

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA SODIUM AZIDE ĐẾN SỰ PHÁT SINH ĐỘT BIẾN TRÊN HOA THANH TÚ (*EVOLVULUS ALSINOIDES*)

Trần Lê Nguyên, Lê Thanh Nhân, Lê Thị Anh Thư, Nguyễn Thị Pha*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Đột biến cảm ứng là một phương pháp tạo giống khả thi được ứng dụng để cải tiến cây trồng và tạo ra sự đa dạng di truyền để tạo ra các giống cây trồng mới. Nghiên cứu này nhằm mục đích gây đột biến cây Thanh Tú (*Evolvulus alsinoides*) bằng sodium azide ở các nồng độ 0, 200, 400, 600 và 800 ppm. Các đoạn thân chứa mầm ngủ được xử lý trong 30, 60, 90 và 120 phút, trong điều kiện nhà lưới. Tỷ lệ sống sót và số lượng hoa mẫu xử lý Sodium azide giảm khi tăng nồng độ của hóa chất này. Tỷ lệ sống thấp nhất ghi nhận ở nghiệm thức xử lý 800 ppm sodium azide trong 120 phút là 5,71%, không ghi nhận sự xuất hiện hoa ở nghiệm thức này và cao nhất 82, 85% với 8,75 hoa/ chậu ở nghiệm thức xử lý 200 ppm trong 30 phút. Mười hai cá thể cây Thanh Tú xử lý sodium azide tạo được kiểu hình khác biệt so với đối chứng trong đó có 4 khác biệt ở lá và 8 khác biệt ở hoa được phân tích di truyền với 6 mỗi ISSR. Kết quả ghi nhận mức độ khác biệt về di truyền của 12 cá thể khảo sát so với đối chứng là 37%, cá thể TT8-90-A (800 ppm; 90 phút) với mức độ khác biệt so với đối chứng 26%, ở nhóm 5 trong gian đồ có tiềm năng nhất trong các cá thể đột biến vì tạo được hoa có màu xanh đậm ở mép cánh hoa và viền trắng ở đầu mép cánh hoa, xuất hiện một phần màu tím phân bố đều trên các cánh hoa.

Từ khóa: Đột biến, *Evolvulus alsinoides*, ISSR, sodium azide, Thanh Tú.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đa dạng nguồn gene giúp tạo, chọn và phát triển các giống cây trồng độc đáo và ưu việt. Trong đó, cây Thanh Tú (*Evolvulus alsinoides*) ($2n = 26$) hay còn được biết đến với tên hoa Bát Giao là một thành viên họ *Convolvulaceae*, là loài hoa được nhiều người ưa chuộng vì đặc tính dễ thích nghi và ra hoa quanh năm. Sinh sản truyền thống và lai tạo theo phương pháp thông thường không tối ưu cho Thanh Tú vì tính miên trạng của hạt Thanh Tú kéo dài trong vài tháng (Naikawadi *et al.*, 2012) gây bất lợi trọng việc chọn tạo giống mới. Cây cảnh được xem là đối tượng lý tưởng cho các nghiên cứu lai tạo giống do các đặc tính thương mại của chúng, bao gồm các đặc điểm của hoa (màu sắc, kích thước, mùi hương, tuổi thọ), các đặc điểm của lá (hình dạng, kích thước, hình thành sắc tố, sự khác biệt), các đặc tính quan trọng về mặt thương mại có thể chọn qua việc xử lý đột biến (Datta *et al.*, 2020). Hiện nay, các tác nhân gây đột biến bao gồm vật lý (tia gamma và X, và neutron nhanh) và hóa học (colchicine, dimethyl sulfate, diethyl sulfate, ethyl methanesulfonate, 1-methyl-1-nitrosourea, và sodium azide) trong đó sodium azide (SA) được nhiều nghiên cứu sử dụng đã chứng minh vai trò của hóa chất này trong cải biến di truyền ở thực vật. Nghiên cứu của Singh và đồng tác giả (2020) cho thấy SA có hiệu quả trong việc tạo ra sự biến đổi di truyền về các đặc tính góp phần vào năng suất ở đậu Hà Lan và có thể được sử dụng để chọn ra các thể hệ ưu việt trong quần thể hoặc được sử dụng trong các chương trình lai tạo khác nhau.

Ngày nay, các chỉ thị phân tử đã được sử dụng một cách hiệu quả trong nhân giống gây đột biến để phát hiện chính xác các đột biến thực sự và để loại bỏ các cây không bị đột biến trong những bước đầu của thí nghiệm. Thêm vào đó, các chỉ thị phân tử có thể xác định mối quan hệ di truyền giữa các đột biến và cây mẹ ban đầu (Kang *et al.*, 2013) thông qua khác biệt về kiểu gene. Chỉ thị phân tử ISSR dựa trên kỹ thuật PCR có độ tin cậy cao, không yêu cầu thông tin về trình tự gene cũng như các nghiên cứu di truyền trước (Holton *et al.*, 2002). Các chỉ thị phân tử phân tử ISSR đã được sử dụng thành công cho đánh giá sự đa dạng di truyền trên nhiều loại cây trồng như đậu nành, cà phê, lúa... Nghiên cứu này kết hợp việc xử lý hóa chất SA kết hợp chỉ thị phân tử ISSR nhằm tuyển chọn các dòng Thanh Tú có khác biệt về hình thái hoa và lá, tạo nguồn vật liệu cho các nghiên cứu chọn tạo giống hoa Thanh Tú.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đoạn thân có chiều dài từ 5-6 cm mang mầm ngủ được cắt từ cây Thanh Tú (*Evolvulus alsinoides*) 1 năm tuổi trồng tại phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô thực vật thuộc Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

Phương pháp nghiên cứu

Đoạn thân cây Thanh Tú mang mầm ngủ được xử lý với hóa chất SA ở 5 mức nồng độ lần lượt 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm trong 4 khoảng thời gian 30, 60, 90 và 120 phút. Sau khi ngâm, mẫu cây được trồng

trong đất chuyên trồng hoa của công ty Xuân Nông - Việt Nam. Thí nghiệm hai nhân tố hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 5 lần, mỗi lần một chậu, mỗi chậu 7 đoạn thân được bố trí thí nghiệm ở nhà lưới Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống (%) thời điểm 30 ngày; số lượng hoa/chậu thời điểm 60 ngày. Sự khác biệt về hình thái hoa, lá được mô tả.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số: Các cá thể có khác biệt về hình thái lá, hoa được chọn để ly trích DNA tổng số theo phương pháp CTAB mô tả bởi Rogers và Bendich (1988) có cải tiến (Trần Nhân Dũng *et al.*, 2011). DNA ly trích được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các phản ứng PCR-ISSR.

Phân tích bằng chỉ thị PCR-ISSR

Sản phẩm của quá trình ly trích DNA được sử dụng để phân tích khác biệt di truyền các mẫu thu được bằng kỹ thuật ISSR với 6 mồi (Bảng 1). Mỗi ISSR được tổng hợp tại Công ty sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ. Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 15 µL. Thành phần một phản ứng PCR: 8,65 µL H₂O, 3 µL Buffer 5X, 1,2 3 µL Mồi 10 pmol, 0,15 µL DNA polymerase 5 unit/µL, 2 µL DNA khuôn 30 µg/ µL. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy PCR với chương trình gia nhiệt: 94°C - 5 phút; 94°C - 45 giây; nhiệt độ gắn mồi 47°C-52°C (Bảng 1) -1 phút; kéo dài 72°C trong 2 phút; thực hiện 40 chu kỳ, ổn định mẫu ở 72°C trong 10 phút. Sử dụng máy PCR SureCycler 8800 (Agilent, Mỹ). Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 2% ở hiệu điện thế 120 Volt, trong 80 phút sử dụng dung dịch đệm TBE (Tris-Borate-EDTA), với thang chuẩn 1000 bp của Fermentas.

Bảng 1. Danh sách mồi ISSR được sử dụng

STT	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	TLTK
1	UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	47	Oumer et al., 2020
2	UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTT	50	Oumer et al., 2020
3	UBC 881	GGGTGGGGTGGGGTG	47	Oumer et al., 2020
4	UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	50	Hassel và Gunnarsson, 2003
5	UBC 830	TGTGTGTGTGTGTGG	52	Saki et al., 2016
6	ISSR 4	CTCTCTCTCTCTCTGG	50	Abbasi and Afsharzadeh, 2016

*UBC: Primer set 9. University of British Columbia, Vancouver, Canada.

Phương pháp xử lý số liệu

Phương pháp phân tích thống kê các số liệu thu được từ các thí nghiệm được nhập, xử lý bằng phần mềm Excel 2019, phân tích phương sai hai nhân tố (two-way ANOVA) và so sánh sự khác biệt (sự khác nhau giữa các kết quả trung bình của các nghiệm thức) bằng kiểm định Tukey có trong phần mềm Minitab 16 ở mức ý nghĩa 1%. Xây dựng giản đồ phả hệ theo thuật toán UPGMA của (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath and Sokal, 1973) được thực hiện bằng chương trình NTSYS 2.1 (Exeter Software, Mỹ) dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard (1908).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả ảnh hưởng của xử lý SA lên tỷ lệ sống và số lượng hoa Thanh Tú

Kết quả về tỷ lệ sống và số lượng hoa ghi nhận ở Hình 1 cho thấy khi gia tăng nồng độ và thời gian xử lý SA thì khả năng sống của đoạn thân cây Thanh Tú giảm từ 82,85% (200 ppm; 30 phút) xuống 5,71% (800 ppm; 120 phút) so với các nghiệm thức đối chứng (có tỷ lệ sống 100%) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% điều này cho thấy tác nhân đột biến SA đã tác động mạnh mẽ lên sức sống của đoạn thân cây Thanh Tú. Theo Salim và đồng tác giả (2009) SA ảnh hưởng lên hầu hết lên các đặc tính sinh lý của thực vật, trong đó SA tác động mạnh mẽ đến sự hô hấp của tế bào bằng cách ngăn chặn một số ion hoá trị 2 dẫn đến ức chế hình thành các enzyme hô hấp gây chết tế bào, điều này làm tăng tỷ lệ chết khi xử lý SA. Thanh Tú là dạng cây cảnh vì thế số lượng hoa là tiêu chí rất quan trọng. Thanh Tú bắt đầu nở hoa dao động ở thời điểm từ ngày 36 đến ngày 54 (tính từ thời điểm bắt đầu xử lý SA), các nghiệm thức đối chứng ra hoa sớm nhất ở 36 ngày. Nghiệm thức 800 ppm trong 30 phút ra hoa sớm ở ngày 37 và nghiệm thức ra hoa trễ nhất ở nồng độ 400 ppm trong 90 phút (ngày thứ 54). Số lượng hoa ở các nghiệm thức ghi nhận ở thời điểm 60 ngày được trình bày trong bảng 2. Có sự tương tác giữa nồng độ SA và thời gian xử lý giữa các nghiệm thức. Kết quả cho thấy số lượng hoa của các mẫu đoạn thân Thanh Tú sau 60 ngày có xu hướng giảm dần theo cả nồng độ và thời gian xử lý SA (khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 1%). Ngoài ra, nghiệm thức xử lý SA trong thời gian và nồng độ cao nhất là 800 ppm, 120 phút không xuất hiện hoa. Số hoa nở cao nhất 8,85 hoa/chậu ở nghiệm thức là 200 ppm với thời gian xử lý là 30 phút, trong khi đó các nghiệm thức đối chứng không xử lý SA cho số hoa dao động từ 8,90-8,99 hoa/chậu. Trong nghiên cứu này, nồng độ SA càng cao kết hợp thời gian xử lý dài đã hạn chế sự ra hoa của Thanh Tú.

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

Quan sát các nghiệm thức ghi nhận được 12 cá thể Thanh Tú xử lý SA tạo được kiểu hình khác biệt so với đối chứng trong đó có 4 khác biệt ở lá về sự xuất hiện màu đỏ sẫm ở vị trí gân lá và toàn bộ bề mặt. Đối với hoa có 8 khác biệt về màu sắc, phần lớn các cá thể có sự xuất hiện của màu trắng ở vị trí viền cánh hoa hoặc dạng các đốm trắng trên toàn bộ bề mặt cánh hoa, ngoài ra một số cá thể có màu hoa nhạt hoặc đậm hơn so với đối chứng được mô tả chi tiết ở bảng 3. Cá thể xử lý 800 ppm, 90 phút có triển vọng trong việc phát triển giống Thanh Tú mới vì ghi nhận được màu xanh, tím và trắng trên bề mặt cánh hoa, khác biệt so với đối chứng (Hình 1). Cũng theo nghiên cứu của Singh và đồng tác giả (2020) khi tạo đột biến bằng hóa chất SA cho thấy, ở mức nồng độ của SA cao đã làm tăng sự đa dạng của đột biến sắc tố chlorophyll trong tất cả các kiểu gene, quang phổ tổng thể của đột biến cảm ứng chlorophyll của đậu hà lan nằm theo thứ tự xanh lục > màu xanh lục nhạt > màu vàng chanh > bạch tạng, điều này cho thấy nồng độ xử lý ảnh hưởng đến mức độ đột biến lên kiểu gen.

Bảng 2. Tỷ lệ sống và số lượng hoa của các nghiệm thức xử lý SA

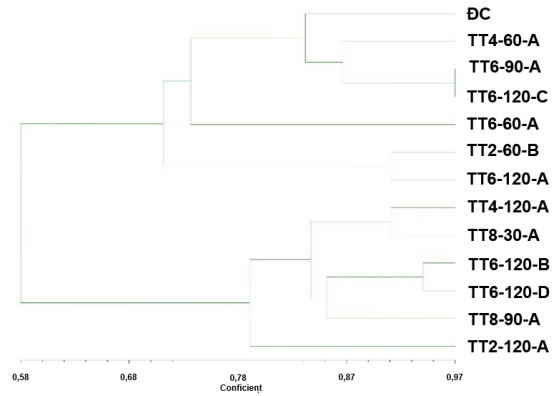
Nồng độ SA (ppm)	Tỷ lệ sống (%)				Số lượng hoa (hoa/ chậu)			
	Thời gian xử lý SA (phút)				Thời gian xử lý SA (phút)			
	30	60	90	120	30	60	90	120
0	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	8,9 ^{ab}	8,99 ^a	8,95 ^a	8,92 ^{ab}
200	82,85 ^{ab}	62,85 ^{cd}	57,14 ^{c-e}	28,57 ^{h-i}	8,85 ^{ab}	8,30 ^c	6,59 ^f	5,84 ^g
400	74,28 ^{bc}	51,42 ^{d-f}	37,14 ^{f-i}	22,85 ^{jk}	8,54 ^{bc}	7,67 ^d	5,30 ^{hi}	5,15 ⁱ
600	57,14 ^{c-e}	48,57 ^{d-g}	31,42 ^{g-i}	17,14 ^k	8,37 ^c	7,05 ^e	4,33 ^j	4,23 ^j
800	51,42 ^{d-f}	42,85 ^{e-h}	28,57 ^{h-i}	5,71 ^k	7,78 ^d	5,58 ^{gh}	3,6 ^k	0 ^l
CV%	54,5				35,2			

Bảng 3. Mô tả khác biệt hình thái lá và hoa của 12 cá thể Thanh Tú

Cá thể	Nồng độ SA (ppm)	Thời gian xử lý (phút)	Mô tả khác biệt hình thái lá và hoa
TT2-60-A	200	60	Cánh hoa có màu xanh sậm hơn so với hoa đối chứng
TT2-60-B	200	60	Vị trí cuốn cánh hoa có màu xanh đậm hơn so với đối chứng và mép cánh hoa có viền màu trắng
TT4-60-A	400	60	Cánh hoa có màu xanh nhạt hơn so với hoa đối chứng
TT4-120-A	400	120	Cánh hoa có màu xanh sậm hơn so với hoa đối chứng
TT2-120-A	200	120	Cánh hoa có màu tím
TT8-30-A	800	30	Viền cánh hoa có màu xanh đậm
TT6-90-A	600	90	Gân lá có màu đỏ sẫm chạy dọc từ gân chính của phiến lá đến các gân phụ
TT6-120-A	600	120	Xuất hiện các đốm trắng trên bề mặt cánh hoa
TT6-120-C	600	120	Gân lá có màu đỏ sẫm chạy dọc từ gân chính của phiến lá đến các gân phụ
TT6-120-B	600	120	Gân lá có màu đỏ sẫm chạy dọc từ gân chính của phiến lá đến các gân phụ
TT6-120-D	600	120	Phần lá có màu đỏ sẫm lan đều từ đầu mép lá và nhạt dần về phía cuống
TT8-90-A	800	90	Hoa có màu xanh đậm ở mép cánh hoa và viền trắng ở đầu mép cánh hoa, xuất hiện một phần màu tím phân bố đều trên các cánh hoa



Hình 1. Sự khác biệt hình thái lá và hoa của 12 cá thể Thanh Tú



Hình 2. Giản đồ phá hệ

Chú thích: DC: cá thể đối chứng, TT2-60-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 200 ppm trong 60 phút, TT2-60-B: Cá thể B được xử lý SA nồng độ 200 ppm trong 60 phút, TT2-120-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 200 ppm trong 120 phút, TT4-60-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 400 ppm trong 60 phút, TT4-120-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 400 ppm trong 120 phút, TT6-120-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT8-30-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 800 ppm trong 30 phút, TT8-90-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 800 ppm trong 90 phút, TT6-120-B: Cá thể B được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT6-120-D: Cá thể D được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT6-120-C: Cá thể C được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT6-90-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 90 phút.

Phân tích đa dạng di truyền dựa trên chỉ thị phân tử PCR-ISSR

Trong 6 môi khảo sát ghi nhận 6/6 môi có khả năng bắt cặp và khuếch đại sản phẩm trên DNA khuôn với tổng số band là 136, trung bình thu được 22,67 band/ môi. Số band đơn hình trung bình thu được 1,5 band/ môi, chiếm 26,4%, số band đa hình trung bình thu được 6,17 band/ môi, chiếm 73,06% (Bảng 4). Mức độ đa hình của các band DNA thu được phản ánh sự khác nhau trong cấu trúc của hệ gene. Chỉ số PIC thu được trung bình là 0,26, cao nhất 0,43 ở môi UBC 818, thấp nhất 0,04 ở môi UBC 813. Band lớn nhất có kích thước khoảng 1000 bp ở môi UBC 813 và môi UBC 818 có kích thước nhỏ nhất khoảng 180 bp.

Bảng 4. Môi ISSR được sử dụng để phân tích sự đa dạng di truyền trên Thanh Tú

STT	Môi	Số band thu được	Số band đơn hình	Tỷ lệ band đơn hình	Số band đa hình	Tỷ lệ band đa hình	Chỉ số PIC	Kích thước band (bp)
1	UBC 818	14	0	0,00%	14	100,00%	0,43	180-1000
2	UBC 881	36	2	33,33%	4	66,67%	0,14	220-290
3	ISSR 4	11	0	0,00%	11	100,00%	0,35	300-910
4	UBC 813	66	5	83,33%	1	16,67%	0,04	500-1000
5	UBC 830	4	1	25,00%	3	75,00%	0,28	400-490
6	UBC 808	5	1	20,00%	4	80,00%	0,33	280-700
Tổng số		136	9		37			
Trung bình		22,67	1,5	26,4%	6,17	73,06%	0,26	

Hệ số tương quan di truyền và giản đồ phá hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các cá thể nghiên cứu (Bảng 5, Hình 2). Hệ số tương quan di truyền dao động trong khoảng 0,46 đến 0,97. Độ tương đồng càng nhỏ thì sự khác biệt về vật chất di truyền và khả năng đột biến xảy ra càng cao. Dựa trên các dữ liệu về khoảng cách di truyền của 12 cá thể và đối chứng, giản đồ phá hệ được chia thành 5 nhóm. Trong đó, nhóm 1 gồm đối chứng và cá thể TT2-60-A (200 ppm; 60 phút) khác biệt so với đối chứng 0,87, nhóm 2 gồm 2 cá thể TT2-60-B (200 ppm; 60 phút) và TT4-60-A (400 ppm; 60 phút) có hệ số tương đồng 0,85, nhóm 3 gồm TT4-120-A (400 ppm; 120 phút), TT2-120-A (200 ppm; 120 phút), và TT8-30-A (800 ppm; 30 phút) có hệ số tương đồng so với đối chứng dao động 0,64 - 0,77, nhóm 4 gồm TT6-90-A (600 ppm; 90 phút), TT6-120-A (600 ppm; 120 phút), TT6-120-C (600 ppm; 120 phút), TT6-120-B (600 ppm; 120 phút) và TT6-120-D (600 ppm; 120 phút) có hệ số tương đồng so với đối chứng trong khoảng 0,49 - 0,74, nhóm 5 chỉ có cá thể TT8-90-A với hệ số tương đồng so với đối chứng 0,74. Qua kết quả phân nhóm di truyền cho thấy nồng độ và thời gian xử lý SA có tác động đến vật chất di truyền khi khảo sát bằng chỉ thị PCR-ISSR. Có thể giải thích sự khác biệt này do SA tạo ra đột biến điểm trên DNA, theo

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

nghiên cứu của Olsen và đồng tác giả (1993) đã xác định được đột biến thay thế A-T → G-C là 86% cao hơn gấp ba lần đột biến thay thế G-C → A-T là 14% và không tìm thấy đột biến mất nucleotide.

Bảng 5. Hệ số tương quan di truyền của 12 cá thể Thanh Tú

	ĐC	TT2-60-A	TT2-60-B	TT4-60-A	TT4-120-A	TT2-120-A	TT8-30-A	TT6-90-A	TT6-120-A	TT6-120-C	TT6-120-B	TT6-120-D	TT8-90-A
ĐC	1,00												
TT2-60-A	0,87	1,00											
TT2-60-B	0,87	0,79	1,00										
TT4-60-A	0,77	0,64	0,85	1,00									
TT4-120-A	0,77	0,80	0,80	0,85	1,00								
TT2-120-A	0,67	0,64	0,74	0,74	0,90	1,00							
TT8-30-A	0,64	0,70	0,71	0,77	0,88	0,92	1,00						
TT6-90-A	0,51	0,64	0,49	0,53	0,59	0,59	0,62	1,00					
TT6-120-A	0,49	0,67	0,46	0,56	0,56	0,56	0,59	0,82	1,00				
TT6-120-C	0,49	0,49	0,51	0,62	0,56	0,56	0,59	0,82	0,95	1,00			
TT6-120-B	0,52	0,46	0,48	0,59	0,59	0,59	0,62	0,85	0,97	0,97	1,00		
TT6-120-D	0,54	0,46	0,51	0,62	0,62	0,62	0,64	0,82	0,95	0,95	0,97	1,00	
TT8-90-A	0,74	0,49	0,67	0,67	0,62	0,62	0,64	0,71	0,69	0,69	0,72	0,74	1,00

KẾT LUẬN

Gia tăng nồng độ và thời gian xử lý sodium azide thì khả năng sống của đoạn thân cây Thanh Tú giảm từ 82,85% (200 ppm; 30 phút) xuống 5,71% (800 ppm; 120 phút). SA có tác động làm biến dị kiểu hình về màu sắc hoa và lá ở 12 nghiệm thức so với đối chứng. SA có tác động đến kiểu gene dẫn đến có sự khác biệt giữa 12 cá thể được khảo sát thông qua giản đồ phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các cá thể chia làm 5 nhóm. Cá thể TT8-90-A xử lý 800 ppm SA trong 90 phút có sắc tố hoa không đồng nhất với sự xuất hiện của màu xanh, tím và trắng trên cùng một hoa. Đây là nguồn vật liệu tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo. Bên cạnh đó, cần thêm thời gian để theo dõi sự biểu hiện các tính trạng được ghi nhận và khả năng sinh trưởng và phát triển của các cá thể đột biến. Nhìn chung, đột biến do SA gây ra cho thấy đây là một công cụ đầy hứa hẹn để hỗ trợ các chương trình chọn tạo các giống Thanh Tú mới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Salim K, Al-Qurainy F, & Anwar F (2009). Sodium azide: A chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environment & We: An International Journal of Science & Technology*, 4: 1-21.

Abbasi S, & Afsharzadeh S (2016). An efficient and simple CTAB based method for total genomic DNA isolation from low amounts of aquatic plants with a high level of secondary metabolites. *Progress in Biological Sciences*, 6(1): 95-106.

Datta S K, Datta M, & Roy S C (2020). Application of mutation breeding for the development of ornamental plants. In D. K. Mohapatra (Ed.), *Mutation Breeding in Horticulture*, 125-142.

Hassel K, & Gunnarsson U (2003). The use of inter simple sequence repeats (ISSR) in bryophyte population studies. *Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology*, 28: 152-157.

Holton T A, Christopher J T, McClure L, Harker N, & Henry R J (2002). Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding*, 9: 63-71.

Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44(1): 223-270.

Kang E J, Lee Y M, Sung S Y, Ha B K, Kim S H, Kim D S, Kim J B, Kang S Y (2013). Analysis of the genetic relationship of gamma-irradiated *in vitro* mutants derived from standard-type chrysanthemum cv. Migok. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54: 76-81.

Naikawadi B V, Ahire L M, Nikam D T (2012). Seed characterization, viability and promotion of seed germination in nervine tonic plant *Evolvulus alsinoides* Linn. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 6(Special Issue 1): 5-11.

Olsen O, Wang X, & von Wettstein D (1993). Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A-T G-C transitions in the barley Ant18 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 8043-8047.

Oumer O, Tesfaye K, Getahun M, Derbew B (2020). Genetic diversity analysis of anchote (*Coccinia abyssinica*) genotypes from Ethiopia using ISSR markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1): 1-14.

Rogers S O, & Bendich A J (1988). Extraction of DNA from plant tissues. In S. B. Gelvin & R. A. Schilperoort (Eds.), *Plant molecular biology manual*, 1-10. Springer.

- Saki S, Bagheri H, Deljou A, Zeinalabedini M (2016). Evaluation of genetic diversity amongst *Descurainia sophia* L. genotypes by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22: 97-105.
- Salim K, Al-Qurainy F, Anwar F (2009). Sodium azide: A chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environment & We: An International Journal of Science & Technology*, 4: 1-21.
- Singh T N, Jeberson M S, Devi Y S, Singh N B, Sinha B, Shashidhar K S, Sharma P R (2020). Study of mutation induced by sodium azide in field pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Current Opinion in Crop Science*, 1(1): 11-15.
- Sneath P H A, & Sokal R R (1973). Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman and Company.
- Trần N D, Nguyễn T H, & Lê V H (2011). Improvements in the CTAB method for DNA extraction from plants. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 9(2): 123-130.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SODIUM AZIDE ON MUTATION INDUCTION IN THANH TU (*EVOLVULUS ALSINOIDES*)

Tran Le Nguyen, Le Thanh Nhan, Le Thi Anh Thu, Nguyen Thi Pha*

Institute of Biotechnology and Food, Can Tho University

SUMMARY

Induced mutation is a viable and established method for crop improvement and the creation of genetic diversity to develop new plant varieties. This study aims to induce mutations in *Evolvulus alsinoides* using sodium azide (SA) at concentrations of 0, 200, 400, 600 and 800 ppm for durations of 30, 60, 90, and 120 minutes on stem segments containing dormant buds under greenhouse conditions. The survival rate and the number of flowers of Sodium azide-treated samples decreased with increasing chemical concentrations. The lowest survival rate was recorded in the treatment with 800 ppm SA for 120 minutes at 5.71%, with no flowers observed in this treatment, while the highest survival rate was 82.85% with 8.75 flowers per pot in the treatment with 200 ppm for 30 minutes. Twelve individuals of *Evolvulus alsinoides* treated with Sodium azide exhibited phenotypic differences compared to the control, with 4 differing in leaf characteristics and 8 in flower characteristics, which were genetically analyzed using 6 ISSR primers. The results recorded a genetic variation level of 37% for the 12 surveyed individuals compared to the control, with the individual TT8-90-A having a similarity coefficient of 0.74 with the control, being the most potential individual among the mutants due to its unique flower phenotype with the most diverse coloration.

Keywords: *Evolvulus alsinoides*, ISSR, mutations, sodium azide, Thanh Tu.

* Author for correspondence: Tel: +84-986364168; Email: ntpa@ctu.edu.vn