

### III. KẾT LUẬN

(+) Tất cả các giống đậu xanh nghiên cứu đều có độ thuần khá cao về các đặc tính hình thái, nông học và năng suất. (+) Trong đó, giống T135 có năng suất cao nhất. Các giống VC3945A, VC1973A và DX06 đều cho năng suất khá. (+) Các đặc tính hình

thái và nông học không có tương quan hoặc tương quan không chặt chẽ với năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất. (+) Năng suất có tương quan thuận rất chặt chẽ với số quả/cây và có tương quan thuận nhưng không chặt chẽ với 2 đặc tính là số cành cấp I/cây và số hạt/quả.

### EVALUATION ON STABILITY OF SOME QUANTITATIVE CHARACTERS IN SOME MUNGBEAN VARIETIES AND THEIR CORRELATION (Summary)

Field experiments were conducted at Bac Giang legume experimental station in three seasons. Eight varieties and lines were tested. The results have shown that all of them have high stability on morphological and agronomic characteristics. They have been considered to be pure varieties and lines.

Plant yield correlates very closely with number of pod per plant, and fairly with number of seed per pod and number of primary branches. Others have been considered having no or loose correlation with plant yield.

### NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG CHUỐI TỨ BỘI BẰNG XỬ LÝ COLCHICINE

PHẠM LÝ THU, ĐỖ NĂNG VỊNH, LÊ HUY HÀM

Để chọn tạo các giống chuối mới người ta thường sử dụng phương pháp tạo các đột biến bằng các tác nhân lý hóa học như dùng phóng xạ, dùng hóa chất... chọn tạo các biến dị soma trong quá trình nuôi cấy in vitro. Hoặc áp dụng các phương pháp lai truyền thông, trong đó chủ đạo là tạo giống tam bội ưu thế lai. Phương pháp tạo giống chuối tam bội phổ biến nhất là lai giữa giống nhị bội (2n) và giống tứ bội thể (4n). Có hai phương pháp tạo giống chuối tứ bội; Hoặc thụ phấn giống chuối nhị bội với giống chuối tam bội hữu thụ cái (do các giống chuối tam bội thường là bất dục hoàn toàn, rất ít giống chuối tam bội có thể bảo trứng tam bội hữu thụ, nên khả năng tạo giống tứ bội bằng lai giống nhị bội với giống tam bội hữu thụ cái rất khó khăn, tốn kém và ít áp dụng), hoặc lai dòng nhị bội với dòng tứ bội. Ở phương pháp lai dòng nhị với tứ bội trước hết phải tạo dòng chuối tứ bội bằng xử lý colchicine chuối nhị bội. Xử lý in vitro là phương pháp hiệu quả nhất để tạo ra các giống chuối tứ bội là nguồn vật liệu không thể thiếu được trong tạo giống chuối tam bội không hạt. Đi theo hướng chọn tạo các giống chuối tứ bội bằng xử lý colchicine chuối nhị bội in vitro là công việc của chúng tôi thời gian qua.

#### I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Vật liệu:** 2 giống nhị bội (2n = 22, nhị thể) là chuối Tiêu Thủy Bằng (AA) và Mãn Tam Quan (AB) được thu thập và bảo quản tại Viện di truyền nông nghiệp với nhiều đặc tính quý như chất lượng quả thơm ngon, ít mắc bệnh với các bệnh chính ở chuối như bệnh héo rũ, bệnh nấm lá và bệnh chùn ngọn.

**Xử lý colchicine chồi chuối in vitro nuôi trong ống nghiệm bằng colchicine của hãng Sigma.** Chồi 2 giống chuối sau 2 - 4 tuần nuôi cấy in vitro đạt tốc độ sinh trưởng tối đa được dùng để xử lý colchicine. Tại thời điểm này, cụm chồi được tách ra thành các chồi riêng rẽ có kích thước khoảng 10 x 30mm. Xử lý colchicine chồi chuối được tiến hành theo 2 phương thức sau: **Phương thức 1: Xử lý lỏng, lác** (theo phương pháp của Hamill et al, 1992 có cải tiến): Colchicine được khử trùng bằng màng lọc vô trùng (màng lọc Millipore Sterivex GS; 0,22 µm; 1atm) và cho trực tiếp vào các bình tam giác chứa 25ml môi trường MSS lỏng (đã khử trùng ở 121°C 20 phút) với các nồng độ 0; 0,05; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0% (trọng lượng/thể tích môi trường lỏng). Mỗi bình xử lý chứa 30 chồi, nuôi trên máy lắc, tốc độ lắc 100 vòng/phút, thời gian xử lý 0,5; 2; 4 giờ. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau khi xử lý, mẫu được rửa sạch bằng môi trường MSS lỏng và được cấy chuyển sang môi trường MSS đặc và nuôi trong điều kiện bình thường. Sau 12 tuần nuôi trong môi trường MSS (tương ứng 3 lần cấy chuyển) tiến hành kiểm tra sự thay đổi về hình thái và tế bào học các chồi đã xử lý.

**Phương thức 2: Xử lý đặc tính:** Colchicine đã khử trùng bằng màng lọc được bổ sung vào 50 ml môi trường MSS đặc (đã khử trùng ở 121°C 20 phút). Nồng độ Colchicine thay đổi từ 0; 0,05; 0,25; 0,5% (trọng lượng/thể tích môi trường). Các chồi chuối được cấy trực tiếp sang môi trường có chứa colchicine ở các nồng độ khác nhau, mật độ cấy 10 chồi/bình và nuôi cây trong thời gian 7 và 14 ngày.

BẢNG 1. Tỷ lệ cây có biến đổi hình thái sau khi xử lý colchicine chồi chuối nhị bội in vitro.

Thời gian (giờ)	0,5				2				4			
	Tỷ lệ chồi chết (%)		Tỷ lệ chồi biến đổi hình thái (%)		Tỷ lệ chồi chết (%)		Tỷ lệ chồi biến đổi hình thái (%)		Tỷ lệ chồi chết (%)		Tỷ lệ chồi biến đổi hình thái (%)	
	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,05	0,0	0,0	0,0	0,0	6,5	4,5	0,0	0,0	10,0	12,5	0,0	0,0
0,25	13,4	19,7	6,6	5,5	33,3	27,3	10,0	6,6	56,7	61,3	8,5	7,5
0,5	23,3	45,3	13,4	12,7	33,3	52,5	16,7	14,5	76,7	85,5	10,0	10,5
0,75	33,4	52,4	6,6	3,7	83,3	79,6	3,4	5,8	80,0	80,0	6,7	5,4
1,00	53,3	62,5	3,4	2,0	86,7	87,0	3,3	6,2	86,6	82,6	3,4	4,8

Ghi chú: MTQ: Mãn Tam Quan. TTB: Tiêu Thủy Bằng.

BẢNG 2. Tỷ lệ tạo cây tứ bội sau khi xử lý colchicine chồi chuỗi nhị bội giống Mãn Tam Quan (MTQ) và Tiêu Thủy Bằng (TTB) (%).

Thời gian (giờ)	0,5				2,0				4,0			
	Tỷ lệ cây tứ bội		Tỷ lệ cây khác dạng		Tỷ lệ cây tứ bội		Tỷ lệ cây khác dạng		Tỷ lệ cây tứ bội		Tỷ lệ cây khác dạng	
	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB	MTQ	TTB
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	6,6	2,2	0,0	3,3	6,6	3,0	3,4	3,6	3,0	3,0	5,5	4,5
0,50	3,4	2,7	10,0	10,0	13,3	9,0	3,4	5,5	6,6	3,4	3,4	7,1
0,75	3,3	0,0	3,3	3,7	3,4	2,2	0,0	3,6	3,3	2,2	3,4	3,2
1,00	0,0	0,0	3,4	2,0	0,0	0,0	3,3	6,2	0,0	0,0	3,4	4,8

Sau xử lý, mẫu được cấy chuyển sang môi trường MSS đặc và tiếp tục nuôi bình thường. Sau 12 tuần (tương ứng 3 lần cấy chuyển) kiểm tra sự thay đổi về hình thái và tế bào học để xác định mức bội thể của mẫu đã xử lý. Mỗi công thức thí nghiệm được làm với 30 chồi, thí nghiệm được nhắc lại 3 lần. Môi trường MSS lỏng = MS + 2mg/l thiamin + 30g/l sucrose + 2 mg/l BAP; pH = 6,0. Môi trường MSS đặc = MSS lỏng + 6g/l agar; pH = 6,0. Điều kiện nuôi cấy như sau: Cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 8h/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 26°C ± 1.

**Xác định tỷ lệ cây tứ bội:** Theo các chỉ tiêu hình thái: Sau 3 lần cấy chuyển, các chồi có thay đổi hình thái đã được cấy chuyển sang môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng. Mỗi bình nuôi chứa 10 chồi, chồi được lấy ra hàng tuần, bắt đầu từ tuần thứ hai đến tuần thứ tám để xác định các chỉ tiêu sẽ được phản ánh ở phần kết quả nghiên cứu.

**Xác định cây tứ bội theo số lượng nhiễm sắc thể và mức bội thể:** Gồm các bước: **Lấy chóp rễ:** Chồi chuỗi đã xử lý colchicine được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ (môi trường MS), sau 3 - 5 ngày xuất hiện các rễ trắng, dài khoảng 1 - 1,5cm. Chóp rễ có kích thước từ 2 - 3mm được cắt ra từ những rễ này vào 8 - 10 giờ sáng. Cho 3 - 4 chóp rễ vào lọ nhỏ chứa dung dịch cố định, giữ ở 4°C. **Cố định mẫu:** Mẫu chóp rễ được ngâm trong các dung dịch cố định Farmer (a xit acetic: etanol = 1:2) và dung dịch Carnoy (chlorofooc: a xit acetic: etanol = 1:1:2), thời gian 24 giờ hoặc ít nhất 72 giờ ở nhiệt độ 4°C. **Làm mềm mẫu:** Mẫu chóp rễ sau khi cố định được rửa lại bằng nước cất và làm mềm bằng các dung dịch HCl 1N, 5N, thời gian 5, 20 và 25 phút. **Nhuộm mẫu:** Chóp rễ sau khi làm mềm được nhuộm bằng các thuốc nhuộm khác nhau, thời gian nhuộm 1,5; 3 và 24 giờ.

Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 400x, 1000x để đếm số lượng nhiễm sắc thể. Mỗi công thức được lặp lại với 4 lọ mẫu thí nghiệm. Chóp rễ được kiểm tra nhiễm sắc thể trong vòng 6 - 10 tuần sau khi thu mẫu.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

a) **Biến đổi của chuỗi qua các phương thức xử lý:** Xử lý theo phương thức 1: Bảng 1 phản ánh nội dung này. Qua bảng 1 cho thấy, đối với cả 2 giống chuỗi khi xử lý colchicine ở nồng độ 0,05%, dù xử lý ở 0,2 hay 4h đều có ảnh hưởng không đáng kể đến khả năng sống sót cũng như sự đa bội hóa các chồi. Ở giống chuỗi Mãn Tam Quan hầu hết các chồi (90 - 100%) sau xử lý không bị ảnh hưởng, tỷ lệ chồi chết

rất thấp 6,5 - 10% ở thời gian xử lý 2 - 4 giờ. Ở giống chuỗi Tiêu Thủy Bằng cũng tương tự, tỷ lệ chồi không bị ảnh hưởng là 95,5% - 87,5% và tỷ lệ chồi chết là 4,5 - 12,5% với thời gian 2 - 4 giờ tương ứng. Khi nồng độ colchicine tăng thì tỷ lệ cây biến đổi sẽ tăng và rõ rệt nhất là từ nồng độ 0,25% trở lên. Nhiều chồi đã bị chết ngay sau khi xử lý. Thời gian xử lý 2, 4 giờ có tỷ lệ cây biến đổi hình thái và tỷ lệ cây chết cao hơn nhiều so với xử lý 0,5 giờ ở cả hai giống chuỗi.

Đối với giống Mãn Tam Quan, tỷ lệ cây có biến đổi hình thái là 10,0% và 8,5% ở thời gian xử lý 2 và 4 giờ. Tỷ lệ này thấp hơn ở giống Tiêu Thủy Bằng (6,6% và 7,5%).

Xử lý colchicine nồng độ 0,5% có hiệu quả hơn cả, số cây có biến đổi hình thái cao hơn hẳn so với các nồng độ xử lý khác. Đối với giống Mãn Tam Quan, tỷ lệ cây có biến đổi hình thái tăng từ 10,0% lên 16,7% và đạt giá trị cao nhất 16,7% ở thời gian xử lý 2 giờ. Tương tự, số cây có biến đổi hình thái thu được đạt giá trị 14,5% ở giống Tiêu Thủy Bằng. Số cây có biến đổi hình thái giảm và tỷ lệ chết tăng dần khi tăng nồng độ colchicine từ 0,75% - 1,00%.

**Xử lý theo phương thức 2:** Ở phương pháp này đạt hiệu quả kém hơn hẳn so với phương thức 1. Các chồi không có hiện tượng chết ngay sau khi xử lý như ở phương thức 1 nhưng tỷ lệ chết đã tăng dần sau mỗi lần cấy chuyển sang môi trường không có colchicine. Tỷ lệ chồi chết và số chồi không bị ảnh hưởng lớn hơn nhiều so với xử lý theo phương thức 1 ở tất cả các nồng độ và thời gian xử lý. Ngay ở nồng độ 0,01% tỷ lệ chết là 70% và 74,3% với thời gian xử lý 7, 14 ngày tương ứng. Tỷ lệ chồi chết lớn nhất là 91,9% - 93,3% khi xử lý nồng độ colchicine 0,05%, thời gian 7 và 14 ngày. Khi xử lý colchicine ở các nồng độ lớn hơn 0,03% thì số chồi chết quá lớn và hầu như không thu được cây nào có biến đổi hình thái so với đối chứng.

b) **Nghiên cứu các đặc điểm hình thái ổn định của chồi chuỗi sau xử lý colchicine:** Chồi đơn sau xử lý được cấy chuyển 3 lần sang môi trường mới MSS không có colchicine, mỗi lần cấy chuyển cách nhau 4 tuần. Sau 3 lần cấy chuyển các chồi mới xuất hiện từ một chồi ban đầu được coi là một dòng. Các chồi từ các dòng khác nhau có sự biến đổi khác nhau và một số dòng khác hẳn đối chứng (thuộc nhóm 1). Các dòng có đường kính thân lớn hơn trước đều được đánh giá là các dòng có kiểu hình tứ bội. Vào cuối chu kỳ nuôi cấy, ở tuần thứ 8 có thể dễ dàng phân biệt các cây chuỗi có mức bội thể cao hơn sau khi xử lý colchicine. Các cây có kiểu hình tứ bội

giống Mãn Tam Quan có lá rộng hơn, xanh sẫm hơn và thân dày hơn: Ở tuần 2, chồi hình tứ bội là  $2,20 \pm 0,13\text{mm}$ , nhị bội (2n) là  $1,35 \pm 0,14\text{mm}$ ; tuần thứ 5 chồi tứ bội là  $3,00 \pm 0,15\text{mm}$ , nhị bội  $1,97 \pm 0,11\text{mm}$ ; Và tuần thứ 8 tứ bội là  $3,77 \pm 0,17$ , nhị bội là  $2,69 \pm 0,12\text{mm}$ . Nhìn chung những cây tứ bội khỏe hơn cây nhị bội. Không có sự khác nhau về chiều cao cây và chiều dài cuống lá giữa các cây nhị bội và cây tứ bội song về chiều rộng lá và chỉ số lá giữa cây nhị bội và tứ bội có sự khác nhau rõ rệt. Chiều rộng lá thứ 1 cây tứ bội là  $9,22 \pm 0,54\text{mm}$ , chỉ số lá là  $2,27$ , còn ở cây nhị bội rộng lá là  $6,36 \pm 0,61$ , chỉ số lá là  $3,69$ . Ở lá thứ 3, sau 5 tuần nuôi cây tứ bội rộng lá  $16,94 \pm 0,92\text{mm}$ , chỉ số lá là  $1,65$ , còn ở nhị bội là rộng  $10,17 \pm 0,75\text{mm}$ , chỉ số lá là  $3,18$ . Ở lá thứ 5, rộng lá của cây tứ bội là  $24,19 \pm 0,83\text{mm}$ , chỉ số lá  $1,82$ ; còn ở nhị bội lá rộng  $15,68\text{mm}$  chỉ số lá là  $2,95$ .

c) *Đặc điểm tế bào học của cây chuối in vitro sau xử lý colchicine: Kích thước và mật độ tế bào khí khổng:* Kích thước tế bào khí khổng được đo cả ở mặt trên và mặt dưới của mỗi lá và giữa các lá. Kết quả đo cho thấy, ở nhị bội mặt trên lá tế bào khí khổng là  $15,52 \pm 0,43\mu\text{m}$ , mặt dưới  $18,45 \pm 0,42\mu\text{m}$ ; Loại tam bội (3n), mặt trên lá  $17,42 \pm 0,54\mu\text{m}$ , mặt dưới  $20,59 \pm 0,62\mu\text{m}$ ; Loại tứ bội (4n) mặt trên lá  $26,06 \pm 0,45$  và mặt dưới là  $31,99 \pm 0,08\mu\text{m}$ .

Như vậy, giữa cây nhị bội và tứ bội có sự khác nhau một cách đáng kể về độ dài khí khổng. Mặt trên các cây tứ bội có khí khổng lớn hơn, chiều dài trung bình là  $26,06\mu\text{m}$ , trong khi đó ở cây nhị bội là  $15,52\mu\text{m}$ ; mặt dưới tứ bội là  $31,99$  còn nhị bội là  $18,45\mu\text{m}$ .

*Mật độ:* Mật độ khí khổng cũng là một chỉ tiêu để nhận biết các mức bội thể khác nhau ở cây chuối. Ở ba bề mặt dưới của lá, số lượng khí khổng của cây nhị bội lớn hơn nhiều so với ở cây có kiểu hình tứ bội. Mật độ khí khổng/ $\text{mm}^2$  diện tích lá, ở bề mặt dưới của lá cây có kiểu hình tứ bội là  $63,48$  khí khổng, trong khi đó ở cây nhị bội là  $103,48$  khí khổng. Sự khác nhau về mật độ khí khổng ở bề mặt trên của lá giữa cây nhị bội ( $17,16$  khí khổng) và cây tứ bội ( $10,28$  khí khổng) là đáng kể. Số lượng khí khổng ở bề mặt dưới của lá nhiều hơn đáng kể

so với bề mặt trên ở tất cả các mức bội thể đã nghiên cứu.

d) *Số lượng nhiễm sắc thể và mức bội thể cây chuối in vitro: Xử lý theo phương thức 1:* Bảng 2 phản ánh nội dung này.

Tỷ lệ cây tứ bội tạo thành so với tổng số cây xử lý đạt  $13,3\%$  ở giống Mãn Tam Quan và đạt  $9,0\%$  ở giống Tiêu Thủy Bằng khi xử lý colchicine nồng độ  $0,5\%$ , thời gian 2 giờ. Với các nồng độ và thời gian xử lý khác, tỷ lệ cây tứ bội tạo thành rất thấp, đạt  $6,6\%$  ở nồng độ colchicine  $0,25\%$ , thời gian 0,5 hoặc 4 giờ đối với giống Mãn Tam Quan và giá trị này còn thấp hơn nhiều ở giống Tiêu Thủy Bằng (chỉ đạt  $3,0\%$ ).

Tỷ lệ cây tứ bội thấp ở giống chuối Tiêu Thủy Bằng so với giống Mãn Tam Quan có thể là do khả năng sinh trưởng và sinh sản của chồi ở giống Mãn Tam Quan in vitro cao hơn so với Tiêu Thủy Bằng.

*Xử lý theo phương thức 2:* Ở phương thức này, sau khi xử lý colchicine chồi chuối nhị bội giống Mãn Tam Quan được nuôi cây trong môi trường đặc, số cây dạng tứ bội thu được rất ít, hầu như không đáng kể so với xử lý theo phương thức 1. Tỷ lệ cây tứ bội đạt được cao nhất là  $3,3\%$  khi xử lý colchicine nồng độ  $0,03\%$ , thời gian 7 hoặc 14 ngày.

Từ các kết quả đã thụ được, chúng tôi thấy rằng xử lý colchicine chồi chuối in vitro trong môi trường đặc và thời gian xử lý kéo dài là hoàn toàn không phù hợp.

### III. KẾT LUẬN

(+) Có thể phân biệt được mức độ bội thể của các cây chuối sau khi xử lý colchicine qua các chỉ số sau (trong trường hợp Mãn Tam Quan và Tiêu Thủy Bằng): Đường kính thân 2n là  $2,69\text{mm}$ , 4n là  $3,77\text{mm}$ ; chiều rộng lá 2n là  $15,68\text{mm}$ , 4n là  $24,19\text{mm}$ ; chỉ số lá (dài/rộng) 2n là  $2,95$ , 4n là  $1,82$ ; kích thước khí khổng ( $\mu\text{m}$ ) 2n là  $18,45\mu\text{m}$ , 4n là  $31,99\mu\text{m}$ ; mật độ khí khổng/ $\text{mm}^2$  lá 2n là  $103,08$ , 4n là  $63,48$ ; và số lượng nhiễm sắc thể 2n là 22 và 4n là 44. (+) Phương thức xử lý tốt hơn cả là xử lý chồi bằng dung dịch colchicine lỏng nồng độ  $0,5\%$  và nuôi cây lác (100 vòng/phút), thời gian 2 hoặc 4 giờ.

### STUDY ON INDUCTION OF TETRAPLOID BANANA LINES BY COLCHICINE TREATMENT OF IN VITRO SHOOT CULTURES (Summary)

Two diploid accessions of banana Man Tam Quan (AB) and Tiêu Thủy Bằng (AA) with outstanding quality and resistant to banana diseases like Fusarium Wilt, Bunchy top, Sigatoka were treated in vitro with colchicine in order to obtain tetraploid forms for breeding purposes. Results showed that the best outcome of tetraploids banana was obtained in the treatment when colchicine in concentration  $0.5\%$  was applied to 2 - 4 week old in vitro shoots in liquid medium on shaker within 2 - 4 hours. Tetraploid forms can be differentiated by both morphological and cytological traits, like the diameter of stem, size of leaves, density and size of stoma and number of chromosomes.

SỬ  
LẠI

Đông 31, bảng 1, trang 417 Tạp chí Nông nghiệp & Công nghiệp thực phẩm số 9-2000 xin đọc lại là: Mẫu phân lập: K98-30, Vật chủ: Chuối cơm lá, hệ gen: AAB, không phải là chuối tây (CT) và ABB.  
Thành thật xin lỗi tác giả và bạn đọc.

## NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH MỘT SỐ GIỐNG MÍA MỚI BẰNG NUÔI CẤY MÔ CALLUS LÁ NON

HÀ THỊ THÚY, LÊ HUY HÀM, ĐỖ NĂNG VỊNH

Nhân nhanh giống mía có thể thực hiện bằng 2 phương thức cây mô: Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và tái sinh phôi vô tính từ bề bảo phiến lá non. Trong quá trình nghiên cứu nhân nhanh một số giống mía mới từ nuôi cấy chồi chúng tôi thấy ở một số giống

hện tượng hóa đen do phenol và các sản phẩm thứ cấp do mầu tiết ra làm chết đỉnh sinh trưởng và chồi nách. Đặc biệt đối với giống ROC22 và Quê đường 15 hiện tượng hóa đen gây chết mầu chiếm  $90\%$ . Để khắc phục hiện tượng chết mầu trên,