

# TÁC ĐỘNG CỦA TIA GAMMA NGUỒN $^{60}\text{Co}$ LÊN KHẢ NĂNG TẠO BIẾN DỊ CỦA CÁC PLBs LAN KIẾM TIÊN VŨ (*Cymbidium finlaysonianum*) *in vitro*

Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Nguyễn Trường Giang, Trần Đức Trọng, Huỳnh Hữu Đức\*

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Lan kiếm Tiên Vũ (*Cymbidium finlaysonianum*) là giống lan bản địa Việt Nam có tiềm năng thương mại hóa cao. Tuy nhiên, việc khai thác thương mại một số giống lan kiếm Tiên Vũ còn hạn chế do hệ số nhân giống thấp và một số đặc tính sinh trưởng chưa cao. Hiện nay, việc cải tiến tính trạng bằng chiếu xạ tia gamma trên các đối tượng cây trồng, đặc biệt là các giống hoa kiểng đã và đang được thực hiện thành công. Trong nghiên cứu này, nguồn xạ tia gamma  $^{60}\text{Co}$  với các liều xạ từ 20 Gy đến 300 Gy được áp dụng trên giống lan kiếm Tiên Vũ nhằm đánh giá tác động lên khả năng sống và sinh trưởng của các PLBs. Kết quả cho thấy các PLBs có tỷ lệ sống sót và khả năng sinh trưởng phát triển giảm khi liều chiếu xạ càng cao. Trong đó, liều xạ 120 Gy được xác định là giá trị  $\text{LD}_{50}$  của PLBs lan kiếm sau 12 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, chiếu xạ tia gamma  $^{60}\text{Co}$  với các liều xạ thấp từ 20 Gy đến 50 Gy đều có tác động phần nào lên khả năng sinh trưởng cũng như gây ra một số khác biệt về hình dạng, cấu trúc và kích thước thân, rễ của các chồi phát sinh sau chiếu xạ. Các kết quả này khẳng định khả năng gây biến dị của tia gamma lên khả năng sống và sinh trưởng của lan kiếm nuôi cấy *in vitro* nói riêng và mở ra khả năng áp dụng trong việc tạo giống mới trên các đối tượng giống hoa kiểng khác.

*Từ khóa:* BA, chất điều hòa sinh trưởng, lan kiếm Tiên Vũ, liều chiếu xạ, NAA, tia gamma.

## MỞ ĐẦU

*Cymbidium* được phân bố rộng rãi trải dài từ Tây Bắc dãy Himalaya qua Trung Quốc, Nhật Bản, Ma-lai-xi-a và kéo dài đến phía Bắc nước Úc. Chi *Cymbidium* được nhà thực vật học Otto Swartz - người Thụy Điển mô tả năm 1799 và được sắp xếp riêng vào một chi trong hệ thống phân loại thực vật của thế giới ngày nay. Các loài trong chi này thích nghi đa dạng với nhiều vùng khí hậu khác nhau, phần lớn sống ở các vùng rừng núi khá cao, khô và lạnh, một số loài khác phù hợp với điều kiện nóng ẩm của rừng nhiệt đới. Lan kiếm Tiên Vũ (*C. finlaysonianum*) là loài mọc bụi, phân bố ở Campuchia, Thái Lan, Ma-lai-xi-a, Phi-líp-pin, In-đô-nê-xi-a và ở Việt Nam, lan kiếm Tiên Vũ là loài được thị trường tiếp nhận và ưa chuộng, do đó việc chọn tạo giống mới của loài này là vô cùng thiết yếu. Kỹ thuật lai tạo giống lan dựa trên việc lai tạo hữu tính truyền thống cần nhiều thời gian trong khi việc ứng dụng các kỹ thuật, công nghệ mới còn nhiều hạn chế thì việc sử dụng các tia phóng xạ gây đột biến sẽ giúp việc tạo và phân lập được các dòng biến dị triển vọng làm nguyên liệu ban đầu phục vụ cho công tác chọn tạo giống lan *Cymbidium* mới.

Bức xạ ion hóa là một tác nhân gây biến dị rất hữu hiệu đối với cây trồng. Tia gamma cũng được chứng minh là có tính kinh tế và hiệu quả so với các bức xạ ion hóa khác vì khả năng thâm nhập của chúng giúp ứng dụng rộng rãi hơn trong các kỹ thuật cải tiến các loài thực vật khác nhau (Moussa, 2006). Ảnh hưởng của chiếu xạ gamma đến sự thay đổi hình thái và phản ứng sinh học của thực vật phụ thuộc vào liều lượng bức xạ (Wi *et al.*, 2007). Nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* là điều kiện bắt buộc đối với kỹ thuật lai tạo giống và sự kết hợp giữa nuôi cấy mô tế bào và đột biến sẽ làm tăng hiệu quả đồng thời rút ngắn thời gian chọn tạo giống mới (Vinh *et al.*, 2020). Mục đích của nghiên cứu này là ứng dụng phương pháp gây đột biến phóng xạ tia gamma nguồn  $^{60}\text{Co}$  để đánh giá tác động lên khả năng tạo biến dị của các PLBs lan kiếm *Cymbidium finlaysonianum*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu nghiên cứu

Chồi đơn *in vitro* có từ 4 – 5 lá, cụm Protocorm-like bodies (PLBs) có chứa 2 – 3 PLB giống lan kiếm Tiên Vũ (*C. finlaysonianum*) *in vitro* được lưu giữ tại Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Cảm ứng tạo PLBs lan kiếm làm nguồn vật liệu cho chiếu xạ

Chồi đơn *in vitro* có từ 4 – 5 lá được cắt bỏ rễ và lá, cắt đoạn thân có kích thước 1 cm (tính từ gốc), hủy đỉnh, tạo vết thương ở gốc và cấy trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 8 g/L agar; BA (0,5 – 2,0 mg/L); NAA (0,5 – 1,0 mg/L); được điều chỉnh ở pH = 5,7. Sự kết hợp của BA và NAA ở các tỷ lệ khác nhau có thể tối ưu hóa quá trình tạo PLBs, dựa trên kết quả nghiên cứu về các đối tượng cây trồng

khác nhau, thí nghiệm được chia làm 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 chai, mỗi chai 6 mẫu (Đức *et al.*, 2022). Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%), số PLBs (PLB/mẫu), số chồi (chồi/mẫu), tỷ lệ mẫu tăng trưởng chồi (%), tỷ lệ mẫu chết/không tạo chồi/PLBs (%).

**Đánh giá tác động của liều chiếu xạ lên khả năng sinh trưởng của PLBs lan kiểm: xác định LD<sub>50</sub>**

PLBs được nhân nhanh từ kết quả của khảo sát trên để tạo nguồn mẫu. Cụm PLBs (2 – 3 PLB/mẫu) được cấy vào đĩa petri, mỗi đĩa petri chứa 25 mL môi trường nuôi cấy và cấy 5 cụm chồi/đĩa. Quy trình chiếu xạ được thực hiện tại Phòng Công nghệ Vật liệu và Nano, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu được chiếu xạ bằng tia gamma với nguồn bức xạ gamma <sup>60</sup>Co. Nghiệm thức không xử lý chiếu xạ là nghiệm thức đối chứng. Thí nghiệm gồm 11 nghiệm thức tương ứng với 11 liều xạ (20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 200 và 300 Gy), mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 đĩa petri, mỗi đĩa petri 5 mẫu. Môi trường nuôi cấy là ½ MS bổ sung 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 8 g/L agar; 0,5 mg/L BA; 1,0 mg/L NAA; được điều chỉnh ở pH = 5,7.

**Đánh giá và sàng lọc mẫu *in vitro* lan kiểm sau chiếu xạ**

Chồi hình thành từ các cụm PLBs sau chiếu xạ có hình thái khác biệt được sàng lọc và cấy sang môi trường biệt hóa tạo chồi ½ MS bổ sung 1,0 mg/L BA; 0,2 mg/L NAA; 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 0,02 g/L glycin; 8 g/L agar được điều chỉnh ở pH = 5,7; theo dõi sau 12 tuần và ghi nhận các chỉ tiêu hình thái (màu sắc, chiều cao,...).

Cây con *in vitro* tăng sinh từ chồi hay cụm chồi có hình thái khác biệt được sàng lọc và cấy phân lập thành các dòng sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh ½ MS bổ sung 1,0 mg/L NAA; 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 0,02 g/L glycin; 8 g/L agar được điều chỉnh ở pH = 5,7; theo dõi sau 12 tuần và ghi nhận các biến dị về hình thái cây (chiều cao, thân, lá,...).

**Điều kiện nuôi cấy và chỉ tiêu theo dõi**

Điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 20 ± 2 μmol/m<sup>2</sup>s, độ ẩm của phòng nuôi 70 – 80%, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 3°C. Thời gian nuôi cấy 12 tuần.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

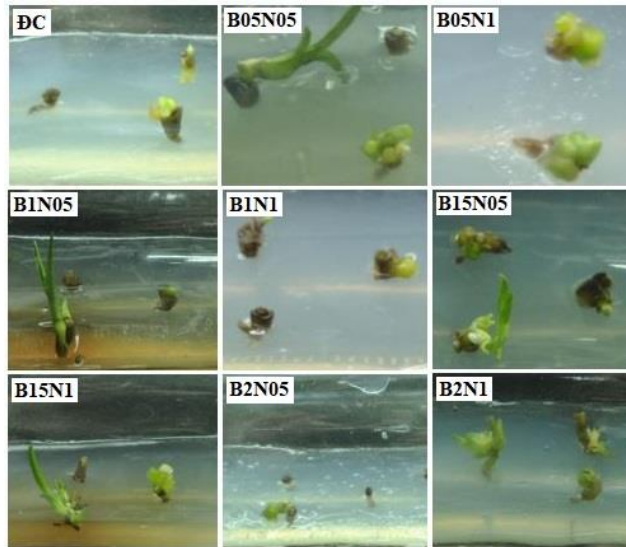
**Cảm ứng tạo PLBs lan kiểm làm nguồn vật liệu cho chiếu xạ**

PLBs đóng vai trò quan trọng trong quá trình nhân giống *in vitro* ở các loài lan nói chung. Ngoài ra, các nhà nghiên cứu đã chứng minh sự cân bằng giữa tỷ lệ auxin và cytokinin cũng có ý nghĩa quyết định trong quá trình nuôi cấy *in vitro* (Petrasek *et al.*, 2018). Sau 12 tuần nuôi cấy đánh giá khả năng tạo PLBs từ chồi lan kiểm Tiên Vũ cho kết quả khảo sát như sau (bảng 1, hình 1):

**Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều hòa lên khả năng tạo PLBs từ chồi lan kiểm Tiên Vũ**

NT	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Số PLBs (PLB/mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo PLB (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu chết/không tạo chồi/PLBs (%)
ĐC	0	0	1,00 <sup>b</sup>	14,4	1,93 <sup>ab</sup>	25,6	60
B05N05	0,5	0,5	1,07 <sup>b</sup>	13,3	2,33 <sup>ab</sup>	26,7	60
B05N1	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	<b>1,53<sup>a</sup></b>	<b>16,7</b>	<b>2,47<sup>a</sup></b>	<b>35,6</b>	47,7
B1N05	1,0	0,5	0,53 <sup>bc</sup>	8,9	2,93 <sup>a</sup>	33,3	47,7
B1N1	1,0	1,0	0,67 <sup>bc</sup>	11,1	2,40 <sup>ab</sup>	27,8	61,1
B15N05	1,5	0,5	0,47 <sup>bc</sup>	7,8	1,60 <sup>ab</sup>	22,2	70
B15N1	1,5	1,0	0,27 <sup>d</sup>	4,4	1,87 <sup>ab</sup>	21,1	74,5
B2N05	2,0	0,5	0,20 <sup>d</sup>	3,3	0,93 <sup>b</sup>	13,3	83,4
B2N1	2,0	1,0	0,33 <sup>c</sup>	5,6	1,80 <sup>ab</sup>	24,4	70

**Ghi chú:** Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy P ≤ 0,05.



**Hình 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs sau 12 tuần nuôi cấy**

Tỷ lệ mẫu tạo PLBs ở các nghiệm thức khá thấp trong đó nghiệm thức B05N1 có tỷ lệ tạo PLBs cao nhất (16,7%). Các nghiệm thức còn lại có tỷ lệ tạo PLBs thấp hơn so với nghiệm thức ĐC (14,4%) lần lượt là nghiệm thức B05N05 (13,3%); nghiệm thức B1N1 (11,1%); các nghiệm thức còn lại đạt dưới 10% và thấp nhất là nghiệm thức B2N05 (3,3%). Nghiệm thức B05N1 cho khả năng tạo PLBs tốt nhất đạt 1,53 PLB/mẫu và nghiệm thức B05N05 đạt 1,07 PLB/mẫu đều cao hơn so với nghiệm thức ĐC đạt 1 PLB/mẫu. Khả năng tạo PLB có chiều hướng giảm khi tăng nồng độ chất điều hòa sinh trưởng, các nghiệm thức B1N05; B1N1; B15N05 đạt lần lượt 0,53; 0,67; 0,47 PLB/mẫu và thấp nhất ở nghiệm thức B2N05 chỉ đạt 0,2 PLB/mẫu. Một số nghiệm thức có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao như nghiệm thức B05N05 (26,7%); B1N1 (27,8%); B1N05 (33,3%) và cao nhất ở nghiệm thức B05N1 (35,6%) và đều cao hơn nghiệm thức ĐC (25,6%). Nghiệm thức B2N1 có tỷ lệ mẫu tạo PLB khá thấp là 5,6% nhưng có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao lên tới 24,4%. Nghiệm thức B2N05 có tỷ lệ mẫu tạo chồi thấp nhất (13,3%). Trong khi đó, các nghiệm thức có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao đều có khả năng tạo chồi tốt như nghiệm thức B05N05 đạt 2,33 chồi/mẫu; B1N1 đạt 2,4 chồi/mẫu; B05N1 đạt 2,47 chồi/mẫu và cao nhất ở nghiệm thức B1N05 đạt 2,93 chồi/mẫu đều cao hơn so với nghiệm thức ĐC chỉ đạt 1,93 chồi/mẫu; nghiệm thức B2N05 đạt 0,93 chồi/mẫu thấp nhất trong các nghiệm thức. Kết quả trên cho thấy môi trường cho khả năng tạo PLBs lan kiểm Tiên Vũ tốt nhất là môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA.

#### **Đánh giá tác động của liều chiếu xạ lên khả năng sinh trưởng của PLBs lan kiểm**

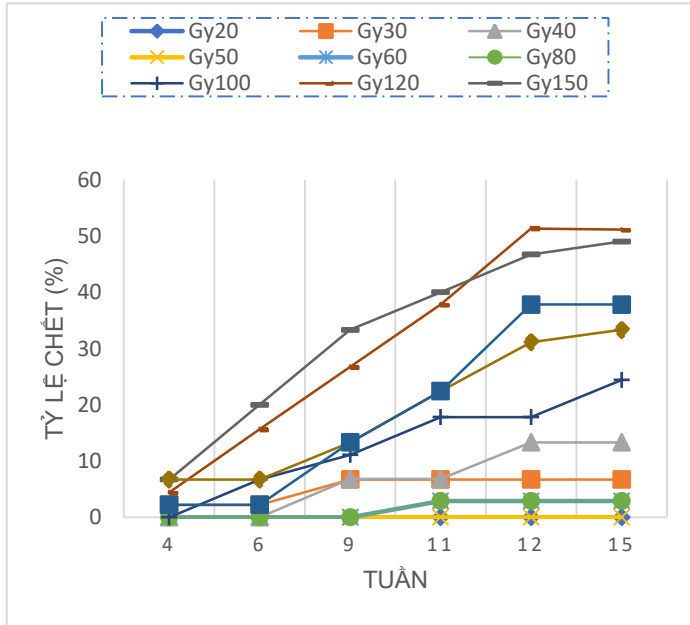
Việc thử nghiệm và xác định khả năng gây chết dưới tác động của liều xạ là yếu tố được quan tâm trước khi tiến hành xử lý chiếu xạ gây đột biến. Độ nhạy cảm của tia phóng xạ khác nhau ở các giống và khác nhau ở biểu hiện của các giai đoạn sinh trưởng và tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nên rất khó để dự đoán được tác động của liều chiếu. Lan kiểm Tiên Vũ thuộc loài lan kiểm lá cứng và có đặc tính khó đáp ứng với tác động của các liều xạ so với các loài lan kiểm lá mềm, đồng thời việc tiên khảo sát ở các liều xạ cao hơn từ 100 Gy đến 300 Gy cho khả năng sống sót của PLBs trong thời gian dài với vài lần cấy chuyển. Các cụm PLBs (2 – 3 PLB) lan kiểm Tiên Vũ được sử dụng làm vật liệu chiếu xạ, liều xạ 0 Gy (đối chứng) và 11 liều xạ từ Gy20 đến Gy300 được sử dụng để xác định LD<sub>50</sub>.

Các cụm PLBs ở các nghiệm thức sau 1 tuần chiếu xạ hầu như không có sự thay đổi và bắt đầu có sự tăng sinh PLB. Một số cụm PLBs ở các nghiệm thức bắt đầu chuyển sang ngả vàng sau 2 tuần xử lý và các tuần sau đó, do chiếu xạ, xác định mẫu chết hoàn toàn khi cả cụm PLBs hóa nâu hoặc không tái sinh được thành chồi. Tuần thứ 4, một số liều xạ bắt đầu có các cụm PLBs chết như liều xạ Gy30 và Gy300 (2,2%); liều xạ Gy120 (4,4%); liều xạ Gy150 và Gy200 (6,7%). Các cụm PLBs chết ở các liều xạ tăng lên từ tuần thứ 6 và đến tuần thứ 9, tỷ lệ chết ở các liều xạ tiếp tục tăng: liều xạ Gy150 (33%); liều xạ Gy120 (26,7%); liều xạ Gy100, Gy200 và Gy300 (12%); liều xạ Gy30 và Gy40 (6,7%). Các cụm PLBs ở các liều xạ vẫn tiếp tục tăng ở tuần thứ 11 và ở tuần thứ 12, tỷ lệ chết ở liều xạ Gy60 và Gy80 là 3%; liều xạ Gy30 không có sự thay đổi là 7%; liều xạ Gy40 tăng lên 13%; liều xạ Gy200 và Gy300 tăng đến 32%; liều xạ Gy150 tăng nhiều chiếm 47% và liều xạ Gy120 tăng nhiều nhất đạt 51%.

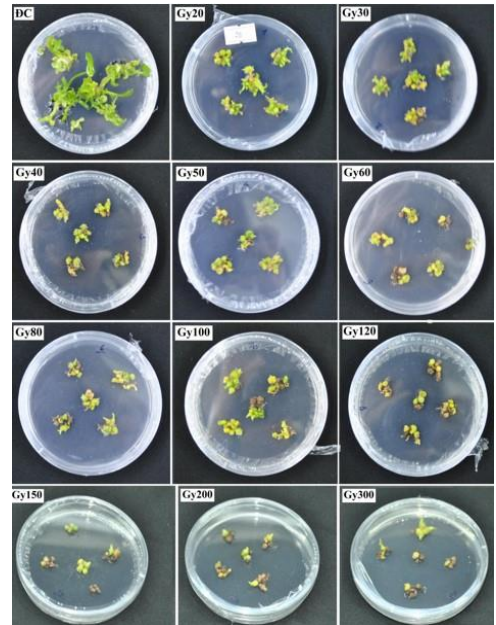
#### **Xác định LD<sub>50</sub>**

Các cụm PLBs ở các liều xạ tiếp tục được theo dõi đến tuần thứ 15, tỷ lệ chết ở các liều xạ tăng thêm rất ít như liều xạ Gy100 tăng từ 18% lên 24%; liều xạ Gy150 tăng từ 46% lên 49%; liều xạ Gy200 tăng từ 31% lên 33% và hầu như không tăng thêm ở một số liều như liều xạ Gy 30 là 7%; liều xạ Gy40 là 13%; liều xạ Gy50 và Gy60 là

3%; liều xạ Gy300 là 38% và liều xạ Gy120 là 51%. Các PLB còn xanh sau thời gian ghi nhận liều xạ LD<sub>50</sub> sẽ tiếp tục được sàng lọc và cấy sang môi trường nhân chồi để tiếp tục theo dõi sự biến dị ở các liều xạ (hình 2). Liều LD<sub>50</sub> thường được sử dụng để dự đoán mức độ tổn thương của một giống và cũng là chỉ số thông dụng trong xử lý đột biến, là ngưỡng mà ở đó tác nhân gây đột biến có thể tạo ra những biến đổi trong bộ máy di truyền của thực vật (Vinh *et al.*, 2019). Việc tìm ra liều LD<sub>50</sub> có ý nghĩa thiết thực cho việc xác định liều gây tạo đột biến một cách hiệu quả nhất. Nghiên cứu của Dehgahi và Joniyas (2017) khi tạo đột biến *in vitro* bằng phương pháp chiếu xạ ở PLBs trên đối tượng *Dendrobium Sonia-28* từ liều 10 Gy đến 200 Gy cho thấy tỷ lệ sống của PLBs tỷ lệ nghịch với liều chiếu xạ và LD<sub>50</sub> đối với PLBs là xấp xỉ 43 Gy. Một nghiên cứu khác của Kim và đồng tác giả (2020) cũng trên đối tượng *Cymbidium* ở các liều xạ từ 20 Gy đến 100 Gy ghi nhận rằng tất cả quần thể được chiếu xạ tia gamma đều sống sót trong thời gian dài nên không thể ước tính được liều LD<sub>50</sub>. Kết quả cho thấy, giá trị liều LD<sub>50</sub> là 120 Gy (biểu đồ 1).



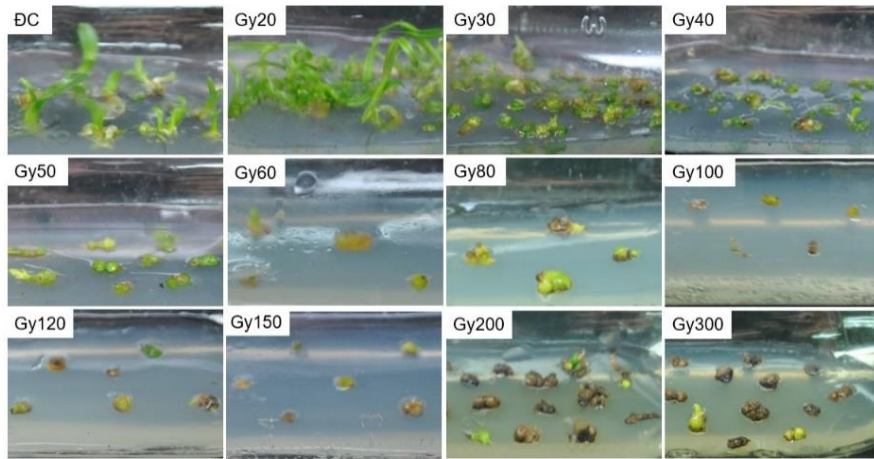
Biểu đồ 1. Tỷ lệ chết của các cụm PLBs sau chiếu xạ ở các liều xạ từ Gy20 đến Gy300



Hình 2. Hình thái các cụm PLBs sau 15 tuần chiếu ở các liều xạ từ Gy20 đến Gy300

**Đánh giá và sàng lọc mẫu *in vitro* lan kiểm sau chiếu xạ**

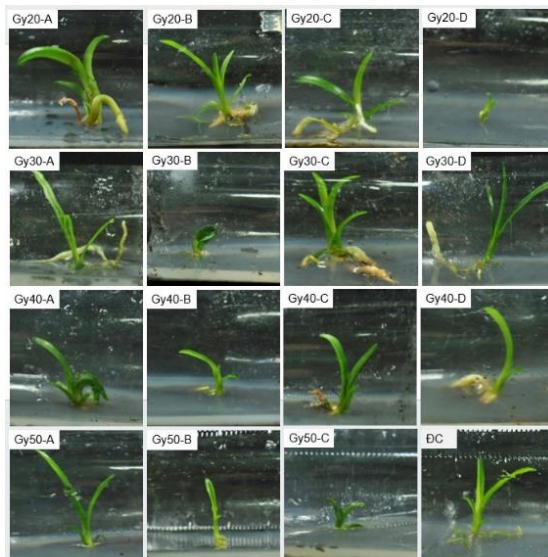
*Sàng lọc chồi hình thành từ các PLBs đã chọn lọc:* PLBs sau chiếu xạ có hình thái to hơn PLBs không xử lý chiếu xạ. Các cụm PLBs có các PLB còn xanh ở các liều xạ được sàng lọc và cấy lên môi trường nhân chồi và tiếp tục theo dõi sự biến dị ở các liều xạ. Nhìn chung, sự tăng trưởng của các cụm PLBs giảm dần theo liều xạ. Sau cấy chuyển 2 tuần, các cụm PLBs tiếp tục có tỷ lệ chết tăng ở các liều xạ cao như liều xạ Gy100 và Gy150 (51%); liều xạ Gy120 và Gy200 (58%) và cao nhất là Gy300 (60%). Các cụm PLBs ở các liều xạ thấp từ Gy20 đến Gy50 đa phần bị tổn thương và chuyển sang ngả vàng. Đến tuần thứ 5, các liều xạ cao tiếp tục có tỷ lệ chết tăng lên khá cao như liều xạ Gy60, Gy100, Gy120 và Gy200 là gần 85%, liều xạ Gy80 và Gy300 lên đến 91%. Các cụm PLBs ở các liều xạ cao gần như ngả vàng và hóa nâu, sau đó bị chết dần và được xác nhận là những biến dị đột biến gây chết khi có tỷ lệ chết là 100% vào tuần thứ 6 ở liều xạ Gy150, Gy300; vào tuần thứ 10 ở liều xạ Gy60 và vào tuần thứ 13 ở liều xạ Gy80, Gy100 và Gy120. Liều xạ Gy200 có tỷ lệ chết là 97% ở tuần thứ 7 nhưng không có sự thay đổi về sự tăng trưởng PLB, cụm PLB ở liều xạ này còn xanh nhưng không có khả năng phục hồi hay tăng trưởng thành chồi. Các cụm PLBs ở các liều xạ thấp từ Gy20 đến Gy50 ở tuần thứ 12 bắt đầu tăng lên nhanh chóng và sang tuần thứ 13 có tỷ lệ chết ở liều xạ Gy20 là 58%, Gy30 là 77%; Gy40 và Gy50 là 91%, tuy nhiên các cụm PLBs có khả năng phục hồi và một số PLB bắt đầu có sự hình thành chồi hay ra rễ phát triển thành cây con, đây có thể là những biến dị không gây chết nhưng ở dạng này, cây không chết nhưng sinh trưởng và phát triển chậm so với cây đối chứng. Các rối loạn của NST, DNA hay hoạt tính của các hợp chất trong thành phần cấu trúc của tế bào bị thay đổi nhưng chưa đủ gây chết cho cây là do các liều lượng phóng xạ trong quá trình chiếu xạ gây biến dị.



Hình 3. Sự sinh trưởng của PLBs ở các liều chiếu xạ tia Gamma nguồn  $^{60}\text{Co}$  sau 20 tuần chiếu xạ

Sàng lọc cây *in vitro* tăng sinh từ chồi đã được chọn lọc: chồi ở các liều xạ Gy20, Gy30, Gy40 và Gy50 được chọn lọc và cấy sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh. Cây con đã có những biểu hiện khác nhau về hình dạng và kích thước xuất hiện ở các liều từ Gy20 đến Gy50. Những sai khác về hình dạng thân, lá giữa các cây chiếu xạ và cây đối chứng như hình dạng, chiều cao cây, chiều dài rễ. Qua quan sát ghi nhận ở liều xạ Gy20 có các cây biến dị về hình thái như cây có lá dày, màu xanh đậm, hình dạng khác, rễ to và dài (hình 4-Gy20A); cây có nhiều lá, rễ to dài, màu vàng (hình 4-Gy20B); cây có nhiều rễ dài, có rễ màu trắng (hình 4-Gy20C) hoặc cây có kích thước nhỏ hơn rất nhiều (hình 4-Gy20D) so với cây đối chứng; liều xạ Gy30 có cây có lá dài, rễ dài và nhiều (hình 4-Gy30A); cây có hình dạng và kiểu lá khác (hình 4-Gy30B); cây có nhiều lá và rễ to (hình 4-Gy30C); cây có lá mỏng và dài, rễ to (hình 4-Gy30D) so với cây đối chứng; liều xạ Gy40 có cây có lá cong xuống gốc; màu xanh đậm (hình 4-Gy40A); cây có kích thước nhỏ hơn (hình 4-Gy40B); cây có ít rễ ngắn và lá có màu xanh đậm và màu xanh đậm (hình 4-Gy40C); cây có hình dạng khác (hình 4-Gy40D) so với cây đối chứng; liều xạ Gy50 có cây có rễ rất ngắn (hình 4-Gy50A); cây có hình dạng khác (hình 4-Gy50B) và cây có hình dáng khác và có kích thước nhỏ hơn rất nhiều (hình 4-Gy50C) so với cây đối chứng.

Việc đánh giá và sàng lọc hình thái các cây con sau chiếu xạ là rất cần thiết vì qua đó có thể xác định việc chiếu xạ đã tác động lên nguồn mẫu PLBs ban đầu, từ đó xác định được cây con có kiểu hình biến dị và duy trì sự biến dị đó. Kết quả cho thấy việc tác động của tia gamma với các liều xạ thấp 20, 30, 40 và 50 Gy đều có sự khác biệt so với đối chứng, trong khi với các liều xạ cao gần như không tăng trưởng và chết hoàn toàn. Nghiên cứu của Vinh và đồng tác giả (2020) cũng cho thấy khả năng sinh trưởng phát triển của cây giảm khi liều chiếu càng cao, gần như chết 100% từ liều 80 Gy trở lên sau chiếu xạ 7 tháng và PLBs tăng tần suất biến dị với phổ biến dị rộng, đa dạng về cấu trúc, màu sắc thân, lá ở các liều thấp 20, 40 và 60 Gy. Một nghiên cứu khác cũng ghi nhận rằng liều phù hợp để gây đột biến tương đương liều 20 – 30 Gy khi sử dụng nguồn gamma  $^{60}\text{Co}$  làm tác nhân phóng xạ đối với mẫu mắt mằm và mẫu đốt thân trên đối tượng *Citrus grandis* L. Osbeck (Rusat *et al.*, 2021).



Hình 4. Sự sinh trưởng của lan kiếm sau 40 tuần chiếu xạ

Vật chất di truyền dưới tác dụng của tia gamma bị thay đổi biểu hiện ban đầu của chúng là những biến đổi hình thái có thể quan sát được. Đột biến thực vật được tạo ra bằng bức xạ ion hóa như bức xạ gamma đã chứng minh đột biến tăng dần theo liều xạ (Vinh *et al.*, 2019). Tuy nhiên, việc tăng liều xạ sẽ dẫn đến các tình trạng không mong muốn như tỷ lệ chết của mẫu hay những đột biến không có lợi cũng tăng theo. Bức xạ ion trước hết sẽ làm tổn thương DNA, hệ thống tự sửa chữa ở một số sinh vật thường dẫn đến lặp đoạn, chuyển đoạn, đảo đoạn và mất đoạn gây nên hiệu ứng gây chết và gây đột biến cho tế bào dẫn đến các kết quả biến dị khác nhau.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy môi trường thích hợp cho khả năng tạo PLBs lan kiếm Tiên Vũ làm nguồn vật liệu cho chiếu xạ tốt nhất là môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 0,5 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA. Sàng lọc từ các liều xạ cho thấy sự sinh trưởng của các cụm PLBs được xử lý với các liều xạ từ 20 Gy đến 300 Gy đều có sự khác biệt so với đối chứng, trong khi sự sinh trưởng của các cụm PLBs ở các liều xạ thấp từ 20 Gy đến 50 Gy PLB có khả năng tăng trưởng chồi và hình thành cây con thì ở các liều xạ cao từ 60 Gy đến 300 Gy có tỷ lệ chết cao và không có sự tái sinh cây. Liều xạ gây chết LD<sub>50</sub> ở lan kiếm được xác định là 120 Gy. Kết quả cho thấy việc chiếu xạ tia gamma <sup>60</sup>Co ở các liều lượng 20, 30, 40 và 50 Gy thích hợp để tạo cây có biến dị hình thái và kích thước thân rễ khác nhau ở lan kiếm. Nghiên cứu đã chứng tỏ có sự tác động của tia phóng xạ gamma ảnh hưởng đến khả năng tạo biến dị của các PLBs lan kiếm Tiên Vũ (*C. finlaysonianum*).

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Rheleh Dehgahi, Alireza Joniyas (2017). A Gamma Irradiation-Induced Variation in *Dendrobium Sonia-28* Orchid Protocorm-Like Bodies (PLBs). *Fungal Genomics & Biology*, 7: 151.
- Đỗ Khắc Thịnh, Dương Lan Oanh, Nguyễn Thị Thanh Huyền, Ngô Thị Bích (2011). Nghiên cứu tạo giống lan Hồ điệp mới thích ứng với khí hậu ở Thành phố Hồ Chí Minh. *Report on scientific research topics of Southern Institute of Agricultural Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam*.
- Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Từ Vy, Nguyễn Thị Xuân Hiền (2021). Phân tích di truyền và nhân giống *in vitro* lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*). *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2021*. NXB Đại học Thái nguyên.
- Kim Sang Hoon, Kim Se Won, Ahn Joon-Woo, Ryu Jaihyunk, Kwon Soon-Jae, Kang Byoung-Cheorl, Kim Jin-Baek (2020). Frequency, Spectrum, and Stability of Leaf Mutants Induced by Diverse  $\gamma$ -Ray Treatments in Two Cymbidium Hybrids. *Plants*, 9(4): 546
- Moussa (2006). Role of gamma irradiation in the regulation of NO<sub>3</sub> level in rocket (*Eruca vesicariassub sp. sativa*) plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 193–197.
- Nguyễn Văn Vinh, Trần Hồng Anh, Bùi Văn Lệ, Bùi Minh Trí (2019). Khảo sát ảnh hưởng của chiếu xạ gamma <sup>60</sup>Co đến cây lan lai *Dendrobium* thấp cây. *The Journal of Agriculture and Development* 19(1): 32-40.
- Petrasek Jan, Hoyerova Klara, Motyka Vaclav, Hejatko Jan, Dobrev Petre, Kaminek Miroslav, Vankova Radomira (2019). Auxins and Cytokinins in Plant Development 2018. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4): 909
- Anmol RJ, Marium S, Hiew FT, Han WC, Lee K K, Wong AKY, Khan F, Sarker MR, Chan SY, Kifli N, Ming LC (2021). Phytochemical and Therapeutic Potential of *Citrus grandis* (L.) Osbeck: A Review. *J Evid Based Integr Med*. 26: 2515690X211043741.
- Wi SG, Chung BY, Kim JS, Kim JH, Baek MH, Lee JW, Kim YS (2007). Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants, *Micron* 38: 553-564.

## EFFECTS OF GAMMA RAYS FROM $^{60}\text{Co}$ SOURCE ON THE MUTATIONAL VARIATION OF *Cymbidium finlaysonianum*' PLBs *in vitro*

Nguyen Hoang Cam Tu, Nguyen Truong Giang, Tran Duc Trong, Huynh Huu Duc\*

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

### SUMMARY

*Cymbidium finlaysonianum* is a native Vietnamese orchid with high commercial potential. However, the commercial exploitation of some *C. finlaysonianum* orchid varieties is limited due to low propagation coefficients and some low growth characteristics. Trait improvement using gamma-ray irradiation on plants, especially ornamental flower varieties, has been successfully implemented. This study applied a  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation source with a dose of 20 to 300 Gy to evaluate the impact on the survival and growth of PLBs of the *C. finlaysonianum* orchid variety. The results showed that the survival rate and growth and development ability of PLBs decreased with higher irradiation doses. In particular, the radiation dose of 120 Gy was determined to be the LD<sub>50</sub> value of PLBs after 12 weeks of culture. In addition,  $^{60}\text{Co}$  gamma-ray irradiation with low radiation doses of 20, 30, 40, and 50 Gy all have some impact on growth ability as well as causing some differences in shape, and structure size after irradiation. These results have confirmed the mutagenic ability of gamma rays on the survival and growth of *in vitro* orchids and opened up the possibility of application in creating new varieties for other ornamental flowers.

**Keywords:** BA, *Cymbidium finlaysonianum*, gamma rays, growth regulators, NAA, radiation dose.

---

\* Author for correspondence: Tel: +84-967137046; Email: hhduc.snn@tphcm.gov.vn