

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

**VIỆN KHOA HỌC
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Tên đề tài:

**Ứng dụng kỹ thuật hạt nhân nhằm nâng cao hàm lượng
Artemisinin ở cây thanh hao hoa vàng bằng phương pháp
chiếu xạ gây đột biến**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số : 60 42 30

Năm bảo vệ : 2010

Học viên : Lê Trung Kiên

**Cán bộ hướng dẫn: PGS. TS Lê Huy Hàm
Ths. Đào Thanh Bằng**

Hà Nội – 2010

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN KHOA HỌC
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Tên đề tài:

**Ứng dụng kỹ thuật hạt nhân nhằm nâng cao hàm lượng
Artemisinin ở cây thanh hao hoa vàng bằng phương pháp
chiếu xạ gây đột biến**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số : 60 42 30

Năm bảo vệ : 2010

Học viên : Lê Trung Kiên

**Cán bộ hướng dẫn: PGS. TS Lê Huy Hàm
Ths. Đào Thanh Bằng**

Hà Nội, 12/2010

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU	1
PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
I. NGUỒN GỐC, PHÂN BỐ VÀ ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC	3
1.1. Nguồn gốc, phân bố	3
1.2. Đặc điểm thực vật học.	4
1.2.1. Rễ cây Thanh hao	4
1.2.2. Thân cây Thanh hao	4
1.2.3. Lá cây Thanh hao	5
1.2.4. Hoa cây Thanh hao	5
1.2.5. Hạt cây Thanh hao	6
II. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ CÂY THANH HAO	7
2.1. Nghiên cứu về kỹ thuật trồng Thanh hao	7
2.2. Nghiên cứu chọn giống Thanh hao	9
2.3. Nghiên cứu hàm lượng Artemisinin và động thái tích lũy Artemisinin trong cây Thanh hao	11
III. TỔNG QUAN VỀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT HẠT NHÂN TRONG CHỌN TẠO GIỐNG	13
3.1. Khái niệm đột biến và chọn giống đột biến.	13
3.2. Tình hình nghiên cứu chọn giống đột biến trên thế giới.	14
3.3. Tình hình nghiên cứu chọn giống đột biến trong nước.	16
3.4. Phương hướng của chọn giống đột biến trong thời gian tới	19
3.4.1. Tìm kiếm, gây tạo và xây dựng chiến lược sử dụng các đột biến	19
Kết hợp nghiên cứu đột biến với nghiên cứu sinh học phân tử	20

IV. CƠ SỞ KHOA HỌC ĐỂ XÁC ĐỊNH LIỀU BỨC XẠ CHO VIỆC CHIẾU XẠ CÂY THANH HAO.	21
4.1. Chiếu xạ hạt khô	21
4.2. Chiếu xạ callus	22
PHẦN II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
I. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	
1.1. Chiếu xạ hạt:	23
1.2. Chiếu xạ callus:	23
II. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	23
III. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm	24
3.2. Chỉ tiêu theo dõi	24
PHẦN III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	26
I. THỂ HỆ M1 (2006):	26
1.1. Chiếu xạ hạt	26
1.1.2. Kết quả theo dõi thời gian nảy mầm của hạt sau chiếu xạ.	26
1.1.3. Khả năng sinh trưởng của giống Thanh hao hoa vàng thể hệ M1	28
1.2. Chiếu xạ callus	32
1.2.1. Tạo vật liệu sạch cho nuôi cấy in-vitro cây thanh hao hoa vàng	32
1.2.2. Xác định môi trường thích hợp để tạo callus ở cây thanh hao hoa vàng	33
1.2.3. Chiếu xạ callus thanh hao	35
II. THỂ HỆ M2 (2007)	37
2.1. Cây chiếu xạ từ hạt	37
2.1.1. Thời gian nảy mầm của hạt sau chiếu xạ	37
2.1.2. Khả năng sinh trưởng của giống Thanh hao hoa vàng thể hệ M2	39

2.2. Cây chiếu xạ callus (ở các liều 0; 3 và 5 kr)	42
2.3. Phân tích hàm lượng Artemisinin ở cây thể hệ M2	43
III. THỂ HỆ M3 (2008)	45
3.1. Tình hình sinh trưởng của cây Thanh hao thể hệ M3	45
3.2. Phân tích hàm lượng Artemisinin	46
IV. Thế hệ M4 (2009)	50
4.1. Kết quả đánh giá tỷ lệ nảy mầm của các dòng triển vọng.	50
4.2. Thời gian nảy mầm, tuổi cây con, thời gian từ trồng đến bén rễ hồi xanh	51
4.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các dòng triển vọng thế hệ M4	52
4.4. Phân tích hàm lượng Artemisinin	53
4.5. Đánh giá năng suất của các dòng có triển vọng	56
V. Thế hệ M5 (2010)	57
5.1. Xây dựng quy trình thâm canh cho dòng thanh hao triển vọng	57
5.1.1. Mục tiêu nghiên cứu	57
5.1.2. Vật liệu nghiên cứu	57
5.1.3. Nội dung nghiên cứu.	57
5.1.4. Phương pháp nghiên cứu	58
5.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận	58
5.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng thời vụ tới năng suất sinh vật học của một số dòng thanh hao triển vọng.	58
5.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ tới năng suất và hàm lượng của các dòng thanh hao triển vọng.	60
PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	64
I. KẾT LUẬN	64
II. ĐỀ NGHỊ	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
MỤC LỤC	

MỞ ĐẦU

Trên phạm vi toàn cầu, những năm gần đây bệnh sốt rét lại phát triển trở lại, hàng năm giết chết gần 2 triệu người và gần 270 triệu người khác mắc bệnh. Nguyên nhân là do các chủng ký sinh trùng gây bệnh đã dần trở nên kháng các loại thuốc trước đây. Theo thông báo của WHO sau một thời gian dài sử dụng các thuốc điều trị bệnh sốt rét như Quinin, Chloroquin, Mefloquin,...đến nay ký sinh trùng sốt rét đã kháng hầu hết các loại thuốc trên. Có 15 nước Đông Nam Á và Tây Thái Bình Dương (Trong đó có Việt Nam), 10 nước Nam Mỹ, 15 nước Châu Phi và Nam Sahara bệnh sốt rét phát triển mạnh nhất.

Năm 1979 các nhà khoa học Trung Quốc đã tìm ra hoạt chất Quing-hao-su (*Artemisinin*) từ cây Qing-hao (Thanh hao) có khả năng điều trị bệnh sốt rét (Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, 2004). Cây hoa thanh hao hoa vàng có tên khoa học là *Artemisia annua* L., cây sống lâu năm, mọc hoang dại thành từng đám ở vùng đồi núi, ven sông suối. Năm 1990 nước ta đã chiết xuất từ lá thanh hao chất *Artemisinin* trên quy mô công nghiệp.

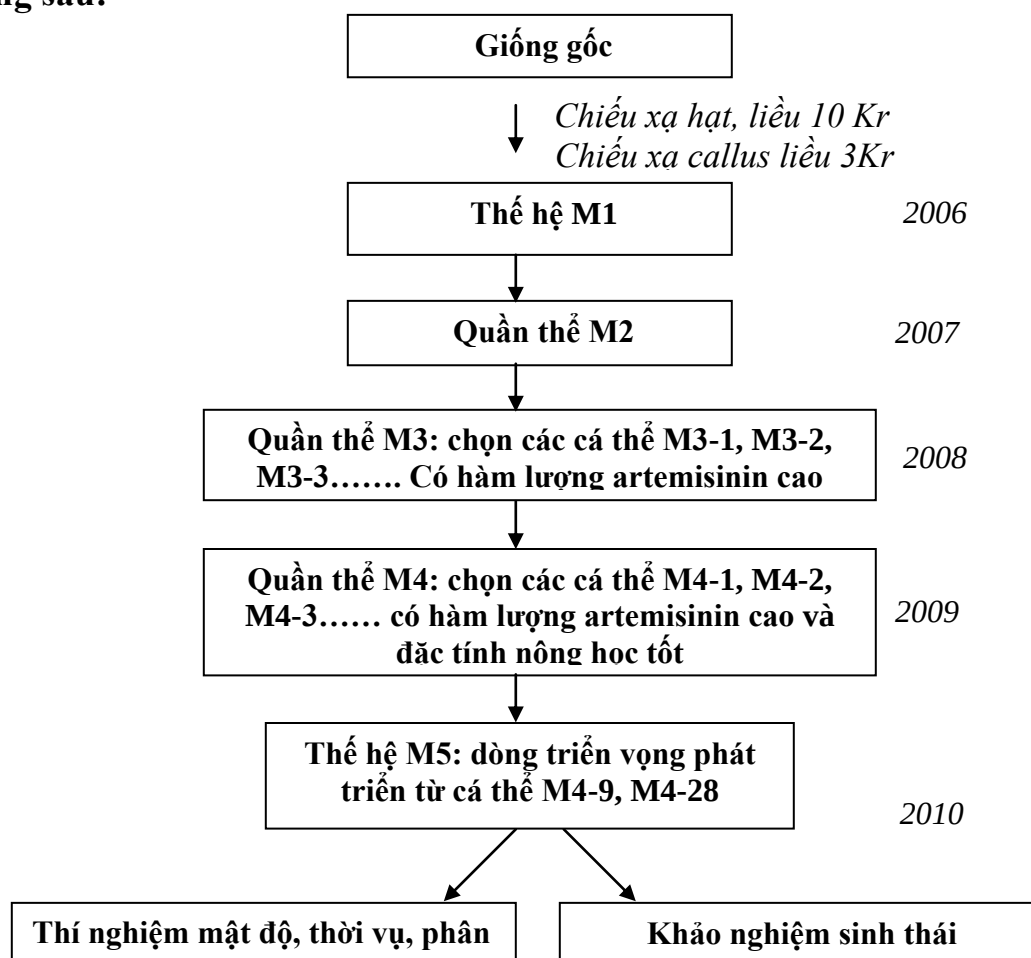
Trong những năm gần đây, ở Việt Nam cây thanh hao đang được phát triển mạnh. Song vấn đề đặt ra cần phải giải quyết là thời gian chiếm dụng đất của nó quá dài so với cây trồng nông nghiệp khác, giống thanh hao trồng chủ yếu là các giống tự nhiên có hàm lượng *Artemisinin* thấp. Do vậy, việc chọn tạo, cải tiến giống thanh hao có hàm lượng hoạt chất *Artemisinin* cao nhằm giảm diện tích đất trồng nhưng vẫn cung cấp đủ lượng *Artemisinin* tự nhiên cần thiết cho ngành Dược là nhiệm vụ cần phải giải quyết của các nhà chọn tạo giống cây trồng.

Gây đột biến là phương pháp hữu hiệu để tạo vật liệu khởi đầu đa dạng và hữu ích cho chọn giống trong nông nghiệp. Tính đến tới tháng 7 - 2006 đã có 2428 giống cây trồng được tạo ra bằng phương pháp gây đột biến thực nghiệm. Tuy nhiên cho đến nay, vẫn chưa có một công bố nào về cải tiến giống cây dược liệu bằng phương pháp gây đột biến.

Viện Di truyền nông nghiệp là một viện nghiên cứu chuyên sâu trong lĩnh vực di truyền, chọn giống và công nghệ sinh học thuộc Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Viện cũng là cơ quan đầu mối quan trọng nhất ở nước ta trong việc ứng dụng kỹ thuật hạt nhân để cải tiến giống cây trồng nông nghiệp. Với sự phối hợp giữa Công ty Dược liệu Mediplantex và viện Di truyền nông nghiệp, xuất phát từ những yêu cầu thực tiễn trên chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài: **“Chọn tạo giống cây Thanh hao hoa vàng có hàm lượng Artemisinin cao bằng phương pháp chiếu xạ gây đột biến”**

Mục đích của đề tài: Ứng dụng kỹ thuật hạt nhân nhằm nâng cao hàm lượng Artemisinin ở cây thanh hao hoa vàng bằng chiếu xạ hạt và chiếu xạ callus.

Để thực hiện được mục tiêu trên chúng tôi đã tiến hành thực hiện các nội dung sau:



PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

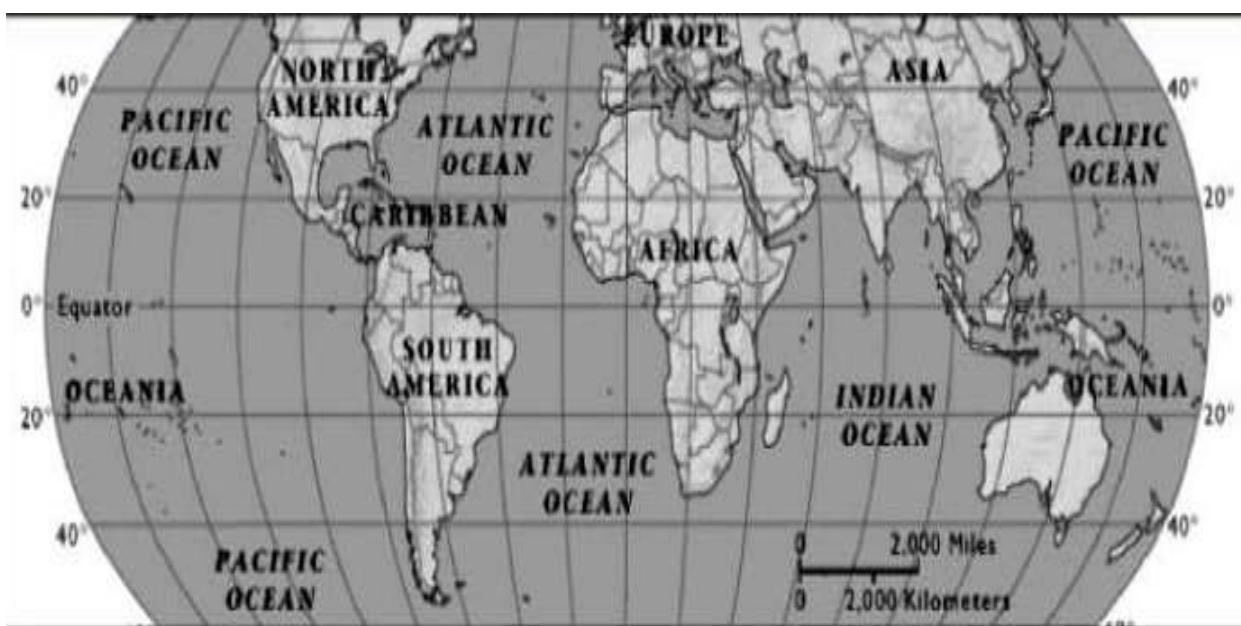
I. NGUỒN GỐC, PHÂN BỐ VÀ ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC

1.1. Nguồn gốc, phân bố

Thanh hao hoa vàng là cây bản địa của các vùng Đông và Bắc Mỹ (Ontario, New Hampshire, Virginia, Tennessee, Kansas và Arkansas). Từ miền trung đến tận miền nam Châu Âu (Anh, Ý, Bungari, Tiệp Khắc, Pháp, Đức, Rumani và Liên Xô cũ) và gần như trên toàn bộ lãnh thổ châu Á (Afghanistan, Trung Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản, Triều Tiên, Mông Cổ và Xibia) (Hiroshi Kawamoto và cộng sự, 1999)[19]. Nhưng thanh hao mọc tập trung và nhiều nhất là ở Trung Quốc, Trung Á và Việt Nam (Phạm Mạnh Kiên, Đinh Huỳnh Kiệt, 1995)[22].

Ở Việt Nam, cây thanh hao chính thức được nhà thực vật học người Pháp phát hiện và mô tả năm 1922, ngoài tên khoa học là *Artemisia annua* L., thanh hao hoa vàng còn có các tên khác như thanh hao, ngải hoa vàng, bù hao, hoàng hoa cao, ... Thanh hao được phân bố ở nước ta gồm các tỉnh: Lạng Sơn (10 huyện), Cao Bằng (7 huyện), Bắc Giang (3 huyện), Quảng Ninh (3 huyện), Bắc Cạn (2 huyện) và Hải Dương (1 huyện). (Nguyễn Thượng Đông, 1995)[3].

Hình 1: Sự phân bố của cây thanh hao trên thế giới



1.2. Đặc điểm thực vật học.

1.2.1. Rễ cây Thanh hao

Rễ thanh hao thuộc loại rễ cọc, rễ chính to và dài hơn các rễ phụ khác nhưng phát triển không cân đối với phần trên mặt đất.

Giai đoạn từ mọc mầm đến trước khi cây phân nhánh rễ thanh hao hầu như chỉ có một rễ chính. Khi rễ chính kéo dài được khoảng 10 - 15 cm thì rễ bên phát triển. Trung bình mỗi cây thanh hao có từ 150 - 170 rễ. Rễ thanh hao phân bố tập trung ở tầng đất từ 30 - 40 cm, rất ít ra rễ sâu tới 50cm. Do vậy thanh hao chịu hạn kém, dễ bị nghiêng, đổ khi gặp gió bão (Nguyễn Văn Thuận, 2001)[1].

1.2.2. Thân cây Thanh hao

Thanh hao là cây thân thảo, hoá gỗ. Thời gian sinh trưởng từ khi hạt nảy mầm đến khi cây bắt đầu ra nụ là cây thân thảo. Thời gian phát triển từ lúc cây hình thành nụ, nở hoa, thụ phấn, đậu hạt cho đến lúc hạt chín là cây thân gỗ. Cây cao trung bình từ 1,5 đến 3,0 m. Cây gồm 1 thân chính và rất nhiều cành cấp I, cấp II, cấp III. Thân cây có hình trụ nhưng phần vỏ cây lại có nhiều đường gờ và rãnh chạy dọc thân nên nhìn bề ngoài cây có hình đa giác. Lớp vỏ ngoài của thân cây ở thời kỳ sinh trưởng có độ dày chiếm khoảng 25% - 35% đường kính thân cây. Khi cây chuyển sang thời kỳ phát triển, lớp vỏ mỏng dần và cuối cùng chỉ còn là lớp vỏ rất mỏng bọc bên ngoài thân cây, lớp vỏ này có thể tạo thành sợi xơ, khá bền chắc. Theo sự mỏng dần, xơ hoá của lớp vỏ, phần gỗ của lõi cây càng to dần và hoá gỗ cứng chắc. Đến cuối thời kỳ phát triển cây thanh hao đã trở thành hoá gỗ hoàn toàn. Thông thường mỗi cây có từ 20 - 120 cành cấp I, 240 - 250 cành cấp II. Cành phân bố đều ra bốn phía. Trên thân chính, cành cấp I, cành cấp II và cấp III đều mang lá.

Thân cây Thanh hao thường có màu xanh, tím nhạt đến tím thẫm. Tỷ lệ cây màu xanh thường chiếm trên 80% quần thể. Dạng thân màu tím thường có thời gian sinh trưởng ngắn hơn, năng suất lá xanh thấp hơn còn hàm lượng *Artemisinin* là tương đương. Khả năng chống chịu sâu bệnh, đổ lopp thì cây thân tím hơn hẳn cây thân xanh (Nguyễn Văn Thuận, 2001)[1].