

NUÔI CÂY LÁT CẮT BẦU NHỤY NHẪM CỨU PHÔI LAI XA GIỮA HAI LOÀI *Lilium longiflorum* VÀ *L. brownii* var. *colchesteri*

Nguyễn Thị Lâm Hải^{1*}, Hiroshi Okubo²

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

² Laboratory of Horticultural Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Email*: lamhai1979@yahoo.com

Ngày gửi bài: 26.06.2013

Ngày chấp nhận: 24.09.2013

TÓM TẮT

Lilium brownii var. *colchesteri* (BRO) mang một tính trạng đặc trưng cho riêng loài: hoa chuyển màu từ vàng sang trắng chỉ sau một ngày nở. Để sử dụng tính trạng này trong tạo giống lily, phép lai giữa *L. longiflorum* và BRO đã được tiến hành, kết quả là các quả lai chỉ tạo hạt lép. Để khắc phục sự bất thụ này, các lát cắt bầu nhụy tại thời điểm từ 7 đến 28 ngày sau thụ phấn đã được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 40g·L⁻¹ sucrose, 40g·L⁻¹ D-mannitol và 2.5g·L⁻¹ gellan gum trong điều kiện chiếu sáng liên tục. Cây lai nảy mầm từ nuôi cấy in vitro được xác nhận bằng phương pháp phân tích isozyme. Chỉ có tổ hợp lai duy nhất giữa *L. longiflorum* 'LPI' × BRO thành công trong việc tạo ra cây lai F1. Sau khi ra ngôi và trồng trong nhà lưới, 11 cây F1 đã ra hoa và đổi màu từ vàng sang trắng giống tính trạng của cây bố *L. brownii* var. *colchesteri*.

Từ khóa: Lai xa, *L. brownii* var. *colchesteri*, *L. longiflorum*.

Ovary Slice Culture Technique for Embryo Rescue of Interspecific Crosses between *Lilium longiflorum* and *L. brownii* var. *colchesteri*

ABSTRACT

Lilium brownii var. *colchesteri* (BRO) has an unique characteristic, i.e., the flower color changes from yellowish-cream to white during anthesis. For introducing this trait to cut flower production in *Lilium*, interspecific crosses of *L. longiflorum* (as seed parents) and BRO (as a pollen parent) were carried out. Capsules with unviable seeds were found in all crosses. To overcome the incongruity barrier, ovary slices excised from developing ovaries at 7 to 28 days after pollination (DAP) were cultured in a Murashige and Skoog medium supplemented with 40g·L⁻¹ sucrose, 40g·L⁻¹ D-mannitol and 2.5g·L⁻¹ gellan gum under 24h illumination. The hybridity of germinated bulblets were confirmed before acclimatization by isozyme analysis. Hybrid plantlets were obtained from the crosses of *L. longiflorum* 'LPI' × BRO. After acclimatization and cultivation, 11 hybrid plants produced flowers changing from yellowish cream to white during anthesis as does the pollen parent.

Keywords: Interspecific cross, *L. brownii* var. *colchesteri*, *L. longiflorum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lilium brownii var. *colchesteri* (BRO) là loài lily đặc hữu của Trung Quốc và phân bố ở độ cao 1500m so với mặt nước biển (McRae, 1998). Hoa của loài này có mùi thơm quyến rũ, có cấu tạo hài hòa dạng loa kèn với bao phấn màu nâu, đặc biệt BRO có một tính trạng không thể tìm thấy ở loài lily khác đó là hoa của chúng chuyển màu từ vàng sang trắng khoảng một ngày

sau khi nở (Okubo, 2006). Củ hoa BRO được sử dụng chủ yếu trong các vị thuốc đông y, chúng được nhân giống bằng phương pháp tách củ và là loài rất mẫn cảm với virus. Do đó BRO chỉ được trồng và khai thác một cách tự nhiên ở Trung Quốc, Hàn Quốc và một số nơi trên quần đảo Nhật Bản.

Lilium longiflorum là loài lily có nguồn gốc từ quần đảo Ruykyu, Nhật Bản. Do là loài có phổ

thích nghi cao nên đã được trồng phổ biến khắp nơi trên thế giới, tại Việt Nam *L. longiflorum* cùng với *L. formosanum* và *L. formolongi* được trồng phổ biến với tên gọi chung là Loa kèn trắng. Hoa của *L. longiflorum* có mùi thơm đậm, hoa hình chuông màu trắng với bao phấn màu vàng. *L. longiflorum* được sử dụng nhiều trong lai tạo giống lily mới trên thế giới do khả năng thích nghi cao, kháng bệnh và sạch virus.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu sự di truyền tính trạng đổi màu hoa của BRO trong phép lai xa giữa BRO và các quần thể *L. longiflorum* thu thập từ quần đảo Ryukyu, Nhật Bản nhằm tạo ra giống lily lai có hoa đổi màu và thích nghi với điều kiện trồng ở nhiều khu vực trên thế giới.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

L. brownii var. *colchesteri* thu thập từ Hàn Quốc và được trồng tại vườn thí nghiệm trường Đại học Kyushu, Nhật Bản. Bao phấn được thu hái 1-2 ngày trước khi hoa nở và giữ trong điều kiện 25°C trong 5 ngày. Hạt phấn được bảo quản ở -20°C cho đến lúc sử dụng. 09 quần thể *L. Longiflorum* thu thập từ quần đảo Ryukyu, Nhật Bản (Bảng 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thụ phấn: hoa của *L. longiflorum* được khử đực 2 ngày trước khi nở, đầu nhụy được bọc cách ly bằng giấy nhôm để tránh sự lẫn tạp. Sự thụ phấn được tiến hành giữa hạt phấn của BRO với hoa của *L. longiflorum* 2-3 ngày sau khi hoa nở.

Nuôi cấy lát cắt bầu nhụy: Bầu nhụy tại thời điểm 7 – 21 ngày sau thụ phấn được thu hái và rửa sạch bằng cồn 70% trong 1 phút. Bầu nhụy được khử trùng bằng NaClO 2% trong 15 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần trước khi được cắt thành lát mỏng 2-3mm (chứa khoảng 30 phôi). Những lát cắt này được đem cấy vào môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung 40g/l sucrose, 40g/l D-mannitol, 2,5 g/l gellan gum, pH = 5.8.

Điều kiện nuôi cấy: Các lát cắt bầu nhụy được nuôi ở nhiệt độ 25°C trong điều kiện tối

kéo dài trong 4 tuần, sau đó được nuôi ở nhiệt độ tương tự và điều kiện chiếu sáng liên tục. Sự nảy mầm của phôi được theo dõi đến tận tháng thứ 4 tính từ khi nuôi cấy.

Bốn tuần sau khi nảy mầm, các phôi được cấy chuyển sang môi trường 1/2MS có bổ sung 20g/l sucrose để tiếp tục nuôi cấy. Những cây có khối lượng từ 3,5g trở lên được trồng chuyển sang nhà lưới nơi có nhiệt độ dao động thấp nhất 5°C vào mùa đông cho đến cao nhất 43°C vào mùa hè. Phân bón dạng lỏng (Hyponex, Hyponex Japan Co. Ltd., Osaka, Japan) và thuốc trừ sâu, bệnh được phun với tần suất hai tháng một lần.

Kiểm tra con lai: Những cây con được kiểm định bằng phương pháp isozyme, các isozyme bao gồm diaphorase (DIA), aspartate aminotransferase (AAT), glucosephosphate isomerase (GPI) được phân tích theo phương pháp của Hiramatsu et al. (2001). Khoảng 200mg mô lá non được nghiền nhỏ trong 200µl dịch chiết Tris-HCl, dịch nghiền được chuyển vào giấy lọc kích thước 12 × 3,5mm và điện di trên bản gel tinh bột (Nacalai Tesque Inc. Japan) tại 75V trong 6 giờ. Các isozyme được nhuộm màu đặc trưng và phân tích.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả lai hữu tính giữa *L. brownii* var. *colchester* với các dòng thuộc *L. longiflorum*

Kết quả lai hữu tính được tổng kết qua bảng 1. Trong tổng số 9 tổ hợp lai với 239 phép lai được thực hiện, chỉ có duy nhất phép lai giữa LPI × BRO hình thành quả, tuy nhiên các quả đó đều không chứa phôi hoàn chỉnh (phôi được coi là hoàn chỉnh khi có chiều dài bằng một nửa chiều dài hạt trở lên). Tất cả các quả lai tạo ra từ các tổ hợp lai của các dòng *L. longiflorum* khác cũng đều bị teo và khô đi khoảng 4 tuần sau khi thụ phấn. Việc hình thành một số quả lai của tổ hợp LPI × BRO chứng tỏ có một cơ chế ức chế sự hình thành hạt lai sau khi thụ phấn đã xảy ra khiến cho các hạt lai được hình thành sau thụ phấn không thể phát triển thành hạt lai hoàn chỉnh.

Bảng 1. Kết quả lai giữa *L. brownii* var. *colchesteri* (cây bố) với các dòng thuộc *L. longiflorum*

Cây mẹ	Số phép lai	Số quả		
		Chết	Không có phôi	Có phôi
FFU (Fulung, Taiwan)	18	18	0	0
LIS (Ishigaki island, Ryukyu)	26	26	0	0
LKI (Kikai island, Ryukyu)	54	54	0	0
LKU (Kume island, Ryukyu)	20	20	0	0
LMI (Miyako island, Ryukyu)	17	17	0	0
LOE (Okinoerabu island, Ryukyu)	32	32	0	0
LPI (Pitouchiao, Taiwan)	31	16	15	0
LYO (Yonaguni island, Ryukyu)	23	23	0	0
LYR (Yoron island, Ryukyu)	18	18	0	0

Hạt lai không phát triển thành thực dẫn đến quả lai bị lép hoặc bị chết trong các phép lai xa trong chi *Lilium* là hiện tượng thường gặp và là rào cản chính trong việc lai tạo giống hữu tính của chi này. Phôi bị biến dạng và sự tiêu giảm của nội nhũ là hai nguyên nhân chính dẫn đến sự thất bại khi lai xa trong chi *Lilium* (Van Tuyl et al., 1997). Nghiên cứu ở mức độ tế bào của các hạt lai qua các giai đoạn khác nhau sau khi thụ phấn đã chỉ ra rằng sự đứt gãy của nhiễm sắc thể là nguyên nhân chính gây nên các hiện tượng bất thụ trên (Dowrick and Brandram, 1970).

3.2. Kết quả cứu phôi lai xa

Để khắc phục hiện tượng phôi bị chết trong các phép lai xa khác loài, phương pháp cứu phôi lai xa, cụ thể là phương pháp nuôi cấy lát cắt

bầu nhụy sau khi thụ phấn thường được áp dụng để tạo cây lai *in vitro* trong chi *Lilium*. Kết quả nuôi cấy phôi tách từ cây mẹ sau thụ phấn từ 7 đến 21 ngày được thể hiện trong bảng 2. Kết quả nảy mầm của phôi *in vitro* thể hiện rõ sự ảnh hưởng của dòng cây mẹ lên khả năng nảy mầm của phôi lai. Trong số các tổ hợp phôi được nuôi cấy, chỉ có duy nhất 29 phôi thuộc phép lai giữa LPI x BRO nảy mầm thành cây với tỉ lệ nảy mầm tương đối thấp 1,61%. Khoảng 2 tháng sau khi nuôi cấy, phôi tách từ các tổ hợp lai còn lại đều bị hóa nâu và chết.

Hình 1 minh họa quá trình nuôi cấy và phát triển của phôi lai cho đến cây trưởng thành. Với những phôi nảy mầm thành cây sẽ được cấy chuyển sang môi trường nuôi để tăng kích thước củ. Khi củ *in vitro* có 3 lá thật trở lên thì các lá này được thu cắt và chiết tách isozyme

Bảng 2. Phôi nảy mầm trong phương pháp nuôi cấy lát cắt bầu nhụy để cứu phôi trong phép lai giữa *L. brownii* var. *colchesteri* và các dòng mẹ thuộc loài *L. longiflorum*

Cây mẹ	Ngày sau thụ phấn	Số lát cắt	Số phôi	
			Nuôi cấy ^y	Nảy mầm
FFU (Fulung, Taiwan)	14	28	840	0
LIS (Ishigaki island, Ryukyu)	20	30	900	0
LKI (Kikai island, Ryukyu)	14	77	2310	0
LKU (Kume island, Ryukyu)	7	40	1200	0
LMI (Miyako island, Ryukyu)	14	55	1650	0
LOE (Okinoerabu island, Ryukyu)	21	50	1500	0
LPI (Pitouchiao, Taiwan)	14	60	1800	29
LYO (Yonaguni island, Ryukyu)	14	56	1680	0
LYR (Yoron island, Ryukyu)	14	28	840	0

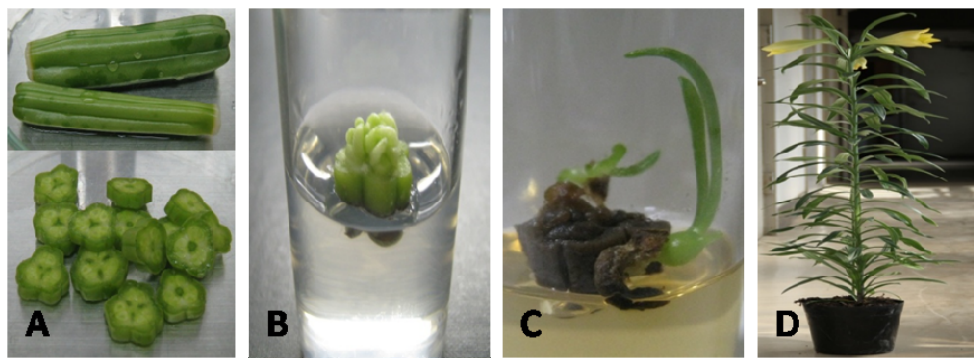
Ghi chú: ^y Số lát cắt $\times$ 30 (Hayashi, 1986)

Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lát cắt bầu nhụy nhằm cứu phôi lai xa giữa hai loài *Lilium longiflorum* và *L. brownii* var. *colchesteri*

nhằm xác định chính xác cây lai giữa BRO và *L. longiflorum*. Các củ đạt khối lượng chuẩn (nặng trên 3,5g) được đưa ra ngôi và trồng trong nhà lưới.

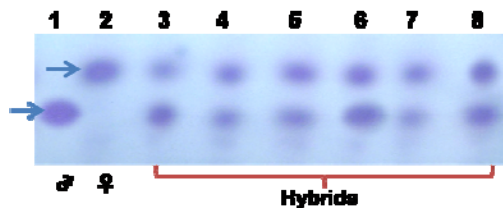
Trong số 3 isozyme được phân tích, chỉ có diaphorase (DIA) cho kết quả rõ về các con lai. Hình ảnh các băng isozyme được nhuộm màu thể hiện sự sai khác và đặc trưng isozyme cho cây bố và cây mẹ (Hình 2), trong khi đó cây lai có biểu hiện của cả hai băng điện di đặc trưng cho cây bố và cây mẹ. Hoa của cây lai có kiểu hình phối trộn của cả hai cây bố mẹ. Cây lai có hoa hình phễu, mở hoa hướng xuống và có mùi

thơm đặc trưng. Ngoài ra cây lai có hai đặc điểm dễ nhận biết của cây bố: bao phấn có màu nâu (trong khi bao phấn của hoa mẹ có màu vàng) và hoa của cây lai cũng đổi màu từ vàng sang trắng sau một ngày tính từ lúc nở hoa (Hình 3). Thời điểm lấy phôi (tính theo số ngày sau khi thụ phấn) cũng ảnh hưởng rất lớn đến sự thành công hay thất bại của kết quả cứu phôi lai xa (Hayashi et al., 1986). Các nghiên cứu của các tác giả Van Tuyl et al. (1991), Hayashi et al. (1986) và Kanoh et al. (1988) đều khẳng định



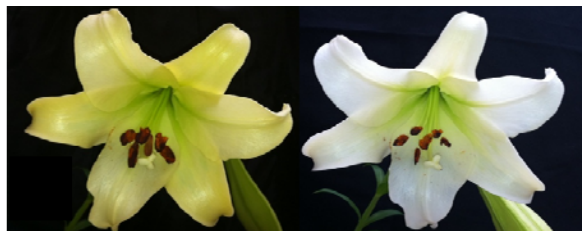
Hình 1. Nuôi cấy phôi lai tạo cây hoàn chỉnh trong phép lai giữa LPI × BRO

Ghi chú: a: bầu nhụy sau 3 tuần thụ phấn được khử trùng và cắt thành các lát mỏng 3 mm; b: các phôi non trên lát cắt mỏng phình to sau 5 tuần nuôi cấy; c: phôi nảy mầm sau 12 tuần nuôi cấy; d: cây lai nở hoa sau 2 năm trồng.



Hình 2. Kết quả phân tích Diaphorase (DIA) của cây bố mẹ và cây lai

Ghi chú: Cột 1: *L. brownii* var. *colchesteri* (BRO); Cột 2, *L. longiflorum* LPI. Cột 3 ~ 8, Cây lai giữa LPI × BRO. Mũi tên chỉ các vệt nhuộm isozyme đặc trưng cho cây bố, mẹ.



Hình 3. Hoa lai giữa LPI × BRO đổi màu từ vàng sang trắng một ngày sau khi nở

rằng thời điểm 7 ngày, 20 ngày và 40 ngày sau thụ phấn là thích hợp nhất khi nuôi cấy lát cắt bầu nhụy của các tổ hợp lai trong chi *Lilium*. Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi, do hạn chế về số lượng tổ hợp lai thu được, nên mỗi tổ hợp lai chỉ được thực hiện một lần lấy mẫu vào cùng thời điểm để đem nuôi cấy, do đó chưa thể khẳng định được thời điểm lấy mẫu cứu phôi lai trong nghiên cứu này là tối ưu nhất cho các tổ hợp lai trên. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của thời điểm cứu phôi lai đến sự nảy mầm của phôi cần được tiếp tục tiến hành trong các thí nghiệm sau.

Như vậy, việc lai xa giữa LPI × BRO bằng kỹ thuật lai tạo truyền thống nhằm thu hạt lai ngoài đồng ruộng đã không thành công do các rào cản xảy ra sau khi thụ phấn khiến cho hạt lai bị lép và chết trước khi thành thực. Tuy nhiên, việc áp dụng phương pháp nuôi cấy lát cắt bầu nhụy sau thụ phấn để cứu các phôi lai xa, cây lai giữa *L. brownii* var. *colchesteri* và *L. longiflorum* đã được lai tạo thành công tạo ra thế hệ F₁ có các đặc điểm quý hiếm của cây cho phấn (hoa đổi màu). Phương pháp cứu phôi lai xa này cũng được áp dụng ở nhiều nghiên cứu khác trong chi *Lilium* và đều cho kết quả tương tự với nhiều tổ hợp hoa mới được lai tạo thành công (Hayashi et al., 1986; Kanoh et al., 1988; Van Tuyl et al., 1991; Fernandez et al., 1996).

Tính trạng hoa đổi màu được tìm thấy duy nhất trong loài *L. brownii* var. *colchesteri*, nghiên cứu sâu về sắc tố trên cánh hoa của Hải (2012) chỉ ra rằng việc giảm hàm lượng carotenoids trong cánh hoa là nguyên nhân chính gây ra sự đổi màu từ vàng sang trắng của loài hoa này và hàm lượng của carotenoids trong cánh hoa tỉ lệ nghịch với sự biểu hiện của gen *LbCCD4* (*Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4*) với chức năng phân giải carotenoids trong cánh hoa. Thành công trong việc tạo ra cây lai F₁ với tính trạng đổi màu cho thấy đây là tính trạng trội và có thể di truyền cho các thế hệ cây lai sau. Điều đó cũng mở ra các hướng lai tạo khác giữa *L. brownii* var. *colchesteri* với các loài có hoa màu sắc khác (đỏ, vàng, cam) trong chi *Lilium* để tạo ra cây lai có tính trạng đổi màu hoa rất có ý nghĩa trong tạo giống lily mới.

4. KẾT LUẬN

Dòng lily mới trong phép lai giữa *L. longiflorum* 'LPI' với *L. brownii* var. *colchesteri* đã được lai tạo thành công bằng phương pháp nuôi cấy lát cắt bầu nhụy sau khi thụ phấn. Dòng lily mới có tính trạng đổi màu hoa từ vàng sang trắng, đây là một tính trạng hiếm có trong lily mà chỉ có *L. brownii* var. *colchesteri* mới có. Các con lai của phép lai này có thể phát triển thành giống lily với tính trạng đổi màu hoa rất đặc sắc, là tiền đề để phát triển thành giống lily mới trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hayashi, M., Kanoh K., Serizawa Y. and Yoon E. (1986). Ovary slice culture of *Lilium formosanum* Wallace. Japan. J. Breed. 36: 304-308.
- Hiramatsu, M., Ii, K., Okubo H., Huang K. L. and Huang C. W. (2001). Biogeography and origin of *Lilium longiflorum* and *L. formosanum* (Liliaceae) endemic to the Ryukyu Archipelago and Taiwan as determined by allozyme diversity. Amer. J. Bot. 88: 1230-1239.
- Nguyen Thi Lam Hai, Hiramatsu M, Kim Jong-Hwa, Masuda Ju-ichiro and Okubo H. (2012). Interspecific Hybrids production between *Lilium brownii* var. *colchesteri* and its close relatives by ovary slice culture. J. Japan Soc. Sci. 81 (2): 191-197.
- Kanoh, K., Hayashi M., Serizawa Y. and Konishi T. (1988). Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. × elegance* by ovary slice culture. Japan. J. Breed. 38: 278-282.
- McRae, E. A. (1998). Lilies. A guide for growers and collectors. Timber Press, Portland, Oregon.
- Okubo, H. (2006). History of *Lilium brownii* var. *colchesteri* in Japan. Sci. Bul. Faculty of Agri. Kyushu University. 61: 145-163 (In Japanese with English summary).
- Van Tuyl, J. M., Chi H. S., van Kronenburg B. C. M. and Meijer B. (1997). Interspecific lily hybrids: a promise for the future. Acta Hort. 430: 539-544.
- Van Tuyl, J. M., van Dien M. P., van Creijl M. G. M., van Kleinwee T. C. M., Franken J. and Bino R. J. (1991). Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. Plant Sci. 74: 115-126.