

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT RA HOA *IN VITRO* ĐỂ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỘT BIẾN VÀ CHỌN LỌC MÀU SẮC HOA Ở CÂY MẮT MÈO (*TORENIA FOURNIERI* L.) SAU CHIẾU XẠ

Lê Văn Thức¹, Lê Thị Bích Thy¹, Lê Thị Thùy Linh¹, Hoàng Hưng Tiến¹, Đặng Thị Diên¹, Hán Huỳnh Điện¹, Dương Tấn Nhựt²

¹Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 08.5.2014

Ngày nhận đăng: 17.6.2014

TÓM TẮT

Kỹ thuật chiếu xạ gamma kết hợp với nuôi cấy mô và ra hoa *in vitro* đã được áp dụng trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, sự thay đổi tần số biến dị của cây tái sinh từ mẫu là chiếu xạ là 0,67% (liều 30 Gy) và 0,72% (liều 40 Gy) ở thể hệ MV1; sự thay đổi tần số biến dị ở mẫu cây con chiếu xạ là 1,05% (liều 30 Gy) và 1,15% (liều 40 Gy) ở thể hệ MV4, tần số khảm ở thể hệ MV3 và MV4 tương ứng 0,25% và 0,08%. Tổng cộng có 16 cá thể đột biến đã được lựa chọn từ thể biến dị kiểu hình thu nhận được thông qua quá trình sàng lọc bằng kỹ thuật nuôi cấy mô và ra hoa *in vitro*. Ba dòng đột biến triển vọng (G40TP1, G40TP2, G30TL1) có sự ổn định di truyền cao qua nhiều thế hệ nhân dòng *in vitro* và nuôi trồng *ex vitro* so với giống đối chứng. Các dòng đột biến G40TP1, G40TP2, G30TL1 hội đủ điều kiện để phát triển thành giống mới. Các kết quả đạt được cho thấy, việc ứng dụng kỹ thuật ra hoa *in vitro* trong chọn tạo giống đột biến cây hoa mắt mèo (*Torenia fournieri* L.) là một mô hình bổ sung có ý nghĩa thực tiễn và hiệu quả trong việc phân lập và chọn tạo giống đột biến phóng xạ.

Từ khóa: Đột biến, gamma, ra hoa *in vitro*, tần số biến dị, *Torenia fournieri* L.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa mắt mèo (*Torenia fournieri* L.) hay *Torenia* là cây hai lá mầm thuộc họ Scrophulariaceae, có nguồn gốc từ khu vực Đông Nam Á, châu Phi và Madagascar (Yamazaki, 1985). Chúng là cây thân thảo, màu sắc rất đa dạng, dễ chăm sóc và được sử dụng với nhiều mục đích như trồng chậu, trang trí tiểu cảnh hay tạo thành những thảm hoa lớn. *Torenia* có bộ nhiễm sắc thể ($2n = 18$) và bộ gen tương đối nhỏ (171 Mbp) nên nó được xem là đối tượng dễ tạo ra đột biến (Kikuchi *et al.*, 2007). Xét về phương diện chọn giống đột biến phóng xạ, những vấn đề như kích cỡ mẫu, thời gian chọn lọc, công sức, chi phí, bổ sung đột biến tiềm năng luôn là câu hỏi lớn được đặt ra cho các nhà chọn giống. Mặt khác, quá trình chọn lọc đột biến truyền thống thường được tiến hành ngoài đồng ruộng nên việc tìm ra các thể đột biến với bản chất di truyền không chen lẫn khảm (đột biến thuần) thì mất rất nhiều thời gian (Broerjes, Van Harten, 1988). Do vậy, việc kết hợp giữa kỹ thuật nhân nhanh với kỹ thuật chọn lọc đột biến bằng phương pháp ra hoa trong ống nghiệm (hoa *in vitro*) là một trong những hướng nghiên cứu giúp chúng ta có thể phân lập nhanh và làm lộ diện các thể đột biến

thuần khiết dễ hơn. Nghiên cứu về một số yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành hoa *in vitro* ở cây *Torenia* đã được thực hiện bởi Dương Tấn Nhựt *et al.*, (2013) và đề xuất mô hình ra hoa *in vitro* của cây này. Bên cạnh đó, quy trình ra hoa *in vitro* trên đối tượng *Torenia* cũng đã được nghiên cứu hoàn thiện để kết hợp với việc ứng dụng kỹ thuật chiếu xạ gamma (Co^{60}) trong chọn giống đột biến. Việc kết hợp giữa hai kỹ thuật này là một hướng nghiên cứu mới có lợi thế rất lớn để phân lập biến dị và tìm ra những thể đột biến có màu sắc, hình dạng hoa khác lạ ngay trong điều kiện *in vitro*, góp phần làm đa dạng nguồn gen và bổ sung thêm màu sắc mới cho thị trường hoa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu và môi trường nuôi cấy

Vật liệu

Cây *Torenia fournieri* L. *in vitro* 2 tuần tuổi đã ổn định qua nhiều lần cấy chuyển (chiều cao khoảng 4 - 5 cm có 4 mầm nách), các mẫu lá được lấy ở đốt thứ 2 và 3 tính từ gốc (đường kính lá: 1 - 1,5 cm)

được làm nguồn nguyên liệu xử lý đột biến. Nguồn xử lý phóng xạ là nguồn phát tia gamma Co^{60} “Issledavachel”, suất liều 9,8 rad/giây (tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Đà Lạt).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường tái sinh cây trực tiếp từ lá

Các lá sau khi chiếu xạ được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar (Hiền *et al.*, 2007; Anchalee, 2011). Ký hiệu: MT1.

Môi trường nhân cụm chồi để tách khảm

Các đốt mầm nách cây *Torenia* được cấy vào môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar (Hiền *et al.*, 2007). Ký hiệu: MT2.

Môi trường tách cây con

Các chồi nuôi cấy trong môi trường cụm chồi được tách lấy chồi có kích thước khoảng 1 cm và cây chuyển sang môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar (Hiền *et al.*, 2007). Ký hiệu: MT3.

Môi trường ra hoa in vitro

Các cây con nuôi cấy trong môi trường MT2 sau 30 ngày nuôi cấy tách lấy các chồi ngọn với kích thước khoảng 3,5 cm cấy vào môi trường $\frac{1}{4}$ MS có bổ sung 60 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar, nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng với cường độ chiếu sáng $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, sử dụng nắp bình là film nylon có gắn màng Millipore (Millipore Ltd., Nhật Bản; kích thước lỗ của màng 0,5 μm , đường kính 1,8 cm) hoặc nút bông gòn không thấm (Thức *et al.*, 2013). Ký hiệu: MT4.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá khả năng biến dị của cây tái sinh từ mẫu lá ở thế hệ MV_1

Mẫu lá sau khi chiếu chiếu xạ gamma ở liều 30 Gy và 40 Gy được cấy trên môi trường MT1 để tái sinh thành cây. Các cây con tái sinh được tiếp tục cấy chuyển trên môi trường MT3. Cuối cùng, các chồi ngọn được cấy vào môi trường ra hoa MT4 để xác định phổ và tần số biến dị về màu sắc và cấu trúc hoa.

Đánh giá khả năng biến dị của cây con xử lý đột biến được phân lập đến thế hệ MV_4

Mẫu cây con cũng được chiếu xạ gamma liều tương tự (30 Gy và 40 Gy) và được cắt thành các đốt mầm nách cây trên môi trường nhân nhanh MT2.

Sau đó, các chồi hình thành được nhân dòng vô tính trên môi trường MT3 đến thế hệ MV_4 rồi cho ra hoa trên môi trường MT4 để xác định phổ và tần số biến dị về màu sắc và cấu trúc hoa.

Xác định tính ổn định di truyền của các thể biến dị ở thế hệ M_1V_1 đến M_1V_4

Những cá thể biến dị có hình dạng, cấu trúc và màu sắc hoa khác biệt so với giống gốc ở hai loại mẫu chiếu xạ (mẫu lá và cây con) được phát hiện. Những cá thể này sẽ được tách dòng, mã hóa và nhân dòng. Sau đó, kiểm tra tính ổn định di truyền của biến dị từ thế hệ M_1V_1 đến M_1V_4 bằng mô hình ra hoa in vitro trên môi trường MT4.

Xác định tính ổn định di truyền của các thể đột biến ở thế hệ M_1V_3 đến M_1V_4

Các dòng đột biến phân lập đến thế hệ M_1V_4 được tiếp tục nhân dòng vô tính theo như quy trình trong thí nghiệm 2 và tiếp tục đánh giá độ ổn định di truyền đến thế hệ M_1V_8 .

Kiểm tra sự ổn định di truyền của các dòng đột biến trong điều kiện in vitro và ex vitro

Các dòng đột biến có độ ổn định di truyền cao (500 cây/dòng) được nuôi cấy trên môi trường MT3 sau khoảng 15 ngày nuôi cấy các chồi hình thành rễ được đưa ra trồng ngoài vườn ươm (ex vitro) để so sánh độ ổn định di truyền của dòng đột biến ở điều kiện in vitro và nuôi trồng ex vitro.

Điều kiện thí nghiệm và hóa chất sử dụng

Điều kiện in vitro

Các thí nghiệm được giữ ở điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày với cường độ $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và ẩm độ phòng nuôi cấy trung bình 75 - 80%. Tất cả các môi trường được chỉnh pH đến 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C , 1 atm trong thời gian 35 phút. Các mẫu cây được cấy vào bình thủy tinh 500 ml chứa 60 ml môi trường.

Điều kiện ex vitro

Nhiệt độ nhà lưới 18 - 27°C , độ ẩm trung bình 85 - 90%, sử dụng nguồn ánh sáng tự nhiên và có che sáng 40%.

Hóa chất sử dụng

Các chất khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin, hormone được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm thuộc hãng Merck (Đức); agar (Công ty Cổ phần đồ

hợp Hạ Long); đường sucrose (Công ty Cổ phần đường Biên Hòa, Đồng Nai).

Các chỉ tiêu theo dõi và xử lý thống kê

Chỉ tiêu theo dõi

Chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều dài lá (mm), đường kính lá (mm), chiều dài đốt thân (mm), số rễ/cây, chiều dài rễ (mm), tỷ lệ sống sót (%), tỷ lệ phân ly màu hoa (%), kích thước hoa (mm), số nụ hoa/cây, màu sắc và cấu trúc hoa, tần số biến dị (%), tần số khảm (%), phổ biến dị. Kết quả thí nghiệm được ghi nhận sau 30, 45 và 60 ngày nuôi cấy.

Xử lý thống kê

Số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010 và phần mềm SPSS 16.0 (SPSS Inc. Headquarters, United States) bằng phép thử Duncan ở mức ý nghĩa tương ứng $P < 0,05$ (Duncan, 1995).

Tính toán tần số biến dị

Tần số biến dị được tính toán theo công thức:

$$F = \frac{M}{N}$$

Trong đó: M: Số lượng cá thể đột biến, N: Số lượng cá thể xử lý đột biến.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng biến dị của cây tái sinh từ mẫu lá ở thể hệ MV₁

Sau khi xác định được liều bức xạ tác động lên giá trị LD50 (Lethal dose 50%) đối với mẫu lá và mẫu cây con chiếu bức xạ gamma nằm trong khoảng liều 30 Gy và 40 Gy. Theo Broerjes, Van Harten (1988) thì giới hạn liều có thể sử dụng để gây tạo đột biến là liều LD50 $\pm 20\%$ (có nghĩa là có thể chọn liều trong khoảng giới hạn thấp hơn hoặc cao hơn 20% so với liều LD50 điều được), do đó, trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng mức liều 30 Gy và 40 Gy để chiếu mẫu, các mẫu lá sau khi chiếu được nuôi cấy tái sinh thành cây trực tiếp trên môi trường MT₁; các cây con tái sinh được chuyển vào môi trường MT3. Sau đó, các chồi ngọn được cấy vào môi trường ra hoa MT4 để xác định phổ và tần số biến dị. Kết quả cho thấy, sự xuất hiện phổ biến dị rất đa dạng, ở liều 30 Gy xuất hiện 43 cá thể biến dị trong tổng số 6.418 cây tái sinh, tương tự, liều 40 Gy có 46 cá thể biến dị trong tổng số 6.389 cây tái sinh (Bảng 1). Điều này cho thấy, loài *Torenia fournieri* L khá nhạy cảm với tác nhân phóng xạ, tần số xuất hiện biến dị ở liều 30 Gy và 40 Gy lần lượt là 0,67% và 0,72% (Bảng 1). Kết quả này cũng gần với kết quả của Đào Thanh Bằng *et al.*, (2007) khi xử lý Co⁶⁰ trên cây hoa cúc (*Chrysanthemum* sp.) và kết quả của Valerie *et al.*, (2011) trên cây *Torenia hybrid*. Về cơ sở lý thuyết, lợi thế lớn nhất khi xử lý bức xạ trên mẫu lá và mẫu mô sẹo là không cần phải phân lập qua nhiều thế hệ như mẫu cây con, vì mẫu lá và mẫu mô sẹo tái sinh trực tiếp từ một tế bào, nếu như tế bào tái sinh bị tác động bởi phóng xạ thì sẽ thu được đột biến thuần ngay ở thế hệ MV₁, mà không cần phải phân lập qua ít nhất đến thế hệ MV₄ như mẫu cây con (Thinh *et al.*, 2000; Wiroaporn *et al.*, 2011).

Bảng 1. Ảnh hưởng của bức xạ gamma lên sự xuất hiện biến dị trên các cây tái sinh từ mẫu lá nuôi cấy *in vitro* ở thể hệ MV₁

Các kiểu biến dị	Liều chiếu bức xạ gamma		
	Đ/C (0 Gy)	30 Gy	40 Gy
Màu sắc hoa	0	16	15
Biến dị cấu trúc	0	3	4
Kích thước hoa	2	9	12
Cây phát sinh cành nhánh	0	3	4
Biến dị diệp lục (bach tạng)	0	1	3
Hình thái ngọn bất thường (còi cọc, sinh trưởng chậm, đa thân)	0	10	6
Dạng lá (lá thuôn dài và lá nhỏ)	0	1	2
Tần số biến dị (%)	0	0,67	0,72

Ghi chú: Số liệu được ghi nhận trong tổng số 6.418 cây ở liều 30 Gy và 6.389 cây ở liều 40 Gy.

Khả năng biến dị của cây con xử lý đột biến được phân lập đến thế hệ MV_4

Phần lớn biến dị mất đi sau một vài thế hệ nhân vô tính và chỉ một vài biến dị có khả năng di truyền ổn định qua nhiều lần cấy chuyển (Broerjes, Van Harten, 1988). Trong nghiên cứu này, các mẫu cây con sau khi xử lý với bức xạ gamma được phân lập qua bốn thế hệ (từ MV_1 đến MV_4) và chuyển vào môi trường ra hoa *in vitro* để đánh giá tác động của bức xạ lên quá trình phát sinh hình thái. Số lượng cá thể biến dị khi chiếu xạ cây con cao hơn so với cây tái sinh từ chiếu xạ mẫu lá (tương ứng: liều 30 Gy có 58 cá thể biến dị và liều 40 Gy có 65 cá thể biến dị trong tổng số cá thể được nhân dòng lần lượt là 5.742 cây và 5.652 cây) (Bảng 2). Hiện tượng khảm (chủ yếu là khảm lá và thân), nhưng tần số rất thấp (tần số khảm ở đời MV_1 và MV_4 lần lượt là 0,25% và 0,08%). Tần số xuất hiện

biến dị ở liều 30 Gy là 1,05% và ở liều 40 Gy là 1,15% (Bảng 3).

Bức xạ gamma tác động rõ lên sự sinh trưởng và ra hoa ở thế hệ MV_4 , thể hiện qua chiều cao cây, số lá/cây và chiều dài rễ có sự khác biệt đáng kể về phương diện thống kê so với đối chứng (Bảng 3). Phổ biến dị về hình thái lá, thân, kích thước, cấu trúc và màu sắc hoa rất phong phú, nhiều nhất là biến dị về màu sắc hoa. Chồi ngọn và cấu trúc hoa cũng có sự thay đổi rất khác biệt so với đối chứng (Bảng 2). Kết quả này chỉ ra rằng, phương pháp phối hợp giữa chiếu bức xạ gamma với kỹ thuật tạo cụm chồi *in vitro* là hiệu quả trong việc phân lập vùng đột biến ở hoa *Torenia* và đánh giá tần số đột biến thông qua mô hình ra hoa *in vitro* cũng là một lợi thế rất lớn giúp chọn lọc đột biến nhanh và triệt để hơn.

Bảng 2. Ảnh hưởng của bức xạ gamma lên sự xuất hiện biến dị của cây con nuôi cấy *in vitro* ở thế hệ MV_4

Các kiểu biến dị	Liều chiếu bức xạ gamma		
	Đ/C (0 Gy)	30 Gy	40 Gy
Màu sắc hoa	0	20	14
Biến dị cấu trúc	0	5	10
Kích thước hoa	3	15	12
Cây phát sinh cành nhánh	0	3	4
Biến dị diệp lục (bạch tạng)	0	5	7
Hình thái ngọn bất thường (còi cọc, sinh trưởng chậm, đa thân)	0	6	11
Dạng lá (lá thuôn dài và lá nhỏ)	0	4	7

Ghi chú: Số liệu được ghi nhận trong tổng số cá thể 5.742 cây ở liều 30 Gy và 5.652 cây ở liều 40 Gy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của bức xạ gamma lên sự sinh trưởng, phát triển và tần số biến dị của cây con *in vitro* ở thế hệ MV_4

Liều gamma	Số lá/cây	Chiều cao cây (mm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (mm)	Số nụ hoa/cây *ns	Tần số biến dị (%)
ĐC (0 Gy)	10,50±0,4b	94,73±0,8a	10,61±1,6a	53,67±2,1a	2,76±0,6	0,0
30 Gy	14,30±0,2a	54,26±1,1b	8,53±1,5b	43,13±2,3b	2,50±0,3	1,01
40 Gy	15,60±0,4b	60,6±0,9b	8,96±1,3b	40,25±2,1b	2,50±0,7	1,15

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy $P < 0,05$ (Duncan's test), các số sau dấu ± là độ lệch chuẩn của các lần lặp; *ns: sự khác biệt không có ý nghĩa (non-significant difference); số liệu được ghi nhận sau 45 ngày nuôi cấy.

Xác định tính ổn định di truyền của các thể đột biến ở thế hệ M_1V_1 đến M_1V_4

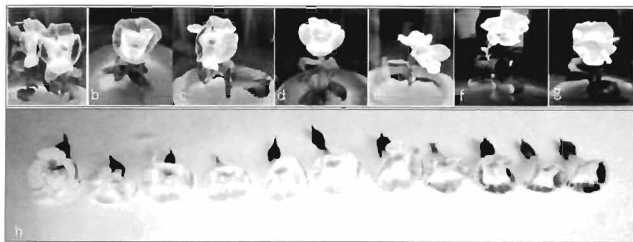
Sau khi xác định được những cá thể biến dị có hình dạng, cấu trúc hoặc màu sắc hoa khác biệt so với giống gốc, những cá thể này sẽ được tách dòng, mã hóa và nhân dòng theo quy trình tách phân lập

đột biến và kiểm tra tính ổn định di truyền của các biến dị từ thế hệ M_1V_1 đến M_1V_4 bằng mô hình ra hoa *in vitro* trên môi trường MT4. Mẫu sau khi chiếu xạ được phân lập bằng cách tái sinh cây trực tiếp (đối với mẫu lá) và nhân cụm chồi từ MV_1 đến thế hệ MV_4 (đối với mẫu cây con) nên việc tạo ra thể khảm lá rất ít và hầu như không còn thể khảm khi

phân lập đến thế hệ M_1V_3 . Kết quả đánh giá cho thấy, dòng hoa màu trắng đã ổn định màu sắc có tỷ lệ phân ly rất thấp chỉ khoảng 1% ở thế hệ M_1V_4 . Trong khi đó màu hoa 4 mỗi màu tím xen lẫn vàng có tỷ lệ phân ly 12,73% cho ra loại hoa có màu vàng, màu tím và màu vàng nhạt.

Như vậy, các thể đột biến mang các tính trạng về sự thay đổi màu sắc cánh hoa, phổ đột biến màu sắc gồm những dòng đột biến màu trắng, màu trắng phớt tím, màu hồng nhạt, màu vàng nhạt, màu vàng đậm, 4 mỗi màu tím, 4 mỗi màu tím xen lẫn vàng có độ ổn định khác nhau (Hình 1). Điều này có thể giải thích, trong quá trình phân chia tế bào, có thể một loạt các đột biến sẽ được tạo ra hình thành phổ đột biến khác nhau nhưng phụ thuộc vào vị trí của tế bào đột biến và kích thước của mô bị đột biến, đột biến khảm

cũng có thể xuất hiện nếu như hơn một tế bào ở mô sinh dưỡng xảy ra đột biến khác nhau (IAEA, 2004; Nguyễn Tiến Thịnh, Lê Văn Thúc, 2007). Hoa 4 mỗi màu tím xen lẫn vàng là loại đột biến khảm có hai màu vàng và tím trên cùng một bông hoa, do đó dễ xác định độ ổn định của tính trạng cần nhân dòng đến các thế hệ xa hơn. Hoa 4 mỗi màu tím có tỷ lệ phân ly đời M_1V_4 là rất thấp 0,85%, điều này cho thấy dòng hoa 4 mỗi màu tím có độ ổn định di truyền cao. Những dòng có tỷ lệ phân ly cao sẽ được tiếp tục nghiên cứu phát hiện những thể đột biến mới, chọn lọc, làm thuần, đánh giá và nhân dòng đột biến triển vọng. Còn đối với những dòng có độ ổn định cao (tức tỷ lệ phân ly tính trạng thấp) sẽ được tiếp tục khảo nghiệm để sản xuất dòng đột biến ưu việt phục vụ trong công tác chọn giống.



Hình 1. Phổ đột biến về màu sắc hoa Torenia ở thế hệ từ M_1V_1 đến M_1V_4 . a. giống gốc, b. hoa đột biến 4 mỗi màu tím xen lẫn vàng (40 Gy ở thế hệ M_1V_1 , từ mẫu cây con), c. hoa đột biến tím nhạt (30 Gy ở thế hệ M_1V_1 , từ mẫu lá), d. hoa đột biến trắng phớt tím (30 Gy ở thế hệ M_1V_1 , từ mẫu cây con), e. hoa đột biến phớt hồng (40 Gy ở thế hệ M_1V_1 , từ mẫu cây con), f. hoa đột biến trắng chấm vàng (30 Gy ở thế hệ M_1V_1 , từ mẫu lá), g. hoa đột biến trắng (40 Gy ở thế hệ M_1V_1 , từ mẫu cây con); h. phổ đột biến màu sắc hoa ở thế hệ M_1V_1 từ mẫu cây con

Xác định tính ổn định di truyền của các thể đột biến ở các thế hệ M_1V_3 đến M_1V_8

Đột biến đơn chỉ xuất hiện một loại đột biến trên một bông hoa, đối với màu sắc thì chỉ có một loại màu sắc trên một bông hoa. Việc chọn lọc, phân lập những thể đột biến đơn và đột biến khảm trong quần thể đột biến có vai trò quan trọng trong nghiên cứu chọn tạo giống cây có hoa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu được 16 thể đột biến có sự khác biệt về màu sắc và cấu trúc so với giống gốc, các thể đột biến này đã được ký hiệu dòng và xác định tính ổn định di truyền. Tuy nhiên, mỗi một thể đột biến thì sự ổn định tính trạng qua các thế hệ nhân dòng cũng rất khác nhau.

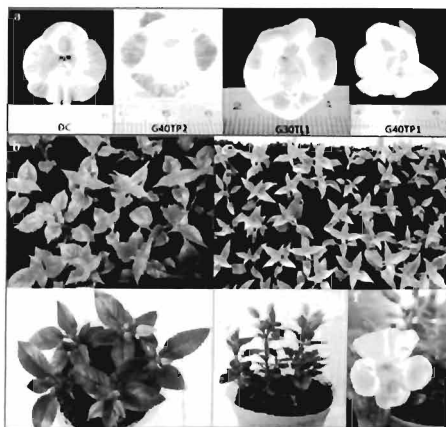
Trong đó, một số dòng đột biến có tính ổn định cao như: hoa màu trắng chấm vàng (có nguồn gốc từ chiếu xạ mẫu lá ở liều 30 Gy, được ký hiệu là dòng G30TL1), hoa màu trắng (chiếu xạ cây con ở liều 40 Gy, ký hiệu là dòng G40TP1), hoa 4 mỗi tím (chiếu xạ cây con ở liều 40 Gy, ký hiệu là dòng G40TP2) và cây có màu vàng toàn thân (chiếu xạ cây con ở liều 40 Gy, ký hiệu là dòng G40TP4) đều có tính ổn định di truyền qua các thế hệ phân lập, các dòng này khi phân lập đến thế hệ M_1V_7 thì hoàn toàn không có sự phân ly về tính trạng, chứng tỏ những tính trạng thay đổi màu sắc hoa của các dòng này có sự ổn định cao (Bảng 4). Do đó, có thể kết luận tính trạng màu sắc hoa của ba dòng (G40TP1, G40TP2, G30TL1) là

những dòng đột biến ổn định. Để kiểm chứng cho tính ổn định di truyền, chúng tôi lấy các mẫu lá từ bốn dòng đột biến trên cây vào môi trường tái sinh cây (MT1) nhằm kiểm tra độ ổn định di truyền của biến dị. Kết quả thu được cho thấy, các cây con sau khi tái

sinh từ mẫu lá được chuyển vào môi trường nhân cây và cho ra hoa trên môi trường MT4, tất cả hoa hình thành đều có độ ổn định di truyền giống như dòng đột biến ban đầu. Điều này khẳng định các dòng đột biến này ổn định tuyệt đối (Bảng 4, Hình 2a).

Bảng 4. Tỷ lệ phân ly kiểu hình của các dòng đột biến ở thế hệ M_1V_3 đến M_1V_5

Mã số dòng đột biến	Màu sắc và cấu trúc hoa	Tỷ lệ phân ly thế hệ M_1V_3 (%)	Tỷ lệ phân ly thế hệ M_1V_4 (%)	Tỷ lệ phân ly thế hệ M_1V_5 (%)	Tỷ lệ phân ly thế hệ M_1V_5 (%)
ĐC	Hoa 3 môi màu tím (đối chứng)	0	0	0	0
G40TP1	Hoa màu trắng	0	0	0	0
G40TP2	Hoa 4 môi màu tím	0,47	0,20	0	0
G30TP3	Hoa 4 môi màu tím xen lẫn vàng	10,25	7,69	5,20	3,06
G40TP4	Cây màu vàng toàn thân	1,9	0,5	0	0
G30TL1	Hoa màu trắng chấm vàng	0,50	0,35	0	0
G30TL2	Hoa màu tím nhạt	12,60	5,20	3,47	2,00
G30TL3	Hoa có nhị tách rời	50,60	35,32	25,09	13,51



Hình 2. Đồng Torenia đột biến trồng ở điều kiện *ex vitro*. a: hoa đối chứng và các dòng đột biến thuần; b: cây con giống đối chứng; c: cây con dòng G40TP1; d: số lượng nụ hoa hình thành của dòng G40TP2; e: dòng G30TL1 nở hoa; f: cận cảnh màu sắc hoa của dòng G30TL1.

Như vậy, từ giống gốc là 3 môi màu tím khi bị tác động bởi tia gamma thì phổ màu tím có khuynh hướng

nhạt dần và một số cá thể có hoa hoàn toàn 4 môi màu trắng. Đột biến về số lượng cánh hoa ở loài Torenia này

xuất hiện rất thấp, chứng tỏ hoa *Torenia* có độ ổn định cao về số lượng cánh hoa, điều này có thể thấy ngoài tự nhiên hoa *Torenia* có rất nhiều màu sắc nhưng số lượng cánh hoa thường không bị thay đổi, chỉ một số ít có sự thay đổi về cấu trúc nhị hoa và kích thước cánh hoa.

Kiểm tra sự ổn định di truyền của các dòng đột biến ở điều kiện *in vitro* và *ex vitro*

Tổng số 500 cây của ba dòng (G40TP1, G40TP2, G30TL1) được đưa ra vườn ươm để trồng khảo nghiệm nhằm đánh giá và so sánh mức độ ổn định di truyền giữa những cây nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* và nuôi trồng ở điều kiện *ex vitro*, các cây được trồng trên giá thể đất mùn trong các chậu nhựa, chế độ tưới 2 lần/ngày vào lúc sáng sớm và chiều mát, tưới dung dịch dinh dưỡng (%MS) mỗi tuần/lần. Số liệu thu được ở bảng 5 cho thấy, giữa các dòng có tỷ lệ sống sót không chênh lệch nhiều so với giống đối chứng, bộ rễ phát triển mạnh, cây xanh tốt, sinh trưởng, phát triển đồng đều và ít bị nấm bệnh. Chỉ tiêu về chiều cao cây giữa các dòng trong cả hai điều kiện không có sự chênh lệch đáng kể, chỉ riêng dòng G40TP2 có chiều cao thấp hơn so với các dòng còn lại (*in vitro*: 6,47 cm và *ex vitro*: 9,50 cm). Bên cạnh đó, chiều dài đốt thân của dòng G40TP2 cũng ngắn hơn so với giống đối chứng và dòng G40TP1 và G30TL1 (Bảng 5).

Riêng đối với dòng G40TP1 có một sự khác biệt rất rõ về cấu trúc lá, ở dòng này lá thuần dài và viền lá có hình răng cưa rất rõ, đường kính lá cũng nhỏ hơn so với giống gốc (*in vitro*: 8,35 mm so với 13,50 mm; *ex vitro*: 11,33 mm so với 15,26 mm). Ngoài ra, chỉ tiêu về số nụ hoa/cây ở dòng G40TP2 cao hơn so với giống gốc (*in vitro*: 3,30 nụ/cây và *ex vitro*: 4,29 nụ/cây).

Trong hai điều kiện *in vitro* và *ex vitro* thì kích thước hoa không có sự khác biệt đáng kể về phương diện thống kê học. Xét về tỷ lệ phân ly màu sắc hoa cho thấy mức độ thuần của các dòng đột biến là tương đối ổn định và không có sự phân ly về màu sắc rõ rệt, riêng dòng G30TL1 trong điều kiện *in vitro* không có sự phân ly màu sắc hoa nhưng khi trồng ngoài vườn ươm thì sự phân ly xuất hiện với tỷ lệ rất thấp và không đáng kể (0,15%), điều này có thể là do ở ngoài vườn ươm cây chịu tác động của những yếu tố bất lợi từ môi trường, cùng với điều kiện ngoài vườn ươm không đảm bảo tiêu chuẩn kỹ thuật nên phần nào cũng ảnh hưởng. Như vậy, xét tổng thể các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của các dòng đột biến thì các dòng này có độ ổn định cao. Kết quả này minh chứng rằng, sử dụng kỹ thuật nhân giống *in vitro* và ra hoa *in vitro* áp dụng trong chọn lọc đột biến hoa *Torenia* là thực sự hiệu quả.

Bảng 5. Đặc điểm hình thái của các dòng đột biến và giống đối chứng ở điều kiện *in vitro* và *ex vitro*.

Mã số dòng đột biến		ĐC	G40TP1	G40TP2	G30TL1
Các chỉ tiêu theo dõi	ĐK				
Tỷ lệ sống sót (%)	<i>In vitro</i>	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0
	<i>Ex vitro</i>	87,47±1,5a	86,41±2,1a	85,31±1,8a	81,15±1,3b
Chiều cao cây (cm)	<i>In vitro</i>	8,92±1,3a	8,73±1,5a	6,47±1,3b	8,65±1,8a
	<i>Ex vitro</i>	12,35±1,9a	11,98±2,3a	9,50±2,1b	12,49±1,6a
Số rễ/cây	<i>In vitro</i>	18,67±0,7 ^{ns}	17,23±1,2 ^{ns}	19,11±0,9 ^{ns}	18,35±1,2 ^{ns}
	<i>Ex vitro</i>	14,25±1,6a	11,79±1,8b	13,08±2,1a	12,73±1,5b
Đường kính lá (mm)	<i>In vitro</i>	13,50±0,6a	8,35±0,8a	12,07±0,5b	13,75±0,6a
	<i>Ex vitro</i>	15,26±0,7a	11,33±1,4c	14,09±0,9b	15,35±0,9a
Chiều dài lá (mm)	<i>In vitro</i>	24,59±1,4b	27,41±1,3a	23,15±1,5b	25,33±1,8b
	<i>Ex vitro</i>	26,19±1,7b	27,89±1,3a	24,30±1,5c	26,83±1,3b
Chiều dài đốt thân (mm)	<i>In vitro</i>	10,07±0,2a	11,30±0,5a	5,49±0,1b	10,33±0,6a
	<i>Ex vitro</i>	14,58±0,7	16,29±0,5	7,34±0,9c	14,87±0,7b
Số nụ hoa/cây	<i>In vitro</i>	2,76±0,4b	2,50±0,1	3,30±0,1a	2,65±0,4b
	<i>Ex vitro</i>	3,48±0,3b	3,65±0,6b	4,29±0,8a	3,19±0,8bc
Kích thước hoa (mm)	<i>In vitro</i>	19,80±0,3 ^{ns}	20,03±0,5 ^{ns}	19,69±0,5 ^{ns}	19,80±0,7 ^{ns}
	<i>Ex vitro</i>	20,15±0,6 ^{ns}	20,46±0,7 ^{ns}	21,05±0,7 ^{ns}	21,11±0,5 ^{ns}
Tỷ lệ phân ly màu hoa (%)	<i>In vitro</i>	KPL	KPL	KPL	KPL
	<i>Ex vitro</i>	KPL	KPL	KPL	0,15

Ghi chú: Các chữ cái (a, b, c) khác nhau trong cùng một dòng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy P < 0,05 (Duncan's test); các số sau dấu ± là độ lệch chuẩn của các lần lặp; ĐC: giống đối chứng; ĐK: điều kiện; KPL: không phân ly. G40TP1: đột biến hoa màu trắng; G40TP2: đột biến hoa 4 môi tím; G30TL1: đột biến hoa trắng chấm vàng. ^{ns}: sự khác biệt không có ý nghĩa (non-significant difference). Số liệu ghi nhận sau 45 ngày nuôi trồng.

KẾT LUẬN

Trên cơ sở thực nghiệm đã xác định được giá trị LD50 tác động lên hai loại mẫu lá và mẫu cây con đối với bức xạ gamma nguồn Co^{60} nằm trong khoảng 30 - 40 Gy là thích hợp cho quá trình chọn lọc đột biến loài *Torenia fournieri* L. Tổng số cá thể biến dị xuất hiện khi chiếu xạ mẫu lá là 43 cá thể (ở liều 30 Gy) và 46 cá thể (ở liều 40 Gy); tần số xuất hiện biến dị ở thế hệ MV_1 tương ứng với liều 30 Gy (0,67%) và 40 Gy (0,72%). Tổng số cá thể biến dị xuất hiện khi chiếu xạ mẫu cây con là 58 cá thể (30 Gy) và 65 cá thể (40 Gy); tần số xuất hiện biến dị đối với mẫu cây con ở liều 30 Gy (1,05%) và 40 Gy (1,15%); tần số khảm ở đời MV_1 và MV_4 lần lượt là 0,25% và 0,08%. Có 16 thể đột biến mang các tính trạng về sự thay đổi màu sắc cánh hoa gồm những dòng đột biến màu trắng, màu trắng phớt tím, màu hồng nhạt, màu vàng nhạt, màu vàng đậm, hoa có 4 môi màu tím, 4 môi màu tím xen lẫn vàng có độ ổn định di truyền khác nhau và đang tiếp tục xác định đột biến tiềm năng. Trong đó, sự ổn định di truyền của 3 dòng (G40TP1, G40TP2, G30TL1) qua các thế hệ *in vitro* và nuôi trồng *ex vitro* so với giống gốc có tính ổn định di truyền cao. Các dòng đột biến triển vọng G40TP1, G40TP2, G30TL1 hội đủ điều kiện để phát triển thành giống.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Hai nhân đã hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở (2012 - 2013) để thực hiện đề tài nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anchalee J (2011) Morphological change due to effects of acute gamma ray on Wishbone flower (*Torenia fournieri*) *in vitro*. *Int Trans J Eng Manag Sci Tech* 2 (4): 375-383.

Broerjes C, Van Harten AM (1988) *Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops*. Elsevier, Amsterdam.

Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test *Biometrics* 11: 1-42.

Dương Tấn Nhựt, Lê Văn Thúc, Trần Trọng Tuấn, Trương Thị Diệu Hiền, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận (2013) Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành hoa *in vitro* ở cây Torenia (*Torenia fournieri* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 51(6): 689-702.

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 một số loài hoa thông qua chiếu xạ *in vitro*. *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học thực vật trong công tác chọn tạo giống hoa* Nxb Nông nghiệp. 165-174.

IAEA (2004) Mutation Breeding Reviews. No. 14, April, FAO/IAEA, Vienna, Austria.

Kikuchi S, Kino H, Tanaka H, Tsujimoto H (2007) Pollen tube growth in cross combinations between *Torenia fournieri* and fourteen related species *Breed Sci* 57: 117-122.

Lê Văn Thúc, Lê Thị Bích Thy, Lê Thị Thùy Linh, Đặng Thị Diên, Hàn Huỳnh Diên, Trần Trọng Tuấn, Trương Thị Diệu Hiền, Nguyễn Phúc Huy, Dương Tấn Nhựt (2013) Nghiên cứu quy trình ra hoa *in vitro* cây hoa mắt mèo (*Torenia fournieri* L.) nhằm ứng dụng trong chọn lọc đột biến phóng xạ. *Hội nghị khoa học hạt nhân toàn quốc lần thứ 10, Vũng Tàu* 192.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Phys* 15: 473-497.

Nguyễn Tiến Thịnh, Lê Văn Thúc (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.

Thịnh NT, Nu NT, Ha VTT, Hao TT, Nhan ND (2000) Induction of flower mutations in *Chrysanthemum* by jointly using *in vitro* culture techniques and ionizing radiation. *Seminar on methodology for plant mutation breeding for quality: Effective use of physical/chemical. Mutagens, Hanoi - Vietnam*: 82-89.

Trương Thị Diệu Hiền, Phan Đình Kim Thu, Trần Thị Lan Anh, Dương Phương Thanh, Lương Ngọc Thuận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, Trần Quế, Dương Tấn Nhựt (2007) So sánh khả năng phát sinh chồi bất định từ lá, chồi ngủ và thân cây Torenia (*Torenia fournieri* L.) trong điều kiện nuôi cấy *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: 93-102.

Valerie W, Suwaserece, Tharathorn T, Shermarl W, Thunya T (2011) Petal color and petal form mutations observed in *Torenia hybrida* following gamma irradiation *in vitro*. *Kasetsart J Nat Sci* 45: 656-665.

Wipapom S, Thunya T, Peeranuch J, Shinji K (2011) Effects of gamma-ray irradiation in plant morphology of interspecific Hybrids between *Torenia fournieri* and *Torenia baillonii*. *Kasetsart J Nat Sci* 45: 803-810.

Yamazaki T (1985) A Revision of the Genera *Limnophila* and *Torenia* from Indochina. *J Fac Sci Univ Tokyo* 3(13): 575-625.

APPLICATION OF *IN VITRO* FLOWERING TECHNIQUE FOR EVALUATING OF MUTATION CAPACITY AND SELECTING FLOWER COLOUR OF *TORENIA FOURNIERI* L. FOLLOWING IRRADIATION

Le Van Thuc¹, Le Thi Bích Thy¹, Le Thi Thuy Linh¹, Hoang Hung Tien¹, Dang Thi Dien¹, Han Huynh Dien¹, Duong Tan Nhut^{2,*}

¹Nuclear Research Institute, Vietnam Atomic Energy Institute

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Gamma irradiation technique combined with tissue culture and *in vitro* flowering was applied in this study. The results showed that the frequencies of variation in plant regeneration from irradiated leaf samples were: 0.67% (with 30 Gy dose) and 0.72% (with 40 Gy dose) in MV₁ generation; the frequencies of variation in irradiated plantlet samples were: 1.05% (with 30 Gy dose) and 1.15% (with 40 Gy dose) in MV₄ generation, the frequencies of mosaic were 0.25% and 0.08% in MV₃ and MV₄ generation, respectively. A total of 16 mutants were selected based on phenotypic variations going through screening processes of tissue culture and *in vitro* flowering. Three promising mutant lines (G40TP1, G40TP2, G30TL1) presented a high genetic stability through generations cultivated in both *in vitro* and *ex vitro* conditions when being compared with the controls. These mutant lines G40TP1, G40TP2, G30TL1 had a high potential to become new cultivars. This paper showed that the application of *in vitro* flowering technique for mutation breeding of Torenia (*Torenia fournieri* L.) is a significant complementary and effective model for selecting mutants produced by irradiation.

Keywords: Mutation, gamma, *in vitro* flowering, frequency variation, *Torenia fournieri* L.

* Author for correspondence: E-mail: duongtannhut@gmail.com