

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA COLCHICINE TRONG CHỌN TẠO GIỐNG QUÍT HỒNG LAI VUNG TỨ BỘI (*CITRUS RETICULATA* BLANCO)

Nguyễn Thị Ngọc Trâm¹, Trần Nhân Dũng¹ và Đỗ Tấn Khang¹

ABSTRACT

The study was performed on two different materials: in vitro seedlings and in vivo sections of shoots with sprouting axillary buds. The purpose was to study on the interfering of concentration of colchicine and immersed time in these materials to get tetraploid cells. The results of colchicine application in vitro seedlings concluded that 3cm was the minimum length of in vitro seedlings to be applied colchicine, and the 100% mortality was all concentrations of colchicines at 24 hours. The highest survival rate of seedlings was on two treatments of 0.05% colchicine and 0.1% colchicine for 3 hours. In colchicines application in vivo sections of shoots with sprouting axillary buds, the results indicated that highest survival rate of scions after colchicine treatment or after grafting 20 days were on two treatments of 0.1% colchicine, 24 hours and 0.2% colchicine, 48 hours. Lastly, the lethal dose for 100% of sections was at colchicine concentration of 0.2% for 72 hours.

Keywords: *Citrus reticulata* Blanco, colchicine, flow cytometry, grafting, tetraploids

Title: *Induction, regeneration, and analysis of tetraploids from Hong Lai Vung mandarin oranges (*Citrus reticulata* Blanco) treated with colchicine*

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã được thực hiện trên hai vật liệu khác nhau: cây con in vitro và mắt ghép trên cành bánh tẻ in vivo. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm khảo sát ảnh hưởng nồng độ và thời gian xử lý colchicine để tạo ra thể tứ bội từ hai vật liệu này. Kết quả ghi nhận chiều cao mẫu cây con in vitro tối ưu để xử lý colchicine là từ 3cm trở lên và ngưỡng chết 100% của mẫu là 24 giờ ở tất cả các nồng độ colchicine xử lý. Tỷ lệ sống cao nhất của thí nghiệm này là hai nghiệm thức 0,05% và 0,1% trong 3 giờ xử lý. Đối với thí nghiệm xử lý colchicine trên mắt ghép cành bánh tẻ, kết quả ghi nhận tỉ lệ sống của mắt ghép cao nhất ở giai đoạn ngay sau xử lý, sau ghép 20 ngày và tỉ lệ bất chôi cao nhất đều nằm ở 2 nghiệm thức 0,1% colchicine, 24 giờ và 0,2% colchicine, 48 giờ. Cuối cùng, ngưỡng chết 100% của các mắt ghép là xử lý ở nồng độ colchicine 0,2% trong 72 giờ.

Từ khóa: *colchicine, ghép cây, phân tích dòng chảy tế bào, quýt Hồng Lai Vung, tứ bội*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Quýt là một trong những loại trái cây có giá trị kinh tế cao. Nó cung cấp nhiều chất dinh dưỡng cần thiết cho cơ thể. Vỏ quýt giàu pectin được sử dụng làm mứt kẹo, tinh dầu của chúng còn được sử dụng nhiều trong công nghệ thực phẩm, dược liệu và mỹ phẩm (Michael *et al.*, 2006). Ở Việt Nam có nhiều loại quýt được trồng phổ biến cả nước như: quýt đường, quýt Hồng Lai Vung, quýt Phú Quý,... một mặt đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước, mặt khác thu nguồn ngoại tệ lớn từ xuất khẩu. Đặc biệt, giống quýt Hồng Lai Vung, Đồng Tháp với nhiều đặc tính vượt trội so với các giống quýt khác như: có vỏ láng, khi chín có màu vàng đậm đặc

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

trung, rất dễ bóc, thịt có màu cam tươi, có thể dùng ăn tươi hoặc làm nước uống. Quýt Hồng thường chín vào dịp tết Nguyên Đán, là thành phần quen thuộc trên mâm Ngũ quả, làm tăng thêm giá trị kinh tế của giống quýt này. Tuy nhiên, giống quýt này có một nhược điểm là có nhiều hạt. Điều này không những gây khó khăn trong việc chế biến mà còn làm giảm chất lượng sản phẩm và khả năng cạnh tranh với các sản phẩm cùng loại nhập khẩu từ Trung Quốc, Thái Lan, Mỹ.

Vấn đề được đặt ra cho các nhà chọn giống là tạo ra giống quýt Hồng Lai Vung không hạt (tam bội) làm tăng chất lượng và tính cạnh tranh cho sản phẩm bằng phương pháp lai giống tứ bội và lưỡng bội bình thường. Trong các phương pháp gây đột biến đa bội đặc biệt là tứ bội như gây chấn thương cơ giới, sốc nhiệt, tia ronghen thì phương pháp hóa học đơn giản và nhanh nhất là xử lý các giống cây trồng nói chung và quýt nói riêng với colchicine để tạo giống quýt tứ bội.

Đề tài “*Đánh giá hiệu quả của colchicine trong chọn tạo giống quýt Hồng Lai Vung tứ bội (Citrus reticulata Blanco)*” được thực hiện nhằm đánh giá khả năng ảnh hưởng của nồng độ colchicine và thời gian xử lý colchicine để tạo giống quýt Hồng Lai Vung tứ bội từ hai nguồn vật liệu: cành bánh tẻ và cây con được nuôi cấy mô từ hạt, xác định chiều cao cây con nuôi cấy mô thích hợp để xử lý colchicines và ứng dụng phương pháp phân tích dòng chảy tế bào (flow cytometry) để phân tích mức bội thể của các mẫu đã xử lý đột biến.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 2 vật liệu là cành bánh tẻ và hạt quýt thuộc giống quýt Hồng được thu thập từ 3 xã Long Hậu, Tân Thành và Tân Phước, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. Chọn cây mẹ có ít nhất 5 năm cho quả, cây sinh trưởng tốt, cho năng suất cao và ổn định, chất lượng quả ngon. Đặc biệt, cây không bị nhiễm bệnh vàng lá greening. Ngoài ra còn sử dụng 2 giống chanh Volka và chanh Tàu làm cây gốc ghép trong thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Đánh giá tác động của colchicine đối với các mẫu cây con trồng trong ống nghiệm để tạo quýt Hồng Lai Vung tứ bội

Nuôi cấy mô hạt quýt Hồng trong môi trường MS cơ bản, tạo thành cây con trong 4 tuần. Tiến hành xử lý mẫu cây con với 4 nồng độ colchicine (0,01%; 0,025%; 0,05%; 0,1%) ở 5 mốc thời gian (3 giờ, 6 giờ, 9 giờ, 12 giờ, 24 giờ). Trong thời gian xử lý, mẫu được lắc đều ở tốc độ 150 vòng/phút trong dung dịch. Tổng số 20 nghiệm thức thí nghiệm 3 lần lặp lại. Tổng số mẫu là 423 mẫu. Thí nghiệm được tiến hành trong tối.

Sau thời gian xử lý, cây con được lấy ra khỏi dung dịch colchicine, rửa sạch hóa chất bằng nước cất 1 lần đã khử trùng và được nuôi cấy tiếp tục trong môi trường MS cơ bản có bổ sung BA 10 mg/ml và NAA 2 mg/ml phát triển chồi trong 4 tuần. Trong điều kiện chiếu sáng tự nhiên (theo chu kỳ ánh sáng mặt trời). Nhiệt độ phòng là $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Chỉ tiêu theo dõi, đánh giá

Quan sát cây con trồng từ hạt trong ống nghiệm từ sau khi xử lý colchicine đến 4 tuần để xác định: tỉ lệ sống, số chồi và lá phát sinh trên 1 mẫu xử lý, chiều cao gia tăng của mẫu.

Sau 4 tuần, kiểm tra mức độ đa bội của quýt Hồng Lai Vung ở các nghiệm thức bằng phương pháp phân tích dòng chảy tế bào trên bằng máy Partec Ploidy Analyser PA-I. Đây là phương pháp kiểm tra mức độ đa bội của tế bào sau khi xử lý colchicine nhanh và chính xác hơn so với phương pháp đếm nhiễm sắc thể. Máy xác định độ đa bội của mẫu thông qua ước lượng nội dung DNA, sau khi chúng đã được nhuộm huỳnh quang (fluorescence). Máy sẽ phân tích các thuộc tính huỳnh quang và các tán xạ ánh sáng (light-scattering) của các hạt đơn khi chúng được vận chuyển trong dòng chất lưu dẫn hẹp.

Thí nghiệm 2: Đánh giá tác động của colchicine đối với các mắt ghép để tạo quýt Hồng Lai Vung tứ bội

Xử lý mắt ghép trên cành bánh tẻ với 4 nồng độ colchicine (0,1%; 0,2%, 0,3% và đối chứng không xử lý) ở 3 mốc thời gian (24 giờ, 48 giờ, 72 giờ). Tổng số 9 nghiệm thức thí nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành trong tối.

Sau khi xử lý, cành bánh tẻ được rửa sạch hóa chất bằng nước cất 1 lần. Sau đó, ghép mắt ghép đã xử lý colchicine vào cây gốc ghép. Kiểu ghép là ghép áp hoặc ghép mắt. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tổng số mẫu là 220 cành.

Chỉ tiêu theo dõi, đánh giá

Quan sát các mắt ghép từ sau khi xử lý colchicine, sau khi ghép lên cây gốc ghép và đến khi bật chồi, phát sinh lá để xác định ảnh hưởng của colchicine lên các chỉ số phát triển các mắt ghép: tỉ lệ mắt ghép sống sót ngay sau thời gian xử lý, tỉ lệ mắt ghép sống sót sau khi ghép 20 ngày, số mắt ghép bật chồi, thời gian từ lúc ghép đến lúc bật chồi, số lá phát sinh từ mắt ghép.

Sau khi ghép 5-6 tuần, các lá phát sinh từ các mắt xử lý được đánh giá sự thay đổi hình thái bằng cách quan sát dưới kính hiển vi xác định mật số khí khổng trên 1 mm² và kích thước khí khổng (µm) so với các mẫu đối chứng. Lặp lại 10 lần đếm và đo trên 1 mẫu thí nghiệm.

Cuối cùng, kiểm tra mức độ đa bội thể của các mẫu lá bằng máy Partec Ploidy Analyser PA-I.

2.2.2 Phân tích số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Plus v4.0. Phân tích phương sai (ANOVA), so sánh giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định DUNCAN ở mức ý nghĩa 5%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đánh giá tác động của colchicine đối với các mẫu cây con *in vitro* để tạo quýt Hồng Lai Vung tứ bội

3.1.1 Tỷ lệ sống của các mẫu cây con nhị bội *in vitro* sau khi xử lý colchicine

Sau 4 tuần theo dõi tỉ lệ sống của các cây con *in vitro* (Bảng 1), nhận thấy mặc dù nồng độ colchicine không làm các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa, nhưng từ tuần thứ hai trở đi, tỉ lệ sống cao nhất của cây con ở 0,05% colchicine xấp xỉ gấp 2 lần tỉ lệ sống thấp nhất của cây con ở 0,1% colchicine. Tức là khi nồng độ tăng lên gấp đôi thì tỉ lệ sống gần như giảm một nửa. Điều này cũng được Trần Thị Hạnh *et al.* (2003) ghi nhận trên cây có múi khi xử lý chồi ở nồng độ 0,05% colchicine, thời gian xử lý 48 giờ và 72 giờ gần như không có ảnh hưởng đến sức sống của chồi. Khi nồng độ tăng lên gấp đôi, ảnh hưởng được biểu hiện rõ ngay ở thời gian xử lý 24 giờ. Ở nồng độ 0,2% và thời gian 24 giờ, tỉ lệ sống giảm xuống 50%. Ngoài ra, nhận thấy rằng mốc thời gian 24 giờ, có thể là ngưỡng chết của các cây con quýt Hồng *in vitro* xử lý colchicine vì sang tuần thứ 2, toàn bộ các nghiệm thức xử lý ở 24 giờ đều chết.

Bảng 1: Tỷ lệ sống (%) của các mẫu cây con nhị bội *in vitro* sau 4 tuần xử lý colchicine ở nồng độ và thời gian khác nhau

Nồng độ colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỷ lệ sống (%)			
		Tuần 1*	Tuần 2 ^{ns}	Tuần 3 ^{ns}	Tuần 4*
0.01	3	51 abc	44	1	0 b
0.025	3	52 abc	50	50	50 ab
0.05	3	77 ab	68	67	67 a
0.1	3	86 ab	60	53	52 ab
0.01	6	60 abc	48	38	38 ab
0.025	6	57 abc	50	33	33 ab
0.05	6	71 ab	55	33	33 ab
0.1	6	96 a	57	4	4 b
0.01	9	63 abc	53	33	0 b
0.025	9	44 abc	44	33	0 b
0.05	9	52 abc	37	33	0 b
0.1	9	0 c	0	0	0 b
0.01	12	49 abc	49	5	3 b
0.025	12	49 abc	33	33	33 ab
0.05	12	41 abc	41	37	37 ab
0.1	12	78 ab	28	17	17 ab
0.01	24	0 c	0	0	0 b
0.025	24	6 c	0	0	0 b
0.05	24	0 c	0	0	0 b
0.1	24	33 bc	0	0	0 b

Ghi chú: Những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định DUNCAN, (*): khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; (ns): khác biệt không có ý nghĩa

3.1.2 Tỷ lệ sống của cây khi xử lý colchicine ở các chiều cao cây khác nhau

Chiều cao mẫu khi bắt đầu xử lý colchicine có ảnh hưởng lớn đến mức độ thành công của thí nghiệm. Mục đích thí nghiệm này nhằm xác định chiều cao thích hợp

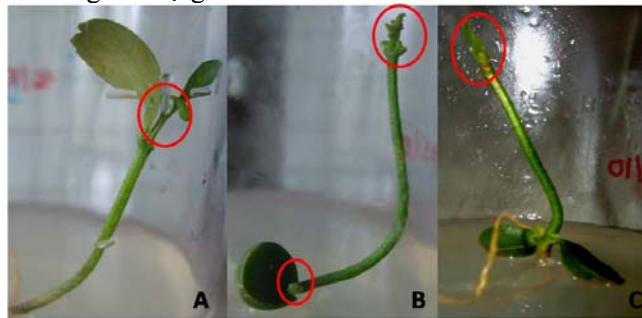
của mẫu khi đưa vào xử lý colchicine, hạn chế nguyên nhân cây chết do quá yếu không thể chịu nổi nồng độ và thời gian xử lý. Dựa vào mối tương quan giữa chiều cao cây con *in vitro* khi bắt đầu xử lý và tỉ lệ cây sống trong 4 tuần sau xử lý thể hiện trong bảng 2 kết luận rằng khi tiến hành xử lý nên chọn đồng loạt một khoảng chiều cao nhất định từ 3 cm trở lên và loại bỏ các mẫu có chiều cao quá thấp.

Bảng 2: Tỉ lệ sống của cây khi xử lý colchicine ở các chiều cao cây khác nhau

Chiều cao cây	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
Mới nhú, đâm rễ, nhỏ hơn 0,5 cm	8	0	0	0
0,5 - 1 cm	20	4	2	0
1-2 cm	21	3	3	3
2-3 cm	34	14	2	2
3-3,5 cm	51	20	5	5
3,5-4 cm	56	32	12	7
4-4,5 cm	68	62	35	22
Tỉ lệ sống tổng cộng (%)	36	19	8	5

3.1.3 Chiều cao cây gia tăng, số chồi và số lá phát sinh của các mẫu cây con *in vitro* sau 4 tuần xử lý colchicine

Sau thời gian xử lý colchicine, các mẫu được cấy vào môi trường MS có bổ sung BA 10 mg/l và NAA 2 mg/l để kích thích sự phát sinh chồi mới. Sau 4 tuần cây chuyển, những cây con *in vitro* phát sinh chồi và lá mới, đồng thời cũng phát triển chiều cao (Hình 1). Nhìn vào Bảng 3 nhận thấy, nồng độ colchicine không tạo ra nhiều sự khác biệt về số chồi phát sinh và chiều cao gia tăng; nhưng trong cùng một nồng độ colchicine, 2 thông số này giảm dần khi thời gian xử lý tăng. Ví dụ, ở nồng độ 0,1% colchicine, khi thời gian là 3 giờ số chồi phát sinh là 4, chiều cao tăng là 0,3cm; khi thời gian tăng lên 6 giờ, số chồi phát sinh là 2, chiều cao tăng lên là 0,2cm. Theo kết quả nghiên cứu của Raza *et al.* (2003) cũng cho thấy số chồi đưa hầu của nghiệm thức không xử lý colchicine cao hơn nghiệm thức xử lý colchicine 4 ngày và số chồi càng thấp hơn khi tăng thời gian xử lý colchicine 7 ngày. Còn theo Silva *et al.* (2002), colchicine ảnh hưởng đến chiều cao của chồi có thể do nó tác động lên cytokinin và làm thay đổi tỉ lệ auxin/cytokinin trong tế bào, nên làm ảnh hưởng đến sự giãn dài tế bào.



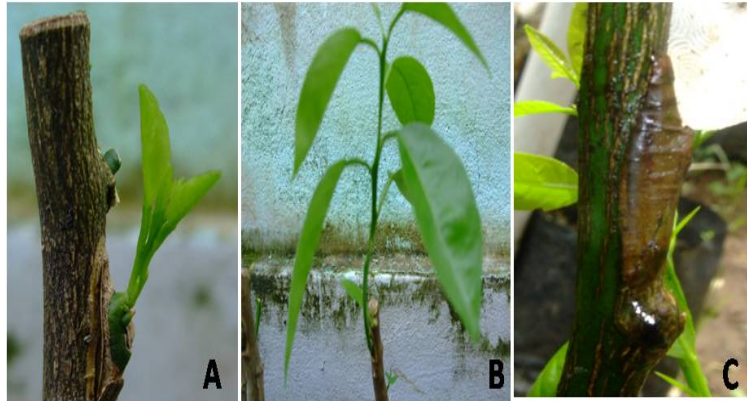
Hình 1: Các mẫu cây phát sinh chồi, lá và gia tăng chiều cao sau khi xử lý colchicine 0.05%

A. Chiều cao gia tăng; B. Chồi mới phát sinh ở ngọn và cuối thân; C. Lá mới phát sinh ở chồi ngọn

3.2 Đánh giá tác động của colchicine đối với các mắt ghép để tạo quýt Hồng Lai Vung tứ bội

3.2.1 Tỷ lệ sống của các mắt ghép sau khi xử lý colchicine và tỷ lệ các mắt ghép bật chồi, thời gian từ lúc ghép đến lúc bật chồi và số lá phát sinh từ mắt ghép

Theo Bảng 5, trung bình có 70% mắt ghép còn sống ngay sau thời gian xử lý colchicine. Nhìn chung, tỷ lệ sống sót giảm dần khi nồng độ colchicine và thời gian xử lý tăng lên. Tỷ lệ sống cao nhất được thể hiện ở nghiệm thức 0,1% colchicine ở 24 giờ, so với tỷ lệ sống thấp nhất chỉ có 46% ở nghiệm thức 0,3% colchicine ở 72 giờ. Trong 70% mắt ghép còn sống ngay sau xử lý đó, chỉ có tổng số 11% mắt ghép còn sống sau 20 ngày ghép, và 3% mắt ghép bật chồi. Tỷ lệ không cao này có thể được giải thích bởi một số lý do sau: Thứ nhất, thời tiết mưa bão vào tháng 9 làm cho ẩm độ trong môi trường quá cao, khiến cho các mắt ghép đang trong giai đoạn tạo nhựa, liền mạch với gốc ghép tiết mủ hôi làm úng vị trí ghép, mắt ghép không được cây gốc ghép tiếp chất dinh dưỡng nên chết (Hình 2). Mặt khác, mắt ghép được ngâm trong colchicine trong thời gian đến 72 giờ, ngoài tác dụng của hóa chất làm giảm tỷ lệ sống và sức nảy mầm của các mắt ghép mà còn làm các mắt ghép dễ bị úng. Điều này có thể thấy rõ khi so sánh tỷ lệ mắt ghép sống qua 20 ngày của mẫu đối chứng ngâm trong nước 72 giờ chỉ có 25%, và 0% mắt ghép bật chồi. Ngoài ra, kỹ thuật ghép cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của các mắt ghép. Thêm vào đó, tỷ lệ mắt ghép quýt Hồng Lai Vung sống và bật chồi trên các gốc ghép sau khi xử lý colchicine còn thấp cũng có thể do nguyên nhân tỷ lệ ghép thành công của các giống quýt là không cao so với các giống khác cùng họ Citrus. Theo kết quả của Hà Thị Thúy *et al.*, (2003), tỷ lệ mắt ghép sống và bật chồi của Quýt Chum cao nhất là 40%, so với các giống cây có múi khác thì thấp hơn, như Cam Vân Du: 72%, Cam Sông Con 71%, Cam Sành 76%, Bưởi Phúc Trạch 68%.



Hình 2: Sự sinh trưởng của các mắt ghép

- A. Mắt ghép bật chồi B. Mắt ghép phát sinh lá C. Mắt ghép chết do úng mưa

Bảng 3: Chiều cao, số lá và chồi gia tăng /mẫu cây con *in vitro* sau 4 tuần xử lý colchicine ở nồng độ và thời gian khác nhau

Nồng độ colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Số chồi gia tăng/mẫu (chồi)	Số lá gia tăng/mẫu (lá)	Chiều cao gia tăng/mẫu (cm)
0,01	6	4	0	0,4
	12	5	3	0,2
	3	3	4	0,3
0,025	6	2	3	0,3
	12	2	0	0,1
	3	4	4	0,2
0,05	6	1	1	0,2
	12	3	0	0,1
	3	4	1	0,3
0,1	6	2	1	0,2
	12	3	3	0,1

Ghi chú: những nghiệm thức không có trong bảng là những mẫu đã chết sau 4 tuần xử lý

3.2.2 Mật số khí khổng và kích thước khí khổng của các mẫu lá phát sinh từ mắt ghép sau xử lý colchicine

Dựa vào bảng 4 và hình 3, nhận thấy mật số khí khổng và kích thước khí khổng của các nghiệm thức luôn nhỏ hơn các mẫu đối chứng và có khác biệt ý nghĩa ở mức thống kê 5%. Hai nghiệm thức 0,1% colchicine xử lý trong 24 giờ và 0,2% colchicine trong 48 giờ đều cho mật số khí khổng thấp hơn mẫu đối chứng và kích thước khí khổng lớn hơn mẫu đối chứng. Theo Silva *et al.* (2000), mật số khí khổng trên cây tứ bội thấp hơn cây lưỡng bội và theo Oiyama và Okudai (1986) mật số khí khổng của một loại citrus "Hyuganatsu" tứ bội là 560,5/mm² và lưỡng bội là 790,8/mm². Tương tự, nghiên cứu trên quýt Kinnow của Usman *et al.* (2008) ghi nhận chiều dài và chiều rộng khí khổng của cây lưỡng bội là 19,8µm và 15,3µm, còn đa bội là 21,9µm và 19,3µm. Do vậy, kết hợp với kết quả bật chồi, phát sinh lá ở mắt ghép, 2 nghiệm thức 0,1% ở 24 giờ và 0,2% ở 18 giờ có khả năng tạo đa bội cao.

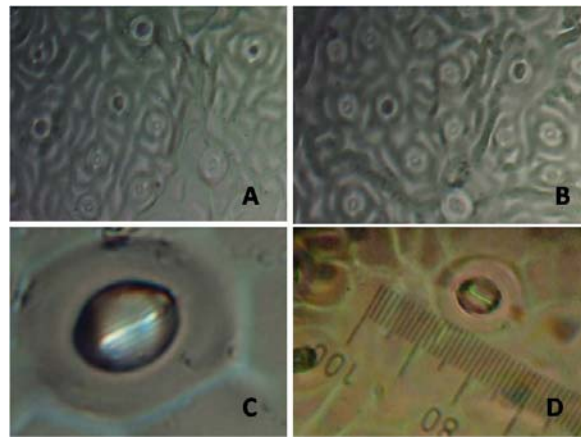
Bảng 4: Mật số khí khổng (số khí khổng/mm²) và kích thước khí khổng (µm) của các mẫu lá phát sinh từ mắt ghép ở các nồng độ colchicine và thời gian xử lý khác nhau

Thời gian xử lý (giờ)	Nồng độ Colchicine (%)	Mật số khí khổng/mm ²	Đường kính dài khí khổng (µm)	Đường kính ngắn khí khổng (µm)
24	0	613,2 ± 61,9 ab	16,1 ± 3,1 c	12,5 ± 2,4 c
	0,1	559,3 ± 92,4 bc	23,2 ± 7,6 a	16,3 ± 5,8 b
	0,2	530,9 ± 92,3 c	17,6 ± 4,2 c	13,3 ± 2,1 bc
48	0	668,5 ± 97,3 a	18,1 ± 4,0 bc	14,0 ± 3,0 bc
	0,1	548,8 ± 60,0 bc	18,2 ± 5,6 bc	13,2 ± 3,7 bc
	0,2	571,1 ± 49,4 bc	22,6 ± 4,6 ab	16,7 ± 4,3 b
72	0,1	570,6 ± 58,0 bc	19,4 ± 4,9 abc	14,3 ± 5,1 bc
F		*	*	*
CV (%)		23,59	1,60	1,25

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định DUNCAN, (*): khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Bảng 5: Tỷ lệ (%) các mắt ghép bật chồi so với tổng số mắt ghép được ghép, thời gian từ lúc ghép đến lúc bật chồi và số lá phát sinh từ mắt ghép ở các nồng độ colchicine và thời gian xử lý khác nhau

Nồng độ Colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỷ lệ mắt ghép còn sống sau xử lý (%)	Tỷ lệ mắt ghép còn sống sau 20 ngày ghép (%)	Tỷ lệ mắt ghép bật chồi (%)	Thời gian từ lúc ghép đến lúc bật chồi (ngày)	Số lá phát sinh từ một mắt ghép (lá)
0.1	24	100	20	7	10-25	2-7
	48	83	13	2	35	2
	72	64	18	3	20	1
0.2	24	82	16	2	10	1
	48	84	12	4	25	5-7
	72	47	0	0	0	0
0.3	24	75	0	0	0	0
	48	59	3	0	0	0
	72	46	6	0	0	0
Mẫu đối chứng 2n	24	67	14	14	25	7
	48	67	29	14	15	7
	72	39	25	0	0	0
Trung bình (%)		70	11	3		



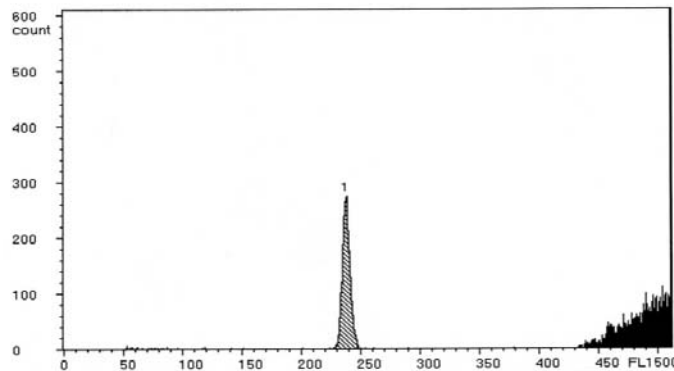
Hình 3: Hình chụp khí khẩu của các mẫu lá phát sinh từ mắt ghép sau xử lý colchicine

- A. Mật số khí khẩu ở vật kính 40X của lá ở nghiệm thức 0,1% colchicine, 24 giờ
- B. Mật số khí khẩu ở vật kính 40X của lá đối chứng, 24 giờ
- C. Kích thước khí khẩu ở vật kính 100X của lá ở nghiệm thức 0,1% colchicine, 24 giờ
- D. Kích thước khí khẩu ở vật kính 100X của lá đối chứng, 24 giờ

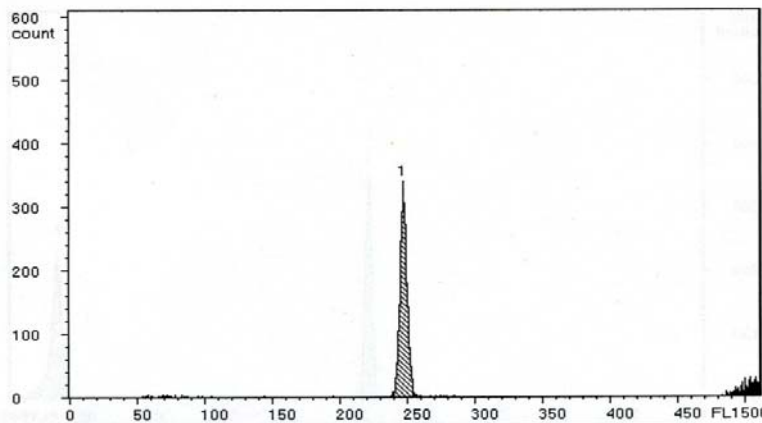
3.3 Phân tích mức đa bội thể của các mẫu cây con in vitro còn sống sau 4 tuần xử lý colchicine và của các mắt ghép bật chồi sau khi xử lý colchicine bằng phương pháp dòng chảy tế bào

Sau khi xử lý colchicine, các cây con *in vitro* còn sống sau 4 tuần và các mắt ghép còn sống sau 30 ngày phát sinh chồi và lá mới được phân tích mức đa bội thể bằng phương pháp phân tích dòng chảy tế bào trên máy Partec Ploidy Analyser I. Tuy nhiên, kết quả phân tích ghi nhận không có mẫu nào đột biến đa bội. Các mẫu

phân tích đều có giá trị nội dung DNA nhân xấp xỉ mẫu đối chứng, nên đều mang bội NST $2n=18$. Mẫu đối chứng là các mẫu quýt Hồng ở các xã trước khi xử lý colchicine. Hình 4 và 5 lần lượt minh họa biểu đồ phân tích mức đa bội thể của mẫu cây con *in vitro* xử lý ở 0,05% colchicine trong 6 giờ và mẫu mắt ghép xử lý ở 0,1% colchicine trong 24 giờ.



Hình 4: Biểu đồ minh họa giá trị trung bình của nội dung DNA nhân mẫu cây con *in vitro* xử lý ở 0,05% colchicine trong 6 giờ



Hình 5: Biểu đồ minh họa giá trị trung bình của nội dung DNA nhân mẫu mắt ghép xử lý ở 0,1% colchicine trong 24 giờ

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Đối với các mẫu cây con trồng từ hạt *in vitro*, chiều cao thích hợp của mẫu khi xử lý colchicine là từ 3 cm trở lên. Khi nồng độ colchicine xử lý tăng lên gấp đôi sẽ làm tỉ lệ sống của cây giảm đi một nửa. Ngoài ra, trong cùng một nồng độ colchicine, số chồi phát sinh và chiều cao gia tăng của các mẫu trong quá trình cây chuyển sẽ tỉ lệ nghịch với thời gian xử lý colchicine. Mốc thời gian 24 giờ là ngưỡng chết 100% đối mẫu cây con *in vitro* này. Tỉ lệ sống cao nhất được ghi nhận trong thí nghiệm là hai nghiệm thức colchicine 0,05% và 0,1% xử lý trong 3 giờ.

Đối với các mắt ghép *in vivo*, tỉ lệ sống cao nhất của các mắt ghép sau khi xử lý colchicine, sau khi ghép 20 ngày và tỉ lệ bật chồi cao nhất đều nằm ở hai nghiệm

thức 0,1% colchicine trong 24 giờ và 0,2% colchicine trong 48 giờ. Mật số khí khổng và kích thước dài rộng của khí khổng của hai nghiệm thức này so với mẫu đối chứng có khác biệt ý nghĩa ở mức độ thống kê 5% do vậy có khả năng đa bội cao. Ngoài ra, nghiệm thức 0,2% xử lý trong 72 giờ là ngưỡng chết 100% của các mắt ghép *in vivo* này.

4.2 Đề nghị

Tiến hành lại thí nghiệm xử lý colchicine trên mắt ghép *in vivo* với số mẫu cao hơn và chọn thời gian ghép thích hợp từ tháng 6-8 (trước mùa mưa) để tăng tỉ lệ thành công của thí nghiệm. Đối với thí nghiệm *in vitro*, nên tăng thêm hai mốc thời gian xử lý là 15 giờ và 18 giờ để xác định ngưỡng chết 100% của mẫu cây con *in vitro* chính xác hơn. Ngoài ra, nên bố trí thời gian cấy chồi các mẫu sau khi xử lý colchicine lâu hơn (10-15 tuần) để đánh giá hình thái chồi biến đổi, số lá phát sinh, chiều cao thân gia tăng so với mẫu đối chứng thuyết phục hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hà Thị Thúy, Trần Ngọc Thanh, Đỗ Năng Vịnh, Vũ Văn Vụ. 2003. “Nghiên cứu tạo các dạng tứ bội thể ở các giống cây ăn quả có múi địa phương”. Tạp chí Di truyền học và ứng dụng (4), Viện Di Truyền Nông Nghiệp.
- Hamill, S.D; M.K. Smith và W. A. Dodd. 1992. “In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids”. Maroochy horticultural research station.
- Lê Thiện Nhân. 2008. Ảnh hưởng của colchicine đến sự sinh trưởng và phát triển của cây dưa hấu nhị bội (*Citrullus vulgaris* Schrad.) *in vitro*. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Trồng trọt, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ
- Michael, G.B., D.S. Nameirakpam, L. Seung-Bum, K. J. Robert và D. Henry. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var ‘Ridge Pineapple’: organization and phylogenetic relationships to other angiosperms, *BMC Plant Biology*: 6-21.
- Oiyama, I. and N. Okudai. 1986. “Production of Colchicine-induced Autotetraploidy Plants through Micrografting in Monoembryonic Citrus Cultivars”. *Japan Journal Breed*, Vol. 36: 371-376.
- Raza, H., Jafar M. Jaskani, M. Mumtazkhan and Tanwir A. Malik. 2003. “In vitro Induction of Polyploids in Watermelon and Estimation Based on DNA Content”. *International Journal of Agriculture & Biology*, 3: 298-302.
- Silva, P.A.K.X.M, S. Callegari-Jacques, M.H. Bodanese-Zanettini. 2000. “Induction and identification of polyploids in *Cattaya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques”. *Science Journal*. Vol. 30, No.1.
- Trần Thị Hạnh, Hà Thị Thúy và Đỗ Năng Vịnh. 2003. “Tạo dòng tứ bội thể ở cây cam Xã Đoài bằng xử lý colchicine chồi nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*”. Báo cáo khoa học: Hội nghị Sinh học toàn quốc. NXB Khoa học và kỹ thuật.
- Usman, M., B.F, K.A.G, M.S.K, M.M.K. 2008. “Exploitation of potential target tissues to develop polyploidy in citrus”, *Pakistan Journal Botany*, Vol. 40, 4: 1755-1766.