



HIỆU QUẢ CỦA LIỀU LƯỢNG TIA GAMMA ^{60}Co TRÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CỤM CHỖI HOA HUỆ (*Polianthes tuberosa* L.) *in vitro*, SỰ XUẤT HIỆN CÁC CẤU TRÚC BẤT THƯỜNG VÀ XÁC ĐỊNH LD₅₀

Đào Thị Tuyết Thanh¹ và Nguyễn Bảo Toàn²

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

²*Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ*

Thông tin chung:

Ngày nhận: 13/01/2016

Ngày chấp nhận: 30/08/2016

Title:

Effects of ^{60}Co gamma doses on the growth and development of *in vitro* tuberose shoot clusters (*Polianthes tuberosa* L.), appearance of abnormal structures and LD₅₀ determination

Từ khóa:

Hoa huệ, gamma, sinh trưởng, *in vitro*, LD₅₀

Keywords:

Tuberose, gamma, growth, *in vitro*, LD₅₀

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the growth and development of shoot clusters of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) *in vitro* irradiated by ^{60}Co gamma doses: 0 (control treatment); 5; 15; 25; 40 and 60 Gy. Results showed that ^{60}Co gamma doses had effects on the growth and development of shoot height, shoot number and leaf number. These growth parameters were significantly decreased by increasing the irradiation dose. Except for 5 Gy dose, most of irradiation doses caused abnormal structures of *in vitro* shoot clusters. These indicated that there will be more phenotypic variations appearing in the field. LD₅₀ value obtained at dose $21,88 \pm 3,52$ Gy.

TÓM TẮT

Nghiên cứu “Hiệu quả của liều lượng tia gamma ^{60}Co trên sự sinh trưởng của cụm chồi hoa huệ (*Polianthes tuberosa* L.) *in vitro*, sự xuất hiện các cấu trúc bất thường và xác định LD₅₀” được thực hiện nhằm đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của chồi hoa huệ được xử lý tia gamma ^{60}Co . Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng các liều chiếu xạ ảnh hưởng trên sự sinh trưởng của chồi cao chồi, số chồi và số lá. Liều chiếu càng cao sự sinh trưởng các thông số này càng giảm. Trừ liều 5 Gy, hầu hết các liều còn lại đều gây ra các cấu trúc bất thường trong nuôi cấy *in vitro*. Điều này hy vọng sẽ có nhiều biến dị kiểu hình khi trồng ngoài đồng. Giá trị LD₅₀ đạt được ở các liều xử lý chiếu xạ tia gamma ^{60}Co là $21,88 \pm 3,52$ Gy.

Trích dẫn: Đào Thị Tuyết Thanh và Nguyễn Bảo Toàn, 2016. Hiệu quả của liều lượng tia gamma ^{60}Co trên sự sinh trưởng của cụm chồi hoa huệ (*Polianthes tuberosa* L.) *in vitro*, sự xuất hiện các cấu trúc bất thường và xác định LD₅₀. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45b: 25-32.

1 GIỚI THIỆU

Cây hoa huệ (*Polianthes tuberosa* L.) là một trong những cây hoa cắt cành ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và cũng là cây hoa cắt cành phổ biến ở Việt Nam. Hiện nay, có hai giống hoa đơn và hoa kép được canh tác phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Cây hoa huệ là cây mang lại thu nhập cao so với lúa và các cây trồng khác. Vì vậy, cây hoa huệ đã được đưa vào chương trình chuyển đổi cơ cấu cây trồng và được xem là cây trồng xóa đói giảm

nghèo ở các tỉnh như Tiền Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ. Tuy nhiên, các giống hoa huệ canh tác hiện nay rất lâu đời và dễ bị thoái hóa nên rất dễ bị sâu bệnh tấn công và làm giảm năng suất đáng kể. Nhu cầu giống mới để thay thế thì rất cần thiết. Tuy nhiên, việc lai tạo để tạo giống mới theo kiểu truyền thống ở cây hoa huệ gặp phải một số hạn chế do tính bất tương hợp. Hoa có nhụy và nhị chín không cùng lúc và hạt không tạo được trong điều kiện tự nhiên (Estrada-Basaldua *et al.*, 2011). Hơn nữa chỉ có giống hoa đơn thì tạo được hạt nhưng

hạt khó nảy mầm. Vì vậy, việc tạo giống mới theo kiểu lai truyền thống khó áp dụng được. Có lẽ tạo đột biến là cách tốt nhất trong việc tạo giống hoa huệ mới. Kỹ thuật tạo đột biến là một công cụ quan trọng trong cải thiện giống cây trồng. Nó được áp dụng rộng rãi trong việc tạo ra nhiều giống cây trồng mới. Có khoảng 2.300 giống cây trồng được tạo ra từ kỹ thuật này (Toker *et al.*, 2007). Sự tạo đột biến có thể sử dụng tác nhân vật lý hay hóa học. Đối với tác nhân vật lý, bức xạ ion hóa như tia X hay tia gamma thường sử dụng. Tuy nhiên, sử dụng tia gamma để đạt được đột biến mang lại hiệu quả cao. Theo thống kê, tia gamma là tác nhân đóng góp 60,3% trong tất cả các tác nhân tạo giống đột biến (IAEA, 2005). Kỹ thuật sử dụng tác nhân là tia gamma gây đột biến làm tăng biến dị di truyền ở một số loài hoa có thể gây ra những thay đổi ở hoa như màu sắc, hình dạng và đặc tính sinh trưởng (dạng thấp cây hoặc có sọc ở hoa hay lá) có thể được dùng cho chương trình chọn giống (Xu *et al.*, 2012).

Nuôi cấy mô hay nuôi cấy *in vitro* là công cụ hữu ích để nhân giống cây trồng. Nó là kỹ thuật tạo ra số lượng lớn cây trồng trong một thời gian ngắn. Sự nhân giống cây hoa huệ *in vitro* cũng được nghiên cứu (Huỳnh Thị Huệ Trang và *ctv.*, 2007). Sự kết hợp giữa kỹ thuật tạo đột biến và nuôi cấy *in vitro* trên cây hoa huệ sẽ tạo ra lợi ích như khả năng sản xuất nhanh một số lượng lớn cây đã được tạo đột biến.

Ở hoa huệ, đa số các công trình tập trung nghiên cứu về xử lý đột biến bằng chiếu xạ tia gamma và sử dụng chất gây đột biến EMS (ethyl methane sulphonate) lên củ không kết hợp nuôi cấy mô (Adisorn, 1992; Anu, 2003; Yanshan *et al.*, 2003; Estrada-Basaldua *et al.*, 2011; Kainthura và Srivastava, 2014; Singh *et al.*, 2015). Các nghiên cứu trên cho thấy hiệu quả của liều chiếu xạ tia gamma để gây đột biến ở các loài cây này không giống nhau và phụ thuộc vào các yếu tố như liều chiếu xạ, tình trạng sinh lý, tuổi, kiểu gen... của vật liệu được xử lý. Liều chiếu xạ được sử dụng để gây đột biến cũng phụ thuộc vào độ mẫn cảm của loài cũng như ở cấu trúc của cây. Ngoài ra, Sparow *et al.* (1968) còn cho rằng tính mẫn cảm của cây đối với liều chiếu xạ còn phụ thuộc vào cấu trúc nhân tế bào như thể tích nhân, số lượng nhiễm sắc thể và mức độ bội thể. Điều này là do tia gamma thuộc nhóm tia ion hóa và tương tác với các nguyên tử hoặc phân tử để tạo ra các gốc tự do trong tế bào. Những gốc tự do này có thể làm tổn thương hoặc thay đổi những thành phần quan trọng của tế bào cây trồng. Ảnh hưởng khác nhau này đã được báo cáo trên kiểu hình, giải phẫu (anatomy), sinh hóa và sinh lý cây trồng bao gồm những thay

đổi ở cấu trúc tế bào, sự trao đổi chất như sự dẫn màn thylakoid, sự thay đổi trong quang hợp, điều chỉnh hệ thống chống oxy hóa và sự tích lũy các hợp chất phenol và điều này phụ thuộc vào mức độ chiếu xạ (Hasbullah *et al.*, 2012). Cần xử lý tia gamma với liều lượng cao ở cây trồng để gây ra sự thay đổi về mặt trao đổi khí ở lá, sự cân bằng chất điều hòa sinh trưởng, sự trao đổi nước và hoạt động của enzyme (Kiong *et al.*, 2008). Nghiên cứu của Adisorn (1992) đã thực hiện chiếu xạ lên củ hoa huệ với các liều lượng tương tự như nghiên cứu của Estrada-Basaldua *et al.* (2011) (5, 10, 15, 20, 25 và 30 Gy) nhưng ở suất liều 7,12 Gy/phút. Hasbullah *et al.* (2012) xử lý chiếu xạ ở các liều 10, 20, 30, 40, 50 và 60 Gy lên vật liệu nuôi cấy từ lá và cuống lá cây *Gerbera jamesonii* ở suất liều 0,204 Gy/s. Gần đây nhất, trong nghiên cứu của Ilyas và Naz (2014) đã sử dụng tia ^{60}Co gamma với liều xử lý cao nhất lên đến 100 Gy lên củ cây nghệ nhằm chọn lọc những cây có hỗn hợp chất curcuminoid và oleoresin cao hơn.

Trong nghiên cứu tạo đột biến, khảo sát LD₅₀ là quan trọng trong nghiên cứu tạo giống đột biến ở cây trồng vì hiệu quả của liều này có thể gây tần số biến dị cao nhất ở cây trồng và giá trị này được cho là gần với giá trị LD₅₀ (Sparow *et al.*, 1967; Le Quang Luan *et al.*, 2012). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định được liều chiếu xạ thích hợp nhất lên sự sinh trưởng và phát triển của các cụm chồi hoa huệ và sự xuất hiện các cấu trúc bất thường trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* cũng như giá trị LD₅₀ làm cơ sở để đánh giá các kiểu hình đột biến ở các giai đoạn tiếp theo trong quy trình chọn tạo giống hoa huệ.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

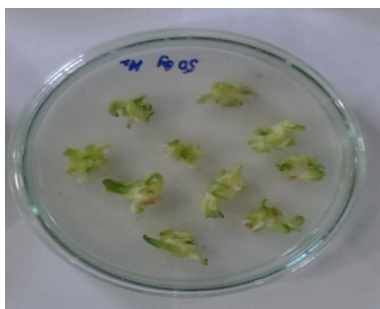
Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 5/2014 đến tháng 2/2015 ở Trại Nghiên cứu và Thực nghiệm Nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1 Vật liệu thí nghiệm

Giống hoa huệ được sử dụng trong nghiên cứu này là giống hoa huệ kép có 12 cánh hoa và thơm được canh tác ở An Giang. Các cụm chồi của giống hoa huệ này được lấy từ nghiên cứu trước (Lê Lý Vũ Vi và *ctv.*, 2014).

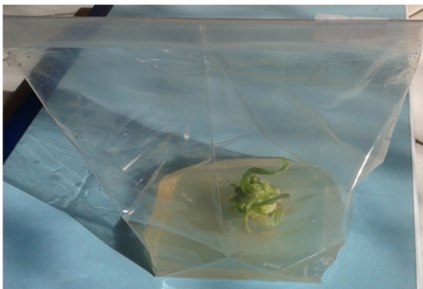
2.1.1 Chuẩn bị mẫu cho chiếu xạ

Các cụm chồi được duy trì trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) được bổ sung 50 mg/l FeNa-EDTA (Merk Co.), 100 ml/l nước dừa, 0,25 mg/l Naphthalen acetic acid (NAA) và 3 mg/l Benzyl adenine (BA), 7 g/l agar và 20 g/l đường. Môi trường được hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C, trong thời gian 20 phút.



Hình 1: Trình bày các mẫu cụm chồi được cấy trong mỗi đĩa petri để chiếu xạ

Khi các cụm chồi đạt được kích thước từ 1 đến 1,2 cm cao và 1 cm đường kính. Các cụm chồi được chọn tương đối đồng nhất về kích thước cây, sau đó cấy vào trong các đĩa petri có đường kính 8,5 cm và chiều cao 2 cm. Mỗi đĩa cấy 10 cụm chồi (Hình 1). Các liều chiếu xạ bao gồm 0 (đối chứng); 5; 15; 25; 40 và 60 Gy, suất liều 1,58 kGy/giờ ($\approx 0,44$ Gy/s). Việc xử lý chiếu xạ được thực hiện ở Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (Complete randomized design, CRD) với 5 lần lặp lại và mỗi đĩa là một lần lặp lại. Từng cụm chồi sau khi chiếu xạ được cấy vào môi trường nuôi cấy bên trên để theo dõi sự sinh trưởng và phát triển.



Hình 2: Một cụm chồi sau khi chiếu xạ được cấy vào bao plastic chứa 100 ml môi trường cơ bản

Môi trường dinh dưỡng pha xong được chứa trong các bao plastic (polypropylene) có kích thước (15 cm x 25 cm). Mỗi bao plastic chứa 100 ml môi trường và cấy một cụm chồi. Sau đó các bao này

Bảng 1: Bảng biến đổi % chết sang giá trị xác suất (Finney, 1952)

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

được gấp lại ba lần (1,5 cm mỗi lần gấp) và dán lại bằng băng keo dính (Hình 2). Môi trường được hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C, trong thời gian 20 phút.

2.1.2 Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các bao plastic chứa các mẫu chiếu xạ được đặt trên các kệ dưới ánh sáng đèn huỳnh quang ở cường độ 1.500 lux, quang kỳ 16 giờ/ngày, nhiệt độ 30 ± 2°C.

2.1.3 Thu thập số liệu

– Phần trăm cụm chồi chết (%) = (Số cụm chồi chết/Tổng số cụm chồi được chiếu xạ)100. Cụm chồi chết là những cụm chồi mất sắc tố diệp lục chuyển sang màu nâu hoặc màu trắng và không phát sinh chồi mới.

– Phần trăm cấu trúc bất thường (%) = (Số cụm chồi bất thường/Tổng số cụm chồi được chiếu xạ)100. Cụm chồi bất thường là các cụm chồi có biểu hiện khác thường được ghi nhận ở lá, rễ, chồi, sự chùn đọt ở chồi.

– Chiều cao chồi đo từ mặt agar đến lá cao nhất (cm).

– Số chồi đếm trên tổng số chồi của mỗi cụm.

– Số lá đếm trên tổng số lá của mỗi cụm.

Tất cả các chỉ tiêu trên được ghi nhận ở ngày 50, 100 và 150 sau khi cấy.

– Xác định LD₅₀ của các liều chiếu xạ gamma ⁶⁰Co ở 150 ngày sau khi cấy được tính theo phương pháp của Miller và Tainter, 1944 như mô tả bởi Randhawa (2009) và bảng biến đổi % chết sang giá trị xác suất theo Finney (1952). Trong đó cần xác định % hiệu chỉnh.

– Công thức % hiệu chỉnh cho 0 và 100% chết.

Giá trị hiệu chỉnh = 100x(% chết - % chết ở đối chứng/100 - % chết ở đối chứng)

Đối với 0% chết: (0,25/n)100; đối với 100% chết: (1 - 0,25/n)100 và n = 50

– Sai số chuẩn (Standard Error, SE) của LD₅₀.

SE của LD₅₀ có thể được tính từ công thức sau:

$$SE \text{ của } LD_{50} = \frac{(\log_{10} LD_{84} - \log_{10} LD_{16})}{\sqrt{2n}} \quad (a)$$

Trong đó: n là số cụm chồi trong mỗi nghiệm thức, n = 50.

Biến đổi liều chiếu xạ sang giá trị log₁₀ và giá trị % hiệu chỉnh của cụm chồi chết sang giá trị xác suất bằng bảng biến đổi % chết sang giá trị xác suất (probit).

– Xác định phương trình tương quan và hồi qui.

2.1.4 Phân tích thống kê

Tất cả số liệu được chuyển đổi sang căn bậc hai + 0,5 để đạt được phân phối chuẩn. Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0. Phép thử F và kiểm định Duncan ở xác suất 5%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cụm chồi

– Chiều cao chồi

Bảng 2: Chiều cao chồi (cm) của các nghiệm thức khác nhau sau khi xử lý tia gamma ⁶⁰Co theo thời gian (ngày)

Nghiệm thức	Liều xử lý (Gy)	Ngày			
		0	50	100	150
1	0 Gy	1,1	1,7c	3,3c	5,4b
2	5 Gy	1,1	3,3a	5, 8a	7,0a
3	15 Gy	1,1	3,0a	5,2a	6,6a
4	25 Gy	1,1	2,6b	4,1b	5,6b
5	40 Gy	1,1	1,3d	1,8d	2,4c
6	60 Gy	1,1	1,1d	1,1e	1,2d
F		ns	*	*	*
CV		8,6%	12,7%	14,4%	14,5%

Các số được theo sau cùng ký tự thì không khác biệt thống kê, (Duncan test, $p < 0,05$), *: ý nghĩa $p \leq 0,05$; ns: không khác biệt

Bảng 2 cho thấy chiều cao chồi gia tăng theo thời gian ở tất cả các nghiệm thức xử lý các liều chiếu xạ khác nhau. Chiều cao chồi đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức 5 Gy và 15 Gy. Nghiệm thức không xử lý chiếu xạ, nghiệm thức 25 và 40 Gy có sự gia tăng chiều cao chồi nhưng không nhiều. Đặc biệt ở liều chiếu xạ 60 Gy chiều cao chồi gần như không gia tăng. Giải thích cho sự sinh trưởng bị hạn chế do ảnh hưởng của các liều chiếu xạ có thể liên quan đến chất điều hòa sinh trưởng nội sinh và DNA (Deoxyribo nucleic acid). Ảnh hưởng

của các liều chiếu xạ trên các phân ứng và cần thiết cho sự tổng hợp DNA và auxin (Jan *et al.*, 2012).

– Số chồi

Hiệu quả của các liều chiếu xạ lên sự gia tăng trên số chồi ở các thời điểm 50, 100 và 150 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 3. Có sự gia tăng về số chồi ở tất cả các nghiệm thức ngoại trừ nghiệm thức 60 Gy. Ở các liều chiếu xạ từ 0, 5 và 15 Gy, số chồi gia tăng theo thời gian ở tất cả các nghiệm thức và không có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức này ở 100 và 150 ngày nuôi cấy. Ở nghiệm thức 40 Gy, số chồi gia tăng tương đối nhỏ. Liều 60 Gy đã gây ảnh hưởng nhiều đến sự phát sinh chồi. Sự thành lập chồi trong *in vitro* thì liên quan đến một số chất điều hòa sinh trưởng nội sinh trong đó có nhóm cytokinin. Hasbullah *et al.* (2012) giả định là sự tổng hợp các chất này bị ảnh hưởng bởi sự chiếu xạ.

Bảng 3: Số chồi của các nghiệm thức khác nhau sau khi xử lý tia gamma ⁶⁰Co theo thời gian (ngày)

Nghiệm thức	Liều xử lý (Gy)	Ngày			
		0	50	100	150
1	0 Gy	3,4	4,0a	5,7a	7,3a
2	5 Gy	3,4	4,0a	5,6a	6,9a
3	15 Gy	3,5	3,9b	5,5a	6,7ab
4	25 Gy	3,5	4,0a	4,6b	6,1b
5	40 Gy	3,5	3,5b	3,8c	4,2c
6	60 Gy	3,4	3,4b	3,4c	3,4d
F		ns	*	*	*
CV		18,6%	7,2%	9,9%	10,8%

Các số được theo sau cùng ký tự thì không khác biệt thống kê, (Duncan test, $p < 0,05$), *: ý nghĩa $p \leq 0,05$; ns: không khác biệt

– Số lá

Bảng 4 cho thấy sự hình thành lá mới của chồi hoa huệ theo liều chiếu xạ ở các mốc thời gian nuôi cấy. Số lá ở các liều chiếu xạ ở 50, 100 và 150 ngày sau khi cấy đều tăng. Liều chiếu xạ càng cao, sự hình thành lá càng ít dần, trừ số lá gia tăng ở nghiệm thức 40 Gy (6 lá) là khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các liều 5; và 15 Gy ở giai đoạn 50 ngày sau khi cấy. Nghiệm thức ở liều chiếu xạ 25 Gy có số lá tạo ít ở 50 và 100 ngày nuôi cấy nhưng lại tạo số lá nhiều nhất (khoảng 21 lá), có khác biệt không có ý nghĩa thống kê với liều chiếu xạ 15 Gy ở 150 ngày nuôi cấy. Mặc dù ở liều chiếu xạ gây chết hoàn toàn 60 Gy không cho sự gia tăng số chồi và chiều cao chồi nhưng vẫn có sự gia tăng số lá ở các thời điểm nuôi cấy 50, 100 và 150 ngày. Điều này là do số chồi chết không đồng thời một lúc, thời gian các chồi được xử lý chiếu xạ chết hoàn toàn trong 150 ngày nên trong thời gian

này chồi vẫn có sự gia tăng về mặt sinh trưởng. Các chồi ở nghiệm thức này có sự gia tăng số lá nhưng rất ít (khoảng 0,4 lá; 0,4 lá và 0,3 lá ở 50; 100 và 150 ngày nuôi cấy theo thứ tự).

Bảng 4: Số lá của các nghiệm thức khác nhau sau khi xử lý tia gamma ⁶⁰Co theo thời gian (ngày)

Nghiệm thức	Liều xử lý (Gy)	Ngày			
		0	50	100	150
1	0 Gy	2,2	5,7b	13,3a	18,0b
2	5 Gy	2,2	5,9ab	14,0a	18,6b
3	15 Gy	2,3	7,0a	14,0a	21,7a
4	25 Gy	2,2	3,2c	9,5b	21,1ab
5	40 Gy	2,2	6,0ab	8,0b	9,9c
6	60 Gy	2,1	2,5c	2,9c	3,2d
F		ns	*	*	*
CV		4,2%	14,3%	19%	19,1%

Các số được theo sau cùng ký tự thì không khác biệt thống kê, (Duncan test, $p < 0,05$), *: ý nghĩa $p \leq 0,05$; ns: không khác biệt

3.2 Phần trăm cụm chồi chết

Kết quả Bảng 5 cho thấy rằng phần trăm cụm chồi chết gia tăng khi liều chiếu gia tăng. Ở liều chiếu thấp nhất (5 Gy) có 6% cụm chồi chết và ở liều chiếu cao nhất (60 Gy), tất cả cụm chồi bị chết (100%). Hiệu quả của việc xử lý tia gamma trên sự sống sót tùy thuộc vào liều chiếu xạ. Khi liều chiếu xạ gia tăng sự sống sót giảm. Kết quả nghiên cứu này cũng giống với các kết quả nghiên cứu trên cây lai *Torenia* (Sawangmee, 2011) hay sự chết cụm chồi trên hai giống hoa huệ (Nguyễn Bảo Toàn và ctv., 2014) và cây *Biomphalaria glabrata* (Cantina, 2009). Estrada-Basaldua (2011) báo cáo sau khi chiếu xạ củ cây hoa huệ, đem các củ con nuôi cấy *in vitro* và trồng ngoài nhà lưới có liều gây chết hoàn toàn là 30 Gy.

Bảng 5: Hiệu quả của các liều chiếu xạ tia gamma ⁶⁰Co trên % của cụm chồi chết ở 150 ngày sau khi cấy

Liều chiếu (Gy)	% của cụm chồi chết
0	0
5	6
15	20
25	40
40	48
60	100

3.3 Xác định LD50

Bảng 6 trình bày các giá trị của liều chiếu xạ được biến đổi giá trị log₁₀ và giá trị % chết sang giá trị xác suất. Hai giá trị ở 0 và 100% chết được hiệu chỉnh. Tất cả giá trị log₁₀ và xác suất được sử dụng để tính tương quan và hồi qui và đạt được phương trình $y = 3,188x + 0,725$, $R^2 = 0,722$ (Hình 3). Trên cơ sở phương trình này, giá trị LD₅₀ đạt được ở liều 21,88 Gy.

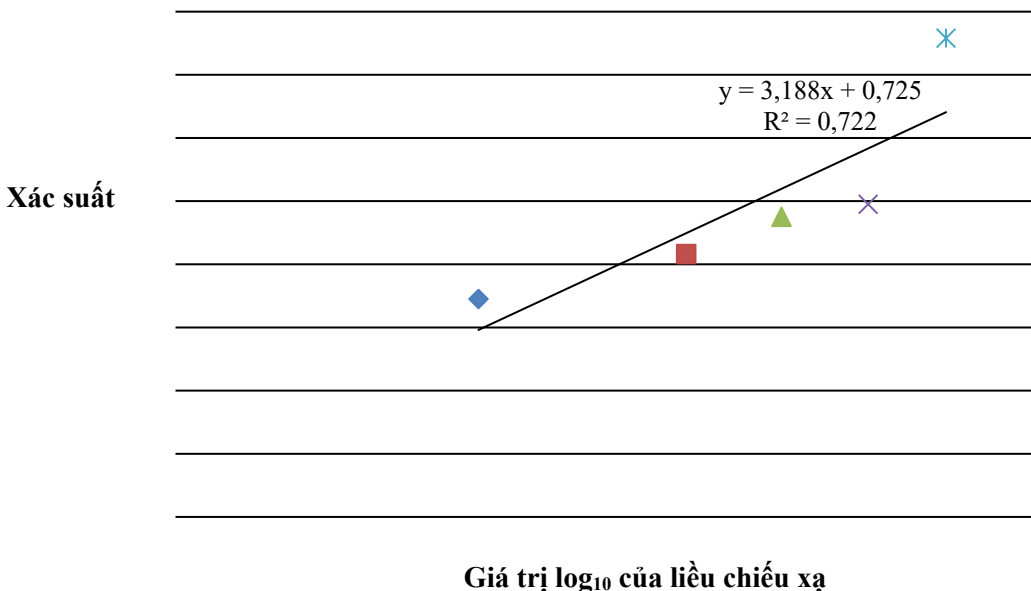
Bảng 6: Kết quả liều gây chết của các tia gamma ⁶⁰Co để xác định LD50

Liều chiếu xạ (Gy)	Giá trị log ₁₀	% chết	Giá trị hiệu chỉnh (%)	Giá trị xác suất
0	-	0	0,5	-
5	0,70	6	6	3,45
15	1,18	20	20	4,16
25	1,40	40	40	4,75
40	1,60	48	48	4,95
60	1,78	100	99,5	7,58

(-): không xác định

Tính sai số chuẩn (SE) của LD₅₀ được tính từ công thức (a). Xác suất của 84 và 16 từ Bảng 1 là 5,99 và 4,01 (xấp xỉ 6 và 4), theo thứ tự. Giá trị log₁₀-LD cho xác suất 6 và 4 đạt được từ đồ thị (Hình 3) là 1,66 và 1,02. Giá trị log₁₀ ngược (antilog₁₀) là 45,71 và 10,47. Sử dụng các giá trị này, SE của LD₅₀ là 3,52. Do đó, LD₅₀ của các tia gamma ⁶⁰Co là 21,88 ± 3,52, với 95% khoảng tin cậy.

Thông thường giá trị LD₅₀ trong xử lý chiếu xạ đạt được không giống ở tất cả các loài cũng như tất cả các mẫu cây khi được xử lý bằng tia gamma do nó thay đổi từ loài này sang loài khác cũng như từ mẫu cây này sang mẫu cây khác. Estrada-Basaldua (2011) đã báo cáo khi xử lý chiếu xạ củ hoa huệ (có từ 2 - 21 củ con) bằng tia gamma ⁶⁰Co rồi tách các củ con (không gây tổn thương) đem nuôi cấy *in vitro* và trồng ngoài nhà lưới, LD₅₀ của các cây huệ được trồng từ các chồi thuần dưỡng sau nuôi cấy *in vitro* là 9,09 Gy, thấp hơn LD₅₀ của các cây phát sinh từ củ được chiếu xạ và được trồng ngoài nhà lưới (25,91 Gy) sau thời gian 5 tháng. Nghiên cứu của Yanshan *et al.* (2003) đã tính toán các giá trị LD₅₀ là 15 và 25 Gy trên cơ sở sự sống sót của củ lớn và củ nhỏ.



Hình 3: Đồ thị tương quan hồi qui để xác định LD₅₀ của các liều chiếu xạ khác nhau ở 150 ngày sau khi cấy

3.4 Tác động của các liều chiếu xạ tia gamma ⁶⁰Co trên các cấu trúc bất thường

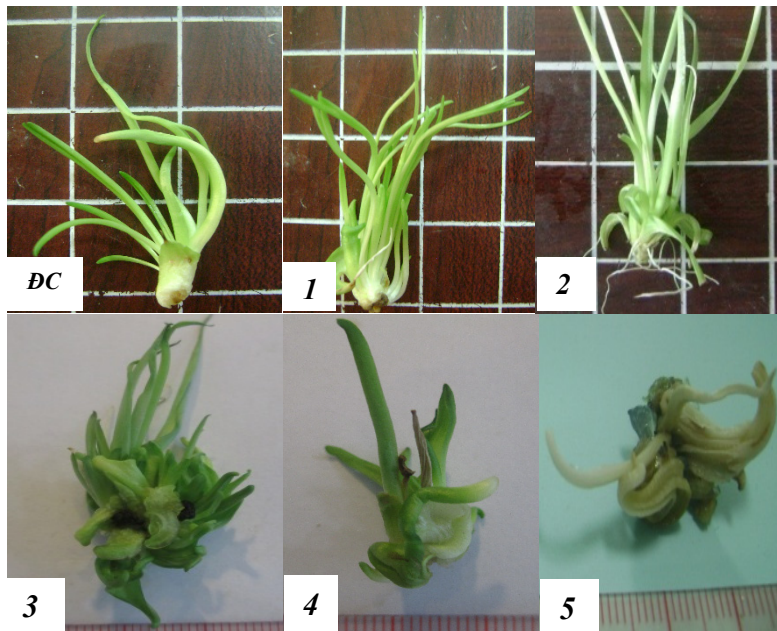
Kết quả Bảng 7 cho thấy rằng có 4 kiểu cấu trúc bất thường được ghi nhận dưới tác động của các liều bức xạ gamma khác nhau. Ở liều 5 Gy, không có xuất hiện cấu trúc bất thường. Ở liều chiếu xạ 15 Gy, có 27 cấu trúc bất thường chiếm 54% số mẫu được xử lý chiếu xạ. Ở liều 25 và 40 Gy, có hai cấu trúc bất thường (chùn đọt) chiếm 4% và ở liều 40 Gy, có 5 cấu trúc bất thường chiếm 10% số mẫu được xử lý chiếu xạ. Ở liều gây chết hoàn toàn 60 Gy, chồi hoa huệ mất sắc tố, chuyển sang màu nâu hoặc trắng hoàn toàn (chiếm 90% số chồi). Đồng thời, ở liều chiếu xạ này, 10% số chồi

hoa huệ chết dần từ dưới gốc lên trên lá với đặc điểm là mô mất nước và xốp.

Các kiểu cấu trúc bất thường khác nhau gần như hoàn toàn về hình dáng ngoại trừ cấu trúc bất thường (4.3) và (4.4) thì hơi giống nhau (chùn đọt) nhưng khác nhau về lá không có răng cưa (4.3) và có răng cưa (4.4). Ở liều chiếu xạ cao, cấu trúc bất thường có dạng chùn đọt và hóa nâu (40 Gy). Ở liều chiếu xạ thấp (5 Gy) không có hiện tượng cấu trúc bất thường. Sự xuất hiện của các cấu trúc bất thường đã cho thấy rằng tia gamma ở các liều cao đã tác động lên tế bào và các thành phần của tế bào như lục lạp (gây ra sự mất sắc tố) hay acid nhân và ảnh hưởng đến sự phân chia tế bào cũng như sự chuyên hóa.

Bảng 7: Phần trăm xuất hiện cấu trúc bất thường ở các liều khác nhau ở 100 ngày sau khi cấy

Các kiểu cấu trúc bất thường	Số cấu trúc bất thường	Tổng số cụm chồi	% cấu trúc bất thường
Lá mất sắc tố và phát sinh rễ (2)	27	50	54
Lá lưỡi răng cưa và chùn đọt (3)	1	50	2
Chùn đọt (4)	1	50	2
Hóa nâu và mất sắc tố (5)	5	50	10



Hình 4: Các dạng cấu trúc bất thường của cụm chồi hiện diện ở các liều chiếu xạ khác nhau ở 150 ngày sau khi cấy

ĐC và (1): bình thường (Đối chứng và 5 Gy); (2): chồi ra rễ (15 Gy); (3): lá răng cưa và chùn đọt (25 Gy); (4): chùn đọt và mất sắc tố (40 Gy) và (5): mất sắc tố và hóa nâu (60 Gy)

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng các liều chiếu xạ ảnh hưởng trên sự sinh trưởng của chiều cao chồi, số chồi và số lá. Liều chiếu càng cao sự sinh trưởng các thông số này càng giảm.

Trừ liều 5 Gy, hầu hết các liều còn lại đều gây ra các cấu trúc bất thường trong nuôi cấy *in vitro*. Điều này hy vọng sẽ có nhiều biến dị kiểu hình khi trồng ngoài đồng. Giá trị LD₅₀ đạt được ở các liều xử lý chiếu xạ tia gamma ⁶⁰Co là 21,88 ± 3,52 Gy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adisorn, K., 1992. Effect of gamma radiation on tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Kasetsart Journal, Natural Sciences*. 26(1): 6 - 11.

Anu, G. K., 2003. *In vitro* multiplication and genetic improvement of tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). Thesis of doctor of philosophy in Horticulture. Kerala Agriculture University. India.

Cantinha, R. S., Demir, A. A., Sueli, I. B., Eliana, N., Silva, L. R. S. and Melo, A. M. M. A., 2009. Effects of high dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. In: International Nuclear Atlantic Conference -INAC 2009. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, September 27 to October 2, 2009.

Estrada-Basaldúa, J. A., Pedraza – Santos, M. E., Cruz – Torres, E., Martínez – Palacios, E. and Morales – García, C. J. L., 2011. Effect of ⁶⁰Co Gamma rays in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.).

In: *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp. Num 31 de noviembre - 31 de diciembre, México*. 445 - 458.

Finney, D. J., 1952. *Probit Analysis*. Cambridge, England, Cambridge University Press.

Hasbullah, N. A., Taha, R. M., Saleh, A., Mohamed, N., 2012. Physiological Responses of Callus from *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook f. to Gamma Irradiation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 55(3): 411- 416.

Huỳnh Thị Huệ Trang, Lê Hồng Giang, Nguyễn Bảo Toàn, 2007. Phục tráng giống huệ trắng (*Polianthes tuberosa* Linn.) nhiễm bệnh chai bông bằng nuôi cấy phân sinh mô chồi. Hội nghị khoa học Công nghệ Sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa. NXB Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh. 141 - 154.

IAEA (International Atomic Energy Agency), 2005. Annual report 2005.

Ilyas, S. and Naz, S., 2014. Effect of gamma irradiation on morphological characteristics and isolation of curcuminoids and oleoresins of *Curcuma longa* L. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 24(5): 1396 - 1404.

Jan, S., Parween, T., Siddiqi, T. O., 2012. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environmental Reviews*. 20: 17 - 39.

Kainthura, P., Srivastava, R., 2014. Induction of Genetic Variability and Isolation of Mutants in Tuberose (*Polianthes Tuberosa* L.). *Tropical Agricultural Research*. 26(1).

- Kiong, A., Pick, A. L., Lai, S. H. G., Harun, A. R., 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 2(2): 135 - 149.
- Lê Lý Vũ Vi, Nguyễn Bảo Toàn, Trần Văn Hậu, Trần Sỹ Hiếu, Trần Thị Doãn Xuân, 2014. Nuôi cấy mô thực vật cây hoa huệ trắng (*Polianthes tuberosa*) trong điều kiện ánh sáng tự nhiên và đánh giá sự sinh trưởng qua mô hình canh tác. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. (4): 63 - 67.
- Le Quang Luan, Nguyen Huynh Phuong Uyen, Vo Thi Thu Ha, 2012. In vitro mutation breeding of *Paphiopedilum* by ionization radiation. *Scientia Horticulturae*. 144: 1- 9.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Plant Physiology*. 15: 473 - 497.
- Nguyễn Bảo Toàn, Nguyễn Quang Thức, Đào Thị Tuyết Thanh, 2014. Xử lý tia gamma ^{60}Co ở các liều chiếu xạ khác nhau trên cụm chồi hai giống hoa huệ (*Polianthes tuberosa*) in vitro. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. (4): 41 - 46.
- Randhawa, M. A., 2009. Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 21(3): 184 - 185.
- Sawangmee, W., Taychasinpitak, T., Jompuk, P., Kikuchi, S., 2011. Effects of Gamma Irradiation in Plant Morphology of Interspecific Hybrids between *Torenia fournieri* and *Torenia baillonii*. *Kasetsart Journal. (Natural Science)*. 45 : 803 - 810.
- Singh P. K., Sadhukhan, R., A. Dudhane, S., Kumar, Sarkar, V. H. K., 2015. Preliminary Study on Mutagenic Effect of EMS on Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Environment & Ecology*. 33(3A): 1386 - 1390.
- Sparow, A. H., Underbrink, A. G., Sparow, R. C., 1967. Chromosomes and cellular radiosensitivity. The relationship of dose to chromosome volume and complexity in seventy nine different organism. *Radiation Research*. 32: 915 - 945.
- Sparow, A. H., Rogers, A. F., Schwemmer, S. S., 1968. Radiosensitivity studies in woody plants. I. Acute gamma irradiation survival data for 28 species and prediction for 190 species. *Radiation Botany*. 8: 149 - 186.
- Toker, C., Yadav, S. S., Solanki, I. S., 2007. Mutation breeding. In: Yadav et al. (Eds) *Lentil: An ancient crop for modern times*. 209 - 224.
- Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M. S., Wan, G. L., Jin, Z. L., Khan, F. and W. J. Zhou. 2012. In vitro mutagenesis and genetic improvement. S.K. Gupta (Ed.): *Technological Innovations in Major World Oil Crops*. (2): 151-173.
- Yanshan, S., Jianxia, L., Guofang, Z., Guiping, Q., Xueen, L., 2003. Search for Proper Dose of ^{60}Co Gamma Ray in Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) Radiation Breeding. *Acta Horticulturae Sinica*. 6.