

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
KHOA KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ XÃ HỘI**

VŨ THỊ DUNG

**NGHIÊN CỨU CHỌN DÒNG TẾ BÀO CHỊU
HẠN VÀ MẶN CỦA GIỐNG LÚA VIỆT LAI 20**

**LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC
NGÀNH : SINH HỌC
CHUYÊN NGÀNH: DI TRUYỀN HỌC**

GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN: ThS. NGUYỄN THỊ HẢI YẾN

THÁI NGUYÊN - 2007

Lời cảm ơn

Em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới cô giáo ThS. Nguyễn Thị Hải Yến đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ em hoàn thành khoá luận tốt nghiệp này.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy cô trong Bộ môn Sinh học Khoa Khoa học Tự nhiên và Xã hội đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho em trong suốt quá trình thực hiện khoá luận tốt nghiệp.

Cuối cùng em xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè, tập thể lớp Cử nhân Sinh K1 đã quan tâm, động viên em trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại khoa.

Trong quá trình thực hiện, khoá luận của em có thể còn nhiều sai sót kính mong nhận được sự đóng góp ý kiến từ phía các thầy cô giáo và các bạn.

Sinh viên

Vũ Thị Dung

MỤC LỤC

TÓM TẮT KẾT QUẢ ĐỀ TÀI.....	1
MỞ ĐẦU.....	2
CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Giới thiệu chung về cây lúa.....	4
1.2. Tình hình sử dụng lúa kháng hạn và mặn.....	5
1.2.1. Lúa kháng hạn và mặn trên thế giới.....	5
1.2.2. Lúa kháng hạn và mặn ở Việt Nam.....	6
1.3. Đại cương về tính chịu hạn, mặn của thực vật.....	6
1.3.1. Đại cương về tính chịu hạn của thực vật.....	6
1.3.1.1. Khái niệm về tính chịu hạn.....	6
1.3.1.2. Cơ chế chịu hạn.....	7
1.3.1.3. Thiệt hại do hạn gây ra.....	8
1.3.2. Đại cương về tính chịu mặn của thực vật.....	10
1.3.2.1. Khái niệm về tính chịu mặn.....	10
1.3.2.2. Cơ chế chịu mặn.....	11
1.3.2.3. Ảnh hưởng của mặn.....	12
1.4. Sơ lược nuôi cấy mô tế bào.....	13
1.5. Lược sử nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	14
1.6. Chọn dòng tế bào thực vật.....	16
1.6.1. Cơ sở khoa học.....	16
1.6.2. Nguyên lý chung.....	18
1.6.3. Phương pháp chọn dòng.....	19
1.6.3.1. Chọn trực tiếp.....	19
1.6.3.2. Chọn gián tiếp.....	19
1.6.3.3. Chọn tổng thể.....	19
1.6.3.4. Chọn lọc sau xử lý đột biến.....	20

1.6.4. Thành tựu đạt được trong chọn dòng tế bào thực vật	20
1.6.4.1. Chọn dòng chịu khô hạn	20
1.6.4.2. Chọn dòng chịu mặn	21
1.6.4.3. Các dòng chống chịu khác	21
CHƯƠNG II VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Vật liệu	23
2.2. Phương pháp	23
2.2.1. Tạo mô sẹo từ hạt lúa	24
2.2.2. Chọn dòng chịu mặn thông qua xử lý muối NaCl	24
2.2.3. Chọn dòng chịu hạn thông qua thối khô	24
2.3. Phương pháp tính toán số liệu	24
2.3.1. Xác định tỉ lệ tạo mô sẹo (C_i) :	24
2.3.2. Xác định tỉ lệ tái sinh (R_c)	25
2.4. Phương pháp xử lý số liệu	25
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26
3.1. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình tạo mô sẹo	26
3.1.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy	26
3.1.2. Ảnh hưởng của các kích thích sinh trưởng	29
3.1.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D	29
3.1.2.2. Ảnh hưởng của α NAA	31
3.1.2.3. Ảnh hưởng phối hợp giữa 2,4-D và α NAA	32
3.1. Chọn dòng tế bào	34
3.2.1. Chọn dòng tế bào chịu mặn	34
3.2.2. Chọn dòng chịu hạn	36
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	39

CHỮ VIẾT TẮT

N6	:	Chu et al, 1975
MS	:	Murashise SKoog
2,4-D	:	2,4- Dichlorophenoxy acetic acid
αNAA	:	α - naphthalene acetic acid
BAP	:	6- benzyl amino purin
cs	:	Cộng sự
NST	:	Nhiễm sắc thể
PEG	:	Polyetilenglycol
ABA	:	Acid absxixic

TÓM TẮT KẾT QUẢ ĐỀ TÀI

1. Tên đề tài: “*Nghiên cứu chọn dòng tế bào chịu mặn và hạn của giống lúa Việt Lai 20*”.

2. Kết quả nghiên cứu của đề tài:

+ Các yếu tố ảnh hưởng lên quá trình tạo mô sẹo:

Môi trường nuôi cấy: Môi trường MS là môi trường thích hợp cho tạo mô sẹo từ phôi hạt giống lúa Việt lai 20 hơn so với N6.

Các chất kích thích sinh trưởng: Ảnh hưởng của các phytohormone khác nhau lên quá trình tạo mô sẹo từ phôi hạt cũng khác nhau. Sau 5 ngày môi trường có 2mg/l 2,4-D và 3mg/l α NAA cho tỉ lệ mô sẹo cao nhất tương ứng 60% và 52,5%. Khi phối hợp 2,4-D và α NAA thì tỉ lệ tạo mô sẹo cao hơn khi bổ sung riêng rẽ (đạt 72,5%).

+ Chọn dòng tế bào:

Chọn dòng chịu hạn: Thời gian thối khô tăng thì khả năng tái sinh của mô sẹo giảm. 4 giờ là ngưỡng chọn các dòng cây chịu hạn.

Chọn dòng chịu mặn: Khi nồng độ NaCl tăng thì tỷ lệ tái sinh cây giảm. Nồng độ 1,5% NaCl là ngưỡng là để chọn dòng cây chịu mặn.

MỞ ĐẦU

I. Đặt vấn đề

Lúa là cây lương thực chính cho khoảng 2,7 tỉ người trên thế giới. Lúa được trồng trên khoảng 1/10 diện tích đất nông nghiệp và là nguồn năng lượng thực phẩm lớn nhất cung cấp cho 1/2 dân số thế giới. Trong hơn 130 triệu ha đất trồng lúa thì 39 triệu ha bị nhiễm mặn cao, 26 triệu ha bị hạn gây ảnh hưởng xấu đến sản xuất lương thực. Ở Việt Nam, theo thống kê của Tổ chức Lương thực thế giới (FAO), trong số 6,58 triệu ha đất trồng lúa thì 2 triệu ha bị hạn và 1,3 triệu ha bị mặn gây thiệt hại cho năng suất, giảm từ 1 - 2 tấn/ha [7]. Do đó việc tạo cây lúa có khả năng chịu hạn và mặn chống lại điều kiện ngoại cảnh bất lợi là rất cần thiết.

Sinh học ngày nay đã có nhiều đóng góp có giá trị cho sản xuất nông nghiệp đặc biệt là trên lĩnh vực tạo giống thích nghi sinh thái. Một trong những lĩnh vực của sinh học là về tính chống chịu ở thực vật nhằm làm sáng tỏ tác động cụ thể của các yếu tố bất lợi, đặc biệt là phản ứng liên quan đến khả năng chống chịu. Trên cơ sở đó mà đề ra các biện pháp về giống và phương hướng tạo giống, về kỹ thuật trồng trọt và thâm canh... nhằm hạn chế tối đa các mặt tiêu cực của sinh thái, tăng cường tính thích nghi của giống góp phần làm ổn định và gia tăng năng suất cây trồng.

Trước đây, các nhà chọn giống thường tạo giống lúa chịu hạn, mặn bằng phương pháp truyền thống: chọn lọc và lai tạo nhưng phương pháp này mất rất nhiều thời gian, tốn kém và hiệu quả không cao. Nhưng hiện nay nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào và chọn dòng tế bào các nhà khoa học có thể tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các tác nhân bất lợi lên thực vật ở các mức độ khác nhau như mức mô và cơ quan nuôi cấy phân lập, cây hoàn chỉnh. Nhờ đó có thể nghiên cứu một cách riêng biệt hay tổ hợp theo ý muốn các tác động mà ngoài tự nhiên khó thực hiện. Qua đó cho phép các nhà nghiên cứu tìm

hiểu và xác định bản chất sinh học của tính chống chịu. Hệ thống tế bào và mô nuôi cấy còn cho phép chọn tạo và thử nghiệm hàng loạt không cần trồng trọt trên đồng ruộng kết hợp với xử lý đột biến để tìm ra các dòng tế bào và cây có tính chống chịu thuần khiết.

Xuất phát từ những vấn đề trên mà chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài *“Nghiên cứu chọn dòng tế bào chịu mặn và hạn của giống lúa Việt Lai 20”*.

II. Nội dung nghiên cứu

+ Tìm hiểu ảnh hưởng của một số yếu tố lên giai đoạn tạo mô sẹo của phôi hạt:

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy.
- Ảnh hưởng của phytohormone.

+ Chọn dòng tế bào chịu hạn và mặn từ mô sẹo thu được.

Đề tài được thực hiện tại Phòng thí nghiệm bộ môn Sinh học – Khoa Khoa học Tự nhiên và Xã hội – Đại học Thái Nguyên.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu chung về cây lúa

Cây lúa thuộc họ Hòa thảo, là loài thực vật sống một năm, có thể cao hơn với các lá bản mỏng, hẹp bản (2-2,5cm) và dài (50-100cm). Các hoa nhỏ, thụ phấn nhờ gió, mọc thành cụm nhỏ, phân nhánh cong hay rủ xuống. Hạt dài là loại quả thóc. Cây lúa thuộc chi *Oryza* với nhiều loài khác nhau. Trong số 23 loài đã được phân loại chỉ có hai loài là *O. glaberrima* Sreud. và *O. sativa* L. là được trồng. Loài *O. glaberrima* được trồng chủ yếu ở một số nước miền Tây Châu Phi. Loài *O. sativa* L. được trồng khắp thế giới. Nhưng phần lớn tập trung ở Châu Á và được chia thành 3 loài phụ: *Indica*, *Japonica* và *Javanica* [21].

Loài lúa trồng *Oryza sativa* L. được thuần hóa từ lúa dại. Tổ tiên của các loại lúa trồng hiện nay là loài lúa dại *Oryza fatua*, *Oryza zaofciracis*, *Oryza minuta*. Các nhà khoa học đã đi đến thống nhất là nguồn gốc cây lúa ở Đông Nam Châu Á vì đây là vùng có diện tích lúa tập trung lớn nhất thế giới [1]. Ngày nay, lúa *Indica* chiếm tới 80% các giống lúa trồng trên thế giới. Lúa *Japonica* được trồng chủ yếu ở các nước ôn đới và cận nhiệt đới còn lúa *Javanica* chỉ được trồng ở một vài vùng của Indonesia.

Lúa *O. sativa* L. có số NST đơn bội $n = 12$. Đa số các loài lúa dại và lúa trồng hiện nay có bộ gene ở trạng thái lưỡng bội và là cây tự thụ phấn ít khi thụ phấn chéo. Theo GS.Khush (1997) [20]. Trên thế giới có khoảng 120 giống lúa được trồng. Từ năm 1960, Viện nghiên cứu lúa quốc tế đã nghiên cứu, cải tiến những giống lúa tốt, có hạt dẻo ngon và đã phổ biến được khoảng 70% diện tích trồng lúa trên thế giới. Theo thống kê có 15 nước trên thế giới

trồng lúa với diện tích trên 1 triệu ha, trong đó có 13 nước ở Châu Á. Riêng Trung Quốc và Ấn Độ chiếm khoảng 50% diện tích trồng lúa và 50% sản lượng lúa toàn cầu. Bangladesh, Indonesia và Thái Lan mỗi nước đều có diện tích trồng lúa lớn hơn tổng diện tích trồng lúa của cả các nước Mỹ La Tinh. Châu Phi có diện tích trồng lúa gần bằng diện tích trồng lúa của Việt Nam nhưng sản lượng lúa lại thấp hơn Việt Nam từ hai đến ba lần [12].

Việt Nam có 80% dân số sống bằng nghề nông nghiệp. Lúa không những cung cấp lương thực cho toàn bộ dân số trong nước mà còn mang lại hiệu quả kinh tế cao do xuất khẩu gạo ra thị trường quốc tế. Năng suất lúa ở Việt Nam đạt 20,473 triệu tấn năm 2000, năm 2001 đạt 20,627 triệu tấn và năm 2003 đạt 34 triệu tấn [12]. Trong tiến trình công nghiệp hóa, hiện đại hóa ở nước ta hiện nay cải thiện năng suất, chất lượng lúa gạo là một trong những yêu cầu cấp bách đặt ra.

1.2. Tình hình sử dụng lúa kháng hạn và mặn

1.2.1. Lúa kháng hạn và mặn trên thế giới

Nhu cầu sản xuất giống lúa chống chịu hạn, mặn có từ lâu và các biện pháp làm tăng tính chịu hạn và mặn đã được thực hiện ở nhiều nước [19]. Năm 1980, Epstein đã mô tả tập hợp một số vấn đề về sinh lý và kỹ thuật liên quan đến tính chịu mặn. Khả năng chịu mặn rất khác nhau ở các sinh vật đã được biết. Từ những năm 1930 và những năm đầu thế kỷ 18 người ta đã chọn lọc ra giống có khả năng chống chịu mặn ở lúa và lúa mạch [2],[15],[16].

Mặc dù có những phát hiện sớm như vậy nhưng mãi đến năm 1993 Flower và Yeo mới xem xét nghiên cứu và tổng kết có dưới 30 giống có khả năng chống chịu mặn. Đến năm 1993 mới chỉ có 3 giống kháng mặn được đăng ký. Một giống chịu mặn được đăng ký tại Mỹ và một phương pháp tăng tính kháng mặn ở ngũ cốc nhờ kết hợp với protein ở phôi hạt [7],[11],[13],[14],[18],[23].