

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

**VŨ HOÀNG HIỆP**

**NGHIÊN CỨU TẠO ĐỘT BIẾN *IN VITRO* VÀ ĐÁNH GIÁ  
SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN, SAI KHÁC DI TRUYỀN  
CỦA CÁC DÒNG ĐỘT BIẾN GIỐNG HOA CẨM CHUỖNG  
QUẬN CHÚA (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.)**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ  
CHUYÊN NGÀNH: KHOA HỌC CÂY TRỒNG**

**HÀ NỘI, NĂM 2014**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

**VŨ HOÀNG HIỆP**

**NGHIÊN CỨU TẠO ĐỘT BIẾN *IN VITRO* VÀ ĐÁNH GIÁ  
SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN, SAI KHÁC DI TRUYỀN  
CỦA CÁC DÒNG ĐỘT BIẾN GIỐNG HOA CẨM CHUỖNG  
QUẬN CHÚA (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS L.*)**

**CHUYÊN NGÀNH: KHOA HỌC CÂY TRỒNG**

**MÃ SỐ: 62.62.01.10**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

**PGS.TS. NGUYỄN THỊ LÝ ANH**

**HÀ NỘI, NĂM 2014**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Các số liệu, hình ảnh, kết quả trình bày trong luận án này là trung thực và chưa từng được sử dụng để bảo vệ một học vị nào trước đây.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án này đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận án đều được chỉ rõ nguồn gốc.

*Hà Nội, ngày 10 tháng 04 năm 2014*

**Tác giả**

**Vũ Hoàng Hiệp**

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án, tôi đã nhận được sự quan tâm giúp đỡ tận tình của nhiều tập thể và cá nhân.

Lời đầu tiên, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Thị Lý Anh đã tận tình hướng dẫn, dìu dắt, tạo mọi điều kiện thuận lợi và chia sẻ những khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, các thầy giáo, cô giáo, cán bộ công nhân viên của Viện Sinh học Nông nghiệp - Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã sẻ chia kinh nghiệm và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể các thầy giáo, cô giáo Bộ môn Di truyền và chọn giống cây trồng, Khoa Nông học, Ban Quản lý đào tạo, Ban Giám đốc Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã giúp đỡ về mặt học vấn cũng như tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Trường Cao đẳng Cộng đồng Hải Phòng đã tạo điều kiện cho tôi có thể đảm bảo thời gian để học tập và thực hiện luận án.

Để hoàn thành được luận án này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ, động viên chân tình của các thành viên trong gia đình, các bạn bè, đồng nghiệp,... Tôi xin được trân trọng ghi nhớ và cảm ơn những sự giúp đỡ quý báu đó.

*Hà Nội, ngày 10 tháng 04 năm 2014*

**Tác giả**

**Vũ Hoàng Hiệp**

# MỤC LỤC

Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục	iii
Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt	vii
Danh mục các bảng	viii
Danh mục các hình	x
<b>MỞ ĐẦU</b>	<b>1</b>
1 Tính cấp thiết của đề tài	1
2 Mục tiêu nghiên cứu	2
3 Yêu cầu của đề tài	2
4 Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	3
5 Đóng góp mới của luận án	4
<b>Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b>	<b>5</b>
1.1 Giới thiệu chung về cây hoa cẩm chướng	5
1.1.1 Nguồn gốc, phân loại	5
1.1.2 Đặc điểm thực vật học của cây hoa cẩm chướng	7
1.1.3 Yêu cầu ngoại cảnh của hoa cẩm chướng	7
1.1.4 Yêu cầu dinh dưỡng	8
1.2 Tình hình sản xuất hoa cẩm chướng trên thế giới và trong nước	9
1.2.1 Tình hình sản xuất hoa cẩm chướng trên thế giới	9
1.2.2 Tình hình sản xuất hoa cẩm chướng tại Việt Nam	11
1.3 Ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô, tế bào trong nhân giống cây hoa cẩm chướng	12
1.4 Đột biến tạo biến dị di truyền và ứng dụng đột biến trong chọn tạo giống cây trồng	16
1.4.1 Đột biến tạo biến dị di truyền	16
1.4.2 Các tác nhân gây đột biến	17
1.4.3 Vai trò của đột biến nhân tạo trong công tác chọn tạo giống cây trồng	21

1.5	Xử lý gây tạo đột biến trong nuôi cấy <i>in vitro</i> và ứng dụng trong chọn tạo giống cây trồng	24
1.5.1	Xử lý gây tạo đột biến trong nuôi cấy <i>in vitro</i>	24
1.5.2	Các phương pháp xử lý gây tạo đột biến trong nuôi cấy <i>in vitro</i>	25
1.5.3	Nguồn vật liệu xử lý đột biến <i>in vitro</i>	29
1.5.4	Sàng lọc thể đột biến	29
1.6	Một số kết quả nghiên cứu về cây hoa cẩm chướng	30
1.6.1	Kết quả nghiên cứu trên thế giới	30
1.6.2	Kết quả nghiên cứu trong nước	35
<b>Chương 2 ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>		<b>39</b>
2.1	Vật liệu nghiên cứu	39
2.2	Nội dung nghiên cứu	41
2.2.1	Nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> cho cây cẩm chướng giống Quận Chúa	41
2.2.2	Nghiên cứu các phương pháp xử lý gây tạo đột biến <i>in vitro</i> cho cây cẩm chướng	41
2.2.3	Nghiên cứu phân lập các dạng chồi <i>in vitro</i> biến dị sau xử lý và đánh giá sự sinh trưởng phát triển của các dạng chồi	41
2.2.4	Nghiên cứu sự sinh trưởng phát triển và phân lập các dạng biến dị của cây cẩm chướng sau xử lý trong điều kiện tự nhiên	42
2.2.5	Nghiên cứu đánh giá sự sai khác di truyền của một số dòng biến dị có triển vọng đã phân lập bằng chỉ thị SSR	42
2.2.6	Nghiên cứu quy trình nhân giống <i>in vitro</i> cho một số dòng đột biến được tuyển chọn	42
2.3	Phương pháp nghiên cứu	42
2.3.1	Phương pháp bố trí thí nghiệm	42
2.3.2	Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật.	47
2.3.3	Phương pháp gây tạo đột biến <i>in vitro</i>	47
2.3.4	Phương pháp đánh giá sự sai khác di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử SSR	50
2.3.5	Phương pháp theo dõi, đánh giá	53

2.4	Phương pháp xử lý số liệu	55
2.5	Thời gian và địa điểm nghiên cứu	54
<b>Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN</b>		<b>56</b>
3.1	Nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> cho cây cẩm chương giống Quận Chúa	56
3.1.1	Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu	55
3.1.2	Nghiên cứu nhân nhanh chồi <i>in vitro</i>	56
3.1.3	Nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh	62
3.1.4	Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp ra cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây <i>in vitro</i> ngoài vườn ươm	63
3.2	Nghiên cứu xử lý gây tạo đột biến cho cây hoa cẩm chương <i>in vitro</i> bằng EMS và tia gamma nguồn $^{60}\text{Co}$	65
3.2.1	Nghiên cứu xử lý gây tạo đột biến cho cây hoa cẩm chương nuôi cấy <i>in vitro</i> bằng EMS	65
3.2.2	Nghiên cứu xử lý gây tạo đột biến cho cây hoa cẩm chương nuôi cấy <i>in vitro</i> bằng tia gamma nguồn $^{60}\text{Co}$	75
3.2.3	Nghiên cứu xử lý kết hợp EMS và tia gamma nguồn $^{60}\text{Co}$ cho cây hoa cẩm chương <i>in vitro</i>	80
3.3	Nghiên cứu khả năng sinh trưởng, phát triển của các dạng chồi <i>in vitro</i>	84
3.3.1	Nghiên cứu khả năng ra rễ của các dạng chồi <i>in vitro</i> cây cẩm chương sau xử lý	85
3.3.2	Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của các dạng chồi <i>in vitro</i> cây cẩm chương sau xử lý trong điều kiện khí canh	86
3.3.3	Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của các dạng chồi <i>in vitro</i> cây cẩm chương sau xử lý giai đoạn ngoài đồng ruộng	88
3.4	Nghiên cứu ảnh hưởng của xử lý gây tạo đột biến đến sự phát sinh biến dị của cây cẩm chương giai đoạn ngoài đồng ruộng	89
3.4.1	Ảnh hưởng của xử lý EMS đến sự phát sinh biến dị của cây cẩm chương giai đoạn ngoài đồng ruộng	96

3.4.2	Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ đến tỷ lệ biến dị của cây cẩm chướng sau xử lý giai đoạn ngoài đồng ruộng	96
3.4.3	Ảnh hưởng của xử lý kết hợp EMS và chiếu xạ đến tỷ lệ biến dị của cây cẩm chướng sau xử lý giai đoạn ngoài đồng ruộng	96
3.4.4	Đặc điểm hình thái một số dạng biến dị về màu sắc hoa sau xử lý giai đoạn ngoài đồng ruộng	97
3.5	Nghiên cứu đánh giá sai khác di truyền của một số dòng cẩm chướng bằng kỹ thuật SSR	103
3.5.1	Kết quả tách chiết DNA tổng số	103
3.5.2	Kết quả phân tích sự nhân bản DNA với các cặp mồi	104
3.5.3	Kết quả phân tích chỉ số PIC với các cặp mồi	115
3.5.4	Đánh giá độ thuần di truyền của các dòng cẩm chướng nghiên cứu	117
3.5.5	Hệ số đồng dạng và mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống cẩm chướng	117
3.6	Nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> một số dòng đột biến được tuyển chọn	121
3.6.1	Nghiên cứu ảnh hưởng chế độ khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu	122
3.6.2	Đánh giá khả năng nhân nhanh <i>in vitro</i> của các dòng cẩm chướng đột biến được tuyển chọn.	124
3.6.3	Nghiên cứu ảnh hưởng của auxin đến khả năng tạo cây <i>in vitro</i> hoàn chỉnh của hai dòng cẩm chướng H6 và H7	125
3.6.4	Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp ra cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây <i>in vitro</i> ngoài vườn ươm	126
	<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ</b>	<b>129</b>
1	Kết luận	129
2	Đề nghị	130
	Danh mục công trình đã công bố có liên quan đến luận án	131
	Tài liệu tham khảo	132
	Phụ lục	141



## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ
AFLP	Amplicon fragment length polymorphism
BA	Benzyl adenin
BAP	6-Benzylamino purine
CT	Công thức
CS	Cộng sự
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DES	Dimethylsulfate
ĐC	Đối chứng
EI	Ethylenimine
EMS	Ethylmethane sulphonate
FAO	Food and Agriculture Organization
IAA	3-Indoleacetic acid
IAEA	International Atomic Energy Agency
IBA	$\alpha$ -Indol butyric acid
LD <sub>50</sub>	Liều gây chết 50% mẫu thí nghiệm
LPB	Protocorm-Like-Bodies
MS	Môi trường Murashige and Skoog
NEU	Nitrosoethylurea
NMU	Nitrosomethylurea
NXB	Nhà xuất bản
PIC	Polymorphic Information Content
r	Hệ số tương quan
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphisms
SSR	Simple sequence repeats
TDZ	Thidiazuron
$\alpha$ NAA	$\alpha$ -Naphthaleneacetic acid

## DANH MỤC CÁC BẢNG

STT	Tên bảng	Trang
1.1	Diện tích trồng và năng suất hoa cầm chương ở một số nước năm 2000	10
1.3	Số giống cây trồng được tạo ra bằng phương pháp gây tạo đột biến ở một số quốc gia tính đến năm 2007	23
2.1	Trình tự nucleotit của các primer được sử dụng trong các phản ứng SSR-PCR	39
3.1	Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống	55
3.2	Ảnh hưởng của BA và kinetin trong môi trường MS đến hệ số nhân, sinh trưởng của chồi <i>in vitro</i>	58
3.3	Ảnh hưởng của của tổ hợp kinetin và auxin đến hệ số nhân, sinh trưởng của chồi <i>in vitro</i>	61
3.4	Ảnh hưởng của $\alpha$ -NAA và than hoạt tính trong môi trường MS tới khả năng ra rễ của chồi <i>in vitro</i>	63
3.5	Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây cầm chương <i>in vitro</i> ngoài vườn ươm	64
3.6	Ảnh hưởng của EMS đến khả năng sống, phát sinh chồi <i>in vitro</i> cây cầm chương	66
3.7	Sự biến động tỷ lệ mẫu chết qua các tuần nuôi cấy	69
3.8	Ảnh hưởng của EMS đến sự phát sinh hình thái của chồi <i>in vitro</i> cây cầm chương với thời gian xử lý 1 giờ	72
3.9	Ảnh hưởng của EMS đến sự phát sinh hình thái của chồi <i>in vitro</i> cây cầm chương với thời gian xử lý 2 giờ	72
3.10	Ảnh hưởng của EMS đến sự phát sinh hình thái của chồi <i>in vitro</i> cây cầm chương với thời gian xử lý 3 giờ	73
3.11	Ảnh hưởng của liều lượng xử lý tia gamma nguồn $^{60}\text{Co}$ đến khả năng sống và sinh trưởng của chồi <i>in vitro</i>	76
3.12	Sự biến động tỷ lệ mẫu chết qua các tuần nuôi cấy	76
3.13	Tỷ lệ chồi biến dị và các dạng chồi sau xử lý tia gamma nguồn $^{60}\text{Co}$	79