

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU TRONG NGHIÊN CỨU TẠO GIỐNG HOA ĐỒNG TIỀN (*GERBERA JAMESONIA*) QUA KỸ THUẬT ĐỘT BIẾN *IN - VITRO* BẰNG TIA GAMMA (NGUỒN ^{60}Co)

**Preliminary Results of Gerbera Breeding Via *In - Vitro* Mutation
Using Gamma Ray (^{60}Co)**

**Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Tuấn Phong, Phí Thị Cẩm Miện,
Trương Thị Lành, Nguyễn Quang Thạch**

Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện với mục đích tạo được một số dòng hoa đồng tiền đột biến bằng xử lý phóng xạ gama nguồn ^{60}Co . Nguồn vật liệu sử dụng là các giống hoa đồng tiền nhập nội: giống Đô nhị nâu, giống Gạch nhị nâu, giống Trắng nhị nâu. Callus tạo từ nụ hoa của 3 giống hoa được xử lý bằng tia γ ^{60}Co với liều chiếu xạ: 0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 krad. Kết quả cho thấy: liều chiếu xạ từ 6- 10 krad là ngưỡng gây chết, liều chiếu xạ từ 3- 5 krad cho các dạng chồi tái sinh từ callus có biến dị hình thái rõ rệt chia thành 5 dạng. Dạng A: Trên lá xuất hiện nhiều chấm xanh dạng khảm; dạng B: Lá bị bạch tạng, trắng toàn bộ, cây thấp, lá mỏng; dạng C: Cây sinh trưởng mạnh, lá dày, màu xanh đậm, cây cao; dạng D: Lá dạng sinh sản nhanh, có hệ số nhân lớn trong thời gian ngắn; dạng E: Cây có lá bị viền trắng toàn bộ, lá mỏng, phiến lá xanh nhạt. Sự duy trì các dạng biến dị qua các lần cấy chuyển có sự khác nhau. Sau 4 lần cấy chuyển, khả năng duy trì của dạng A là 76,89%, dạng B là 69,27%, dạng E là 59,14%, dạng C và dạng D có khả năng duy trì là 100%.

Từ các dạng đột biến thu được đem trồng ngoài đồng ruộng đã thu được 2 dạng đồng tiền mới có màu sắc và cấu trúc khác với đối chứng. Các vật liệu này được đưa vào chương trình chọn tạo giống tiếp theo.

Từ khóa: Callus, đột biến, hoa đồng tiền, liều chiếu xạ.

SUMMARY

The aim of study was to induce mutations in gerbera clones by gamma radiation treatment with three introduced cultivars: Mademoiselle, Goldy and Winterqueen. Calluses induced from flower bud explants were treated with 7 doses of γ ^{60}Co ray: 3; 4; 5; 6; 7; 8 and 10 krad. The dose of 6 - 10 krad caused 100 percent death but the doses from 3 to 5 krad resulted in morphological changes/variants in shoots regenerated from calli. Morphological changes could be categorized into 5 types: type A - leaves with mosaic green spots; type B - leaves showing albinism, totally white and thin, short plant; type C - vigorous growth with thick and dark- green leaves; type D: leaves grow very quickly and have high multiplication coefficient and type E: thin leaves with white edges and light green leaf blade.

The stability of induced mutants was evaluated through continuous subcultures and two clones with different flower color and structure were selected for further breeding program.

Key words: Callus, gamma rays, Gerbera, induced mutants.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) là một loài hoa đẹp, trồng phổ biến trên thế giới và được sử dụng làm hoa chậu, hoa cắt cành, hoa trồng cảnh, được coi là một trong những loài hoa quan trọng, cho giá trị kinh tế cao, được nhiều địa phương quan tâm phát triển. Hoa đồng tiền ưu việt hơn các loài hoa khác như hoa hồng, hoa lily, hoa lan... là ở chỗ ra hoa và vẫn đảm bảo chất lượng cao vào mùa hè, đây là thời điểm miền Bắc khan hiếm hoa nhất trong năm. Chính vì vậy, hoa đồng tiền rất cần được phát triển ở Việt Nam.

Trước đây, các giống hoa đồng tiền chủ yếu được nhân giống bằng phương pháp tách chồi, gieo hạt tuy đơn giản dễ làm không tốn kém, song chất lượng cây giống ban đầu thường thấp, nhanh bị thoái hóa do nhiễm bệnh virus...

Ngày nay, ở Việt Nam, chủng loại và màu sắc các loài hoa nói chung, cũng như hoa đồng tiền nói riêng ngày càng phong phú và đa dạng. Tuy nhiên hầu hết các giống hoa đồng tiền đẹp, quý ở nước ta lại chủ yếu được nhập nội từ Hà Lan, Đài Loan, Trung Quốc... cây giống không rõ nguồn gốc, thiếu chủ động, đây chính là nguyên nhân khiến giá của một số loại hoa đồng tiền còn khá cao, chưa đáp ứng được nhu cầu thưởng thức của người dân. Vì vậy trong những năm gần đây, công tác chọn tạo giống hoa đồng tiền ở Việt Nam đã bắt đầu được quan tâm nghiên cứu.

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển của công nghệ tế bào thực vật, công nghệ xử lý đột biến *in-vitro* đã trở thành công cụ hữu hiệu trong chọn tạo giống cây trồng. Kỹ thuật này đã gây tạo và làm tăng tần suất xuất hiện đột biến với các tính trạng có giá trị kinh tế ở các loài thực vật nói chung và cây hoa nói riêng.

Dựa trên những yêu cầu của sản xuất cũng như cơ sở khoa học đã được khẳng định, nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật đột biến *in-vitro* trong chọn tạo giống hoa đồng tiền được thực hiện với mục đích tạo được một số dòng đồng tiền đột biến bằng xử lý phóng xạ gamma nguồn ^{60}Co .

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu là 3 giống hoa: hoa đỏ nhị nâu (Đ), hoa màu gạch nhị nâu (G) và giống hoa màu trắng nhị nâu (T), là các giống nhập nội từ Trung Quốc được trồng phổ biến ở Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật

Sử dụng phương pháp nuôi cấy *in vitro* trên môi trường cơ bản MS (MuraShige & Skoog, 1962 với 6,2 g/l agar, 30 g/l saccarose và 100 mg/l inositol), pH từ 5,8 - 6,0. Nhiệt độ phòng nuôi 24 - 26°C, cường độ chiếu sáng: 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

2.2.2. Phương pháp xử lý callus đồng tiền bằng chiếu xạ tia gamma (nguồn ^{60}Co)

Các khối callus trung bình khoảng 0,5 - 1 cm được chiếu xạ ở các liều khác nhau (3 - 10 krad) sau được đưa vào môi trường phát sinh chồi. Tiến hành phân lập các dạng biến dị của chồi và đánh giá khả năng duy trì các dạng biến dị đã được phân lập qua 5 lần cấy chuyển. Các dạng biến dị đã được duy trì ổn định chuyển sang môi trường ra rễ. Các cây được chuyển xuống vườn ươm, ruộng sản xuất để theo dõi sự sinh trưởng phát triển và ra hoa, chọn lọc các dạng hoa biến dị.

2.2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Các công thức thí nghiệm trong phòng nuôi cấy mô được bố trí ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại bố trí 30 - 45 mẫu.

Các công thức thí nghiệm ngoài ruộng sản xuất được bố trí tuần tự không lặp lại theo dạng, theo giống, số lượng cây ở mỗi dạng 200 cây.

Số liệu được xử lý thống kê theo chương trình IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của liều chiếu xạ đến tỷ lệ sống, khả năng tái sinh chồi của callus đồng tiền

Các mức chiếu xạ khác nhau ảnh hưởng rất khác nhau tới tỷ lệ sống và khả năng tái sinh của callus (Bảng 1). Liều chiếu xạ càng cao tỷ lệ sống và tỷ lệ tái sinh chồi của callus chiếu xạ càng giảm. Quy luật này thể hiện đúng trên cả 3 giống thí nghiệm: giống hoa đỏ nhị nâu (Đ), hoa gạch nhị nâu (G) và hoa trắng nhị nâu (T). Tại liều chiếu xạ thấp 3 Krad, tỷ lệ sống của các giống đạt từ 46,67 - 57,78%, tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 58,33 - 71,42% cao nhất là ở giống G đạt 71,42%. Ở liều chiếu xạ 4 Krad thì tỷ lệ sống cũng như tái sinh của mẫu cấy các giống khác nhau đều giảm và thấp nhất tại liều chiếu xạ 5 Krad thì tỷ lệ sống của khối callus chỉ còn 31,11 - 44,44%, tỷ lệ mẫu tái sinh là 11,76 - 21,43%.

Các liều lượng chiếu xạ từ 6 đến 10 Krad là ngưỡng gây chết callus (các callus thâm đen toàn bộ, sau đó chết).

Như vậy, liều chiếu xạ càng cao thì tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi càng giảm và liều gây chết callus là 6 Krad trở đi.

3.2. Phân lập và đánh giá khả năng sinh trưởng các dòng biến dị về hình thái trong giai đoạn *in vitro*

Các chồi biến dị thu được, được phân lập đột biến thành các dạng biến dị sau đây (Bảng 2):

- Dạng A: Trên lá xuất hiện nhiều chấm xanh dạng khảm, lá dày.
- Dạng B: Lá bị bạch tạng, trắng toàn bộ, cây thấp, lá mỏng.
- Dạng C: Dạng cây sinh trưởng mạnh, lá dày, màu lá xanh đậm, cao cây, dạng này chỉ xuất hiện ở liều chiếu xạ thấp 3 Krad.
- Dạng D: Là dạng sinh sản nhanh, có hệ số nhân lớn trong thời gian ngắn.
- Dạng E: Dạng cây có lá bị viền trắng toàn bộ, lá mỏng, phiến lá xanh nhạt.

Bảng 1. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ đến tỷ lệ sống, khả năng tái sinh chồi của callus đồng tiền

Giống	Liều lượng xử lý	Số mẫu sống	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Số mẫu tái sinh	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)
Giống hoa đỏ nhị nâu (Đ)	Đ/C	45	100	45	100
	3 Krad	24	53,33	14	58,33
	4 Krad	20	44,44	5	25,00
	5 Krad	17	37,78	2	11,76
	6 Krad	0	0,0	0	0,0
	7 Krad	0	0,0	0	0,0
	8 Krad	0	0,0	0	0,0
Giống hoa gạch nhị nâu (G)	Đ/C	45	100	45	100
	3 Krad	21	46,67	15	71,42
	4 Krad	18	40,00	6	33,33
	5 Krad	14	31,11	3	21,43
	6 Krad	0	0,0	0	0,0
	7 Krad	0	0,0	0	0,0
	8 Krad	0	0,0	0	0,0
Giống hoa trắng nhị nâu (T)	Đ/C	45	100	45	100
	3 Krad	26	57,78	17	65,38
	4 Krad	24	53,33	9	37,50
	5 Krad	20	44,44	4	20,00
	6 Krad	0	0,0	0	0,0
	7 Krad	0	0,0	0	0,0
	8 Krad	0	0,0	0	0,0
10 Krad	0	0,0	0	0,0	

Bảng 2. Tỷ lệ các dạng chồi thu được ở các liều lượng xử lý khác nhau trên các giống khác nhau

Giống	Liều xử lý (krad)	Σ chồi thu được (chồi)	Dạng A		Dạng B		Dạng C		Dạng D		Dạng E	
			Số chồi	%	Số chồi	%	Số chồi	%	Số chồi	%	Số chồi	%
Đỏ nhị nâu	0	178	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	3	92	7	7,6	8	8,7	6	6,5	0	0,0	0	0,0
	4	53	9	16,9	13	24,5	4	7,5	0	0,0	0	0,0
	5	21	7	33,3	6	28,6	1	4,8	0	0,0	0	0,0
Gạch nhị nâu	0	192	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	3	87	0	0,0	0	0,0	0	0,0	13	14,9	0	0,0
	4	62	0	0,0	0	0,0	0	0,0	20	32,3	0	0,0
	5	8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Trắng nhị nâu	0	168	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	3	86	0	0,0	10	11,6	0	0,0	69	80,2	7	8,1
	4	62	0	0,0	16	25,8	0	0,0	5	8,1	7	11,3
	5	11	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Bảng 3. Khả năng duy trì của các dạng cây đồng tiền đột biến *in vitro* sau 5 lần cấy chuyển (sau 20 tuần)

STT	Dạng chồi	Lần 2		Lần 3		Lần 4		Lần 5	
		Tổng chồi thu được	Tỷ lệ chồi giống ban đầu (%)	Tổng chồi thu được	Tỷ lệ chồi giống ban đầu (%)	Tổng chồi thu được	Tỷ lệ chồi giống ban đầu (%)	Tổng chồi thu được	Tỷ lệ chồi giống ban đầu (%)
1	Dạng A	102	92,03	182	81,04	314	76,89	340	76,89
2	Dạng B	72	83,33	140	71,35	245	69,27	248	69,27
3	Dạng C	62	100,0	123	100,0	258	100,0	267	100,0
4	Dạng D	168	100,0	474	100,0	247	100,0	253	100,0
5	Dạng E	61	72,6	128	63,7	241	59,14	264	59,14

Trong các dạng biến dị thu được thì dạng E (cây có lá bị viền trắng toàn bộ, lá mỏng, phiến lá xanh nhạt) có số lượng chồi ít nhất và chỉ xuất hiện trên giống màu trắng nhị nâu ở liều chiếu xạ 3,4 krad.

Dạng D (dạng sinh sản nhanh, có hệ số nhân lớn trong thời gian ngắn) có số lượng chồi nhiều nhất xuất hiện trên cả 2 giống đồng tiền trắng và giống đồng tiền gạch.

Dạng B (dạng lá bạch tạng, trắng toàn bộ, cây thấp lá mỏng) xuất hiện trên cả 2 giống là giống trắng và giống đỏ nâu.

Dạng A (dạng có chấm xanh dạng khảm) và dạng C (sinh trưởng nhanh, phát triển mạnh) là chỉ xuất hiện trên giống màu đỏ nâu và xuất hiện trên cả 3 liều chiếu xạ 3Krad, 4Krad và 5Krad.

Như vậy, các giống khác nhau sự xuất hiện các dạng biến dị rất khác nhau. Giống màu đỏ nhị nâu xuất hiện 3 dạng biến dị (A, B, C). Giống màu gạch xuất hiện dạng (D). Giống màu trắng xuất hiện 3 dạng biến dị (B, D, E).

Những kết quả này cũng phù hợp với các công bố trước đây của Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Phương Hoa (2004, 2005), Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Tuấn Phong (2008).

3.3. Đánh giá khả năng duy trì các dạng biến dị hoa đồng tiền *in vitro* thu được sau chọn lọc

Kết quả thu được sau 3 lần cấy chuyển (Bảng 3) cho thấy:

Tất cả các dạng biến dị đều được duy trì với tỷ lệ cao, đặc biệt là dạng C và dạng D có khả năng duy trì biến dị là 100%, các dạng A, B, E khả năng duy trì biến dị thấp hơn nhưng vẫn đạt từ 59,14 đến 76,89%. Đến cây chuyển lần 5 thì tỷ lệ biến dị duy trì như lần cây chuyển 4, các dạng biến dị đã bắt đầu ổn định.

Như vậy, sau 5 lần cây chuyển, các dạng biến dị thu được đều thể hiện khả năng duy trì ổn định về mặt hình thái. Đây là các vật liệu phục vụ việc chọn tạo tiếp tục.

3.4. Khả năng sinh trưởng và nhân nhanh của các dạng biến dị đồng tiền *in-vitro*

Các dạng cây khác nhau có sự sinh trưởng, hệ số nhân khác, đặc trưng riêng cho từng dạng (Bảng 4).

- Sinh trưởng về số lá: Nhìn chung các dạng cây khác biệt không nhiều so với đối chứng. Với các dạng biến dị xuất hiện trên giống đỏ nâu thì dạng A có số lá tương đương

với đối chứng, dạng B và dạng C có số lá ít hơn đối chứng. Với các dạng biến dị xuất hiện trên giống trắng, số lá dạng D (4,66 lá) lớn hơn so với đối chứng (4,53 lá), dạng B và dạng E đều có số lá thấp hơn so với đối chứng. Với dạng D xuất hiện trên giống màu gạch có số lá (5,20 lá) cao hơn so với đối chứng (4,68 lá).

- Sinh trưởng về chiều cao: Dạng C có chiều cao vượt trội hơn hẳn so với đối chứng. Dạng B thấp hơn so với đối chứng. Các dạng còn lại có chiều cao tương đương với đối chứng.

- Về hệ số nhân: Khi các chồi được cấy trên cùng một môi trường nhân nhanh thì khả năng nhân nhanh các dạng A, B, C, E và đối chứng (có hệ số nhân đạt từ 4,94 - 5,67 lần/3 tuần). Dạng D có hệ số nhân vượt trội (12,08 lần/3 tuần). Đây là dạng biến dị có ý nghĩa với sản xuất, bởi chúng ta có thể tạo ra được số lượng cây lớn hơn rất nhiều so với cây thông thường trong một khoảng thời gian ngắn.

Bảng 4. Khả năng sinh trưởng và hệ số nhân của các dạng biến dị đồng tiền *in-vitro* (sau 3 tuần theo dõi)

STT	Giống	Dạng cây	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Hệ số nhân (lần/3 tuần)
1	Đỏ nhị nâu	A	6,39d	5,62e	5,56d
		B	5,82c	5,15d	5,10b
		C	8,43e	5,29d	5,67e
		Đ/C	6,42d	5,81e	5,32c
2	Gạch nhị nâu	D	6,35d	5,20d	11,95f
		Đ/C	6,40d	4,68c	5,68e
3	Trắng nhị nâu	B	5,31ab	4,36ab	5,16b
		D	5,84c	4,66c	12,08f
		E	5,22a	4,21a	4,94a
		Đ/C	5,66bc	4,53bc	5,18b
CV (%)			2,4	3,5	2,7
LSD (%)			0,171	0,205	0,197

Ghi chú: Các chữ a, b, c, d, e, f trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

3.5. Kết quả bước đầu trong thử nghiệm đồng ruộng

Trong một số dạng hoa đồng tiền mới có màu sắc và cấu trúc cánh hoa khác so với đối chứng (Hình 1).

- Từ dạng B của giống đỏ nhị nâu, liều chiếu xạ 4 krad và 5 krad đã xuất hiện dạng cấu trúc hoa méo mó.

- Từ dạng D của giống màu gạch, liều chiếu xạ 4 krad đã xuất hiện dạng hoa có cánh hoa màu gạch nhạt.

- Từ dạng D của giống màu gạch, liều chiếu xạ 5 krad đã xuất hiện dạng có cánh hoa màu vàng.

Đây là những dạng mới, có khả năng phát triển thành giống, hiện đang được tiếp tục duy trì và chọn lọc.



Hình 1. Các dạng biến dị hình thái của hoa đồng tiền ở các liều chiếu xạ khác nhau

4. KẾT LUẬN

Xử lý đột biến cho callus tạo từ nụ hoa đồng tiền bằng tia gamma (nguồn ^{60}Co) ở các liều chiếu xạ khác nhau đã cho các chồi tái sinh từ callus có biến dị hình thái rõ rệt. Liều chiếu xạ từ 3 - 5 krad có khả năng tạo chồi tái sinh biến dị, trong khi liều chiếu xạ từ 6 krad trở đi là liều gây chết

Các biến dị thu được có thể phân thành các nhóm có đặc trưng khác nhau:

- Dạng A: Trên lá xuất hiện nhiều chấm xanh dạng khảm, lá dày.

- Dạng B: Lá bị bạch tạng, trắng toàn bộ, cây thấp, lá mỏng.

- Dạng C: Cây sinh trưởng mạnh, lá dày, màu lá xanh đậm, cao cây.

- Dạng D: Là dạng sinh sản nhanh, có hệ số nhân lớn trong thời gian ngắn.

- Dạng E: Cây có lá bị viền trắng toàn bộ, lá mỏng, phiến lá xanh nhạt:

Sau 4 lần cấy chuyển, các dạng biến dị thu được đi vào trạng thái ổn định. Khả năng duy trì của các dạng biến dị trong *in-vitro* của dạng A là 76,89%, dạng B là 69,27%, dạng E là 59,14%, dạng C và dạng D có khả năng duy trì là 100%.

Từ các dạng biến dị thu được đã trồng ra ngoài đồng ruộng tạo được 2 dạng hoa mới có màu sắc khác hẳn so với đối chứng. Đây là các vật liệu khởi đầu có ý nghĩa có thể đưa vào chương trình tạo giống hoa mới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đào Thanh Bằng, Nguyễn Phương Đoàn, Nguyễn Quang Minh, Vũ Thị Hằng, Lê Thị Liễu, Nguyễn Kim Lý, Nguyễn Hữu Đống, Nguyễn Xuân Linh, Viện Di

- truyền Nông nghiệp (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 nhân giống và chọn tạo giống hoa, pp.165-175.
- Kim Gi-Jun, Cab-Cheon Koh, Gwang-Yeon, Kyong-Junchoi, Hi-Sup Song (2006). *In-vitro* mutant induction by irradiation of Gamma-ray in *Rosa hydrida* Hort, *Korean Journal of Horticultural science and technology*, vol. 24(64): 497 - 502.
- Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Phương Hoa, Nguyễn Thị Giang, Nguyễn Quang Thạch (2005). "Xây dựng quy trình nhân giống hoa đồng tiền bằng kỹ thuật cấy mô". *Tạp chí Khoa học kỹ thuật nông nghiệp* - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, P31-36.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Phương Hoa (2005). "Nghiên cứu thăm dò ảnh hưởng của Colchicine, tia Gama nguồn Co⁶⁰ trên cây hoa đồng tiền Nam Phi (*Gerbera Jamesonii*) *in-vitro*". Luận án thạc sĩ nông nghiệp - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Tuấn Phong (2008). "Nghiên cứu đánh giá đặc tính nông sinh học của một số dòng hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) đột biến tạo được trong nuôi cấy *in-vitro* và *in-vivo*". Luận án thạc sĩ nông nghiệp - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

