

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

HÀ NỘI – 2014

Công trình hoàn thành tại:

HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

Người hướng dẫn: PGS.TS. NGUYỄN THỊ LÝ ANH

**Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo
Học viện Nông nghiệp Việt Nam**

**Phản biện 2: PGS.TS. Lê Huy Hàm
Viện Di truyền Nông nghiệp**

**Phản biện 3: TS. Đặng Văn Đông
Viện Nghiên cứu Rau quả**

Luận án sẽ được bảo vệ tại hội đồng chấm luận án cấp Học viện họp tại:

Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Vào hồi , ngày tháng năm 2014

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Học viện Nông nghiệp Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Cẩm chướng là một trong bốn loài hoa cắt cành được trồng phổ biến trên thế giới, chiếm 17% tổng sản lượng hoa cắt (Nguyễn Thị Kim Lý, 2012). Đây cũng là loại hoa có nhiều triển vọng trong sản xuất nội tiêu cũng như xuất khẩu của Việt Nam. Ở nước ta hiện nay, chủ yếu trồng các giống cẩm chướng nhập nội từ nước ngoài do đó không chủ động và chi phí sản xuất cao, đặc biệt là không thể mở rộng sản xuất và xuất khẩu bởi không có bản quyền giống. Vì vậy, việc nghiên cứu chọn tạo những giống hoa cẩm chướng mới đáp ứng được nhu cầu thị trường, phù hợp với điều kiện sinh thái và có bản quyền của Việt Nam là yêu cầu bức thiết.

Đối với cây hoa việc chọn tạo giống tập trung chủ yếu là tạo giống có màu sắc mới. Điều này được thực hiện thông qua con đường lai xa và gây tạo đột biến. Tuy nhiên đối với cây hoa cẩm chướng ở nước ta việc lai xa rất khó thực hiện bởi khả năng thụ phấn thụ tinh rất khó. Vì vậy việc tạo giống có màu sắc mới chỉ có thể thực hiện thông qua con đường gây tạo đột biến. Phương pháp chọn tạo giống bằng gây tạo đột biến được phát triển từ giữa thế kỷ 20 và ngày càng phát triển rộng rãi mang lại những thành tựu to lớn trong công tác chọn tạo giống cây trồng. Hơn thế nữa, việc gây tạo đột biến nhân tạo kết hợp với nuôi cấy mô tế bào thực vật *in vitro* đã trở thành công cụ hữu hiệu giúp giảm thiểu chi phí và thời gian chọn tạo giống cây trồng mới. Kỹ thuật này đã làm tăng tần số xuất hiện đột biến với các tính trạng có giá trị kinh tế ở các loài thực vật nói chung và cây hoa nói riêng, góp phần không nhỏ cho việc cải tiến giống cây trồng. (Okamura, 2006; Shu, 2009; IAEA, 2009, 2013). Xuất phát từ những vấn đề nêu trên chúng tôi thực hiện đề tài **“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 chướng Quận Chúa (*Dianthus caryophyllus* L.)”**.

2. Mục tiêu của đề tài

Nghiên cứu phương pháp xử lý đột biến *in vitro* nhằm xác định được phương pháp xử lý đột biến hiệu quả và tạo được các dòng biến dị di truyền làm nguồn nguyên liệu cho công tác chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới.

3. Yêu cầu của đề tài

- Xác định khả năng nhân giống *in vitro* cho cây cẩm chướng giống Quận Chúa, làm cơ sở cho việc tái sinh và tạo cây hoàn chỉnh các mẫu xử lý đột biến *in vitro* bằng tác nhân gây đột biến.

- Xác định hiệu quả xử lý gây tạo đột biến cho cây hoa cẩm chướng trong nuôi cấy mô mang lại hiệu quả cao:

 - + Xác định nồng độ, thời gian xử lý EMS thích hợp cho chồi nhân *in vitro* cây hoa cẩm chướng.

 - + Xác định liều lượng xử lý tia gamma nguồn ^{60}Co thích hợp cho chồi nhân *in vitro* cây hoa cẩm chướng.

 - + Xác định hiệu quả của xử lý phối hợp EMS và tia gamma nguồn ^{60}Co cho chồi nhân *in vitro* cây hoa cẩm chướng.

 - Phân lập các thể đột biến qua các thế hệ nhân chồi *in vitro*.

 - Sàng lọc các dạng biến dị của cây cẩm chướng sau xử lý trong điều kiện tự nhiên.

 - Đánh giá sự sai khác di truyền của một số dòng đột biến có triển vọng đã phân lập bằng chỉ thị SSR.

 - Xác định phương pháp khử trùng mẫu, môi trường nhân nhanh, môi trường ra rễ và giá thể ra cây thích hợp cho một số dòng đột biến có tiềm năng được tuyển chọn.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

4.1. Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu của đề tài đã cung cấp các dẫn liệu khoa học có giá trị về việc ứng dụng nhân giống *in vitro* và phương pháp tạo giống mới thông qua xử lý đột biến *in vitro* của cây hoa cẩm chướng.

Các kết quả nghiên cứu của đề tài là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu tạo dòng đột biến làm nguồn nguyên liệu di truyền cho việc chọn tạo giống cẩm chướng mới. Đồng thời là tư liệu có giá trị cho việc nghiên cứu lĩnh vực công nghệ sinh học và chọn tạo giống cây trồng.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

Đề tài đã xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* cho một số dòng, giống hoa cẩm chướng, góp phần giải quyết khó khăn trong thực tiễn về nhân giống hiện nay; ứng dụng thành công phương pháp xử lý đột biến *in vitro* và xây dựng được quy trình xử lý gây tạo đột biến kết hợp nuôi cấy *in vitro* cho cây hoa cẩm chướng bằng tác nhân EMS và chiếu xạ tia gamma nguồn ^{60}Co ; tạo được các vật liệu khởi đầu phục vụ cho công tác nghiên cứu chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới và chọn lọc được một số dòng đột biến có triển vọng.

5. Những đóng góp mới của luận án

Các kết quả nghiên cứu đã xác định được tác nhân gây đột biến EMS và tia gamma cho hiệu quả cao trong việc gây tạo biến dị có tiềm năng có thể làm vật liệu cho công tác chọn tạo giống hoa cẩm chướng mới.

Đề tài đã tạo ra các dòng đột biến có tiềm năng và đánh giá được đặc điểm sinh trưởng phát triển của các dòng đột biến mới về màu sắc hoa trong điều kiện tự nhiên. Các dòng đột biến này cũng đã được đánh giá sự sai khác di truyền bằng chỉ thị phân tử SSR và xác định mối quan hệ di truyền với cây mẹ.

Đề tài đã xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* cho 2 dòng đột biến có triển vọng (dòng H6 và dòng H7) trong số các dòng đột biến nêu trên, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo để phát triển hai dòng này thành giống hoa cẩm chướng mới.

6. Giới hạn của đề tài

- Thời gian nghiên cứu từ năm 2009 – 2013.
- Địa điểm nghiên cứu: Viện Sinh học Nông nghiệp – Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

7. Bố cục của luận án

Nội dung chính của luận án được thể hiện trong 130 trang, gồm: 4 trang mở đầu, 34 trang tổng quan, 17 trang vật liệu nội dung và phương pháp nghiên cứu, 73 trang kết quả và thảo luận, 2 trang kết luận và kiến nghị. 126 tài liệu tham khảo, trong đó 32 tài liệu tiếng Việt, 94 tài liệu tiếng Anh. Kết quả nghiên cứu có 34 bảng số liệu và 41 hình. Phân phục lục hình ảnh minh họa và kết quả xử lý số liệu.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Cẩm chướng là loại hoa có giá trị kinh tế cao, chiếm tỷ lệ lớn trong các loài hoa cắt cành trên thế giới (chiếm 17%) và trong các loài hoa xuất khẩu ở nước ta. Việc đẩy mạnh sản xuất và nâng cao chất lượng sản phẩm hoa cẩm chướng ở Việt Nam còn nhiều hạn chế, trong đó đề bản quyền giống đang là khó khăn trong việc tiếp cận thị trường hoa thế giới.

Đột biến đóng vai trò quan trọng trong chọn giống cây trồng, nhờ vào quá trình đột biến mà chúng ta đã tạo ra nhiều giống hoa mới, đặc sắc có năng suất cao, khả năng chống chịu tốt, kháng sâu bệnh,... trên lĩnh vực hoa cảnh nói riêng và trong ngành chọn giống nói chung. Xử lý gây tạo đột biến kết hợp nuôi cấy *in vitro* có nhiều ưu điểm so với phương pháp chọn giống truyền thống: tần số đột biến cao và khả năng thu nhận những thể đột biến đồng nhất về kiểu gen dễ dàng hơn; có thể xử lý một số lượng lớn tế bào, mô, cây con mà không đòi hỏi diện tích lớn; có thể sử dụng nhiều bộ phận khác nhau của cây (tế bào, mô sẹo, chồi *in vitro*, đoạn thân, hạt, ...); có khả năng rút ngắn thời gian so phương pháp truyền thống (chỉ cần 3 - 6 thế hệ).

Các kết quả nghiên cứu của các tác giả về chọn tạo giống đột biến hoa cẩm chướng cho thấy việc ứng dụng kỹ thuật gây tạo đột biến nhân tạo đối với cây trồng nói chung và cây hoa cẩm chướng nói riêng mang lại hiệu quả rất lớn. Có rất nhiều giống hoa cẩm chướng mới với những tính trạng mới được tạo ra nhờ xử lý gây tạo đột biến. Vì vậy, có thể nói rằng, phương pháp chọn giống cẩm chướng và các loại hoa nói chung bằng xử lý đột biến là một phương pháp đầy triển vọng trong công tác chọn tạo giống hoa mới cho sản xuất.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu ngủ của chồi *in vitro* cây hoa cẩm chướng thơm giống Quận Chúa (Tên khoa học *Dianthus caryophyllus* “Princess”; tên thương mại Princess).

- Các thiết bị dụng cụ hóa chất trong nuôi cấy mô tế bào.

- Phản ứng PCR-SSR được tiến hành 20 mỗi SSR của hãng Bioneer (theo Smulders et al., 2003, Tetsuya et al., 2009).

- Hóa chất dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử như Tris bazo, agarose, isopropanol, Ethanol, chloroform, isoamylalcohol, CH₃COONa, SDS, CTAB, Nacl, EDTA,...

- Các hóa chất cho phản ứng PCR gồm deoxynucleotit triphosphat (dNTPs) của Sigma, Taq-DNA polymeraza của Fermentas.

2.2. Nội dung nghiên cứu.

2.2.1. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cho cây cẩm chương giống Quận Chúa

- Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hệ số nhân, sự sinh trưởng của chồi *in vitro*:

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của BA và kinetin trong môi trường MS đến hệ số nhân, sự sinh trưởng của chồi *in vitro*.

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp cytokinin và auxin đến hệ số nhân, sự sinh trưởng của chồi *in vitro*.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của α -NAA và than hoạt tính trong môi trường MS tới khả năng ra rễ của chồi *in vitro*.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây *in vitro* ngoài vườn ươm.

2.2.2. Nghiên cứu các phương pháp xử lý gây tạo đột biến *in vitro* cho cây cẩm chương

- Nghiên cứu xử lý EMS cho cây hoa cẩm chương *in vitro*.

- Nghiên cứu xử lý tia gamma nguồn ⁶⁰Co cho cây hoa cẩm chương *in vitro*.

- Nghiên cứu xử lý kết hợp EMS và tia gamma nguồn ⁶⁰Co cho cây cẩm chương *in vitro*.

2.2.3. Nghiên cứu phân lập các dạng chồi *in vitro* biến dị sau xử lý và đánh giá sự sinh trưởng phát triển của các dạng chồi

- Nghiên cứu phân lập các dạng chồi biến dị về mặt hình thái.

- Nghiên cứu khả năng ra rễ của các dạng chồi phân lập sau xử lý.

- Nghiên cứu khả năng sinh trưởng phát triển của các dạng chồi

trong điều kiện vườn ươm.

2.2.4. Nghiên cứu sự sinh trưởng phát triển và phân lập các dạng biến dị của cây cảm chướng sau xử lý trong điều kiện tự nhiên

Cây cảm chướng sau xử lý được đưa ra trồng tại nhà lưới, theo dõi phân lập các dạng biến dị.

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

Chọn lọc một số dòng biến dị có tiềm năng đánh giá sự sai khác di truyền ở mức độ phân tử bằng chỉ thị SSR.

2.2.6. Nghiên cứu quy trình nhân giống in vitro cho một số dòng đột biến được tuyển chọn

- Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu
- Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hệ số nhân, sinh trưởng của chồi *in vitro*.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của auxin trong môi trường MS tới khả năng ra rễ của chồi *in vitro*.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây *in vitro* ngoài vườn ươm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu.

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại.

2.3.2. Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Sử dụng phương pháp nuôi cấy *in vitro* trên môi trường cơ bản MS (Murahige and Skoog, 1962) với 6,5 g/l agar, 30 g/l saccarose và 100 mg/l inositol) có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng.

Các thí nghiệm nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 20 – 22°C, cường độ chiếu sáng 2.000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Các công thức thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm bố trí 150 mẫu, chia làm 3 lần nhắc lại.

2.3.3. Phương pháp gây tạo đột biến in vitro

Phương pháp gây tạo đột biến được tiến hành theo quy trình của Novak and Brunner (1992) có cải tiến. Mỗi công thức thí nghiệm xử lý 3 lần nhắc lại mỗi lần 60 mẫu với liều lượng xử lý như sau:

- *Xử lý gây tạo đột biến bằng tác nhân EMS*: Mẫu được xử lý ở

các mức nồng độ EMS 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0% với 3 mức thời gian 1, 2 và 3 giờ.

- *Xử lý gây tạo đột biến bằng tia gamma nguồn ^{60}Co* : Mẫu được xử lý với các liều hấp thụ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 G_γ .

- *Xử lý gây tạo đột biến bằng EMS kết hợp tia gamma nguồn ^{60}Co* : Mẫu được xử lý EMS với nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4% trong thời gian 2 giờ kết hợp tia gamma nguồn Co^{60} với liều hấp thụ 10, 20, 30 G_γ .

2.3.4. Phương pháp đánh giá sự sai khác di truyền của các dòng đột biến bằng chỉ thị phân tử SSR

Để tiến hành phân tích và đánh giá sự sai khác di truyền của các giống hoa cẩm chướng ở mức độ phân tử, DNA của 7 mẫu hoa cẩm chướng được nhân bản bằng phương pháp PCR với 20 môi SSR. Các sản phẩm được điện di trên gel agarose 3,5%.

2.3.4.1. Phương pháp chiết tách DNA

Trong thí nghiệm này chúng tôi chiết tách DNA tổng số của các mẫu cẩm chướng dựa theo phương pháp của Obara – Okeyo P. and Kako (1998) có cải tiến.

2.3.4.2. Phương pháp PCR – SSR

Phản ứng PCR được thực hiện với nhiều chu kì, nhiệt độ biến tính DNA 95°C , nhiệt độ gắn môi $37- 55^\circ\text{C}$ tùy theo từng môi, nhiệt độ tổng hợp chuỗi DNA 72°C .

2.3.4.3. Phương pháp điện di trên gel agarose

Sản phẩm của phản ứng PCR-SSR được kiểm tra trên gel agarose 1% và soi gel dưới ánh sáng đèn UV, nhận biết sản phẩm khuếch đại dựa vào thang chuẩn DNA 1Kb.

2.3.4.4. Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu này được đưa vào xử lý theo chương trình NTSYSpc 2.1 của Rohlf (2002) để tính ma trận tương đồng giữa các cặp mẫu.

Hệ số PIC - Chỉ số thông tin đa hình (Nei, 1973).

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

Trong đó: p_i là tần số xuất hiện alen thứ i .

Tỷ lệ dị hợp tử (H%)

$$H\% = \frac{\text{Số môi xuất hiện } \geq 2 \text{ alen/ 1 locus SSR}}{\text{Tổng số môi sử dụng} - \text{Số môi khuyết số liệu}} \times 100$$

2.3.5. Phương pháp theo dõi, đánh giá đặc điểm nông, sinh học

Các chỉ tiêu đánh giá ngoài đồng ruộng theo Quy phạm khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định của Hiệp hội Quốc tế về bảo hộ giống cây trồng mới (Hiệp hội Quốc tế về bảo hộ giống cây trồng mới, 2008).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương phân tích phương sai (ANOVA) theo chương trình Irristat 5.0S và Excel. Số liệu phân tích SSR được xử lý bằng phần mềm NTSYS pc2.1. Sử dụng thuật toán nội suy lagrange để xây dựng mô hình toán học. Sử dụng phương pháp Reed and Muench (1983), Behrens and Karber (1935) để xác định liều gây chết 50% mẫu thí nghiệm (LD₅₀).

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cho cây cấy chương giống Quận Chúa

3.1.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu

Kết quả nghiên cứu cho thấy, đối với cây cấy chương giống Quận Chúa sử dụng hóa chất HgCl₂ 0,1% để khử trùng mẫu có hiệu quả tốt hơn so với NaOCl (5%). Trong các công thức thí nghiệm được nghiên cứu công thức 2 (sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 phút) cho hiệu quả tốt nhất.

3.1.2. Nghiên cứu nhân nhanh chồi *in vitro*

3.1.2.1. Ảnh hưởng của BA và kinetin trong môi trường MS đến hệ số nhân, sinh trưởng của chồi *in vitro* cây cấy chương

Kết quả nghiên cứu cho thấy: các công thức có bổ sung kinetin hoặc BA đều cho sự phát sinh chồi cao hơn đối chứng. Tuy nhiên, ở mỗi nồng độ BA hoặc kinetin bổ sung khác nhau thì số chồi phát