



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.019

ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, DI TRUYỀN CÁC DÒNG HOA CHUÔNG (*Gloxinia speciosa*) ĐƯỢC CHIẾU XẠ

Nguyễn Trường Giang, Hà Thị Loan*, Nguyễn Hoàng Quân, Phan Diễm Quỳnh, Huỳnh Hữu Đức, Đỗ Thị Lịch Sa và Dương Hoa Xô

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hà Thị Loan (email: haloan762001@yahoo.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 27/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Evaluation of morphological and genetic characteristics of *Gloxinia speciosa* varieties irradiated

Từ khóa:

Chiếu xạ, dòng biến dị

Gloxinia speciosa, phân tích di truyền

Keywords:

Genetic analysis, *Gloxinia speciosa*, irradiation, mutant line

ABSTRACT

Gloxinia speciosa is a beautiful herbaceous plant with colorful flowers and has a high economic value. The aim of this study is to develop new and distinctive flowers for meeting the commercial needs. Callus of *Gloxinia speciosa* were irradiated by gamma Co60 from 30 to 150Gy. The shoots differentiating from the callus were evaluated morphological traits in vitro and ex vitro. There were twelve varieties with different characteristics compared to *Gloxinia speciosa* that was not irradiated in terms of floral and leaf shape. It can be recorded that there were genetic differences of *Gloxinia speciosa* varieties through RAPD markers, with similarity coefficient at 0.6. After analyzing and evaluating morphological and genetic characteristics, some varieties with light green leaves, petals with white rays along the vertical line (B variety) were selected. The results show that the application of irradiation would be effective to generating novel *Gloxinia speciosa* varieties.

TÓM TẮT

Hoa chuông (*Gloxinia speciosa*) là cây thân thảo, kiểu hoa đẹp, hoa có nhiều màu sắc khác nhau, và là cây trồng có giá trị kinh tế cao. Với mục tiêu phát triển nhiều dòng hoa chuông mới có kiểu hình hoa lạ, độc đáo phục vụ nhu cầu thị trường, các mô sẹo của dòng hoa chuông đã được chiếu xạ bằng tia gama nguồn Co⁶⁰ với liều thích hợp 30 -150 Gy. Sau các bước đánh giá thích hợp từ các mẫu chồi biệt hóa từ mô sẹo chiếu xạ trong giai đoạn in vitro được đánh giá đặc điểm hình kiểu hình và tiến hành đánh giá ở điều kiện nhà màng. Mười hai dòng hoa chuông biến dị mang một số đặc tính khác biệt so với dòng đối chứng về kiểu hình hoa, lá được chọn lọc. Kết quả phân tích di truyền bằng chỉ thị phân tử RAPD các dòng hoa chuông biến dị cho thấy giữa các dòng biến dị có sự sai khác về mặt di truyền với hệ số tương đồng di truyền 0,63. Tổng hợp các kết quả phân tích, đánh giá hình thái và di truyền các dòng hoa chuông biến dị, dòng biến dị với đặc điểm như lá màu xanh nhạt, cánh hoa có tia màu trắng xuyên dọc, lượng gam màu trắng nhiều (dòng biến dị B) và mang các đặc điểm nổi trội được chọn. Kết quả nghiên cứu này mở ra khả năng ứng dụng tia phóng xạ tạo đột biến hoa chuông và hướng tới tạo giống hoa chuông mới.

Trích dẫn: Nguyễn Trường Giang, Hà Thị Loan, Nguyễn Hoàng Quân, Phan Diễm Quỳnh, Huỳnh Hữu Đức, Đỗ Thị Lịch Sa và Dương Hoa Xô, 2019. Đánh giá đặc điểm hình thái, di truyền các dòng hoa chuông (*Gloxinia speciosa*) được chiếu xạ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 142-150.

1 GIỚI THIỆU

Cây hoa chuông (*Florists gloxinias*) có nguồn gốc ở Brazil năm 1789. Tên khoa học *Gloxinia speciosa* được đặt đầu tiên năm 1817 bởi Conrad Loddiges. Năm 1825, loài này được đổi tên theo chi là *Sinningia*, sau này còn có tên tiếng Anh là Temple bell, Canterbury bell. Ngoài ra, nó còn có một số tên thường được gọi như: *Gloxinia*, *Sinningia speciosa*. Hoa chuông là giống nhập nội vào nước ta trong những năm gần đây và đã xuất hiện khá rộng rãi trên thị trường. Trên thế giới, hoa chuông được trồng phổ biến ở một số nước như: Brazil, Mexico, Mỹ, Hàn Quốc, Nhật,... Về đẹp và hương thơm của loài hoa này nên thời gian gần đây nó được trồng rộng rãi ở những vùng trồng hoa có khí hậu phù hợp.

Một số tác giả đã ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* thành công trong việc nhân giống cây hoa chuông từ phiến lá và chồi. Đặc điểm hình thái của phiến hình thành từ mẫu lá được theo dõi và đánh giá. Một số nghiên cứu về việc khảo sát, đánh giá môi trường nuôi cấy, thành phần khác nhằm tìm ra môi trường nhân giống thích hợp cho cây hoa chuông. Pang *et al.* (2006) đã nhân giống cây hoa Chuông từ nuôi cấy phiến lá và chồi thành công. Các đặc điểm hình thái của phiến hình thành từ mẫu lá dài được ghi nhận qua các giai đoạn. Theo Park *et al.* (2012), sự hình thành các cơ quan được cải thiện bằng việc xử lý mẫu với bạc nitrate. Mẫu lá nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA và 0,1 mg/L NAA có tần số tái sinh chồi cao nhất. Theo Minami, giá thể thích hợp để trồng cây là hỗn hợp đất mùn: chất khoáng: đá trân châu với tỷ lệ 2:1:0,5 thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa chuông (Minami and Salvador, 2005; Pang *et al.*, 2006; Park *et al.* (2012). Tia gamma và tia X là 2 dạng tia được sử dụng như nguồn chiếu xạ cơ bản trong các thực nghiệm, phổ biến nhất là tia gamma với nguồn Co^{60} và Cs^{137} . Do có bước sóng rất ngắn và vận tốc rất lớn, không có khối lượng và điện tích, không bị lệch trong điện trường và có sức xuyên khá lớn. Phương pháp gây đột biến gene bằng tia phóng xạ đã được nghiên cứu từ lâu như gây đột biến *in vitro* trong việc tạo các giống hoa mới. Cho đến nay đã có 187 giống hoa cúc, 34 giống hoa thực được, 27 giống hoa hồng, 8 giống hoa phượng tiên, 25 giống hoa thu hải đường, 18 giống hoa cẩm chướng được tạo bằng con đường đột biến, chủ yếu xử lý ở giai đoạn *in vitro* chồi mầm, mô sẹo, hạt phấn, bao phấn, phiến soma... (Ahloowalia and Maluszynski, 2001). Việc lai tạo giống đột biến đã được ứng dụng thành công trong việc cải thiện chất lượng của nhiều loài cây trồng, có khoảng 70% giống đột biến trên thế giới được tạo thành từ chiếu xạ tia gamma. Với bức xạ tác động, các giống bị đột biến đem lại những đặc tính nổi trội như: tăng tính chịu hạn, chịu nóng,

cải thiện giá trị dinh dưỡng và tinh bột, tăng các hoạt chất thứ cấp.

RAPD ra đời vào năm 1990, RAPD là marker di truyền trội, dựa trên kỹ thuật PCR nhưng không cần biết trước trình tự của DNA bản mẫu do đó được xem là một marker di truyền đơn, đánh giá mối quan hệ di truyền trên cây trồng. Kỹ thuật RAPD có ưu điểm là thực hiện nhanh, dễ thao tác, ít tốn kém, thường được dùng để phân tích và xác định mối quan hệ thân thuộc giữa các loài hay giữa các cá thể để phục vụ cho công tác chọn giống hoặc phân loại. Chính vì vậy, kỹ thuật RAPD là một trong những kỹ thuật được ứng dụng trong chọn giống bằng phương pháp gây đột biến. Trên thế giới, một vài nghiên cứu gần đây đã sử dụng kỹ thuật này để đánh giá sự di truyền của cây đột biến so với giống bố mẹ và đã minh chứng rằng kỹ thuật này hữu hiệu trong việc đánh giá sự khác biệt di truyền so với giống gốc. Nghiên cứu của Chakrabarty and Datta (2010) đã sử dụng kỹ thuật RAPD với 20 primer để phân biệt giữa 6 giống hoa hồng gốc và 12 giống đột biến bằng tia gamma. Kết quả cho thấy mức độ tương đồng di truyền của 18 giống dao động trong khoảng 0,40 đến 0,91. Barakat cho thấy việc sử dụng kỹ thuật RAPD có hiệu quả trong việc phát hiện các dạng đột biến so với cây bố mẹ (Chakrabarty and Datta, 2010; Barakat *et al.*, 2011).

Nghiên cứu được đề xuất thực hiện phân tích đánh giá hình thái, di truyền các dòng hoa Chuông được chiếu xạ với mục tiêu chọn, tạo dòng hoa Chuông mới làm phong phú thêm nguồn hoa kiểng tại Thành phố Hồ Chí Minh, đáp ứng nhu cầu tiêu thụ cây hoa kiểng tại thành phố và các vùng lân cận.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mô sẹo được tạo từ cuống lá của hoa chuông đở kẹp trên môi trường MS + 1 mg/L NAA đặt trong điều kiện tối 1 tuần, nhiệt độ 23°C. Tái sinh chồi từ mẫu mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L BA với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ, cường độ ánh sáng 1.000 – 2.000 lux, nhiệt độ 23°C.

Môi: OPE-10: 5' CAC CAG GTG A 3' ($T_a=32^\circ C$), OPE-11: 5'GAG TCT CAG G3' ($T_a=28^\circ C$), OPE-17: 5'CTA CTG CCG T3' ($T_a=33^\circ C$), OPF-14: 5'TGC TGC AGG T3' ($T_a=37^\circ C$), OPF-16: 5' GGA GTA CTG G3' ($T_a=28^\circ C$), OPG-12: 5'CAG CTC ACG A3' ($T_a=33^\circ C$), OPG-13: 5'CTC TCC GCC A3' ($T_a=37^\circ C$), OPI-08: 5'TTT GCC CGG T3' ($T_a=37^\circ C$), OPI-10: 5'ACA ACG CGA G3' ($T_a=35^\circ C$), OPJ-04: 5'CCG AAC ACG G3' ($T_a=37^\circ C$) (Dubreuil *et al.*, 2008; Operon RAPD 10

mer Kit; Verma *et al.*, 2007; Boora and Dhillon, 2010).

Kit ly trích DNA tổng số: GeneJET Plant Genomic DNA Purification.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiếu xạ và chọn lọc các dòng hoa chuông biến dị ở điều kiện *in vitro*

Mẫu mô sẹo (100 mẫu) và mẫu chồi mới tái sinh 2-3 tuần tuổi (100 mẫu) được chuyển sang đĩa petri, theo dõi 3 ngày trước khi tiến hành chiếu xạ tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt. Chiếu xạ 5 liều dao động xung quanh LD50 (LD50 là liều xạ mà tại đó số mẫu bị chết 50%) trong tổng số mẫu chiếu xạ nhằm lựa chọn liều chiếu xạ gây đột biến thích hợp đối với cây hoa chuông. Sau khi đã xử lý bằng tia gamma Co⁶⁰, mẫu được tiến hành nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi (MS bổ sung 0,2 mg/L BA) với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ, cường độ ánh sáng 1.000 – 2.000 lux, nhiệt độ 23°C. Quan sát, theo dõi đặc điểm hình thái (màu sắc lá, hình dạng lá), đặc điểm sinh trưởng của các mẫu hoa chuông đã được chiếu xạ.

Các biến dị sau khi được quan sát sẽ được tiến hành chọn lọc cây chuyển nhân dòng 3 lần (M1V2, M1V3, M1V4) (M1: Cá thể biến dị; V2, V3, V4: số lần cây chuyển). Cắt đốt thân chồi biến dị cấy sang môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L BA. Các chồi biến dị được phát hiện sẽ tách riêng và tiếp tục nuôi cấy nhân chồi MS bổ sung 0,2 mg/L BA nhằm theo dõi tính ổn định của các biến dị đồng thời giúp tăng số lượng chồi biến dị trong 1 dòng.

Các chồi chưa phát hiện biến dị trong điều kiện *in vitro* vẫn được tiếp tục lựa chọn để tái sinh cây hoàn chỉnh, sau đó được trồng ra vườn nhằm khảo sát các đặc điểm sinh trưởng phát triển của cây.

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

Cây hoa chuông hoàn chỉnh (mỗi dòng 100 cây) ở thể hệ M1V4 có chiều cao từ 3–4 cm được trồng trên giá thể theo quy trình trồng và chăm sóc hoa chuông của Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh, trên hệ thống tưới nhỏ giọt. Đánh giá các biến dị dựa vào những khác biệt về màu sắc hoa, số lượng cánh hoa, hình dạng cánh hoa, hình dáng hoa, sự khác biệt về lá, thân, sự khác biệt về sinh trưởng và phát triển như chiều cao cây, thời gian ra hoa sớm, muộn,... Số liệu được phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm MSTATC. Các số liệu được mã hóa sang hệ nhị phân (như màu sắc hoa được chia ra nhiều tiêu đặc điểm: màu đỏ; màu trắng; vệt trắng; viền trắng; độ dày lá: dày, mỏng) để đánh giá mối quan hệ di truyền theo kiểu

hình và tiến hành phân tích bằng phần mềm NTSYS-pc version 2.1

2.2.3 Phân tích đa dạng di truyền các dòng hoa chuông biến dị bằng kỹ thuật RAPD.

Các dòng hoa chuông có mang biến dị về kiểu hình đã được đánh giá ở điều kiện nhà màng được phân tích sự đa dạng di truyền giữa các dòng biến dị với so với giống gốc ban đầu dựa trên kỹ thuật RAPD, xây dựng hệ số tương đồng trình tự và cây đa hình của giống gốc và các dòng biến dị. Dựa trên kết quả phân tích kiểu hình của các dòng hoa chuông biến dị và có các đặc điểm khác biệt so với đối chứng, hoa có những đặc tính lạ và đẹp, cây sinh trưởng phát triển tốt đã được đánh giá ở điều kiện nhà màng sẽ được chọn để đánh giá bằng chỉ thị phân tử RAPD.

Ly trích DNA tổng số bằng GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit. DNA ly trích được trữ ở -20°C để sử dụng trong phản ứng PCR-RAPD. Thành phần 01 phản ứng PCR với thể tích tổng 20 µl chứa 0,2 mM (cho mỗi dATP, dCTP, dGTP, dTTP), enzyme dream taq polymerase 1U, dream taq buffer 10X, 0,8 µM mỗi, nước cất 2 lần khử trùng, 1 µl DNA khuôn (nồng độ từ 50-100 ng/µl). Chu kỳ PCR: 1 chu kỳ tiền biến tính 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ: 95°C trong 30 giây; T_a trong 30 giây; 72°C trong 40 giây; 1 chu kỳ hoàn thành 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được phát hiện bởi điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy gel doc. Kết quả điện di sản phẩm RAPD được chuyển sang hệ nhị phân và phân tích bằng phần mềm NTSYS-pc version 2.1.

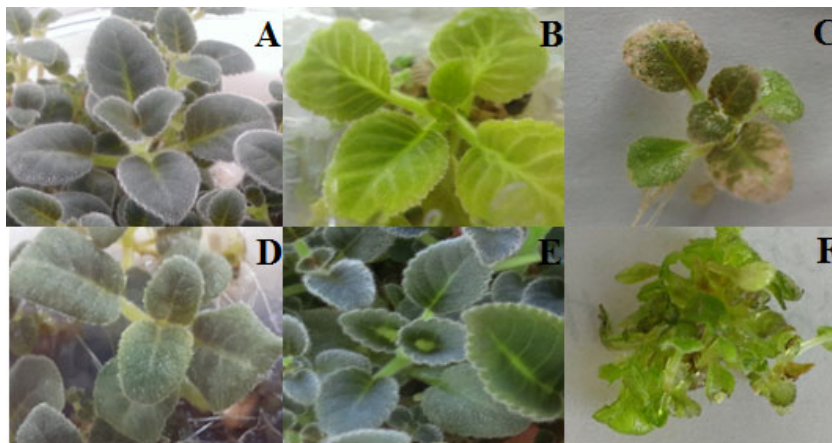
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chiếu xạ và phân lập các dòng hoa chuông biến dị ở điều kiện *in vitro*

Kết quả chiếu xạ giống hoa chuông có hoa đỏ kép ở liều xạ 30-150 Gy xuất hiện các kiểu hình lá cuộn tròn phát triển bình thường và ổn định qua các lần nhân dòng. Kiểu hình lá xoắn lại, cụp xuống và lá xanh nhạt cũng phát triển bình thường nhưng kiểu hình mất dần sau khi nhân dòng từ thế hệ thứ 2, đến thế hệ thứ 4 thì mất hoàn toàn. Kiểu hình lá màu xanh pha hồng phát triển kém hơn cây đối chứng và kiểu hình cũng mất dần sau khi nhân dòng từ thế hệ thứ 2, đến thế hệ thứ 4 thì mất hoàn toàn. Còn kiểu hình bạch tạng đã nhân dòng được cá thể biến dị, tuy nhiên các mẫu nhân dòng duy trì trong điều kiện *in vitro* sau một thời gian nuôi cấy cây bị chết. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy các mẫu *in vitro* biến dị kiểu hình bạch tạng thì khả năng nhân nhanh thấp và chết sau một thời gian. Theo Lê Tiến Vinh và *ctv.* (2014), khi xây dựng quy trình nhân giống cây Đan Sâm đã xuất hiện các biến dị bạch tạng và những mẫu *in vitro* này không thể tiếp tục nhân nhanh.

Bảng 1: Các cá thể biến dị ở giai đoạn *in vitro* của hoa Chuông đỏ kép sau 30 ngày cấy chuyển lần thứ 1

Liều xạ	Số chồi hình thành	Dạng biến dị	Số cá thể biến dị	Tần suất biến dị (‰)
ĐC	900		0	0,000
30 Gy	900	Xanh nhạt	0	0,000
		Màu xanh pha hồng	0	0,000
		Xoăn lại, cụp xuống	1	1,1
		Cuốn tròn	0	0,000
		Bạch tạng	0	0,000
50 Gy	850	Xanh nhạt	2	2,35
		Màu xanh pha hồng	0	0,000
		Xoăn lại, cụp xuống	0	0,000
		Cuốn tròn	0	0,000
		Bạch tạng	0	0,000
70 Gy	850	Xanh nhạt	0	0,000
		Màu xanh pha hồng	0	0,000
		Xoăn lại, cụp xuống	2	2,35
		Cuốn tròn	2	2,35
		Bạch tạng	0	0,000
90 Gy	580	Xanh nhạt	3	5,1
		Màu xanh pha hồng	2	3,4
		Xoăn lại, cụp xuống	2	3,4
		Cuốn tròn	0	0,000
		Bạch tạng	2	3,4
110 Gy	490	Xanh nhạt	3	6,1
		Màu xanh pha hồng	5	10,2
		Xoăn lại, cụp xuống	1	2,04
		Cuốn tròn	1	2,04
		Bạch tạng	0	0,000
130 Gy	380	Xanh nhạt	4	10,2
		Màu xanh pha hồng	2	5,26
		Xoăn lại, cụp xuống	2	5,26
150 Gy	290	Xanh nhạt	2	6,9
		Màu xanh pha hồng	0	0,000
		Xoăn lại, cụp xuống	3	10,3
		Cuốn tròn	0	0,000
		Bạch tạng	0	0,000

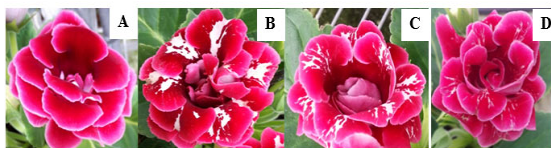


Hình 1: Các biến dị *in vitro* đỏ kép sau khi chiếu xạ và cấy chuyển lần thứ 1

(A. Đối chứng; B. Xanh nhạt; C. Bạch tạng; D. Xanh pha hồng; E. Xanh đậm; F. Lá xoăn lại, cụp xuống)

3.2 Khảo sát khả năng sinh trưởng, phát triển và phân lập các dạng biến dị của các cây hoa chuông ở điều kiện nhà màng

Dựa trên đặc điểm hình thái như màu sắc lá, hình dạng của các dòng biến dị có sự khác biệt so với giống hoa chuông đối chứng, 12 cá thể hoa chuông biến dị ở giai đoạn *in vitro* được chọn để nhân dòng đến thế hệ thứ 4 (M1V4: cá thể biến dị với lần cấy chuyên thứ 4) tái tạo thành cây hoàn chỉnh và đưa ra trồng ở điều kiện nhà màng. Mỗi dòng biến dị trồng 100 cây để đánh giá. Cây hoa chuông trồng trên giá thể theo quy trình trồng và chăm sóc hoa chuông của Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh, trên hệ thống tưới nhỏ giọt để tiến hành đánh giá các đặc tính nông học.



Nhóm 1: Đối chứng và kiểu hình cánh hoa có điểm trắng nhiều (Tia trắng xuyên dọc cả cánh hoa)



Nhóm 2: Kiểu cánh hoa có ít điểm trắng (Tia trắng tập trung rải rác ở phần trên cánh hoa)



Nhóm 3: Kiểu cánh hoa có hình dạng bất thường (phân tầng, cánh không đều)

Hình 2: Một số biến dị kiểu hình hoa của hoa chuông đỏ kép ngoài nhà màng

Sau thời gian theo dõi, dựa vào màu sắc cánh hoa có thể phân thành 3 nhóm chính, nhóm 1 là các hoa có vệt trắng nhiều, nhóm 2 là cánh hoa có ít vệt trắng, nhóm 3 là cánh hoa có màu xanh và màu sắc không đẹp, bị dị dạng (Hình 2).

Về hình dạng cánh hoa có thể chia thành 3 dạng, cánh rũ như đối chứng, cánh hoa dựng đứng hướng lên trên, và cánh hoa bị dị dạng.

Về kiểu hình hoa, có 2 dạng chính là hoa kép không phân tầng như cây đối chứng và nhóm hoa phân thành 2 tầng đơn (I, J), hoa có kiểu hình cánh hoa có điểm trắng nhiều (B, E) là có đường kính lớn hơn đối chứng, trong khi kiểu hình D, H có đường kính nhỏ hơn đối chứng (Bảng 2, Hình 2).

Bảng 2: Đánh giá kiểu hình hoa của các dòng biến dị *ex vitro* của mẫu hoa chuông đỏ kép

Các biểu hiện biến dị	Các kiểu hình biến dị	Kiểu hình
Kiểu hình tia màu trắng xuyên dọc cánh hoa, lượng gam màu trắng nhiều	3	B, C, D
Kiểu hình có vệt/đốm/chấm màu trắng ở môi cánh hoa	3	E, F, G
Kiểu hình có đốm trắng hình tròn ở cánh hoa	1	H
Cánh hoa có màu xanh, hoa phân 2 tầng rõ ràng	2	I, J
Kiểu hoa có cánh ngoài cùng ngắn	2	J, K
Hoa to cánh hoa dài, cánh hoa có hình dạng không nguyên vẹn như đối chứng	2	K, L
Cánh hoa có chiều hướng lên	3	D, G, L
Cánh hoa có chiều hướng cong mềm mại như đối chứng	4	C, F, H, K

Các cá thể biến dị kiểu hình hoa ở điều kiện nhà màng được chọn lọc để nhân giống vô tính ở điều kiện nhà màng và nhân giống *in vitro* từ củ, lá, thân. Các cá thể này được nhân dòng tới thế hệ thứ tư và được đưa trồng ở điều kiện nhà màng để đánh giá các đặc điểm sinh trưởng và hoa. Kết quả ghi nhận ở Bảng 3 cho thấy về thời gian sinh trưởng của dòng có kiểu hình F, I và J dài hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê so với dòng đối chứng. Độ bền của hoa đối dòng D, H, I và K thấp hơn so với dòng đối chứng, độ bền hoa các dòng này chỉ đạt khoảng 7,5 ngày so với đối chứng là 15,4 ngày khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê.

Các cá thể biến dị kiểu hình hoa ở điều kiện nhà màng được chọn lọc, nhân giống vô tính đến thế hệ

thứ tư để theo dõi các chỉ tiêu về thời gian sinh trưởng cũng như hình thái cây và hoa. Kết quả khảo sát được ghi nhận ở Bảng 3. Nhìn chung, ở tất cả các chỉ tiêu khảo sát các dòng đột biến đều tạo được khác biệt có ý nghĩa thống kê so với dòng đối chứng. Ở chỉ tiêu thời gian sinh trưởng các dòng J, J, K có thời gian sinh trưởng dài (trên 66 ngày) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với dòng đối chứng (dòng A là 64,3 ngày). Ở chỉ tiêu về thời gian ra hoa dòng D và G tạo được khác biệt có ý nghĩa so với dòng đối chứng với thời gian ra hoa ngắn hơn đối chứng là hơn 2 ngày. Về chỉ độ bền hoa đây là chỉ tiêu khá quan trọng đối với hoa chuông vì là cây dùng làm cảnh, trang trí, dòng cho độ bền hoa tốt nhất là dòng B với độ bền hoa đạt 17,5 ngày tuy nhiên chưa tạo được khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng

(dòng A) và các dòng C, D, E, F, G, H và L. Đường kính hoa cũng là một tiêu chí trong chọn giống trên hoa chuông, ở chỉ tiêu này đường kính hoa lớn nhất thuộc về dòng E (9,1 cm) khác biệt không có ý nghĩa so với dòng đối chứng và các dòng B, C, F, G và L. Về chỉ tiêu số nụ hoa dòng D là dòng tạo được khác

biệt có ý nghĩa thống kê so với dòng đối chứng và tất cả các dòng còn lại với số nụ nhiều nhất đạt 16,4 nụ/cây. Dòng đối chứng là dòng có độ dày lá mỏng, kết quả quan sát cho thấy có 03 dòng bao gồm D, F và L có độ dày lá dày hơn so với đối chứng và tất cả các dòng còn lại.

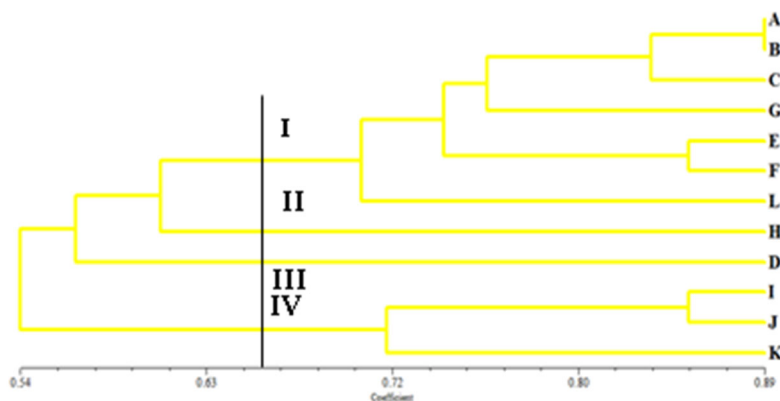
Bảng 3: Một số tiêu chí đánh giá hoa chuông đỏ kép biến dị

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	Độ dày lá
A	Đối chứng	64,3 ^a	66,7 ^b	15,4 ^a	8,2 ^a	10,5 ^b	Mỏng
B	Vệt trắng lớn (đọc theo cánh hoa)	63,2 ^a	68,6 ^b	17,5 ^a	9,0 ^a	9,4 ^{bc}	Mỏng
C	Vệt trắng ít hơn B	65,6 ^{ab}	68,5 ^b	14,8 ^a	8,1 ^a	13,5 ^b	Mỏng
D	Có vệt trắng dọc cánh, cánh hoa hướng lên	63,5 ^a	65,2 ^a	16,4 ^a	7,5 ^b	16,4 ^a	Dày
E	Có vệt trắng ở viền cánh, cánh cong	64,3 ^a	69,8 ^{bc}	14,7 ^a	9,1 ^a	12,8 ^b	Mỏng
F	Vệt trắng nhỏ ở viền cánh	66,5 ^b	69,2 ^{bc}	15,5 ^a	8,4 ^a	12,6 ^b	Dày
G	Cánh đứng, vệt trắng ở viền cánh ít	63,1 ^a	65,3 ^a	14,8 ^a	8,3 ^a	11,5 ^b	Mỏng
H	Cánh hoa có đốm trắng tròn	65,5 ^{ab}	67,3 ^{ab}	16,7 ^a	7,4 ^b	8,4 ^c	Mỏng
I	Hoa phân tầng, cánh có màu xanh	67,6 ^b	70,8 ^c	8,1 ^b	7,3 ^b	8,5 ^c	Mỏng
J	Hoa phân tầng, cánh hoa có điểm xanh, cánh hoa bị dị dạng	66,5 ^b	69,7 ^{bc}	7,5 ^b	7,2 ^b	10,2 ^b	Mỏng
K	Cánh hoa bị dị dạng	64,4 ^a	68,5 ^b	10,3 ^b	7,8 ^b	10,8 ^b	Mỏng
L	Cánh hoa đứng thẳng	65,6 ^{ab}	68,6 ^b	16,7 ^a	8,2 ^a	11,4 ^b	Dày
CV%		32,5%	28,2%	24,5%	22,8%	32,5%	

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (**)

Thông tin từ kiểu hình không chỉ vì phục vụ mục đích mô tả và phân tích mà còn để thu nhận thông tin giá trị về cấu trúc genome và kiểm soát di truyền các tính trạng có ích mà không cần phát triển bản đồ quần thể chuyên biệt, bảo tồn nguồn vật liệu di truyền và tăng giá trị khoa học cho công tác chọn tạo giống (Clemen, 2003; Marcano, 2007). Dựa trên đặc

điểm về kiểu hình như màu sắc hoa, hình dạng cánh hoa để phân tích mối quan hệ của các dòng hoa hoa Chuông biến dị với dòng đối chứng. Theo đó, 28 đặc điểm về kiểu hình hoa Chuông đỏ kép được chọn phân tích trên 12 dòng kép biến dị để vẽ được sơ đồ phân nhóm di truyền trên nhóm này theo kiểu hình có mức độ tương đồng di truyền từ 0,54 đến 0,89 (Hình 3).



Hình 3: Sơ đồ phân nhóm di truyền các dòng biến dị hoa chuông đỏ kép theo kiểu hình

Kết quả trên cho thấy ở hệ số tương đồng di truyền là 0,69, 12 dòng biến dị hoa chuông đỏ kép được chia thành bốn nhóm chính.

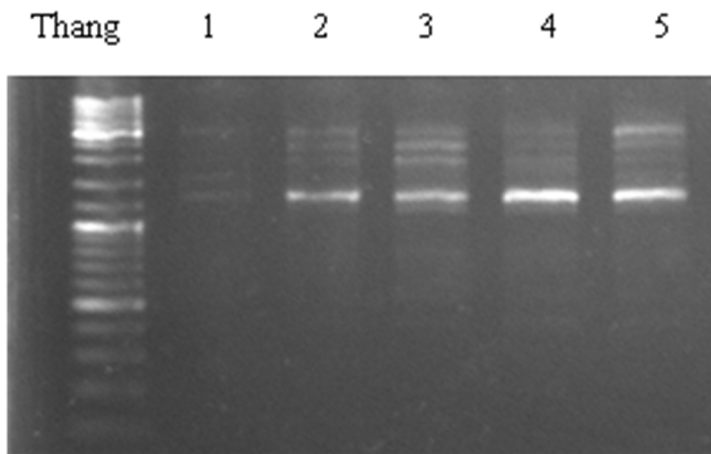
Nhóm I là nhóm lớn gồm 6 dòng biến dị B, C, G, E, F, L và dòng đối chứng A. Giữa dòng A và dòng B có hệ số tương đồng cao nhất (0,89) với hoa có kiểu hình cánh hoa có điểm trắng nhiều, thời gian sinh trưởng, thời gian ra hoa như nhau, lá mỏng, hoa bèn. Dòng biến dị B có kiểu di truyền gần với dòng đối chứng theo di truyền hình thái, nên dòng này có khả năng sinh trưởng phát triển tốt như giống đối chứng nhưng có kiểu hình hoa khác đối chứng cánh hoa có tia trắng xuyên dọc, lượng gam màu trắng nhiều. Bên cạnh đó, dòng biến dị E, F có hệ số tương đồng di truyền (0,85). Nhóm II chỉ có một dòng biến dị H, hoa có đột biến đốm tròn trắng ở cánh hoa. Nhóm III cũng có một dòng biến dị D, cánh hoa có vệt trắng dọc cánh, cánh hoa hướng lên. Nhóm IV có 3 dòng biến dị I, J, K với hệ số tương đồng 0,72; trong

đó dòng I, J có mức độ tương đồng cao với hệ số tương đồng là 0,86.

Dựa vào phân tích di truyền giữa 12 dòng biến dị theo kiểu hình có thể chọn ra 4 dòng hoa chuông biến dị có đặc điểm hình thái sinh trưởng phát triển, đặc điểm hoa, hình dạng hoa đẹp và có đặc điểm khác biệt nhau gồm dòng B, dòng H, dòng D, dòng K. Các dòng này được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật RAPD cùng với dòng đối chứng (dòng A).

3.3 Phân tích đa dạng di truyền các dòng hoa Chuông biến dị bằng kỹ thuật RAPD.

Kết quả ly trích DNA bốn dòng đột biến và dòng đối chứng cho thấy các mẫu có tỷ lệ OD260/OD280 đều nằm trong khoảng 1,6 – 1,98 và nồng độ DNA đạt từ 134 - 391 ng/μl đủ điều kiện để thực hiện phản ứng PCR với môi RAPD.

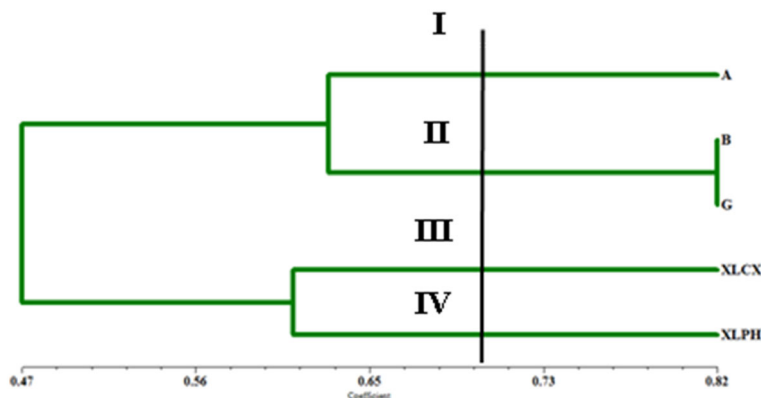


Hình 4: Hình điện di 5 dòng hoa Chuông biến dị với môi OPG13

(Thang: 1kb, 1/ Đối chứng; 2/ Dòng B; 3/ Dòng G; 4/ Dòng có lá xoắn lại cuộn xuống; 5/ Dòng có lá màu xanh pha hồng)

Kết quả khuếch đại các vùng với 10 môi cho thấy 9 môi đã khuếch đại thành công với môi OPE11 và OPE17 cho số sản phẩm PCR khuếch đại là 1, khuếch đại với môi OPE14, OPE16, OPI10, OPI04 cho số sản phẩm PCR khuếch đại là 4 trong đó 2 band đa hình đối với mỗi môi OPE14 và OPE16, khuếch đại với môi OPG12 cho số band

khuếch đại là 3 trong đó 1 band đa hình khuếch đại với môi OPG13 cho số band khuếch đại là 5 trong đó 2 band đa hình và một môi không khuếch đại được sản phẩm PCR. Kết quả PCR – RAPD của các dòng hoa chuông được mã hóa sang hệ nhị phân, tiến hành phân tích trên phần mềm NTSYS-pc version 2.1.



Hình 5: Sơ đồ phân nhóm di truyền dòng biến dị hoa chuông đỏ kép theo kiểu gene

Bốn dòng biến dị (dòng B, dòng G, dòng có lá xoắn lại cuộn xuống và dòng có lá màu xanh pha hồng) được chọn để đánh giá di truyền bằng kỹ thuật RAPD cùng với dòng hoa chuông đối chứng với 10 mẫu khác nhau. Kết quả cho thấy năm dòng hoa chuông đỏ kép được phân thành 4 nhóm với mức độ tương đồng di truyền 0,63. Trong đó nhóm I chỉ có dòng A là mẫu hoa chuông đối chứng. Nhóm II có dòng B, G có hệ số tương đồng di truyền là 0,82, đồng thời phân tích về kiểu hình cho thấy thời gian sinh trưởng, thời gian ra hoa cũng như độ bền của hoa, lá mỏng, số nụ hoa, kích thước hoa như nhau nên có độ tương đồng về kiểu gene cao. Nhóm III chỉ có dòng biến dị xoắn lại cuộn xuống với. Nhóm IV cũng có một dòng biến dị màu xanh pha hồng. Từ kết quả trên, dòng biến dị B được sử dụng để nhân giống vì có các đặc điểm như thời gian sinh trưởng ngắn, độ bền của hoa cao, hoa có đường kính lớn, cây sinh trưởng, phát triển tốt và khác biệt về mặt di truyền so với dòng đối chứng trong nghiên cứu này là 40%. Đồng thời các đặc tính về kiểu hình ổn định qua nhiều thế hệ. Dòng biến dị này rất có triển vọng trong việc phát triển giống hoa chuông mới

4 KẾT LUẬN

Chọn được 12 dòng biến dị có sự khác biệt về kiểu hình so với dòng đối chứng khi chiếu xạ bằng tia gamma Co⁶⁰. Đặc điểm hình thái của 12 dòng hoa chuông biến dị trồng ở điều kiện nhà màng có tương đồng phân nhóm theo kiểu hình là 0,69 chia 12 dòng biến dị thành bốn nhóm chính. Phân tích di truyền dựa trên kỹ thuật RAPD thì 4 dòng hoa chuông biến dị và dòng hoa chuông đối chứng được phân thành 4 nhóm với mức độ tương đồng di truyền 0,63. Phân tích di truyền theo kiểu hình, kiểu gene chọn được dòng biến dị B trong các biến dị của hoa chuông đỏ kép mang các đặc tính hình thái nổi trội và có sự khác biệt về mặt di truyền, cũng như hình thái hoa so với giống đối chứng; và đây là dòng triển

vọng có thể nhân và phát triển thành giống hoa chuông mới.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí và cơ sở vật chất để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahloowalia, B. S., and Maluszynski, M., 2001. Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*. 118(2): 167-173

Barakat M. N., El S. and Heba., 2011. In vitro mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in Baby's breath *Gypsophila paniculata* L.. *Australia Journal of Crop Science*. 5(Yu GJ1): 214-222.

Boora, K. S. and Dhillon, R. S., 2010. Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*. 9: 50-57.

Chakrabarty, D. and Datta, S., 2010. Application of RAPD markers for characterization of γ -ray-induced rose mutants and assessment of genetic diversity. *Plant Biotechnology Reports*. 4(3): 237-242.

Dubreuil, M., Riba, M. and Mayol, M., 2008. Genetic structure and diversity in *Ramonda myconi* (Gesneriaceae): effects of historical climate change on a preglacial relict species. *American Journal of Botany*. 95(5): 577-587.

Lê Tiến Vinh, Ninh Thị Thảo, Lê Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thủy và Nguyễn Thị Phương Thảo., 2014. Quy trình nhân giống in vitro cây Đan Sâm (*Salvia multiorrhiza* Bunge). *Tap chí khoa học và Phát triển*. 12 (5): 744-752.

Marcano M, Pugh T and Cros E, et al., 2007. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theor Appl Genet*. doi: 10.1007/s00122-006-0486-9

- Minami, K. and Salvador, E. D., 2005. Evaluation of Different Substrates on Gloxinia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) Growth. In International Symposium on Growing Media. 779: 555-560.
- Pang, J. L., Wang, L. L., Hu, J. Q., Xiang, T. H. and Liang, H. M., 2006. Morphological studies on direct regeneration of floral buds from in vitro cultures of sepal segments in *Sinningia Speciosa* Hiern. *Journal of molecular cell biology*. 39(4): 383-389.
- Park, E. H., Bae, H., Park, W. T., Kim, Y. B., Chae, S. C. and Park, S. U., 2012. Improved shoot organogenesis of gloxinia (*'Sinningia speciosa'*) using silver nitrate and putrescine treatment. *Plant Omics*. 5(1): 6-9.
- Verma, V. K., Behera, T. K., Munshi, A. D., Parida, S. K. and Mohapatra, T., 2007. Genetic diversity of ash gourd [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] inbred lines based on RAPD and ISSR markers and their hybrid performance. *Scientia horticulturae*. 113(3): 231-237.