,59	0,90	5,30	0,29	10,11
D7	15,86	11,77	6,60	1,28	8,00	0,40	13,45
D9	14,56	9,40	7,83	1,58	8,40	0,45	12,26
CV(%)	3,6	2,0	1,8	2,4	2,4	3,7	1,6
LSD _{0,05}	1,15	0,49	0,25	0,09	0,4	0,03	0,44

Bảng 6. Một số chỉ tiêu phát triển và khả năng chống chịu sâu bệnh của các dòng cảm chương D7 và D9 (sau trồng 70 ngày)

Dòng cây	Số hoa/ cây/đợt	Đường kính hoa (cm)	Độ bền hoa (ngày)	Màu sắc hoa	Loại sâu bệnh hại	
					Sâu khoang (%)	Bệnh héo vàng lá (%)
D1 (ĐC)	12,13	2,94	6,02	Tím nhạt	100	83,33
D7	13,87	3,41	7,70	Tím	20,00	63,33
D9	15,33	3,67	8,00	Tím đậm	13,33	50,00
CV(%)	2,9	2,4	3,9			
LSD _{0,05}	0,9	0,18	0,64			

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được nồng độ colchicine và thời gian xử lý thích hợp để tạo đột biến đa bội đối với cẩm chướng gấm (*Dianthus chinensis*) giống Tím viên trắng. Các kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Có thể tạo các dạng đột biến bằng xử lý colchicine *in vitro* ở nồng độ 0,05; 0,1% trong 24 hoặc 48 giờ, hoặc ở nồng độ colchicine 0,01, 0,05% trong 72 giờ với tỷ lệ mẫu đột biến từ 0,87-12,85%.

- Hiệu quả gây đột biến tạo ra các dạng biến dị đa bội có chất lượng cây tốt (có chiều cao cây, kích thước lá, đường kính hoa, độ bền hoa, độ đậm màu sắc hoa và chống chịu sâu bệnh của cây cao hơn hẳn dòng đối chứng) thu được khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,05-0,1% trong 48 giờ.

- Đã chọn tạo được hai dòng cẩm chướng tứ bội triển vọng là D7 và dòng D9. Các dòng tứ bội này có thể dùng làm nguyên liệu cho phát triển giống mới.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin trân trọng cảm ơn chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã tài trợ kinh phí cho việc thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trần Thị Hạnh, Hà Thị Thuý, Đỗ Năng Vịnh (2003). Tạo dòng tứ bội thể ở cam Xã Đoài bằng xử lý colchicine chồi nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Kim Hằng (2010). Tạo cây dưa hấu tứ bội bằng xử lý colchicine *in vitro*. Tạp chí Khoa học, 16a: 234-244.
- Trần Duy Quý (1997). Đột biến cơ sở khoa học và ứng dụng. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 46-61.
- Lê Duy Thành (2001). Cơ sở di truyền chọn giống thực vật, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr. 67 - 97
- Nguyễn Thị Ngọc Trâm, Trần Nhân Dũng và Đỗ Tấn Khang (2012). Đánh giá hiệu quả của colchicine trong chọn tạo giống quýt hồng Lai vùng tứ bội (*Citrus reticulata* Blanco). Tạp chí Khoa học, 23a: 174-183.
- Ali, M., Okubo, H. and Fujieda, K. (1992). Production and characterization of *Solanum amphidiploids* and their resistance to bacterial wilt. Scientia Hort., 49: 181-196.
- Beyene Demtsu, Thunya Taychasinpitak, Sherma Wongchaochant, Benya Manochai (2013). Induced Mutation by Colchicine Treatment of Somatic Embryos in 'Namwa' Banana (*Musa* sp. ABB). International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies, 4(4): 311-320.
- Chakraborti SP, Vijayan K, Roy BN, Qadri SMH (1998). *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cel Rep., 17: 79-803.
- Doležal J, Binarova P, Lucretti S. (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum, 31: 113-120.
- Gamborg OL, Phillips GC (1995). Plant cell, tissue and organ culture: Fundamental methods. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, p. 358.
- Ganga, M., and N. Chezhiyan (2002). Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.), J. Hortic. Sci. Biotechnol., 77(5): 572-575.
- Hasan Abu-Qaoud and Munqez J. Y. Shtaya (2014). The Effect of Colchicine on Adventitious Shoot Regeneration from Cultured Leaf Explants of *Petunia hybrida*. British Biotechnology Journal, 4(5): 531-540.
- Höfer M, Meister A (2010). Genome size variation in *Malus* species. J. Bot., 2010: 1-8.
- Ishizaka, H. and Uematsu, J. (1994). Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton induced through colchicine treatment of ovules *in vitro* and plants. Breed. Sci., 44: 161-166.
- Kaewpoo M, Te-chato S. (2010). Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. J. Agric. Technol., 6(2): 391-400.
- Kim MS and Kim JY (2003). Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture. Proc. Nioc., 1: 37-40.
- Kubalakova M, Vrana J, Cihalikova J, Simkova H, Dolezel J (2002). Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum*). Theor. Appl. Genet., 104(8): 1362-1372.
- Madon M, Clyde MM, Hasmim H, Mohd YY, Mat H, Saratha S (2005). Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. J. Oil Palm Res., 17: 110-123.
- Motonobu E, Kim JS, Inada I (1997). Production and characteristics of chromosome doubling plants of small flowered garden *Chrysanthemum*,

- Dendranthema x Gradiflorum* Ramat. Kitam. cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips. J. Jpn Soc. Hortic. Sci., 65: 528-833.
- Murashige T. and Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Pinheiro AA, Pozzobon MT, Valle CB, Penteado MIO, Caneiro VTC (2000). Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Rep.*, 19(3): 274-278.
- Sajad Y, Jaskani MJ, Mehmod A, Ahmad I, Abas H (2013). Effect of colchicines on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). *Pak. J. Bot.*, 45(3): 125- 58.
- Sakhanokho HF., Rowena KRY, Islam-Faridi KN (2009). Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* R. M. Smith) using colchicine and oryzalin. *Hortscience*, 44(7): 1809-1814.
- Carine Simioni and Cacilda Borges do Valle (2009). Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9: 328-334.
- Souza FF, Queiróz MA (2004). Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. *Hort. Bras.*, 22(3): 516-520.
- Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki, and H. Okubo (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 72: 19-25.
- Vichiato MRM (2004). Indução de tetraploides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobili* LINDL. (Orchidaceae). Thesis, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Xing SH, Xin-Bo G, Quan W, Qi-Fang P, Yue-Sheng T, Pin L, Jing-Ya Z, Guo-Feng W, Xiao-Fen S, Ke-Xuan T (2011). Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J. Biomed. Biotechnol.*, 1: 1-10.
- Watrous, S.B. and Wiiber, D.E. (1988). Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. *Lmdleyana*, 3: 177-183.