

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	6
MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI:.....	7
PHẦN 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	8
1.1. Các tác nhân gây đột biến.	9
1.1.1.1. Tác nhân hóa học:	9
1.1.1.2. Tác nhân vật lý:.....	10
1.2. Các phương thức sàng lọc đột biến	11
1.2.1. Bản chất các loại bức xạ chính sử dụng và tác động của chúng đến vật chất và vật liệu.	12
1.3. Phương pháp xác định liều chiếu xạ được sử dụng để sản sinh các thể đột biến.....	15
1.4. Các thành tựu về chọn tạo giống bức xạ.....	17
1.5. Kết hợp công nghệ nuôi cấy mô tế bào và công nghệ chiếu trong công tác đột biến giống cây trồng	19
1.6.2. Các phương pháp đánh giá đa dạng di truyền.....	20
1.6.2.1. Các phương pháp làm sản sinh các đặc trưng nhận diện đặc điểm di truyền.....	21
1.6.2.1.1. Các phương pháp sử dụng các chỉ thị hình thái [8]	21
1.6.2.1.2. Phương pháp sử dụng các chỉ thị protein và Allozyme	21
1.6.2.1.3. Phương pháp sử dụng chỉ thị sinh học phân tử dựa trên DNA (đặc trưng nhận dạng DNA – DNA fingerprinting) [2] [7] [11].....	21
1.6.2.1. Các phương pháp và tiêu chí đánh giá đa dạng di truyền quần thể	25
PHẦN 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
2.1 Đối tượng nghiên cứu	28
Bảng 2.1: Đặc điểm hình thái của 6 thể đột biến tiềm năng so với các chủng đối chứng của chúng.....	28
2.2 Phương pháp nghiên cứu	30
2.2.1 Quy trình vào mẫu các thể đột biến tiềm năng:.....	30

2.2.2 Trồng thể nghiệm và xác định sự ổn định về mặt hình thái các thể đột biến tiềm năng	31
2.2.3..Đánh giá sự đa dạng di truyền các dòng cúc đột biến tiềm năng nhận được trên đồng ruộng ở mức phân tử.....	33
2.2.4.....Đánh giá sự ổn định di truyền các dòng cúc đột biến tiềm năng qua các thế hệ vi nhân giống.....	37
PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	38
3.1.....Kết quả nhân các thể đột biến qua sàng lọc trên đồng ruộng (M1V0) bằng phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	38
3.1.1.....<i>Nhân nhanh chôi (M1V1- M1V2- M1V3)</i> và tái sinh thành cây hoàn chỉnh	38
3.1.2 Kết quả xác định tính phân li trong lần trồng thử nghiệm đầu tiên các thể đột biến tiềm năng	39
3.2Kết quả về đánh giá đa dạng di truyền các thể đột biến tiềm năng tạo ra thông qua chiếu xạ gamma.....	43
3.3Kết quả về đánh giá tính ổn định di truyền các thể đột biến tiềm năng tạo ra thông qua chiếu xạ gamma	51
PHẦN 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	57
4.1. Kết luận.....	57
4.2 Kiến nghị.....	57
Tài liệu tiếng Việt.....	59
Tài liệu tiếng nước ngoài	59
PHỤ LỤC.....	65
PHỤ LỤC 1.....	65

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Đặc điểm hình thái của 6 thể đột biến tiềm năng so với các chủng đối chứng của chúng.....	28
Bảng 2.2. Tên và trình tự các mồi RAPD	35
Bảng 3.1. Kết quả vào mẫu cánh hoa của các thể đột biến tiềm năng.....	38
Bảng 3.2. Hệ số nhân <i>in vitro</i> của 06 dòng đột biến tiềm năng (M1V1) cùng với đối chứng tương ứng của chúng.....	39
Bảng 3.3. Tỷ lệ sống của cây con từ các dòng đột biến thuộc thể hệ M1V3....	40
Bảng 3.4. Đặc điểm hình thái của 6 thể đột biến tiềm năng so với các chủng đối chứng của chúng	41
Bảng 3.5. Ghi nhận về sự xuất hiện, vắng mặt đặc biệt của các band DNA	47
Bảng 3.6. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu thuộc hai giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng.....	48
Bảng 3.7. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu thuộc hai giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng.....	52

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Sơ đồ sàng lọc đột biến toàn bộ các cá thể và sàng lọc hai chiều.....	10
Hình 1.2: Tác động của các bức xạ.....	13
Hình 3.1: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi BIO 27.....	46
Hình 3.2: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPA 02.....	46
Hình 3.3: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPA 06.....	46
Hình 3.4: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPC 02.....	47
Hình 3.5: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi UBC 728.....	47
Hình 3.6: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPA 18, OPA 15.....	48
Hình 3.7: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi S201, S208.....	48
Hình 3.8: Sơ đồ dạng cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống và các thể đột biến tiềm năng từ chúng.....	52
Hình 3.9: Sơ đồ dạng cây về tính ổn định di truyền qua các thế hệ <i>in vitro</i> của các thể đột biến tiềm năng và các giống gốc của chúng.....	58

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

FAO	Tổ chức quốc tế về nông nghiệp và thực phẩm
IAEA	Viện năng lượng nguyên tử quốc tế
LD ₅₀	Liều gây chết 50 %
LD ₁₀₀	Liều gây chết 100 %
PCR	Polymerase Chain Reaction.
NLNTVN	Năng Lượng Nguyên Tử Việt Nam.
PTN	Phòng Thí Nghiệm.
ĐC	Đối chứng
E	Kí hiệu giống Farm tím
E (a-b-c)	Kí hiệu giống Farm tím M1V3-M1V5-M1V7
I	Kí hiệu giống đóa đồng
I (a-b-c)	Kí hiệu giống Đóa đồng M1V3-M1V5-M1V7
M1V1,M1V2,M1V3	Nhân nhanh đợt 1, đợt 2, đợt 3
BAP	6-benzylaminopurine
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
MS	Môi trường Murashige và Skoog (1962)
bp	Base pair
Kb	Kilo base
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acide
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unit
TBE	Tris-borid-EDTA

MỞ ĐẦU

Từ đầu thế kỷ 20, phương pháp đột biến nhân tạo nhằm tạo ra nguồn biến dị phục vụ cho công tác lai hoặc chọn lọc trực tiếp các cá thể đột biến tiềm năng đã được tiến hành ở các viện nghiên cứu nông nghiệp trong nước cũng như các viện nghiên cứu của Viện năng lượng nguyên tử Việt Nam nói riêng và trên thế giới nói chung và đã đạt nhiều thành tựu đáng kể, góp phần đảm bảo an ninh lương thực và phục vụ thiết thực cho nhu cầu nhiều mặt của nhân loại.

Sự gây tạo đột biến có thể làm tăng biến dị di truyền, đa dạng hóa vật liệu chọn giống và có khả năng làm phát sinh những tính trạng quý hiếm mới không có sẵn ở đối tượng nghiên cứu phục vụ lợi ích khác nhau của con người. Trong một số trường hợp, phương pháp gây tạo đột biến có thể cải tiến một hoặc một số tính trạng mà không làm ảnh hưởng đến những tính trạng khác của cây. Những giống đột biến được trồng và khai thác thương phẩm ở 50 nước khác nhau trên thế giới, chủ yếu thuộc các nước Trung Quốc, Ấn Độ, Hà Lan, Nhật và Mỹ. Tính đến năm 2010, trên thế giới có 3100 giống cây thuộc 170 loài được tạo ra bằng phương pháp gây đột biến với sự tham gia của 160 quốc gia và vùng lãnh thổ, trong đó tạo giống bức xạ chiếm 89% lượng giống trồng; trong đó hoa, cây cảnh và cây trang trí chiếm hơn 700 giống. [5, 6]

Chương trình liên kết FAO/IAEA về cây lương thực và nông nghiệp hiện nay mỗi năm đầu tư 20 triệu Euro để thực hiện 140 Dự án quốc gia và khu vực, thu hút trên 400 Viện và Trạm thực nghiệm tham gia nghiên cứu phối hợp trong Chương trình nông nghiệp hạt nhân. Hầu hết các nước trong khu vực ASEAN đều đã thành lập các trung tâm ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong nông nghiệp.

Góp phần xây dựng hướng chọn tạo giống bức xạ của Trung tâm Ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong công nghiệp, tập dượt và trang bị các kiến thức, tích lũy các kinh nghiệm trong công tác chọn giống bức xạ về sau trên các mảng công việc: chuẩn bị vật liệu, chiếu xạ để sản sinh đột biến, nhân giống, sàng lọc đột biến, nhận dạng đột biến ở mức độ hình thái và phân tử..., chúng tôi tiến hành đăng ký và triển khai nhiệm vụ cấp cơ sở: **“Bước đầu đánh giá tính đa dạng di truyền, tính ổn định các thể đột biến tiềm năng từ hai dòng cúc “Đóa đồng” và “Farm tím” thông qua chiếu xạ gamma”**. Trong pha thứ nhất của đề tài, nhóm nghiên cứu đã tiến hành việc thu thập, chuẩn bị vật liệu nghiên cứu, nhân giống tạo vật liệu hạt nhân tạo *in vitro* làm vật liệu cho chiếu xạ, xác định LD₅₀ bằng thực nghiệm, thông qua đó xác định liều chiếu hiệu quả phù hợp với điều kiện thực tiễn về trang thiết bị, nhân lực. Thông qua việc sàng lọc đột biến trên đồng ruộng đã thu thập được các thể đột biến kiểu hình, từ đó chọn ra được các đột biến kiểu hình tiềm năng đưa vào nhân giống làm vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Các kết quả đạt được trong giai đoạn thứ nhất của đề tài đã đáp ứng được mục tiêu, tiến độ đăng ký, sản phẩm trung gian của toàn bộ đề tài. Những kết quả này cũng chính là cơ sở để triển khai tiếp giai đoạn hai.

MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI:

Tạo được vật liệu và xây dựng cơ sở cho việc chọn tạo giống hoa mới.

Mục tiêu cụ thể:

1. Có được các thể đột biến tiềm năng được nhận dạng và đánh giá ổn định di truyền làm nguồn vật liệu phục vụ cho công tác chọn tạo giống hoa nhằm đáp ứng cho nhu cầu sản xuất và thị trường. Góp phần vào công tác nội địa hóa việc chọn tạo giống.
2. Thông qua quá trình thực hiện đề tài, đội ngũ cán bộ khoa học được đào tạo, nâng cao về trình độ chuyên môn, nghiệp vụ; Góp phần hoàn thiện phương pháp, kỹ năng chọn tạo giống

THỜI GIAN THỰC HIỆN: 2 NĂM (2012-2013)

NỘI DUNG THỰC HIỆN TRONG NĂM THỨ NHẤT 2012:

- **Nội dung 1:** Tạo nguồn mẫu *in vitro* hai giống cúc Đóa Đồng và Farm Tím, ứng dụng kỹ thuật tạo hạt nhân tạo để tạo vật liệu ban đầu cho việc chiếu xạ.
- **Nội dung 2:** Thực nghiệm xác định LD₅₀, thiết kế và triển khai thí nghiệm chiếu xạ hạt nhân tạo bằng tia Gamma nguồn ⁶⁰Co
- **Nội dung 3:** Tạo cây con *in vitro* từ vật liệu qua chiếu xạ
- **Nội dung 4:** Trồng khảo nghiệm đồng ruộng với quy mô nhỏ để chọn ra các thể mang kiểu hình đột biến, sàng lọc các thể đột biến tiềm năng.

NỘI DUNG THỰC HIỆN TRONG NĂM THỨ HAI 2013:

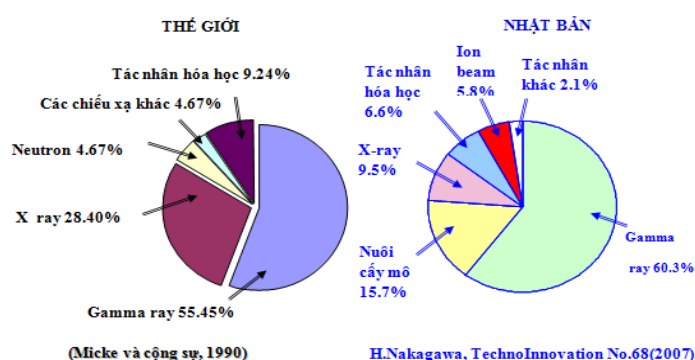
- **Nội dung 1:** Nhân dòng thể đột biến tiềm năng (tiếp tục)
- **Nội dung 2:** Trồng thể nghiệm các thể đột biến tiềm năng
- **Nội dung 3:** Nghiên cứu đánh giá sự đa dạng di truyền của các dòng cúc đột biến tiềm năng so với giống gốc, đánh giá tính ổn định di truyền của các dòng đột biến tiềm năng *in vitro* ở mức độ phân tử bằng kỹ thuật RAPD

➤ PHẦN 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan chung về lĩnh vực chọn tạo giống đột biến thực vật

Từ lâu, gây đột biến thực nghiệm để làm vật liệu khởi đầu cho chọn giống đã được coi là một trong những kỹ thuật ứng dụng cao trong nông nghiệp. Phương pháp gây đột biến được biết đến vào năm 1925 khi Natxon và Philippop phát hiện rằng tia Roentgen có khả năng gây ra biến dị di truyền ở nấm Hạ Đẳng. Đến năm 1926 - 1928, với các nghiên cứu của Muller trên ruồi dấm, Stadler trên lúa mạch,... di truyền học phóng xạ đã trở thành nền tảng cho sự ra đời ngành chọn giống đột biến phóng xạ. Năm 1946, Auerbach và Robson phát hiện vài hợp chất có thể gây đột biến, sau đó, ngày càng nhiều hóa chất được tìm thấy có khả năng làm tăng tần số đột biến. Nhưng đến nay, phương pháp sử dụng hóa chất gây đột biến bị hạn chế vì độc hại và có nguy cơ gây ung thư cao.

Ứng dụng các phương pháp gây tạo đột biến nhân tạo bằng nguồn bức xạ tia Gamma tạo được khoảng 55,45% lượng giống đột biến, trong khi đó dùng Ion beam chỉ tạo được 5% lượng giống đột biến, bằng tia X là 28,4%, bằng hóa chất là 9,24% và bằng các bức xạ khác là 4,67%. Bên cạnh đó, ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào để tạo nguồn nguyên liệu chiếu xạ ban đầu đã góp phần giúp giảm thời gian, công sức và chi phí vì thông qua các cơ chế tái sinh cây *in vitro* do tính toàn thể (totipotency) mà thể đột biến “thuần” (solid mutant, sau khi tách khảm hoàn toàn) [phỏng theo Novak, 1990] có thể được tái tạo ngay trong lòng sector đột biến; thông qua cơ chế ức chế ưu thế đỉnh, thúc đẩy sự sinh trưởng chồi bên mà kích thước của sector đột biến tăng nhanh chóng làm sớm lộ diện thể đột biến thuần; mẫu nguyên liệu *in vitro* luôn có kích thước rất nhỏ bé tạo thuận lợi trong xử lý chiếu xạ cũng như trong việc tăng cao độ nhạy cảm phóng xạ. [1, 2, 3, 4]



Biểu đồ 1.1: Đóng góp của các tác nhân gây đột biến vào thành tựu của công tác chọn tạo giống.

Ở Việt Nam, lĩnh vực này đã được cố giáo sư Lương Định Của khởi xướng từ những năm 1960. Nhưng mãi đến năm 1980, hướng nghiên cứu này mới được phát

triển một cách tương đối có hệ thống và định hướng do cố tiến sĩ Phan Phải và cộng sự tiến hành.

Để nhận thức rõ hơn về chọn tạo giống đột biến, ta có một số khái niệm liên quan sau: [13, 15]

- Hiện tượng đột biến (mutation): là một thay đổi đặc tính một cách bất thường và đột ngột trong gene hay nhiễm sắc thể có khả năng di truyền của một cơ thể sinh vật không do hiện tượng phân ly hay tái tổ hợp tự nhiên.

- Thay đổi do đột biến (mutated): Các gene hay cấu trúc nhiễm sắc thể bị thay đổi.

- Thể đột biến (mutant): một cơ thể sinh vật mới mang gene đột biến hay các nhiễm sắc thể được sắp xếp lại.

- Đột biến tự nhiên (Spontaneous mutation): là hiện tượng đột biến do các yếu tố tự nhiên trong môi trường sống (tia bức xạ mặt trời, tia cực tím, các sản phẩm do phản ứng hóa học trong tự nhiên, đột biến tự phát trong nội bào và mô như các rối loạn của quá trình sao chép DNA...).

- Đột biến nhân tạo (Artificia/Intentional mutation): là hiện tượng đột biến thực nghiệm do con người chủ định tạo ra dưới tác động của các tác nhân vật lý và hóa học.

- Chọn giống đột biến (mutation breeding): việc cải thiện di truyền đặc điểm cây trồng ở một hay nhiều tính trạng khác nhau thông qua sử dụng các thể đột biến được tạo ra.

1.1.1. Các tác nhân gây đột biến.

Đột biến có thể xảy ra ở mọi cơ quan, mọi thời kỳ sinh trưởng của cây trồng, theo nhiều hướng khác nhau và tần số xuất hiện cũng khác nhau, đột biến có thể xảy ra bất cứ lúc nào do những thay đổi nội tại trong cấu trúc vật chất di truyền, do môi trường thay đổi đột ngột cũng như những tác động vật lý, hóa học... của con người. Đột biến thường có hại là gây dị dạng, gây chết... nhưng cũng xuất hiện dạng có lợi như năng suất cao, chống chịu tốt với điều kiện môi trường, xuất hiện các tính trạng mới, khắc phục các nhược điểm của giống vật liệu khởi đầu.[2,7,15]

Trong tự nhiên đột biến luôn xảy ra nhưng lại xảy ra với tần số thấp, chỉ ở mức 1/10.000.000 đến 1/10.000. Do vậy, việc tạo đột biến nhân tạo tỏ ra có hiệu quả và được sử dụng rộng rãi trong công tác chọn tạo giống. Các tác nhân được sử dụng trong tạo đột biến nhân tạo: tác nhân vật lý (bức xạ ion hóa, bức xạ không ion hóa), sốc nhiệt, tác nhân hóa học. [19]

1.1.1.1. Tác nhân hóa học:

Số lượng các chất hóa học gây đột biến là rất nhiều và số lượng các chất như vậy được phát hiện ngày càng nhiều. Tuy nhiên, trong thực tế công tác chọn tạo giống đột biến ở cây trồng chỉ một số ít được sử dụng và tỏ ra hữu ích, hầu hết trong số đó thuộc về nhóm alky hóa như: ethyl methane sulphonate (EMS), diethyl sulfate (DES),

ethyleimine (EI), ethyl nitroso urethane (ENU), dimethyl sulfate (DMS), ethyl nitroso urea (ENH), methyl nitroso urea (MNH)... [13, 15]

Các tác nhân hóa học sẽ tạo sai hỏng khi sao chép: các chất đồng đẳng của base (bromouracil, 2-amino purine...) gắn vào sai khi sao chép. Các chất màu acridine có thể gắn vào giữa các base của mạch xoắn kép làm mất hay thêm vào một base. Các chất hóa học sẽ tác động trực tiếp lên gene khi không có các sao chép có thể gây đột biến điểm hay các biến đổi A-T thành G-C hoặc G-C thành A-T. [24]

1.1.1.2. Tác nhân vật lý:

Các tác nhân vật lý có thể tác động làm thay đổi cấu trúc DNA, nhiễm sắc thể một cách hiệu quả so với các nhân tố hóa học là điều đã được chứng minh thông qua lịch sử chọn tạo giống đột biến. Các tác nhân vật lý bao gồm:

- Việc gây sốc nhiệt
- Bức xạ đột biến gây ra bức xạ ion hóa các cặp base có chứa nitơ trong chuỗi DNA xảy ra trong quá trình sinh tổng hợp DNA có khả năng gây ra các đột biến.[13]
- Tia Gamma: Tia Gamma có bước sóng ngắn hơn và do vậy có mức năng lượng photon cao hơn tia X. Khác với tia X, tia Gamma được tạo ra từ các đồng vị phóng xạ. [3,13,19]
- Tia cực tím (UV): Có khả năng xuyên thấu vật chất rất giới hạn, vì thế chúng chỉ được sử dụng một cách hạn chế để xử lý các vật liệu có kích thước nhỏ như bào tử, hạt phấn, các tế bào hạt và nuôi cấy tế bào. Bước sóng trong khoảng 10 – 400nm mang lại ảnh hưởng về mặt sinh học cao nhất bởi đây là vùng hấp thụ ánh sáng cao nhất của các acid nucleic. [2,7,13]
- Tia neutron: Chùm tia neutron chậm và nhanh từ việc phân hạch hạt nhân Uranium trong các lò phản ứng hạt nhân cũng có thể được sử dụng để chiếu xạ gây đột biến ở vật liệu thực vật. [2,13]
- Chùm electron: Hình thành từ các máy gia tốc điện tử, phương pháp này bị hạn chế và cấm sử dụng trong việc chiếu xạ tạo đột biến để đảm bảo tính an toàn cho người vận hành thiết bị. [6]
- Chùm ion: Chùm ion được tạo ra từ các máy gia tốc mang một năng lượng lớn với mức năng lượng cao truyền qua vị trí các mô. Do đó, có thể trông đợi những ảnh hưởng sinh học khác biệt của vật liệu thực vật so với các loại bức xạ có mức năng lượng truyền qua thấp như tia X, tia Gamma. [13]

Tuy có nhiều loại bức xạ có thể được áp dụng trong chọn tạo giống đột biến nhưng tại các quốc gia phát triển mạnh về công nghệ chiếu xạ gây đột biến trên thế giới như Nhật, Ấn Độ, Mỹ... có những tổ chức tiến hành việc nghiên cứu này một cách quy mô, chuyên nghiệp và bài bản thì hai loại bức xạ chính là tia Gamma và chùm ion hiện đang sử dụng. [5, 6]

Trong phạm vi đề tài này, loại bức xạ được sử dụng để sản sinh đột biến trên đối tượng nghiên cứu là tia Gamma trên hệ thiết bị buồng Gamma

1.1.2. Các phương thức sàng lọc đột biến

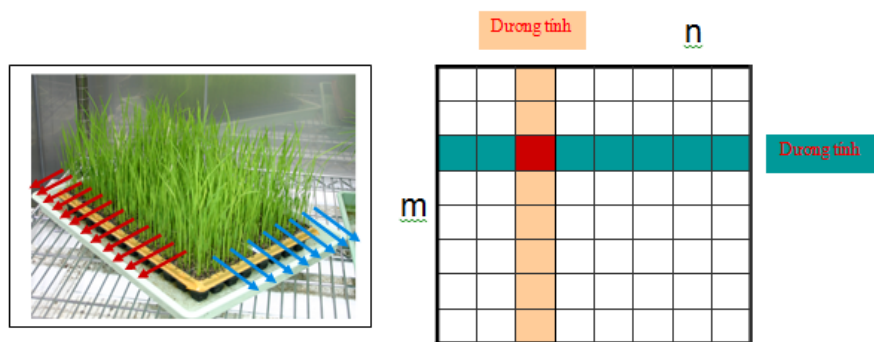
Như đã biết, tần suất các đột biến phụ thuộc vào chủng loại, liều lượng, cường độ xử lý bằng các tác nhân gây đột biến và bản thân loài của mẫu chiếu. Vì vậy đối với việc tạo giống thì tần suất thu nhận đột biến có ích dao động trong một dải khá lớn, có thể từ 0,05 % - 5% . [14]

Điều kiện tiên quyết để nhận dạng, xác định thể đột biến là so sánh với thí nghiệm đối chứng hay chủng quần thể tự nhiên về các tính trạng hữu ích được quan tâm.

Đối với từng mục tiêu riêng, trên một đối tượng nhất định nào đó, nhà chọn giống cần xác định rõ chỉ tiêu cần theo dõi, đo đạc và mô tả riêng cho quy trình chọn giống. Có thể chia việc sàng lọc đột biến tùy theo mục tiêu sàng lọc đột biến như sau:

- Sàng lọc đột biến để nghiên cứu về tính nhạy cảm bức xạ của giống: trong thực tế thì công việc này chiếm tỷ lệ công việc không lớn, mục tiêu này nhằm xác định mức độ thay đổi về DNA và cả kiểu hình dưới tác động của bức xạ. Tính nhạy cảm đó được chứng minh là phụ thuộc vào hai yếu tố đều thuộc về bản chất loài: quyết định bởi gene quy định tính nhạy cảm và tính bền vững của bộ gene (tính bền vững do cấu trúc và phân bố gene trên nhiễm sắc thể và tính bền vững của bộ máy tự sửa chữa các sai lệch di truyền). [6]

- Tuy mục đích, kiểu tính trạng quan tâm và đối tượng nghiên cứu mà việc quan sát và ghi nhận đột biến có thể thực hiện trên toàn bộ các cá thể thí nghiệm hay nhóm cá thể (sàng lọc hai chiều -2 dimension screening) để tiết kiệm thời gian và công sức. Có thể hình dung hai hình thức sàng lọc đột biến thông qua ví dụ về sàng lọc để chọn giống lúa được tiến hành tại Viện bức xạ tạo giống Nhật Bản (Institute of Radiation Breeding) như sau:



Hình 1.1 Sơ đồ sàng lọc đột biến toàn bộ các cá thể và sàng lọc hai chiều

Tổng số mẫu bố trí thí nghiệm: $(m \times n) = 64$ mẫu, ví dụ có một thể đột biến mang tính trạng quan tâm thì việc tìm ra chúng có thể tiến hành theo hai cách sau: bằng cách sàng lọc toàn bộ cá thể, cần khảo sát cả 64 mẫu riêng rẽ, nghĩa là cần đến 64 lần khảo sát, trong khi sử dụng cách sàng lọc hai chiều, việc khảo sát được thực hiện trên n nhóm bề dọc và m nhóm bề ngang, số lần khảo sát cần thực hiện là $(m+n) = 16$ lần.[16,18,19]

Trong các chương trình chọn giống, khi tính trạng quan tâm thuộc về hình thái có thể quan sát bằng mắt hay dựa vào năng suất, hàm lượng hoạt chất đã biết nhà chọn giống thường ưu tiên sử dụng phương pháp khảo sát toàn bộ các cá thể, phương pháp sàng lọc hai chiều được sử dụng nhiều cho các tính trạng liên quan đến hoạt chất lạ khi việc sàng lọc được thực hiện bằng kỹ thuật sinh học phân tử. [19]

Tùy vào đối tượng nghiên cứu là cây hữu tính hay vô tính mà quá trình sàng lọc đột biến khác nhau. Đối với các giống cây trồng sinh sản hoặc được nhân giống vô tính, các tính trạng đột biến quan tâm có thể bộc lộ ngay trong lần trồng thể nghiệm đầu tiên, tuy nhiên việc nhân giống *in vitro*, *in vivo* và trồng thể nghiệm các lần tiếp theo cũng có thể thu nhận được các thể đột biến khác do hiện tượng các thể khảm tiếp tục được tách và thể hiện tính trạng. Đối với các giống cây trồng sinh sản hay nhân giống hữu tính, việc nhân giống thường được điều khiển theo chiều hướng tự thụ để các thể đột biến đồng hợp lặn có thể được thể hiện ra kiểu hình, do vậy đối với cây trồng loại này thì việc thu nhận, chọn đột biến thường được tiến hành ở thế hệ thứ hai, thứ ba hay thứ tư. Chính việc phân tích tầng số xuất hiện kiểu hình đồng hợp lặn qua các thế hệ còn giúp cho nhà chọn giống có cơ sở đánh giá về quy luật di truyền của tính trạng quan tâm. [5, 6, 14]

Trong thực tiễn chọn giống, thường hay xuất hiện các thể đột biến khảm về tính trạng nào đó. Để tách dòng tế bào khảm ra riêng phục vụ cho chọn giống thì nuôi cấy *in vitro* là một phương pháp hiệu quả, bên cạnh đó việc kích thích (bằng cách cắt ngọn, chiếu xạ...) để làm phát sinh và tái cấu trúc đỉnh sinh trưởng chồi bất định, chồi nách để thu nhận các vật liệu đột biến thuần (không khảm) hay ổn định cấu trúc đỉnh sinh trưởng có lợi (các thể khảm periclinal trong chọn giống hoa, cây cảnh) cũng là một cách làm mang lại hiệu quả cao. Ví dụ, tại Viện bức xạ tạo giống Nhật Bản, đối với thể đột biến hoa cúc khảm màu sắc cánh hoa, các cánh hoa có màu khác nhau được tách riêng và nuôi cấy *in vitro* (vài thế hệ) để tách thành dòng tế bào thuần, từ đó tái sinh thành các cá thể mang đặc điểm mong muốn. [8,17]

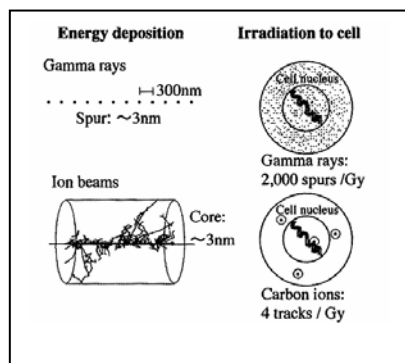
1.2. Chọn tạo giống bức xạ (Radiation breeding)

1.2.1. Bản chất các loại bức xạ chính sử dụng và tác động của chúng đến vật chất và vật liệu.

1.2.1.1. Bản chất các loại bức xạ chính:

Các loại bức xạ thường được sử dụng trong chiếu xạ vật liệu thực vật là: chùm tia ion (ion beam), tia X (X ray), tia Gamma (Gamma ray).

Gamma ray và X ray mang hai bản chất sóng và hạt không mang điện nên khi tương tác với vật chất, chúng ít bị mất năng lượng còn các loại Ion beam thì có bản chất của hạt mang điện nên mất năng lượng nhanh khi tương tác với vật chất. Có thể hình dung tác động của các bức xạ có mức năng lượng truyền qua cao và thấp thông qua sơ đồ sau: [18, 19]



Hình 1.2 Tác động của các bức xạ

Qua đó cho thấy sự xuyên thấu qua vật chất của Gamma ray, X ray là tốt hơn Ion beam. Do vậy, khi ứng dụng trong chiếu xạ tạo đột biến cần tính toán kích thước mẫu chiếu cũng như cấu trúc của những phần bảo vệ bao quanh khu vực cần tác động của bức xạ như vỏ cây, lá che phủ đỉnh sinh trưởng, vách cellulose của tế bào để việc chiếu xạ đạt hiệu quả mong muốn. [19]

1.2.1.2. Tác động của bức xạ ion hóa lên thực vật

Mức độ nhạy cảm phóng xạ của một bậc phân loại thực vật nào phụ thuộc vào đặc điểm di truyền của nó, được kiểm soát bởi gene hay các gene. Theo đó, có một số chủng nông nghiệp của cùng một loài thể hiện mức độ nhạy cảm với phóng xạ khác nhau. Cho dù sự nhạy cảm của mẫu chiếu khác nhau đối với liều chiếu và cường độ chiếu xạ là khác nhau, cũng có những nguyên lý chung về tương quan hiệu quả gây đột biến, liều chiếu và cường độ chiếu xạ như sau: [6, 11, 22]

- Thực vật càng nhạy cảm với phóng xạ thì càng có nhiều thay đổi kiểu hình khi được áp dụng cùng một liều/suất liều chiếu xạ và càng có nhiều cơ hội để sàng lọc các thể đột biến.
 - Các phương thức chiếu xạ khác nhau có các ảnh hưởng khác nhau trên cùng một loại vật liệu thực vật. Đối với cùng một liều chiếu hay cùng một loại bức xạ, hiệu ứng các tác động bức xạ phụ thuộc vào suất liều, LET và bản chất của loại bức xạ.
 - Các vật liệu đang có sự trao đổi chất mạnh thường nhạy cảm phóng xạ hơn các vật liệu đang có mức độ trao đổi chất yếu. Ví dụ, hạt giống khô là kém nhạy cảm phóng xạ hơn hạt giống trương sấp nảy mầm.
 - Với cùng một chủng loại vật liệu, các vật liệu non thường nhạy cảm hơn vật liệu trưởng thành. Ví dụ: cành khác với chồi.
 - Liều chiếu càng cao thì số lượng đột biến tạo ra, khả năng thương tổn của tế bào hay mô càng lớn nhưng kèm theo đó là khả năng sống của mẫu chiếu càng thấp hay nói cách khác là tỷ lệ chọn lọc được thể đột biến tồn tại được trên tổng đột biến tạo ra là thấp.

- Cường độ chiếu càng lớn thì khả năng gây thương tổn càng cao DNA và khả năng sửa chữa thấp đi.
- Hệ thống di truyền của mỗi taxon thực vật là khác nhau, có mức độ ổn định khác nhau và có tính nhạy cảm với bức xạ khác nhau. Do đó không thể áp dụng một chuẩn chung nào đó cho tất cả các taxon khi tiến hành chiếu xạ đột biến. Có chăng chỉ là những đánh giá chung để tiến hành thực nghiệm đối với nhóm thực vật nào đó với từng loại vật liệu chiếu xạ (mô, hạt, cây...).

Hiệu ứng của bức xạ ion hóa lên thành phần cấu tạo của DNA:

DNA là vật liệu di truyền quan trọng, có hai chức năng cơ bản trong hóa sinh tế bào: một mặt DNA đảm bảo việc chuyển các thông tin di truyền một cách chính xác cho thế hệ sau trong quá trình phân bào của tế bào. Mặt khác, những thông tin chứa đựng trong phân tử DNA xác định bản chất và thuộc tính chức năng của tất cả các protein được tổng hợp trong tế bào [3]. Nếu một tế bào tiếp xúc với bức xạ, xác suất để bức xạ tương tác ảnh hưởng đến phân tử DNA là rất nhỏ. Tuy nhiên, mỗi tế bào, giống như là một cơ thể con người, chủ yếu có nước. Vì vậy, có một xác suất cao hơn của bức xạ tương tác với các phân tử nước, vì nước chiếm hầu hết khối lượng của tế bào. Khi bức xạ tương tác với nước, nó có thể phá vỡ các liên kết giữa các phân tử nước với nhau, sản sinh ra các phân tử như hydro (H) và hydroxyls (OH). Những mảnh vỡ có thể tái kết hợp hoặc có thể tương tác với nhau hoặc các ion khác để tạo thành hợp chất, chẳng hạn như nước, mà không làm hại các tế bào. Tuy nhiên, chúng có thể kết hợp để tạo thành các chất độc hại, chẳng hạn như hydrogen peroxide (H_2O_2), có thể góp phần vào sự hủy diệt của tế bào. Không phải tất cả các tế bào sống đều nhạy cảm với bức xạ. Những tế bào đang trong quá trình sao chép có nhiều nhạy cảm hơn so với những tế bào không sao chép. Điều này là bởi vì các tế bào phân chia yêu cầu thông tin DNA chính xác để cho các tế bào con của tế bào tồn tại.[28]

Tác động lên cấu trúc bậc hai của DNA:

Việc đứt các liên kết hydro của cấu trúc DNA bị chiếu xạ là một hiện tượng rất quan trọng vì hiệu suất tiếp nhận phóng xạ cao. Song song với việc thay đổi cấu trúc bậc một, có 3 tác động lên cấu trúc bậc 2 của DNA là:

- Hiện tượng cắt mạch (degradation): cắt đứt hai mạch của phân tử DNA và tạo thành các đoạn DNA có kích thước nhỏ hơn.
- Hiện tượng biến tính (denaturation): đứt các liên kết hydro hoặc các liên kết photphodiester.
- Hiện tượng khâu mạch (cross linking): chuỗi đa nucleotide dính với nhau bằng các liên kết hóa học và không tách ra được. Khi chiếu xạ ion hóa trên dung dịch DNA thoát đầu các nhà nghiên cứu thấy có hiện tượng giảm trọng lượng phân tử thể hiện qua việc giảm độ nhớt của dung dịch, nhưng nếu

tiếp tục tăng liều chiếu thì trọng lượng phân tử tăng lên và tạo thành các dạng gel không hòa tan do hiện tượng “cross linking” từ các đoạn DNA đã bị cắt đứt.

1.3. Phương pháp xác định liều chiếu xạ được sử dụng để sản sinh các thể đột biến

1.3.1. Quy trình chung

Để xác định liều chiếu nhằm sản sinh các thể đột biến phục vụ cho chọn tạo giống bức xạ, có thể áp dụng các bước căn bản trong quy trình tiến hành được mô tả dưới đây do Viện tạo giống bức xạ Nhật Bản xây dựng [21]. Các bước trong quy trình về căn bản tương đồng với các phương thức tiến hành được FAO/IAEA ghi nhận, thống kê cũng như được đề cập trong tài liệu.

- Tìm hiểu và tham khảo các tài liệu hay internet về các thông tin liên quan.
- Tùy tình huống và hoàn cảnh, chọn loại bức xạ và thiết bị chiếu để thực hiện chiếu xạ.
 - Chọn loại vật liệu để chiếu.
 - Chuẩn bị mẫu chiếu để khảo sát nhằm thiết kế liều chiếu.
 - Tùy vào kiểu vật liệu, thiết kế dải liều thí nghiệm kiểm tra để xác định Liều gây chết 50% (LD₅₀ - Lethal dose 50): Chiếu xạ với 10 liều từ 0 đến tối đa (Tỷ lệ chết là 100%, LD₁₀₀ - Lethal dose 100). LD₁₀₀ cho các nhóm thực vật và loại mẫu vật liệu là khác nhau, những nhóm chính được đề cập trong cơ sở dữ liệu của Diễn đàn hợp tác hạt nhân châu Á (Forum for Nuclear Cooperation in Asia – FNCA) và các cơ sở dữ liệu khác. Trong trường hợp chưa có các dữ liệu liên quan, việc xác định LD₁₀₀ cần phải dựa trên thực nghiệm: đối với các vật liệu có mức nhạy cảm với bức xạ cao: bố trí 10 liều chiếu từ 0 – 100Gy; với các vật liệu có mức nhạy cảm với bức xạ trung bình: bố trí 10 liều chiếu từ 0 – 400Gy; với các vật liệu có mức nhạy cảm với bức xạ thấp: bố trí 10 liều chiếu từ 0 – 2000 Gy để xác định liều gây chết hoàn toàn. [36]
 - Quan sát các tỷ lệ sống của mẫu theo liều, vẽ biểu đồ và xác định LD₅₀.
 - Chuẩn bị mẫu để chiếu xạ lại nhằm mục đích xác định các liều chiếu tối ưu.
 - Chiếu xạ với 7 liều: 5/8LD₅₀; 6/8LD₅₀; 7/8LD₅₀; LD₅₀; 9/8LD₅₀; 10/8LD₅₀; 11/8LD₅₀

-
- Khảo sát để chọn 2-3 liều tốt nhất để làm dải liều phù hợp hay tối ưu nhất để sản sinh đột biến dựa trên tần suất xuất hiện các thay đổi hình thái nhận được.

- Sau khi xác định liều tối ưu, có các lựa chọn để ứng dụng chiếu xạ thực tế phụ thuộc hoàn cảnh:

- Nếu việc chuẩn bị mẫu là dễ dàng và việc tiến hành chiếu xạ là sẵn sàng đáp ứng cho lượng mẫu lớn đồng thời đủ nguồn nhân lực để sàng lọc về sau thì việc chiếu xạ có thể thực hiện với tất cả 5 liều $5/8LD_{50}$; $6/8LD_{50}$; $7/8LD_{50}$; LD_{50} ; $9/8LD_{50}$; $10/8LD_{50}$; $11/8LD_{50}$

Nếu chuẩn bị mẫu khó khăn và các mẫu là hiếm, các liều lân cận ngưỡng thấp nên được áp dụng.

Nếu chuẩn bị mẫu là dễ nhưng quá trình chiếu xạ là không sẵn sàng để thực hiện nhiều lần, các liều lân cận ngưỡng cao nên được áp dụng.

Nếu việc chuẩn bị mẫu là dễ dàng, việc tiến hành chiếu xạ là sẵn sàng đáp ứng cho lượng mẫu lớn, đủ nguồn nhân lực để sàng lọc về sau đồng thời ý đồ của nhà chọn giống là có được càng nhiều vật liệu đột biến càng tốt thì việc chiếu xạ có thể thực hiện với cả 10 liều $0,1 LD_{50}$; $0,2 LD_{50}$; $0,3 LD_{50}$; $0,4 LD_{50}$; $0,5 LD_{50}$; $0,6LD_{50}$; $0,7 LD_{50}$; $0,8LD_{50}$; $0,9 LD_{50}$; và $1LD_{50}$

Nếu việc chuẩn bị mẫu là dễ dàng, việc tiến hành chiếu xạ là sẵn sàng đáp ứng cho lượng mẫu lớn, đủ nguồn nhân lực để sàng lọc về sau đồng thời ý đồ của nhà chọn giống là có được nhiều vật liệu và chú trọng các đột biến bền thì việc chiếu xạ có thể thực hiện với 5 liều $0, 2 LD_{50}$; $0, LD_{50}$; $0, 6 LD_{50}$; $0, 8 LD_{50}$; và $1 LD_{50}$.

Bước chọn lựa nâng cao:

Nếu việc nghiên cứu chi tiết là cần thiết hay để xác định tính nhạy cảm với bức xạ của vật liệu, chỉ tiêu Reduction dose RD_{50} được yêu cầu phải xác định. Đơn vị được sử dụng để đánh giá tần suất xuất hiện các thay đổi về tính trạng quan tâm là Reduction dose (RD). RD_{50} là liều mà tại đó 50% đặc điểm quan tâm xuất hiện thay đổi. Số lượng mẫu dùng cho kiểm tra xác định RD_{50} là nhiều hơn xác định LD_{50} , phải đạt từ 100 trở lên.

Đối với một số nhóm đối tượng cây trồng, thay vì sử dụng LD_{50} , các chỉ tiêu LD_{75} hay LD_{25} được sử dụng sau khi đã khảo sát nhiều và nắm vững tính hiệu quả của việc chiếu xạ khi áp dụng chiếu xạ một loại bức xạ nhất định.

Có một số cải biên từ quy trình chung này để đánh giá dải liều tối ưu để nhận được đột biến làm vật liệu cho chọn tạo giống bức xạ.

Cho dù quy trình trên được đề xuất chung cho cả hai phương thức chiếu xạ, trên thực tế nó được áp dụng chủ yếu cho phương thức chiếu xạ cấp tính. Trong trường hợp chiếu xạ trường diễn thì rất khó và mất nhiều thời gian để đánh giá hay xác định các khoảng cách tối ưu (tương đương với liều và suất liều tối ưu) cho việc sản sinh các

đột biến và đột biến hữu dụng trên Gamma field bởi thời gian thế hệ của cây trồng cũng như thời gian phát sinh đột biến kéo dài, đồng thời việc sản sinh ra đột biến và việc vận hành cơ chế tự sửa chữa của thực vật xảy ra song song, thế nên thông thường thì việc sàng lọc đột biến được tiến hành trên một dải liều/suất liều rộng. Sau một thời gian sàng lọc lâu trên một loại cây trồng nào đó, các nhà nghiên cứu thống kê lại các đột biến suất hiện cho từng dải liều/suất liều nhỏ hơn và theo đó thì vùng thích hợp để sản sinh đột biến hữu ích sẽ được chỉ ra. [6, 11, 13]

1.3.2. Phương thức xác định suất liều thích hợp cho việc chiếu xạ thường xuyên một loại vật liệu

Nói chung, thì việc chọn suất liều cho chiếu xạ thông thường được thực hiện theo kinh nghiệm và phụ thuộc vào đặc tính, lịch vận hành thiết bị và thường chọn mức trung bình của dải liều được đề nghị dưới đây. Tuy nhiên, trong các chương trình tạo giống đột biến lặp lại quá trình chiếu xạ nhiều lần, việc xác định suất liều thích hợp được yêu cầu để nâng cao hiệu quả tạo thể đột biến và số lượng đột biến dùng làm vật liệu cho sàng lọc về sau. [6,21,22]

Sau khi xác định dải liều và liều phù hợp, bố trí thí nghiệm xác định dải suất liều phù hợp bằng cách thay đổi suất liều (thời gian chiếu) sao cho vẫn giữ được đúng liều thích hợp, so LD hay RD để xác định suất liều thích hợp dùng cho một loại vật liệu/loài nào đó để áp dụng về sau.

Dải suất liều được đề nghị để thử với phương thức chiếu xạ trường diễn mỗi ngày 8 giờ là: từ 0,5Gy – 2,0Gy /ngày đối với cây thảo ngắn ngày và 0,015Gy – 0,4 Gy/ngày với cây gỗ dài ngày.

Dải suất liều được đề nghị để thử trong trường hợp đoản chiếu trên hệ Gamma room vận hành 20 giờ là từ 10Gy-80 Gy/h với các vật liệu cần chiếu liều cao; là 5Gy – 20Gy/h với các vật liệu cần chiếu liều trung bình; là 0,4Gy – 5Gy/h.

Dải suất liều được đề nghị để thử trong trường hợp đoản chiếu bằng các kênh của các máy gia tốc hay bằng máy phát tia X là 5Gy-10 Gy/phút với các vật liệu cần chiếu liều cao; là 1Gy – 5Gy/phút với các vật liệu cần chiếu liều trung bình; là 0,2Gy – 2Gy/phút với các vật liệu cần chiếu liều thấp.

Tuy nhiên, với các loại cây hay vật liệu xác định nào đó thì dải suất liều đề nghị trên có thể gia giảm phụ thuộc vào kinh nghiệm và sự suy xét sự tương quan, tính tương đồng giữa các mẫu đang thực hiện chiếu xạ và các mẫu/loài đã tiến hành trước đó cũng như loại bức xạ được sử dụng.

1.4. Các thành tựu về chọn tạo giống bức xạ

Ngay từ những năm 1970, cơ quan năng lượng nguyên tử quốc tế (IAEA) và tổ chức nông lương thế giới (FAO) đã tài trợ mở rộng hướng nghiên cứu gây đột biến cải tạo những giống cây nông nghiệp và cây công nghiệp nhiều nước trên thế giới nhằm tạo ra hàng loạt giống mới như: lúa, lúa mỳ, lúa mạch, táo, chanh và những giống cây

trồng khác. Cho tới năm 2007 (FAO/IAEA Mutant Varieties Database), trên 2600 giống cây trồng đã được tạo ra bằng gây đột biến thực nghiệm trên phạm vi 62 nước. Việc ứng dụng kỹ thuật hạt nhân để cải tạo cây trồng đã mang lại hiệu quả cực kỳ to lớn về kinh tế nông nghiệp. Ước tính hàng trăm tỉ đô la Mỹ và hàng ngàn heta gieo trồng bằng những giống cây trồng được tạo ra từ đột biến. Những thành tựu to lớn mà gây đột biến thực nghiệm đem lại trên thế giới đó là một số giống cây trồng như: Cỏ Bermuda, lê, giống lúa lùn Remei, khoai lang, khoai tây, hoa cúc, hoa hồng với màu sắc khác nhau và hình thái cánh hoa đa dạng, hoa lan kháng côn trùng và có màu sắc lạ của Nhật, cam không hạt của Iran, vải không hạt A4 của Trung Quốc... Đặc biệt ở Trung Quốc giống lúa đột biến Zhefu 802 được trồng với diện tích lớn nhất thế giới (trên 10,5 triệu heta) và được sử dụng rộng rãi trong sản xuất trong thời gian khá dài trên 10 năm.[54,55]

Ở Việt Nam, các nghiên cứu di truyền và chọn tạo giống ở Việt Nam được tiến hành chậm hơn nhiều so với thế giới. Năm 1966, các nghiên cứu về ảnh hưởng của tia Gamma, nguồn ^{60}Co , DES, DMS đến các biến dị di truyền của lúa, đậu tằm tại bộ môn di truyền khoa sinh Đại Học Tổng Hợp Hà Nội (Trịnh Bá Hữu, Phan Phải, Lê Duy Thành). Từ năm 1968 trên đậu Hà lan của Trần Minh Nam, trên *Nigenladamastica* của Phan Phải (1969 – 1972), tiếp theo là các nghiên cứu trên cây cà chua, táo, lúa của Viện cây lương thực và thực phẩm (Vũ Tuyên Hoàng và cộng sự năm 1975 – 1980). Các nghiên cứu ảnh hưởng của tia Gamma của Thái Công Tung, Nguyễn Văn Mừng (1971 – 1974)... trên một số cây trồng. [5,6]

Sau năm 1975, các nghiên cứu chọn tạo giống đột biến phát triển mạnh ở nhiều viện nghiên cứu và các trường Đại Học. Một số nghiên cứu và thành công của các trung tâm nghiên cứu hạt nhân:

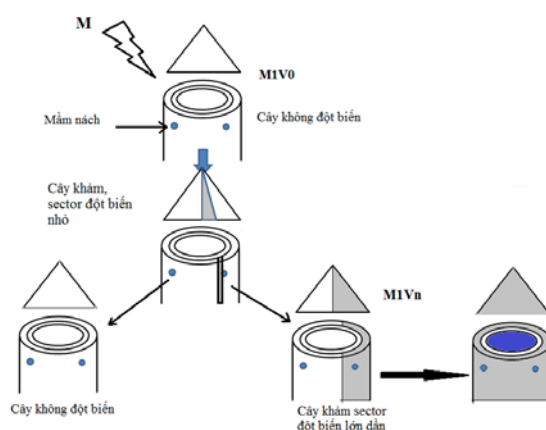
- Các dòng lúa Basmati đột biến (BĐS3, BĐBS5, v.v.) từ kết quả của Đề tài cấp Bộ trước đây do do TTHN Tp. HCM chủ trì thực hiện những năm trước đây hiện đang được khảo nghiệm diện rộng (hơn 1000ha mỗi giống) tại tỉnh Sóc Trăng và một số tỉnh khác tại Đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL).
- Năm 2012 ThS Nguyễn An Đệ trung tâm nghiên cứu giống cây bưởi đường không hạt (ĐLC240, ĐLC434, ĐLC436) [40],
- Năm 2002 Nguyễn Văn Vinh thuộc Viện khoa học kỹ thuật hạt nhân chiếu xạ gây đột biến hom mía,
- Năm 2004 T.S Nguyễn Tiến Thịnh thuộc Viện nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt chiếu xạ Gamma liều thấp lên mẫu khoai tây giống ,
- Năm 2012 Th.S Đào Thị Thanh Bằng và cộng sự tại Viện Di truyền Nông Nghiệp Việt Nam đã tạo ra giống cúc sạch bệnh và đã được trồng thử nghiệm ở xã Tây Tựu, Từ Liêm Hà Nội cho năng suất cao, chống được sâu bệnh, giảm 1/3 chi phí sản xuất so với giống cũ .[50]

1.5. Kết hợp công nghệ nuôi cấy mô tế bào và công nghệ chiếu trong công tác đột biến giống cây trồng

Trong thực tế chọn tạo giống bằng phương pháp gây tạo đột biến truyền thống, các nhà nghiên cứu thường phải đối mặt với những vấn đề như sự hình thành thể khảm, những khó khăn trong phân lập vùng mô đột biến, khả năng bỏ sót các vùng mô đột biến tiềm năng, việc thiết lập các áp lực chọn lọc, và các hạn chế thực tế khi mẫu vật quan tâm xử lý đột biến có kích cỡ lớn. Những trở ngại này có thể làm cho chương trình chọn giống trở nên công kềnh, tốn kém, kéo dài thời gian và thậm chí đôi khi không thực hiện được. [35]

Do đột biến là biến cố đơn bào trong khi mẫu chiếu là hệ thống đa bào, ta luôn nhận được cấu trúc khảm giữa thiểu số tế bào đột biến với đa số tế bào bình thường sau khi chiếu xạ (IAEA, 1986). Cùng với sự phát sinh cá thể (ontogenesis), những vùng khảm sẽ hình thành nên từ tế bào đột biến trong nội bộ cấu trúc phân sinh. Khi cho rằng cấu trúc phân sinh có cấu tạo 3 lớp, người ta đã đề xuất các cấu trúc khảm là: khảm xen (mericlinal), khảm vùng (sectorial), và khảm vòng (periclinal). Trong đó, dạng khảm vòng trong nhiều trường hợp, ví như khi chỉ xét đến các tính trạng hình thái, có thể xem như là dạng đột biến thực tế có thể dùng được. [36, 37]

Sự phân lập đột biến như sau là quá trình làm tăng kích thước của vùng mô khảm qua một số thế hệ cho đến khi vùng mô này đủ lớn để có thể che phủ một vùng mầm phân sinh nào đó, sao cho thế hệ sau phát sinh từ vùng phân sinh này có cấu trúc di truyền vùng mô khảm. Nguyên lý tạo lớp (layering) ở đỉnh phân sinh thường được áp dụng cho quá trình phân lập này. Theo đó có thể thấy rằng bằng phương pháp trồng trọt truyền thống, chiến lược phân lập qua layering như vậy sẽ khá tốn kém không chỉ về tiền bạc, công sức mà còn kéo dài thời gian chọn giống nếu đối tượng quan tâm là những cây dài ngày. [11]



Hình 1.5: Nguyên lý layering trong tách khảm và phân lập đột biến

Một số tính trạng khó hay không thể thiết lập để chọn lọc trong điều kiện đồng ruộng có thể được phát hiện thông qua các áp lực chọn lọc *in vitro*. Thật vậy, kỹ thuật nuôi cấy mô *in vitro* giúp có thể giả lập lại những áp lực tự nhiên như độ mặn, phèn, khô hạn, độc tố bệnh hại... Tất cả trong một quy mô thu hẹp, chủ động, và quản lý

được; nghĩa là chọn lọc *in vitro* giúp tiến hành công tác chọn giống một cách an toàn và tiết kiệm hơn. [38]

1.6. ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN

1.6.1. Đa dạng di truyền [9]

Đa dạng di truyền là mức độ đa dạng sinh học, liên quan đến các đặc điểm di truyền trong cấu trúc di truyền của một loài. Nó khác biệt với biến động di truyền, vốn dùng để mô tả xu hướng biến động các đặc điểm di truyền (www.wikipedia.org).

Các yếu tố ảnh hưởng đến tính đa dạng di truyền có thể là: sự chọn lọc tự nhiên, sự trôi dạt gene ngẫu nhiên, đột biến, hệ thống giao phối không ngẫu nhiên, sự di cư di truyền (giữa các quần thể). Năm yếu tố ảnh hưởng lớn nhất này chính là nguyên nhân tạo nên các cơ hội tiến hóa.

Số lượng khác biệt nhau về gene trong một quần thể được xác định bởi số gene trong vốn gene đó, thường có nhiều hơn một allele (được gọi là các gene đa hình) và số lượng các allele cho mỗi một gene đa hình. Sự tồn tại của các gene đa hình cho phép các cá thể trong quần thể có thể có kiểu gen dị hợp tử, có nghĩa là các cá thể có thể nhận được những allele khác nhau từ kiểu gene trong mỗi bố mẹ. Sự khác biệt về gen cho phép các loài thích ứng được với sự thay đổi của môi trường. Nói chung, những loài quý hiếm thường đơn điệu về gen hơn so với những loài phổ biến, phân bố rộng và hậu quả là những loài quý hiếm thường rất nhạy cảm với sự biến đổi môi trường và dễ bị tuyệt chủng.

Ý nghĩa của sự đa dạng di truyền

Sự đa dạng di truyền giúp cho một loài sinh vật cụ thể có khả năng đáp ứng lại những biến đổi của điều kiện môi trường sống và tồn tại theo thời gian. Đánh giá sự đa dạng di truyền của một quần thể là một trong những việc làm cần thiết giúp chúng ta phác thảo ra những chiến lược bảo tồn *in situ* và *ex situ*. Hiểu biết về sự đa dạng di truyền của quần thể còn giúp chúng ta có hướng khai thác nguồn tài nguyên di truyền một cách phù hợp.

Sự đa dạng di truyền ở những loài cây có giá trị sử dụng cao là điều mong mỏi của các nhà lai tạo vì như thế họ có thể tạo ra một nguồn nguyên liệu phong phú cho công tác chọn tạo giống mới hoặc cải tiến một số đặc tính của một loài nào đó. Theo đó, việc bảo tồn nguồn gene cũng đồng nghĩa với việc bảo vệ nguồn nguyên liệu sống cho việc sử dụng trong một thời gian dài nhằm tạo ra thực phẩm, thuốc men, quần áo, nhiên liệu cũng như những sản phẩm công nghiệp khác cho cuộc sống.

1.6.2. Các phương pháp đánh giá đa dạng di truyền

1.6.2.1. Các phương pháp làm sản sinh các đặc trưng nhận diện đặc điểm di truyền

1.6.2.1.1. Các phương pháp sử dụng các chỉ thị hình thái [8]

Sự đa dạng di truyền có thể phát hiện dựa vào các biểu hiện hình thái. Trước đây, khi sinh học phân tử và kỹ thuật di truyền chưa phát triển, thì marker hình thái thường được sử dụng để nghiên cứu sự đa dạng di truyền. Tuy nhiên, các marker này có nhiều điểm hạn chế như:

- Các biến đổi hình thái không phát hiện được ở một số loài
- Các nghiên cứu sử dụng đặc điểm hình thái nói chung thường giới hạn trong một locus
- Nhiều đặc điểm hình thái chỉ có thể quan sát được vào những giai đoạn nhất định trong chu kỳ sống.
- Nhiều đặc tính hình thái không riêng biệt mà liên tục và chồng lấp giữa các cá thể gây trở ngại cho việc phân tích chính xác sự đa dạng di truyền của quần thể
- Hình thái là kết quả tương tác giữa kiểu gene và điều kiện sống, vì thế nhiều lúc không phản ánh đúng về bản chất kiểu gene.

Vì vậy, ngày nay phương pháp đánh giá đa dạng di truyền không còn được sử dụng nhiều mà thay vào đó là các phương pháp khác liên quan trực tiếp đến khảo sát ở mức độ DNA.

1.6.2.1.2. Phương pháp sử dụng các chỉ thị protein và Allozyme

Đối với việc hình thành các marker phân tử dựa trên cơ sở đa hình protein, kỹ thuật được sử dụng thường xuyên nhất là phân tách protein bằng điện di, sau đó nhuộm đặc hiệu các phân lớp protein riêng biệt. Một cách kém thông dụng hơn, các protein đặc biệt được phát hiện bằng các kháng thể được nhân dòng đơn được gắn với chất đánh dấu huỳnh quang. Dù các nghiên cứu sớm hơn tập trung vào việc tìm các kiểu protein chứa trong hạt, phần lớn các marker protein được dẫn xuất từ các allozyme (các biến thể của một enzyme được mã hóa trong các allele khác nhau của cùng một locus).

Tuy việc áp dụng chỉ thị protein và Allozyme đã làm thay đổi việc nghiên cứu đa dạng di truyền theo chiều hướng thuận lợi hơn nhưng số chỉ thị cũng quá ít, không thỏa mãn cho nhu cầu nghiên cứu.

1.6.2.1.3. Phương pháp sử dụng chỉ thị sinh học phân tử dựa trên DNA (đặc trưng nhận dạng DNA – DNA fingerprinting) [2] [7] [11]

Chỉ thị phân tử (Marker) di truyền đóng góp vào lĩnh vực nghiên cứu sự đa dạng quần thể thực vật bằng cách cung cấp các kỹ thuật để phát hiện những biến đổi di

truyền giữa các cá thể, quần thể và loài. Trong những năm gần đây, khi sinh học phân tử và kỹ thuật di truyền phát triển mạnh mẽ, thì nhiều marker di truyền dựa trên DNA cũng được phát triển và mở ra một kỷ nguyên mới cho ngành sinh học quần thể và bảo tồn. Các marker này giúp chúng ta hiểu và từ đó có biện pháp quản lý và sử dụng sự đa dạng của quần thể một cách tốt hơn. Các kỹ thuật như giải trình tự (sequencing), minisatellite, microsatellite, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) và một số kỹ thuật dựa vào PCR như RAPD được phát triển sau như RADP (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat Polymorphisms)... giúp phân tích tinh vi hơn cấu trúc di truyền của quần thể và các sự kiện khác trong quá trình sinh học tiến hóa của chúng. Do dự phát triển mạnh mẽ về kỹ thuật và công nghệ, gần đây việc giải trình tự DNA đã cải thiện rất nhiều về thời gian thao tiến hành, chi phí giảm nhiều so với trước đây nên việc ứng dụng chúng trong việc làm nảy sinh các đặc trưng nhận diện DNA cũng đã trở nên phổ biến hơn, các nhà khoa học trên thế giới đã và đang tập trung nhiều vào giải trình tự các đoạn DNA/gene ngắn mang thông tin tiến hóa cao (DNA barcodes) phục vụ cho việc nhận dạng loài, chủng giống và đánh giá đa dạng di truyền quần thể. Sự phát triển mạnh mẽ cùng với số lượng nhiều các kỹ thuật phân tử trên đã giúp chúng ta giải quyết được nhiều vấn đề liên quan đến sự di truyền cũng như bảo tồn các quần thể thực vật. Các kỹ thuật này cho phép khảo sát để thu lượng lớn dữ liệu về sự biến đổi trong quần thể và loài nghiên cứu. Marker phân tử đầu tiên được phát triển là RFLP (1980), tiếp đến là RAPD (1990).

Mỗi một kỹ thuật sinh học phân tử nhằm làm nảy sinh đặc trưng nhận diện DNA (DNA fingerprinting) đều dựa trên những nguyên lý khác nhau, có các ưu điểm và hạn chế riêng và ít hay nhiều cũng đã đạt những thành tựu nhất định, phục vụ cho các mục đích nghiên cứu khác nhau.

Trong phạm vi của đề tài này, chúng tôi chọn sử dụng kỹ thuật RAPD nhằm làm nảy sinh đặc trưng nhận diện DNA phục vụ cho mục tiêu đánh giá đa dạng di truyền bởi lẽ, cho dù kỹ thuật này có các hạn chế :

- Kỹ thuật RAPD có mức độ tái lập kết quả (productivity) không cao, điều này có nguyên nhân từ tính nghiêm ngặt trong phản ứng PCR và phụ thuộc mức độ thành thực trong thao tác cũng như tính ổn định của điều kiện triển khai thí nghiệm.

- Khả năng nhân bản trong phản ứng PCR cao nhưng khả năng xuất hiện đa hình thấp và độ tin cậy không cao do khó phân biệt các đoạn ADN có kích thước gần giống nhau.

- Chỉ thị phân tử RADP là chỉ thị trội, không phân biệt được tính đồng hợp tử và dị hợp tử.

Nhưng nó cũng có nhiều ưu điểm, thích hợp với điều kiện thời gian và kinh phí thực hiện đề tài cũng như bước đầu tiếp cận thực tiễn công tác nghiên cứu của sinh

viên:

- Về mặt kỹ thuật: Kỹ thuật RAPD dễ thực hiện và dễ thành công do không cần biết trước trình tự bộ gen của đối tượng cần nghiên cứu, thao tác đơn giản. ADN khuôn mẫu không cần độ tinh sạch cao.

- Thời gian thực hiện nhanh.

- Khả năng nhân bản cao.

- Về mặt kinh tế: Chi phí thực hiện thấp.

- Kỹ thuật RAPD có thể được sử dụng kết hợp với những kỹ thuật cao cấp khác để đánh giá đa dạng di truyền và nhận diện chỉ thị phân tử có độ tin cậy cao.

Để làm rõ hơn về kỹ thuật được chọn lựa để sử dụng trong nghiên cứu này, chúng tôi đề cập sâu hơn về kỹ thuật RAPD dưới đây:

Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN - đa hình các đoạn ADN được khuếch đại ngẫu nhiên) do William phát minh năm 1990, Welsh và cộng sự hoàn thiện năm 1991. Kỹ thuật này cho phép phát hiện tính đa hình các đoạn ADN được nhân bản ngẫu nhiên bằng việc sử dụng mỗi đơn chứa trật tự nucleotide ngẫu nhiên. Đến nay, kỹ thuật này đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực của sinh học phân tử. Người ta đã sử dụng kỹ thuật này để thiết lập bản đồ di truyền, đánh giá hệ gen của giống và sự đa dạng di truyền của tập đoàn giống cũng như đa dạng di truyền quần thể làm cơ sở cho việc bảo tồn, quản lý, khai thác, chọn tạo giống và sử dụng tài nguyên sinh vật nói chung, thực vật nói riêng một cách hợp lý.

Kỹ thuật RAPD dựa trên nguyên lý phản ứng chuỗi polymer hóa (Polymerase Chain Reaction – PCR), sử dụng những môi ngắn (khoảng 10 nucleotide) có trình tự biết trước, bắt cặp và nhân bản ngẫu nhiên những đoạn ADN có trình tự bổ sung với trình tự của các môi. Theo nguyên tắc, khi 2 cá thể hoàn toàn giống nhau, sau khi thực hiện phản ứng PCR – RAPD ở điều kiện như nhau sẽ tạo ra tập hợp các đoạn sản phẩm bằng nhau về chiều dài (đặc trưng nhận diện DNA giống nhau). Khi có sự sai khác hoặc đột biến ở vị trí bắt môi sẽ dẫn đến sự không bắt cặp được, hoặc đoạn được khuếch đại bởi môi được sử dụng thuộc hai cá thể có kích thước sẽ sản sinh các đặc trưng nhận diện DNA khác nhau. Vì vậy việc sử dụng kỹ thuật RAPD có thể giúp phát hiện đột biến và các sai khác hoặc tương đồng trong bộ gene sinh vật.

Cũng theo nguyên lý chung các yếu tố cần thiết để tiến hành phản ứng RAPD-PCR bao gồm:

(1) **ADN khuôn** (ADN template) với nồng độ 5 - 50 ng trong 20 - 25 μ l. ADN khuôn là vật liệu khởi đầu cho phản ứng RAPD, được tách từ các mẫu: virus, vi khuẩn, tế bào thực vật, động vật... ADN có độ tinh sạch nhất định, có thể là sợi đơn, sợi đôi, mạch vòng hoặc mạch thẳng. ADN khuôn được khuếch đại dưới dạng thẳng có hiệu quả hơn dạng vòng. Kích thước ADN khuôn nhỏ hơn 3 kb cho kết quả tốt nhất.

(2) **Đoạn môi** (primer): chỉ sử dụng một môi đó là một oligonucleotide có trật tự nucleotide ngẫu nhiên và có chiều dài 8 - 10 nucleotide (thường sử dụng môi dài 10

nucleotide). Nhiệt độ gắn môi trong phản ứng RAPD thấp ($32^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$). Nồng độ môi phải thích hợp để đảm bảo kết quả phản ứng (phù hợp với lượng ADN cần tổng hợp) tạo nên lượng sản phẩm cần thiết. Nếu nồng độ môi quá cao có thể làm cho hiệu quả phản ứng kém chính xác, do môi bám vào các vị trí không đặc hiệu. Nếu nồng độ môi quá thấp sẽ không đảm bảo đủ lượng sản phẩm RAPD. Nồng độ môi thích hợp để tiến hành phản ứng thường là $0,1 - 0,5 \mu\text{M}$.

(3) **Taq-polymerase**: là một enzyme quan trọng, có vai trò quyết định đến phản ứng PCR. Đây là loại enzyme chịu được nhiệt độ cao trong các loại enzyme. Đặc điểm của chúng là có khả năng kéo dài môi để tạo một sản phẩm có chiều dài 8 - 13 kb. Taq-polymerase được tách chiết từ chủng vi khuẩn ở suối nước nóng *Thermus aquaticus*, không bị mất hoạt tính ở nhiệt độ biến tính ADN ($92^{\circ} - 95^{\circ}\text{C}$). Taq-polymerase có hoạt tính ở dải nhiệt độ cao, tồn tại ở nhiệt độ 95°C kéo dài. Enzyme này có hoạt tính cao ở $72^{\circ} - 80^{\circ}\text{C}$ làm cho phản ứng xảy ra nhanh, hiệu quả và chính xác.

(4) **dNTP**: là các nucleotide tự do được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng RAPD, gồm bốn loại: dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Nồng độ dNTP mỗi loại thường dùng trong các phản ứng RAPD khoảng $50 - 200 \mu\text{M}$. Nếu nồng độ các loại dNTP quá ít thì tạo sản phẩm ít không đủ để phát hiện, ngược lại, nồng độ dNTP quá cao thì phản ứng khó thực hiện.

(5) **Dung dịch đệm**: là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng và hiệu quả của phản ứng. Dung dịch đệm của phản ứng phải đảm bảo thành phần các chất cần thiết cho hoạt động của enzyme như: MgCl_2 , KCl, Tris HCl... Thành phần của dung dịch đệm của phản ứng bao gồm: Tris HCl 10mM (pH = 8.3 ở nhiệt độ phòng), KCl 50mM, MgCl_2 1,5mM khi ủ ở nhiệt độ phòng. Nồng độ MgCl_2 có thể dao động từ $0,5 - 5\text{mM}$. Thành phần này đóng vai trò quan trọng đến khả năng bắt cặp và gắn các môi với mạch khuôn.

Phản ứng RAPD thường được tiến hành qua các giai đoạn trong chu trình nhiệt như sau :

(1) Giai đoạn biến tính ADN: Ở nhiệt độ 95°C trong 30 - 60 giây làm cho các liên kết hydro giữa 2 mạch bị đứt. Khi đó ADN sợi đôi tách thành 2 sợi đơn tạo điều kiện cho sự bắt cặp môi.

(2) Giai đoạn tiếp hợp môi: Nhiệt độ hạ xuống $32^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$, môi bám vào đầu 3'OH của mạch khuôn ADN và bắt đầu quá trình tổng hợp sợi mới.

(3) Giai đoạn tổng hợp: Nhiệt độ được nâng lên 72°C thì các đoạn môi đã bắt cặp với các mạch đơn sẽ được kéo dài với sự tham gia của Taq-polymerase. Một chu kỳ trên xảy ra, một đoạn ADN được nhân lên thành hai, các đoạn ADN được nhân tiếp tục được coi là mạch khuôn để tổng hợp cho chu kỳ sau.

Như vậy, sau n chu kỳ thì sẽ tạo ra 2^n các đoạn ADN giống hệt đoạn ADN khuôn ban đầu. Phản ứng RAPD có thể thực hiện 40 - 45 chu kỳ.

Được phát minh và sử dụng ngay sau khi kỹ thuật PCR ra đời, mặc dù cho kết quả có độ tin cậy không cao nhưng vẫn được sử dụng do ưu điểm dễ thực hiện và chi phí thấp. Kỹ thuật RAPD đã được ứng dụng và đạt một số thành tựu sau:

- Đánh giá đa dạng di truyền: Đã được áp dụng trên rất nhiều các đối tượng: cúc lai, cà phê, bắp, đậu nành, lúa mì, lúa mạch, dâu tây, khoai tây, cà chua, điều,...

- Nhận diện chỉ thị phân tử: như ở Việt Nam, nghiên cứu đa dạng di truyền và mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình phản ánh bệnh đạo ôn của một số giống lúa ở Việt Nam (Lã Tuấn Nghĩa và cộng sự, 1999)...

- Xây dựng bản đồ gene: Sử dụng phương pháp BSA kết hợp kỹ thuật RFLP và RAPD lập bản đồ gen tms – 1 của dòng lúa TGMS (5460S) (Wang và cộng sự, 1995)

1.6.2.1. Các phương pháp và tiêu chí đánh giá đa dạng di truyền quần thể

Để đánh giá đa dạng di truyền quần thể, trên thế giới đến nay đã phát triển rất nhiều phương pháp, các phương pháp ra đời sau thường khắc phục những hạn chế của các phương pháp trước đó về lý luận, khả năng ứng dụng tin học trong xử lý dữ liệu.... Tuy nhiên, dù có tiến hành theo mô hình nào, thuật toán nào thì việc đánh giá đa dạng di truyền cũng dựa trên một nền tảng chung gắn liền với định nghĩa về sự đa dạng di truyền: chính là sự đa dạng về vật chất di truyền tồn tại giữa các cá thể trong quần thể và các yếu tố ảnh hưởng đến sự đa dạng di truyền. Các yếu tố ảnh hưởng đó có thể là: sự chọn lọc tự nhiên, sự trôi dạt gene ngẫu nhiên, đột biến, hệ thống giao phối không ngẫu nhiên, sự di cư di truyền (giữa các quần thể). Năm yếu tố ảnh hưởng lớn nhất này chính là nguyên nhân tạo nên các cơ hội tiến hóa.

Công cụ chủ yếu căn bản tiền đề cho việc đánh giá các yếu tố ảnh hưởng nói trên là nguyên lý Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$ đối với tần số kiểu gene; $p + q = 1$ đối với tần số allele (gene), khi mà p và q là tần số của các alleles trong hệ thống 2-allele).

Trong đánh giá đa dạng di truyền hiện đại, dữ liệu để đánh giá thường là các đặc trưng nhận diện DNA được nảy sinh thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên PCR, tức thường là tập hợp các band sau điện di. Do vậy, một trong những tiêu chí đơn giản nhất để thể hiện tính đa dạng di truyền là tỷ lệ các locus đa hình (P), (xét các band trên gel sau điện di, tỷ lệ đa hình là số band đa hình so với tổng số band). $P = n_{pj}/n_{total}$, với n_{pj} : số locus đa hình; n_{total} : tổng số locus.

Số lượng allele trung bình cho một locus cũng là một tiêu chí đánh giá trong trường hợp sử dụng các marker đồng trội, tuy nhiên cách tính này chưa thể hiện được vai trò của các allele trong tổng thể nên người ta tính số lượng allele hiệu quả trong quần thể (A_e).

Trên thực tế khi triển khai đánh giá đa dạng di truyền bằng kỹ thuật sinh học phân tử, người ta thể hiện các đặc điểm nói trên thông qua hệ số tương đồng Dice (Dice's coefficient) vốn còn biết đến là hệ số tương đồng Nei và Li (Nei and Li's coefficient):

$$S = \frac{2n_{ab}}{n_a + n_b}$$

n_a và n_b đại diện cho số lượng các band hiện diện lần lượt trong hàng a và b và n_{ab} biểu hiện số lượng các band cùng được chia sẻ bởi cả hai hàng (hiện diện ở cả hai hàng). S có thể đạt giá trị bất kỳ giữa 0 và 1, khi $S = 0$ nghĩa là chẳng có band nào chung, $S = 1$ nghĩa là hai kiểu hình thành band là y hệt nhau. Một chỉ số khác, có lẽ thậm chí còn được sử dụng phổ biến hơn là hệ số Jaccard (Jaccard's coefficient):

$$S_J = \frac{n_{ab}}{n_a + n_b - n_{ab}}$$

Hai chỉ số này chỉ đưa sự tương ứng dương tính (cả hai band đều hiện diện) vào việc tính toán và thường cho các kết quả tương quan gần. Tuy nhiên chỉ số Dice đặt một trong hai trọng số vào các band cùng được chia sẽ vốn cho phép một cách công khai thừa nhận sự khác nhau một cách tốt hơn của các cá thể ở mức độ thấp hơn của sự giống nhau. Do sự vắng mặt của band, ví dụ như một band RAPD, có thể có vài nguyên nhân khác nhau, vấn đề được tranh luận là sự thiếu vắng qua lại giữa các band là không thích hợp cho việc tính toán sự giống nhau. Tuy nhiên, hệ số tương ứng đơn giản, vốn bao gồm điểm không kép, cũng đã được sử dụng trong một số trường hợp:

$$S_S = \frac{n_{ab} + n_{AB}}{N}$$

ở đây, n_{ab} đại diện cho số band cùng được chia sẽ bởi cả hai hàng, n_{AB} đại diện cho tổng số band thiếu vắng ở cả hai hàng a và b nhưng có mặt ở vài hàng khác) và N là tổng số các band. Nhiều chỉ số khác cũng được sử dụng trong tính toán với cùng mục đích.

Khoảng cách di truyền giữa các mẫu thường được tính toán như phần bổ sung cho các chỉ số tương đồng đề cập trên. Theo như thế, phần bổ sung cho hệ số tương ứng đơn giản (S_S) được biết đến là chỉ số Gower. Một trong những công thức đánh giá khoảng cách được áp dụng thường xuyên nhất, đặc biệt là cho các ma trận dữ liệu trong một số trường hợp, ví dụ như các phân tích lập nhóm/đám, là công thức khoảng cách Euclidean, mà vốn ở đó các công thức đánh giá tính bình phương khoảng cách được tính tổng bao trùm tất cả các band được ghi nhận trong hai mẫu liên quan:

$$D_E = \sum (x_a - x_b)^2$$

$x = 0$ khi một band vắng mặt ở hàng a hay hàng b và $x = 1$ nếu band diện diện

Một tiêu chí quan trọng khác trong đánh giá đa dạng di truyền là Tính dị hợp H (Heterozygosity, H_E) (hay còn gọi là tính đa dạng gene - gene diversity, D).

Trong trường hợp đơn giản chỉ xét trên một locus, tính dị hợp được tính theo công thức $H = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$, với p_i là tần số allele thứ i của k allele. Trong trường hợp chỉ có 2 allele với tần số p và q thì công thức $H = 1 - p^2 - q^2$ được áp dụng. Tuy nhiên, trong thực tiễn công việc thì một locus đơn không phản ánh hết tính đa dạng di truyền nên thường thì nhiều locus được đưa vào xem xét, tính toán, khi đó tính dị hợp được tính như sau:

$$H_E = 1 - \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k P_{ij}^2$$

Với m là số lượng các locus xem xét. Công thức này có thể được hiệu chỉnh thành

$$\hat{H}_E = \frac{2N}{2N-1} \left[1 - \sum_{i=1}^n \hat{P}_i^2 \right]$$

để phù hợp với thực tế công việc, khi mà các mẫu đại diện cho tập hợp được khảo sát bé hơn $N \leq 50$.

Trong trường hợp dữ liệu trội, người ta có thể sử dụng chỉ số Shannon về sự đa dạng gene:

$H' = -\sum p_i \log_2(p_i)$, với p_i là tần số của allele thứ i trong quần thể hay loài, cả hai allele (hiện diện và thiếu vắng) đều được đưa vào tính toán. Logarit tự nhiên cũng có thể dùng để thay thế cho \log_2 .

Mức độ dị hợp (H hay D) thể hiện xác suất kỳ vọng của một cá thể dị hợp tử về 1 locus (hoặc được tính toán với nhiều locus) trong hệ thống đa allele.

Khoảng cách di truyền giữa hai quần thể cũng là một trong các tiêu chí cần xem xét, nhất là trong trường hợp một tổng thể bao gồm các quần thể bị chia nhỏ. Cách thức tính toán phổ biến trong trường hợp này là Khoảng cách di truyền của Nei: D_{XY}

$$= -\ln(I_{XY}) \text{ được dựa vào cơ sở tính tương đồng với } I_{XY} = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$$

D_{XY} là khoảng cách di truyền giữa hai quần thể X và Y

J_X và J_Y lần lượt là giá trị đồng hợp tử trung bình của quần thể X và Y

J_{XY} là giá trị đồng hợp tử trung bình giữa hai quần thể X và Y

(Tài liệu tập huấn về Lý thuyết và ứng dụng chỉ thị di truyền “Genetics marker training course” của Đại học Wyoming, 2008)

Ngoài việc đưa ra các con số thông thường để đánh giá lượng hóa các tiêu chí đa dạng di truyền quần thể, việc đánh giá quan hệ di truyền của các cá thể, sự lập nhóm/đám, sự biệt hóa di truyền, khoảng cách di truyền còn có thể được thể hiện một cách sinh động thông qua việc xây dựng biểu đồ dạng cây quan hệ phát sinh các mẫu khảo sát.

Ngoài ra, người ta còn sử dụng nhiều tiêu chí khác để xem xét tính đa dạng di truyền quần thể nhằm xem xét các dòng gene di cư, sự đóng góp của quần thể vào sự tổng mức đa dạng gene... (“DNA fingerprinting”, Taylor & Francis group, 2005)

Hiện nay có khá nhiều các phần mềm chuyên cho việc xử lý các dữ liệu di truyền phục vụ đa mục đích hay các khảo sát chuyên biệt như POPGENE, CLUSTAL W, Structure, LCDMV, NTSYSpc 2.1...

PHẦN 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 6 thể đột biến tiềm năng của hai giống hoa cúc chủng nông nghiệp Đóa Đồng và Farm Tím.



Cúc Farm tím






Cúc Đóa đồng

Hình 2.1: Cúc Đóa đồng và Farm tím

Sáu thể đột biến tiềm năng các đặc điểm thay đổi khác với đối chứng về màu sắc hoa, hoa cân đối tròn đều không hoặc ít bị dị dạng, mang tính thẩm mỹ cao, ít bị khảm. Sáu thể đột biến tiềm năng này được tập trung để xác định đa dạng di truyền, nhận dạng các khác biệt về di truyền so với các giống gốc đối chứng tương ứng của chúng. Các thể đột biến này có các đặc điểm cụ thể như sau :

Bảng 2.1: Đặc điểm hình thái của 6 thể đột biến tiềm năng so với các chủng đối chứng của chúng

STT	Kí hiệu	Phương thức chiếu và liều chiếu	Mô tả đặc điểm đã chọn được	Hình ảnh
1	I8	Gamma 40 Gy	<ul style="list-style-type: none"> - Chiều cao thân cây trung bình 80 - 110cm - Số lượng hoa trung bình 5-8 hoa/cây - Kích thước cụm hoa trung bình: 7 - 11 cm. - Hoa màu vàng tươi, cánh hoa ngắn hơn so với đối chứng và bung đều. 	

2	I9	Gamma 40Gy	- Cánh hoa chuyển màu vàng tươi, cấu trúc trong cánh hoa có 1-2-3 lớp cánh hoa phụ	
3	I7	Gamma 30 Gy	Cánh hoa chuyển màu vàng tươi	
4	E2	Gamma 20 Gy	- Cánh hoa có cấu trúc hình ống	
5	E28	Gamma 40 Gy	Cánh hoa chuyển màu tím nhạt	
6	E29	Gamma 40 Gy	- Cánh hoa chuyển trắng phớt tím	

Chúng tôi chọn đại diện cho các kiểu đột biến vì nhiều đột biến cùng kiểu và cùng liều chiếu với nhau.

- Farm tím: màu sắc cánh hoa chuyển sang trắng
- Farm tím: màu sắc cánh hoa chuyển sang tím nhạt
- Farm tím: cấu trúc hoa chuyển sang hình ống
- Đóa đồng: màu sắc cánh hoa chuyển sang vàng tươi
- Đóa đồng: màu sắc cánh hoa chuyển sang vàng, cấu trúc cánh hoa có thêm cánh phụ
- Đóa đồng: thay đổi kết cấu cánh hoa ngắn hơn và hoa nở bung đều.

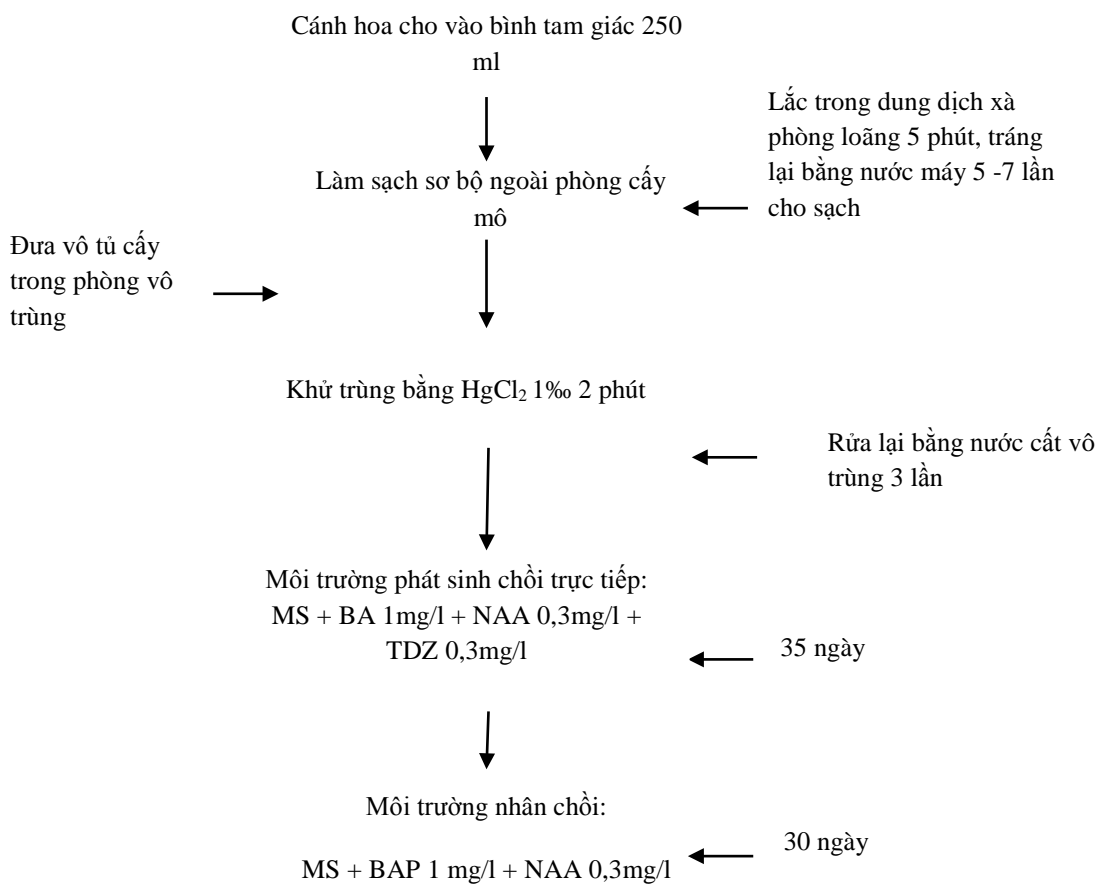
Các thể đột biến được thu thập, vào mẫu lại (cánh hoa) và nhân giống tạo vật liệu cho việc trồng thể nghiệm đồng ruộng nhằm xác định tính ổn định hình thái đột

biên. Kết quả vào mẫu các thể đột biến đến giai đoạn vào mẫu cánh hoa từ những cụm hoa đột biến đã được sàng lọc và tạo callus từ cánh hoa đó đang được ghi nhận lại. Quy trình vào mẫu cánh hoa và tạo callus từ cánh hoa dựa trên quy trình có sẵn qua nghiên cứu Nhiệm vụ Nghị định thư “*Hợp tác chiếu xạ in vitro, in vivo trong chọn tạo một số giống hoa đột biến ở Việt Nam*” của phòng Tạo giống bức xạ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Quy trình vào mẫu các thể đột biến tiềm năng:

Ứng dụng theo quy trình đã hoàn thiện trong đề tài Nghị Định Thư (2009-2012) “*Hợp tác chiếu xạ in vitro, in vivo trong chọn tạo một số giống hoa đột biến ở Việt Nam*” của phòng Tạo giống bức xạ, CANTI để tiến hành vào mẫu và nhân nhanh hai giống hoa cúc Đóa đồng và Farm tím như sau:



Môi trường cơ bản được sử dụng trong qui trình trên là MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 30gram/l sucrose, 7.0 gram/l agar, pH 5.8. và các chất điều hòa sinh trưởng được bổ sung. Các môi trường tái cây hoàn chỉnh: MS + NAA 0,5mg/l trong 18 phút.

Các mẫu sau khử trùng cấy trên môi trường phát sinh chồi trực tiếp được để trong phòng tối 14 ngày trước khi đưa ra phòng nuôi cây, cây ở giai đoạn nhân nhanh

cũng như tạo cây hoàn chỉnh được đặt trong phòng nuôi cây với các điều kiện như sau:

- + Ánh sáng : 2000 – 2500 lux
- + Thời gian chiếu sáng : 12h/ngày
- + Nhiệt độ : 22 – 25°C
- + Độ ẩm : 60-70 %

Các hoa của các cá thể đột biến được lấy mang ngay về phòng thí nghiệm xử lý và tiến hành theo qui trình chung đã trình bày ở trên.

Số lượng cánh hoa được vô mẫu là: 20 cánh (từ 1 hoa được chọn từ 1 cây xuất hiện đột biến)

Theo dõi và ghi nhận:

- + Tỷ lệ mẫu sống sau 35, 43, 45 và 53 ngày tương ứng 4 đợt thu mẫu
- + Số lượng mẫu phát triển thành callus
- + Số lượng mẫu phát sinh chồi
- + Số lượng chồi M1V1 trung bình/callus
- + Hệ số nhân chồi M1V1
- + Số lượng cây *in vitro* tạo ra từ cây đột biến qua quá trình nhân dòng sẵn sàng cho đợt trồng xác định phân li.

2.2.2 Trồng thể nghiệm và xác định sự ổn định về mặt hình thái các thể đột biến tiềm năng

Qui trình ươm cây *in vitro* và trồng cây trên đồng ruộng được trình bày áp dụng chung cho các chủng hoa cúc như sau:

- a. Giai đoạn vườn ươm:
 - Cây cấy mô các liệu chiếu xạ sau khi đủ số lượng mỗi lô thí nghiệm 200 cây/lô. Cây giữ nguyên trong chai cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm để tập nắng (trong nhà màng nylon có che lưới đen, cây nhận được 75% ánh sáng tự nhiên) để cây thích nghi với ánh sáng tự nhiên 3- 5 ngày.
 - Sử dụng giá thể là đất sạch của công ty đất sạch Bến Tre hiện đang bán trên thị trường. Giá thể được nhồi vô các vỉ xốp 112 lỗ (8 x 14 lỗ).

- Dùng panh gấp cây ra khỏi chai cấy, rửa bằng nước sạch 3 lần, rửa lại bằng dung dịch thuốc tím loãng 3%. Sau đó cây được cấy lên vỉ và ký hiệu theo từng lô thí nghiệm.

- Các vỉ xốp được để trong nhà nylon có che lưới đen che 25% ánh sáng (trong quá trình này khi cây ra vỉ 2 ngày chúng ta pha thuốc trừ sâu và trừ bệnh xịt cho cây lần đầu). Tưới phun sương giữ ẩm cho cây; xịt thuốc trừ sâu, bệnh 2 – 3 ngày/lần (thuốc trừ sâu dùng loại: abamectin/binhtox/supracid thuốc trừ bệnh dùng dithan/kasuzan nồng độ sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Chiếu điện thêm vào ban đêm 6h/đêm từ 19h tối đến 2h sáng ngày hôm sau, sử dụng bóng đèn 3U loại ánh sáng vàng. Thống kê tỉ lệ cây sống chết và những thay đổi và kiểu hình trong giai đoạn cây con.

- Cây trong vỉ được 30 ngày lá to thân cứng cao 5cm trở lên sẵn sàng ra vườn trồng.

- Chi tiêu theo dõi:

- + Tỷ lệ sống cây con

- + Các thay đổi về mặt hình thái

b. Giai đoạn trồng cây:

- Đất trồng, được cày xới kỹ và nhặt sạch cỏ

- Bón lót: Phân chuồng hoai mục: 10m³/1000m², Phân lân 170 kg/1000m². Bón vôi bổ sung để điều chỉnh pH đất đạt 6.5 – 7.2 (khoảng 100kg vôi/1000m²).

- Cây con được trồng với mật độ trung bình 4.000 cây/100m²(khoảng cách 15 x 15 cm). Trồng theo từng lô thí nghiệm và trồng các lô cùng giống liền kề nhau.

- *Phân bón:* (Lượng phân bón tính cho 100 m²)

- + Bón xăm môi: 7–10 ngày sau khi trồng: 1kg Urê + 2 kg DAP.

- + Bón thúc 1: 20 ngày sau khi trồng: 1 kg DAP+ 2kg N-P-K (15- 5-20).

- + Bón thúc 2: cây hoa cúc sau 45 ngày trồng sẽ xuất hiện nụ hoa, tiến hành theo dõi quá trình phát triển của cây so với cây đối chứng, ghi nhận những khác biệt về khả năng phát triển của cây (chiều cao, các biến dị bất thường về hình thái cây, màu sắc lá...). Giai đoạn này bổ sung N-P-K (15-5-20) với liều lượng 3 kg.

- *Lưới đỡ cây:* cây trồng sau 30 ngày bố trí lưới đỡ cây để cây không bị ngã rạp ở giai đoạn tạo nụ và ra hoa (giàn đỡ có thể dễ dàng nâng lưới theo chiều cao của cây).

- *Tưới nước:* Sau khi trồng cây cần tưới nhẹ 1 lần/ngày liên tục 3 – 4 ngày để cây nhanh hồi phục. Sau đó chỉ cần tưới đủ ẩm, 2 - 3 ngày/lần.

- *Bảo vệ thực vật:*

+ Phun phòng định kỳ 2 – 3 ngày/lần (thông thường phun thuốc vào buổi chiều tối những ngày tưới cây) luân phiên bằng các loại thuốc chống nấm: Dithan/kasuzan kết hợp thuốc trừ sâu, côn trùng: abamectin/supracid, liều lượng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Cây sau khi trồng được 75 – 95 ngày nụ hoa bắt đầu nở, tiến hành quan sát và lựa chọn mẫu dựa trên sự thay đổi về hình thái cây, màu sắc lá, số lượng hoa/cây, màu sắc hoa, kích thước hoa

Sau khi sàng lọc được các thể đột biến từ vật liệu sau chiếu xạ và chọn ra các thể đột biến tiềm năng, trong trường hợp này là các dòng hoa cúc E2a, E2c, E28, E29 từ chủng gốc Farm tím (E); I7, I8 từ chủng gốc Đóa đồng (I) thì việc xem xét tính ổn định về hình thái đột biến của chúng là một việc làm cần thiết để khẳng định dòng đột biến tạo ra và phát triển chúng thành các giống về sau.

Trồng thể nghiệm các dòng đột biến và đánh giá tính ổn định của các dòng chính là xác định độ phân li (nếu có) của các đặc điểm đột biến mới khác biệt với giống gốc mà nhà chọn giống mong muốn giữ lại ở chúng và là một trong những khâu quan trọng nhất trong quá trình chọn giống.

Việc trồng khảo sát sự phân ly tính trạng đột biến được chọn ngoài việc tạo dựng cơ sở về tính ổn định về hình thái qua các thế hệ *on farm*, còn mục đích thứ hai là giới hạn bớt số các dòng đột biến để phù hợp với quy mô của nhiệm vụ. Chính vì vậy, chỉ có những dòng đột biến có trên 5% số cá thể trồng giữ tính trạng đột biến mới được thu thập vật liệu vào mẫu *in vitro* lại để khảo sát tiếp với mục đích tạo giống.

2.2.3 Đánh giá sự đa dạng di truyền các dòng cúc đột biến tiềm năng nhận được trên đồng ruộng ở mức phân tử

a. Phương pháp tách chiết DNA

Phương pháp tách chiết DNA tổng số dựa theo quy trình CTAB 1 (Kurt Weising và cộng sự, DNA fingerprinting, 2005) có cải tiến.

Quy trình tách chiết DNA:

1. Nghiền tối đa 3g mẫu lá tươi thành bột mịn bằng cách sử dụng dung dịch nitrogen lỏng bằng cối và chày sứ.
2. Chuyển mô được nghiền vào 800 μ l dung dịch đệm CTAB làm ấm trước ở 60 $^{\circ}$ C trong ống eppendorf 2ml có nắp đậy. Đệm CTAB được cải tiến bổ sung dung dịch SDS 10%.
3. Ủ 30 phút ở 60 $^{\circ}$ C trong bể ổn nhiệt. Đảo nhẹ 10 phút/lần.

4. Bổ sung dung dịch chloroform–isoamyl với tỷ lệ 1:1, trộn nhẹ nhàng nhưng đủ để xuyên suốt đầu tới cuối để đảm bảo sự nhũ tương hóa các pha.

5. Ly tâm 11,000 vòng trong 15 phút, nhiệt độ phòng. Pha lỏng (phía trên) có thể được chiết lại một lần với dung dịch chloroform–isoamyl sạch với tỷ lệ 1:1.

6. Chuyển phần pha lỏng cuối cùng vào eppendorf.

7. Thêm dung dịch isopropanol tinh khiết với tỷ lệ 1:1, bọc bằng parafilm, trộn nhẹ nhàng xuyên suốt đầu cuối bằng cách đảo ngược ống vài lần. Ở giai đoạn này, phức DNA-CTAB có thể kết tủa ở dạng mạng hơi trắng. Trong trường hợp này, mang phần kết tủa ra khỏi dung dịch bằng cách sử dụng móc thủy tinh (như pipet Pasteur cong), chuyển nó sang ethanol 70% (bước 8) và để cho khô (bước 9). Nếu mẫu xuất hiện tình trạng đóng cục, vẩn đục hay trong như nước sau khi trộn với isopropanol (vốn thường xảy ra trong trường hợp này), thu tủa bằng việc ly tâm 11,000 vòng trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Nếu quan sát được các viên vón, tiếp tục bước 8. Nếu không, để dung dịch trong tủ lạnh âm -20°C trong từ 30 phút đến qua đêm và ly tâm lại lần nữa, có thể ở tốc độ cao hơn.

8. Thêm $100\mu\text{l}$ ethanol 70%, rung động nhẹ nhàng phần vón vài phút sau đó thu bằng cách ly tâm 11,000 vòng trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Phần CTAB dư được loại bỏ trong bước này.

9. Lật ngược ống và cho dịch thoát ra vào giấy thấm khoảng 1 giờ. Cần thận để phần vón không được trượt ra khỏi thành ống eppendorf. Phần vón nên không chứa ethanol dư mà cũng không được trở nên quá khô. Trong cả hai trường hợp, việc hòa tan lại sẽ khó khăn.

10. Cho thêm một thể tích thích hợp nước cất và để cho các viên vón hòa tan lại ở 40°C mà không cần phải rung động. Sự hòa tan của DNA trong lượng phân tử cao có thể diễn ra từ vài giờ đến qua đêm.

11. Bổ sung RNase A được xử lý làm nóng đến nồng độ $250\mu\text{g/ml}$. Trộn, ủ ở 37°C trong 2 giờ.

12. Thêm 5% thể tích dung dịch NaCl 5M (nồng độ cuối là 0.25M), trộn đều.

13. Thêm 3.5% thể tích cồn 100%, trộn bằng cách đảo ngược và giữ trong nước đá khoảng 10 phút. Polysaccharide sẽ kết tủa trong bước này.

14. Ly tâm 11,000 vòng trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Chuyển dịch nổi sang ống mới.

15. Bổ sung dung dịch isopropanol theo tỷ lệ thể tích 1:1, trộn bằng cách đảo nhẹ vài lần và giữ trong 1 giờ ở -20°C.

16. Ly tâm 11,000 vòng trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, rửa vón trong ethanol 70% và ly tâm lại lần nữa.

17. Tháo dịch khỏi phần vón và hòa tan lại trong nước cất. Bảo quản ở -20°C.

b. Phương pháp PCR

Kỹ thuật được sử dụng để làm sản sinh các đặc trưng nhận dạng DNA là kỹ thuật RAPD-PCR. Trong nghiên cứu này, 33 môi RAPD được sử dụng trong nghiên cứu thuộc nhóm môi BIO, OPA, OPC, OPM, OPN, S, và UBC do hãng Operon cung cấp (bảng 2.2).

Bảng 2.2. Tên và trình tự các môi RAPD

STT	Môi	Trình tự Nu (5'-3')	STT	Môi	Trình tự Nu (5'-3')
1	BIO27	TGGGCTCGCT	12	OPN6	GAGACGCACA
2	OPC2	GTGAGGCGTG	13	OPN7	CAGCCCAGAG
3	OPA1	CAGGCCCTTC	14	OPN10	ACAACCTGGGG
4	OPA2	TGCCGAGCTG	15	OPN13	AGCGTCACTC
5	OPA18	AGGTGACCGT	16	OPM9	GTCTTGCGGA
6	OPA4	AATCGGGCTG	17	S300	AGCCGTGGAA
7	OPA15	TTCCGAACCC	18	S201	GGGCCACTCA
8	OPA6	GGTCCCTGAC	19	UBC728	GTGGGTGGTG
9	OPC10	TGTCTGGGTG	20	OPM9	GTCTTGCGGA

10	OPC11	AAAGTCGCGG	21	OPM18	CACCATCCGT
11	OPC14	TGCGTGCTTG	22	OPN5	ACTGAACGCC

Phương pháp PCR: phản ứng được tiến hành với các thành phần phản ứng như sau: DNA mẫu 25ng, dung dịch đệm PCR 1X, MgCl₂ 2mM, dNTP 10μM, Taq polymerase 1U, mỗi RAPD 1μM và bổ sung H₂O để tổng thể tích phản ứng là 15μl.

Chu trình nhiệt phản ứng PCR:

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	95	5 phút	1
2	Biến tính	95	1 phút	40
3	Bắt cặp mồi	35	1 phút 30 giây	
4	Kéo dài mạch	72	1 phút 45 giây	
5	Hoàn tất kéo dài	72	7 phút	1
6	Kết thúc phản ứng	4	∞	1

c. Điện di trên gel agarose

Sản phẩm PCR được phân tách bằng điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TBE 1X. Thực hiện điện di ở điện thế 100V, 90mA trong khoảng 30 phút. Nhuộm bản gel với ethidium bromide trong 10 phút rồi rửa lại bằng nước. Hiện thị sản phẩm khuếch đại dưới ánh sáng đèn cực tím (UV) của máy soi gel. Sản phẩm khuếch đại được nhận biết nhờ kích thước của chúng dựa vào thang DNA chuẩn 1Kb.

d. Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Office Excel 2003. Các băng RAPD được ghi nhận sự có mặt hoặc vắng mặt của chúng trên gel, các băng xuất hiện được chấm là 1 và các băng không xuất hiện được chấm là 0. Các số liệu này được xử lý theo chương trình Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System computer program version 2.01 (NTSYS-pc2.1.1) (F.J Rohlf., 2000) [15] để xác định hệ số tương đồng di truyền và xây dựng cây quan hệ phát sinh.

Tính toán hệ số tương đồng được dựa theo công thức:

$$J_{ij} = \frac{2n_{ij}}{n_i + n_j}$$

Trong đó: - n_{ij} là số băng DNA có ở cả hai mẫu i và j

n_i và n_j là tổng số băng RAPD của từng cá thể i và j tương ứng.

- J_{ij} là hệ số tương đồng giữa hai mẫu i và j

2.2.4 Đánh giá sự ổn định di truyền các dòng cúc đột biến tiềm năng qua các thế hệ vi nhân giống

Vật liệu nghiên cứu là các mẫu của 06 dòng hoa cúc đột biến tiềm năng được chọn lọc và nhân *in vitro* ở các thế hệ khác nhau cùng với 02 giống gốc đối chứng tương ứng của chúng.

Phương pháp tách chiết DNA và phương pháp chạy PCR như phần đánh giá đa dạng di truyền 2.2.3.

Mỗi RAPD được sử dụng trong nghiên cứu là 07 mỗi decamer, gồm: BIO27, OPC2, OPA2, OPA6, OPA15, OPA18, S201, S208, và UBC728.

PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả nhân các thể đột biến qua sàng lọc trên đồng ruộng (M1V0) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*

Kết quả vào mẫu và phát sinh chồi trực tiếp của 6 thể đột biến tiềm năng và 2 đối chứng của chúng như sau:

Bảng 3.1: Kết quả vào mẫu cánh hoa của 06 thể đột biến tiềm năng (M1V0) và mẫu giống gốc đối chứng của chúng

ST T	Các thể đối chứng và đột biến	Số lượng cánh hoa vào mẫu M1V0	% mẫu sống sót	% mẫu phát sinh callus	% mẫu phát sinh chồi	Số chồi trung bình/mẫu	Số lượng chồi tạo ra M1V1
1	E2	20	80	80	70	6,9	97
2	E28	20	80	75	70	6,8	95
3	E29	20	75	70	70	6,9	97
4	E	20	80	80	70	6,9	97
5	I7	20	75	70	65	7,2	94
6	I8	20	70	70	65	7,1	92
7	I9	20	80	80	70	6,9	97
8	I	20	75	70	60	7,2	86

Ghi chú: Các tỷ lệ trong bảng là so với tổng số lượng mẫu khử trùng, vào mẫu lại ban đầu

Trong những mẫu bị nhiễm thì phần lớn là các mẫu bị nhiễm khuẩn phát hiện sau 5 – 10 ngày sau khi vào mẫu. Những mẫu không nhiễm nhưng bị hoá nâu theo quan sát của chúng tôi là do các mẫu này qua quá trình khử trùng làm mẫu đã bị dập gây tổn thương mô.

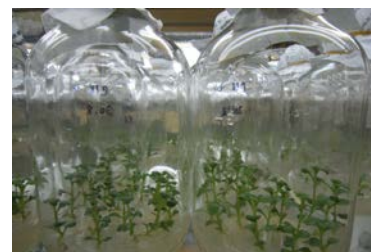
Kết quả sau 30 ngày cấy như sau:



Tái sinh cụm chồi từ cánh hoa



Nhân nhanh



Tái sinh cây hoàn chỉnh

Hình ảnh mô tả các bước nhân dòng đột biến in vitro

Tiến hành tách các chồi được hình thành chuyển sang môi trường nhân cụm chồi, các chồi được tách ra lúc này thuộc thể hệ M1V1, kết quả sau 30 ngày như sau:

Bảng 3.2. Hệ số nhân *in vitro* của 06 dòng đột biến tiềm năng (M1V1) cùng với đối chứng tương ứng của chúng

STT	Các thể đột biến	Số lượng chồi cây chuyển M1V1	Hệ số nhân chồi	Số lượng chồi tạo ra sau nhân chồi lần 1
1	E2	97	3,6	357
2	E28	95	3,7	352
3	E29	97	3,4	348
4	E	97	3,8	367
5	I7	94	3,2	333
6	I8	92	3,0	323
7	I9	105	3,2	298
8	I	86	3,3	312
	Trung bình		3,4	336,25

Sau khi nhân qua 3 thế hệ, đến thế hệ M1V3 chúng tôi tiến hành tạo cây hoàn chỉnh để trồng thử nghiệm ngoài đồng ruộng xác định độ phân li về mặt hình thái.

Cây tại thời điểm 22 ngày có 4 – 5 lá cao trên 3 cm, chúng tôi chọn những bình nuôi cấy mô (200 cây) có chứa các cây có kích thước tương đối đều nhau đem ra để dưới ánh sáng tán xạ ngoài môi trường (75% ánh sáng tự nhiên) để cây thích ứng với điều kiện tự nhiên 7 ngày trước khi đem cây ra vườn ươm. Các cây còn lại chúng tôi để lưu giữ tại phòng cấy mô của Trung tâm.

3.1.2 Kết quả xác định tính phân li trong lần trồng thử nghiệm đầu tiên các thể đột biến tiềm năng

Kết quả chuẩn bị cây giai đoạn vườn ươm

Qua quá trình chuyển cây từ trạng thái *in vitro* sang trạng thái *ex vitro* và chăm sóc trong vườn ươm sau 30 ngày, tỷ lệ sống của cây như sau:




Bảng 3.3. Tỷ lệ sống của cây con từ các dòng đột biến thuộc thể hệ M1V3






STT	Kí hiệu	Phương thức chiếu và liều chiếu	Số lượng cây <i>in vitro</i> ra vườn ươm	Số lượng cây con sống sau 30 ngày	Tỷ lệ sống (%)
1	E Đối chứng	0	200	190	95
2	E2	Gamma 20 Gy	200	176	88
3	E28	Gamma 40 Gy	200	178	89
4	E29	Gamma 40 Gy	200	185	92.5
5	I đối chứng	0	200	168	84
6	I7	Gamma 40 Gy	200	183	91.5
7	I8	Gamma 30 Gy	200	179	89.5
8	I9	Gamma 40 Gy	200	182	91
	Trung bình			180.1	90.1


Qua đó cho thấy tỷ lệ sống của cây dao động trong khoảng ở các dòng 84% đến 95%, trung bình là 90,1%. So với việc ra cây *in vitro* bình thường, tỷ lệ sống của cây nằm trong mức trung bình và các dòng đột biến có tỷ lệ sống ở giai đoạn vườn ươm hầu như không phụ thuộc gì vào việc chúng được tạo ra thông qua chiếu xạ.

Cũng qua quá trình theo dõi, ghi nhận đặc điểm sinh trưởng phát triển, dựa trên các tiêu chí sàng lọc đột biến được nêu trong phần phương pháp, nhóm thực hiện đề tài đã phát hiện và ghi nhận được các thể biến dị/đột biến kiểu hình (phenotypical mutants) chủ yếu về chiều cao thân cây, kích thước hoa, màu hoa, cấu trúc hoa, màu sắc lá, màu thân, một số đặc điểm khác.

Bảng 3.4: Đặc điểm hình thái của 6 thể đột biến tiềm năng so với các chủng đối chứng của chúng

STT	Kí hiệu	Phương thức chiếu và liều chiếu	Mô tả đặc điểm đã chọn được	Trồng thể nghiệm lần 1 (M1V3)		Hình ảnh
				Đặc điểm xuất hiện sau trồng		
				Mô tả	Tỷ lệ (%)	
1	I	Đối chứng	Chiều cao thân cây trung bình 80 - 110cm - Số lượng hoa trung bình 5-8 hoa/cây - Kích thước cụm hoa trung bình: 7 - 11 cm. - Hoa màu đồng	Không thay đổi so với ban đầu	100	
2	I8	Gamma 40 Gy	- Chiều cao thân cây trung bình 80 - 110cm - Số lượng hoa trung bình 5-8 hoa/cây - Kích thước cụm hoa trung bình: 7 - 11 cm. - Hoa màu vàng tươi	Hoa màu vàng tươi	87.3	
3	I7	Gamma 30 Gy	Cánh hoa chuyển màu vàng tươi	Hoa màu vàng tươi	91.5	

4	I9	Gamma 40Gy	Cánh hoa chuyển màu vàng, xuất hiện cánh phụ	Cánh hoa chuyển màu vàng, xuất hiện cánh phụ	2.1	
5	E	Đôi chứng	Chiều cao thân cây trung bình 80 - 110cm - Số lượng hoa trung bình 6-8 hoa/cây - Kích thước cụm hoa trung bình: 7 - 11 cm. Cánh hoa màu tím	Không thay đổi so với ban đầu	100	
6	E2a	Gamma 20 Gy	Cánh hoa có cấu trúc hình ống	Cánh hoa có cấu trúc hình ống	78.2	
7	E2c	Gamma 20 Gy	- Cánh hoa có cấu trúc hình ống toàn bộ bông hoa	Cánh hoa có cấu trúc hình ống toàn bộ bông hoa	65.8	
8	E28	Gamma 40 Gy	Cánh hoa chuyển màu tím nhạt	Cánh hoa chuyển màu tím nhạt	92.1	

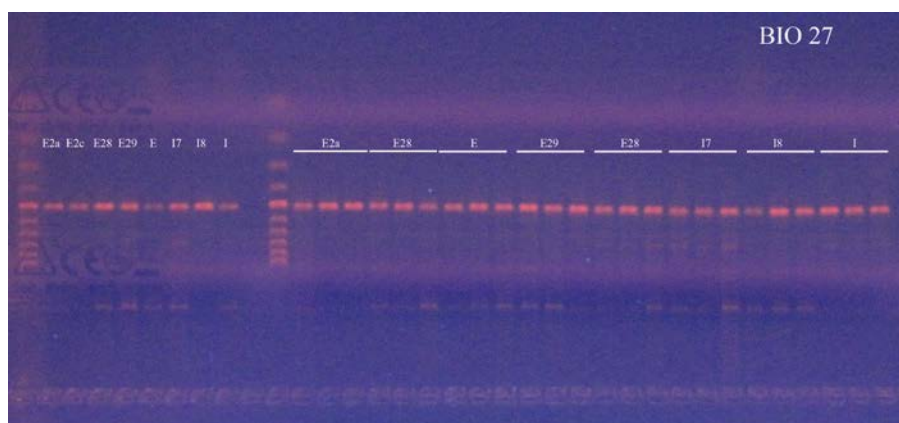
	E29	Gamma 40 Gy	- Cánh hoa chuyển trắng phớt tím	Cánh hoa chuyển trắng phớt tím	72.5	
--	-----	----------------	-------------------------------------	---	------	---

Có thể nhận thấy ở các dòng hoa cúc đột biến E2, E28, E29, I7, I8 phân ly ít ngay từ vụ trồng thử nghiệm đầu tiên. Các chủng gốc tương ứng với các thể đột biến không phân ly. Chỉ có các thể dòng I9 là thể hiện sự phân ly gần như mất hết đặc điểm cánh hoa có lớp cánh phụ bên trong, chỉ 2.1% số cây trồng giữ được đặc điểm như đột biến ban đầu.

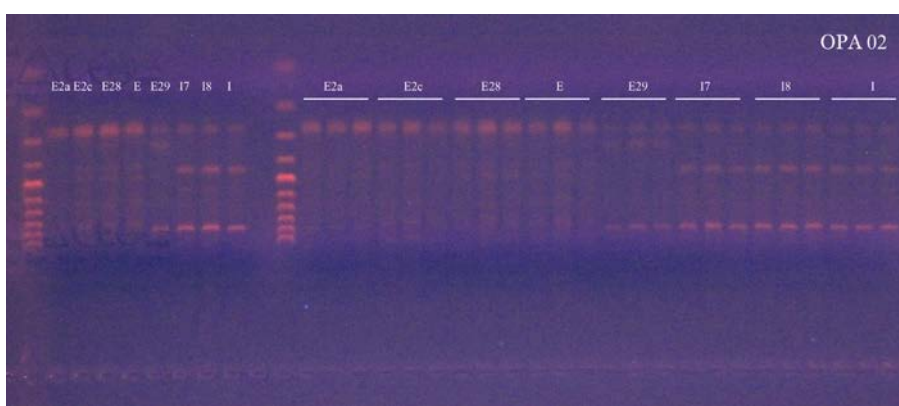
Mẫu lá lấy từ các cá thể mang tính trạng đột biến vẫn được thu thập cùng với 6 thể đột biến tiềm năng còn lại (E2a, E2c, E28, E29, I7, I8) cũng như các đối chứng tương ứng của chúng để tách chiết DNA phục vụ cho việc khảo sát sự khác biệt và đa dạng di truyền của chúng.

3.2 Kết quả về đánh giá đa dạng di truyền các thể đột biến tiềm năng tạo ra thông qua chiều xạ gamma

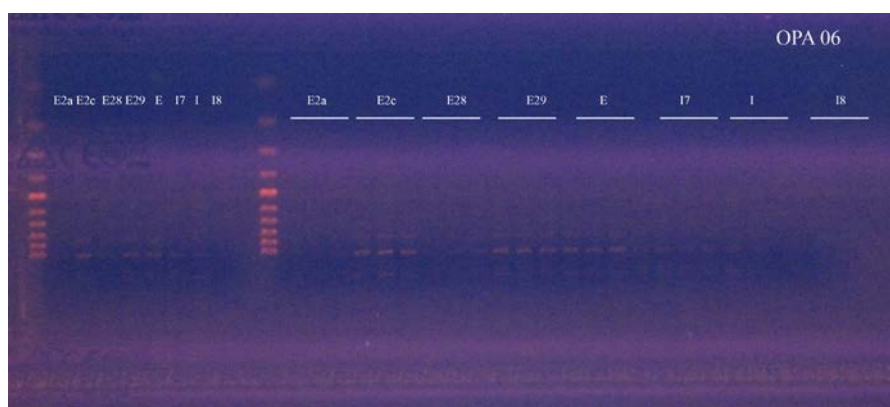
Sử dụng 9 môi decamer để khuếch đại 8 mẫu DNA của 2 giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng, ghi nhận ảnh và lập ma trận về sự xuất hiện, vắng mặt của các band DNA sau quá trình điện di đã đi đến kết quả ghi nhận được tổng số 61band DNA, trong đó có 11 band đơn hình và 50 band đa hình. Tỷ lệ band đa hình ghi nhận được như vậy là khá cao so với kết quả nghiên cứu của Barakat. Tác giả này đã sử dụng 5 môi RAPD để khuếch đại các băng ADN của giống hoa cúc Delistar và 13 dòng cúc đột biến. Kết quả đã thu được từ 6-14 băng/môi, các băng có kích thước dao động từ 300 đến 1200bp. Trong tổng số 48 băng thu được, tỉ lệ băng cho đa hình là 52.1%, tỉ lệ các băng đơn hình là 46.9%. Hệ số tương đồng di truyền giữa giống gốc và các dòng đột biến dao động từ 0,425 đến 0.95. Qua đó tác giả đã kết luận có sự khác biệt di truyền lớn giữa giống cúc gốc và các dòng đột biến gây tạo bằng tia gamma (Barakat, 2010) [1].



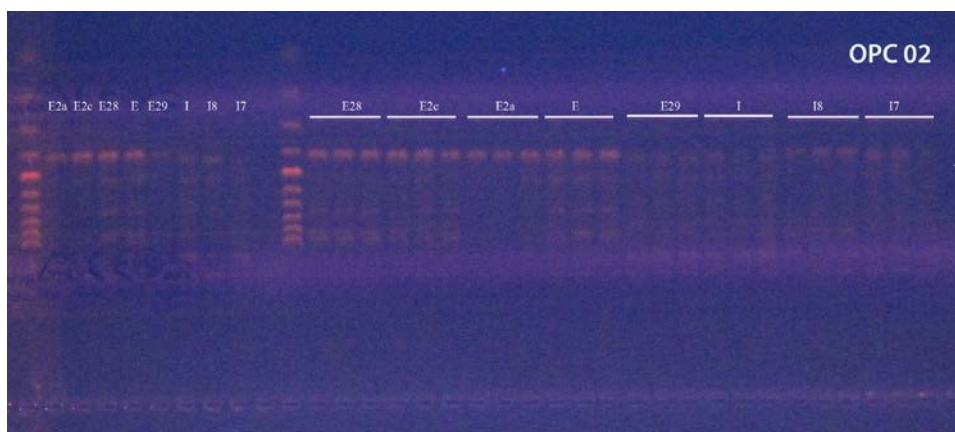
Hình 3.1: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi BIO 27



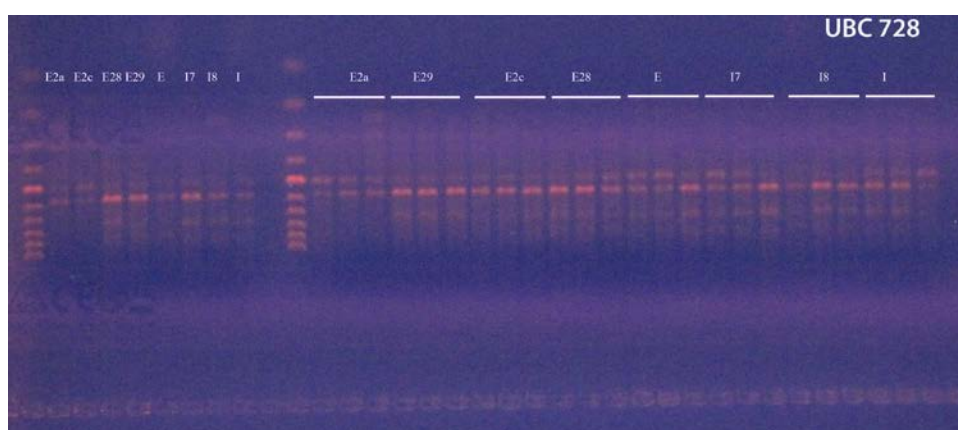
Hình 3.2: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPA 02



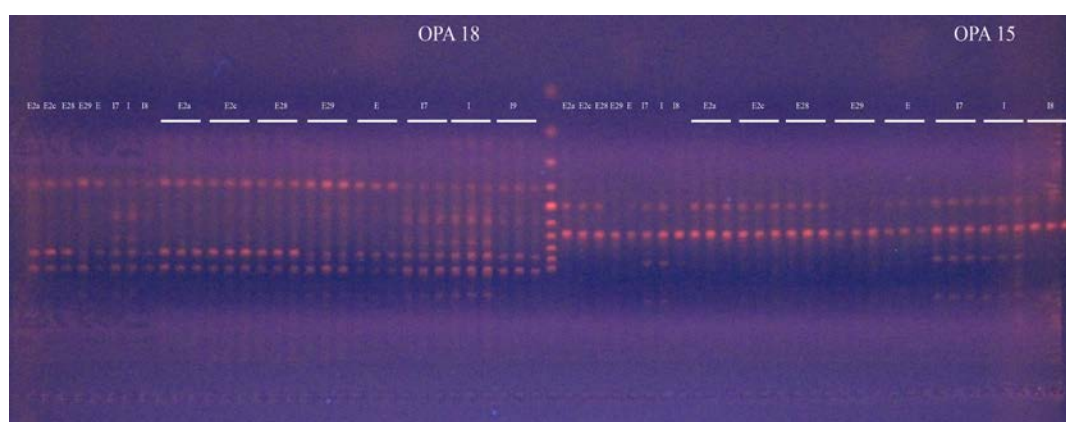
Hình 3.3: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPA 06



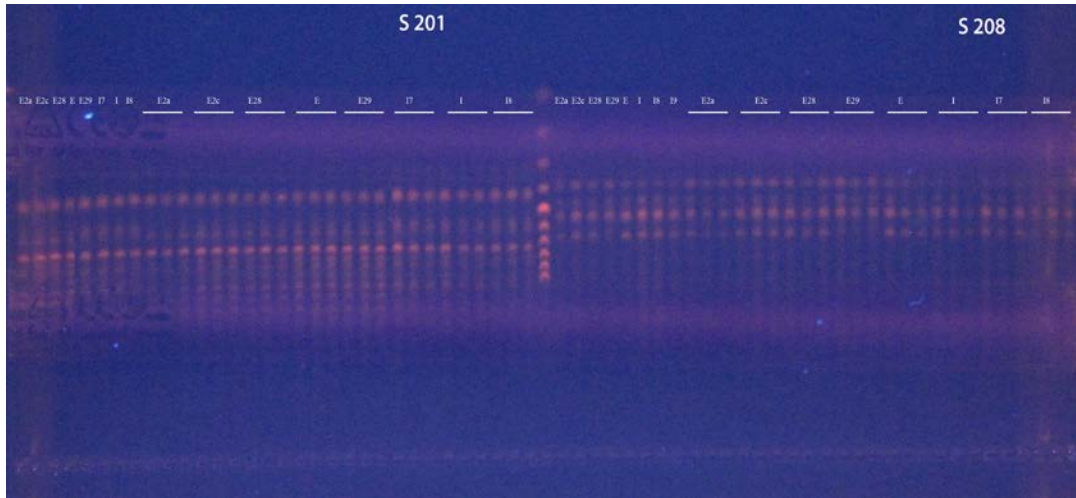
Hình 3.4: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPC 02



Hình 3.5: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi UBC 728



Hình 3.6: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi OPA 18, OPA 15



Hình 3.7: Ảnh điện di đánh giá tính đa dạng di truyền và tính ổn định các thể đột biến tiềm năng với môi S201, S208

Từ tập hợp hình ảnh và các ma trận về sự xuất hiện, vắng mặt của các band DNA sau quá trình điện di có thể nhận thấy có 9 sự xuất hiện duy nhất và 3 sự vắng mặt duy nhất của một band DNA sau điện di ở một mẫu từ thể đột biến được khảo sát khi sử dụng một môi nhất định. Đặc điểm này được thống kê lại trong bảng dưới đây:

Bảng 3.5. Ghi nhận về sự xuất hiện, vắng mặt đặc biệt của các band DNA

MÔI	Marker			
	Băng xuất hiện duy nhất ở mẫu		Thiếu vắng băng duy nhất ở mẫu	
	Band có kích thước	Mẫu	Band có kích thước	Mẫu
UBC 728	1	E2a		
	5	E29		
	6	I7		
BIO 27	2	I7		
S201	7	E2c		
			8	I8
S208			1	I7
			4	E29
OPA18	2	E29		
	7	E29		
	9	E29		
OPA2	2	E29		

Theo như thống kê trên thì các thể đột biến sau có thể được phân biệt với tổng thể mẫu còn lại: ở thể đột biến E29 là thông qua 5 sự xuất hiện và 1 sự vắng mặt của band DNA sau điện di duy nhất; ở thể đột biến I7 là thông qua 2 sự xuất hiện và 1 sự vắng mặt duy nhất của band DNA; ở thể đột biến E2a là thông qua 1 sự xuất hiện duy nhất của band DNA; ở thể đột biến I8 là thông qua 1 sự vắng mặt duy nhất của band DNA. Có thể đề xuất sử dụng dữ liệu này để làm marker nhận dạng các dòng đột biến. Cũng từ kết quả này cho thấy thể đột biến E29 đã có những thay đổi mạnh mẽ về di truyền do tác động của bức xạ Gamma so với những đột biến khác, cũng cùng từ một giống gốc (E), cùng chịu tác động của một liều chiếu và cùng được khuếch đại DNA trong cùng điều kiện nhưng thể đột biến E28 không hình thành nên các đặc điểm khác biệt duy nhất như thể đột biến E29. Tuy rằng có thể là do số lượng môi khuếch đại được sử dụng trong khuôn khổ đề tài này là chưa đủ nhiều để có thể nhận ra tất cả các thay đổi di truyền sau quá trình chiếu xạ nhưng những gì được ghi nhận và trình bày trên cũng có thể góp phần bổ sung dẫn liệu cho luận điểm các đột biến di truyền xảy ra trong các bộ gene của thực vật dưới tác động của tia Gamma nói riêng, các loại bức xạ nói chung là mang tính ngẫu nhiên, đồng thời kỹ thuật (RAPD-PCR) sử dụng

để làm nảy sinh các đặc trưng nhận dạng DNA trong nghiên cứu này đúng như tên gọi của nó cũng mang tính ngẫu nhiên, không định hướng.

Từ ma trận về sự xuất hiện hay vắng mặt các band DNA sau điện di, qua xử lý thống kê nhóm nghiên cứu đưa ra được kết quả về tính tương đồng/khác biệt di truyền được thể hiện trong bảng sau:

Bảng 3.6. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu thuộc hai giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng

	E2a	E2c	E28	E29	E	I7	I8	I
E2a	1.000							
E2c	0.738	1.000						
E28	0.770	0.836	1.000					
E29	0.689	0.721	0.656	1.000				
E	0.672	0.902	0.902	0.689	1.000			
I7	0.656	0.557	0.590	0.508	0.557	1.000		
I8	0.623	0.492	0.557	0.443	0.525	0.803	1.000	
I	0.623	0.557	0.525	0.475	0.525	0.803	0.869	1.000

Từ bảng hệ số tương đồng giữa các giống gốc và các thể đột biến từ chúng, có thể có các nhận xét sau:

- Trong nhóm I (giống gốc Đóa đồng và các đột biến từ nó) thì:
 - + Mức độ khác biệt di truyền giữa thể đột biến I8 và giống gốc (hệ số tương đồng 0,803) là xa hơn so với giữa thể đột biến I7 và giống gốc (hệ số tương đồng 0,869).
 - + 80.3% cũng là mức độ tương đồng giữa hai thể đột biến I7 và I8.
 - + So với các nghiên cứu có trước thì mức độ sai khác về di truyền giữa các thể đột biến và giống gốc trong nghiên cứu này là ở mức trung bình khá.
- Trong nhóm E (giống gốc Farm tím và các đột biến từ nó) thì:
 - + Mức độ khác biệt di truyền giữa thể đột biến E2a so với giống gốc xa nhất (hệ số tương đồng 0.672), khác biệt di truyền ít nhất so với giống gốc là hai thể đột biến E2c và E28 (hệ số tương đồng 0.902), thể đột biến E29 tương đồng với giống gốc ở mức 68.9%.

+ Trong cả nhóm, mức độ dị biệt di truyền cao nhất là giữa hai thể đột biến E28 và E29 (hệ số tương đồng là 0.656) và mức độ dị biệt di truyền thấp nhất là giữa giống gốc khi so với hai thể đột biến E28 và E29 (hệ số tương đồng 0.902).

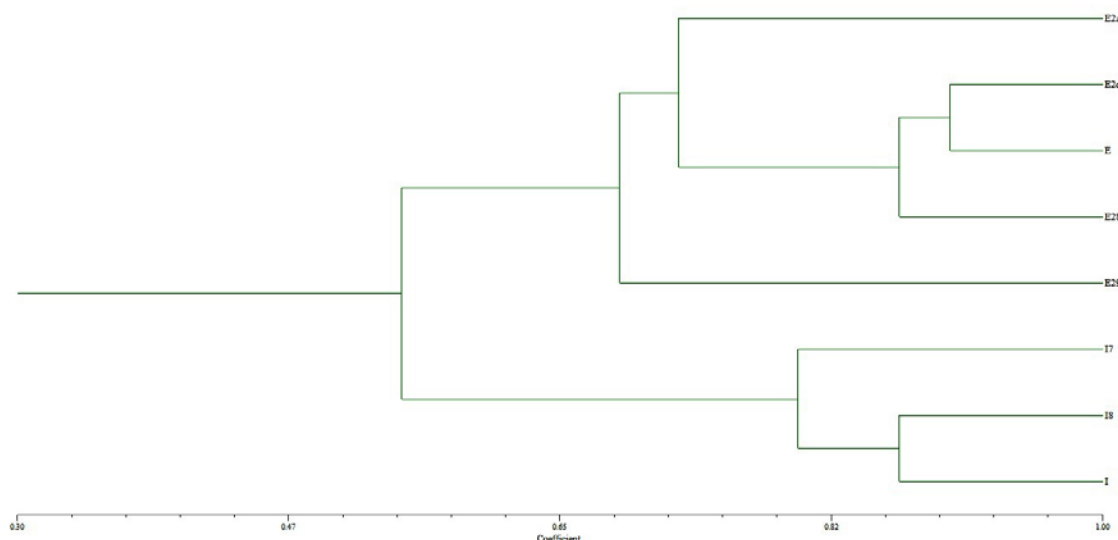
+ So với các nghiên cứu có trước thì mức độ sai khác về di truyền giữa các thể đột biến và giống gốc trong nghiên cứu này là cao.

- Khi so sánh cả hai giống gốc và các thể đột biến từ chúng có thể nhận thấy:

+ Hệ số tương đồng giữa hai giống gốc là 0.525, điều này thể hiện rằng mức độ sai khác di truyền giữa chúng là rất cao và cao hơn so với các khác biệt di truyền do đột biến thông qua chiếu xạ được thực hiện trong nghiên cứu này. Nói cách khác là quá trình chiếu xạ tuy đã tạo ra các đột biến nhưng các thể đột biến hình thành có mức độ dị biệt di truyền không vượt quá phạm vi phân biệt các giống gốc ban đầu.

+ Mức độ sai khác di truyền trong tổng thể các mẫu lớn nhất được ghi nhận khi so sánh hai thể đột biến E29 và I8 (hệ số tương đồng 0.443), tiếp đến là giữa thể đột biến E2c và I8 (hệ số tương đồng 0.443). Nhìn chung khi so sánh riêng các phần tử trong nhóm E (giống gốc Farm tím và các đột biến từ nó) với các phần tử trong nhóm I (giống gốc Đóa đồng và các đột biến từ nó) thì mức độ sai khác di truyền là rất cao, hơn hẳn mức dị biệt di truyền trong mỗi nhóm.

Cũng qua xử lý bằng phần mềm NTSys 2.1, nhóm nghiên cứu thu được sơ đồ dạng cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu DNA thuộc hai giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng như sau:



Hình 3.8: Sơ đồ dạng cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống và các thể đột biến tiềm năng từ chúng

Từ sơ đồ dạng cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu khảo sát về tính đa dạng giữa các giống gốc và các đột biến hình thành từ chúng có thể nhận thấy:

- Có sự phân tách thành hai nhóm khá rõ: nhóm thứ nhất gồm giống gốc Đóa đồng và các đột biến từ nó (nhóm I); nhóm thứ hai gồm giống gốc Farm tím và các đột biến từ nó (nhóm E). Hai nhóm này tương đồng nhau ở mức khoảng 54%.
- Nhóm E có thể chia thành ba phân nhóm chính: phân nhóm thứ nhất chỉ gồm thể đột biến E29, khác biệt khá xa so với tập hợp giống gốc và các đột biến khác; phân nhóm thứ hai cũng chỉ gồm thể đột biến E2a, hình thành nên một nhánh song song với phân nhóm thứ ba; phân nhóm thứ ba gồm giống gốc và hai thể đột biến E2c và E28 vốn có mức độ tương đồng di truyền với giống gốc cao hơn hai thể đột biến còn lại.
- Nhóm I có thể chia thành hai phân nhóm chính: phân nhóm thứ nhất chỉ gồm thể đột biến I7, khác biệt so với phân nhóm thứ hai gồm giống gốc và thể đột biến còn lại.

Mức độ đa dạng di truyền của các dòng cúc đột biến so với các giống gốc cũng tương tự kết quả nghiên cứu nhóm tác giả Senapati và cộng sự [59]. Kết quả phân tích đa dạng di truyền giữa các dòng hoa hồng đột biến gây tạo bằng việc sử dụng EMS kết hợp với nuôi cấy *in vitro*, tác giả đã chỉ ra sự sai khác di truyền dao động từ 19.2 đến 27.1% (hệ số tương đồng di truyền giữa các dòng hoa hồng đột biến First red; Cri Cri và Pusa Gaurav dao động từ 72.9 đến 80.8%) (Senapati và cộng sự 2008) [59]. Cũng trên đối tượng hoa hồng, Chakrabarty đã sử dụng 20 môi RAPD để khuếch đại các băng ADN của 6 giống gốc và 12 dòng đột biến được tạo ra bằng chiếu xạ tia gamma. Kết quả đã thu được 48 băng đa hình ở 7 môi, hệ số tương đồng di truyền giữa 18 giống dao động từ 0.40 đến 0.91. Tác giả kết luận thị RAPD không chỉ hiệu quả để đánh giá đa dạng di truyền giữa các giống được gây tạo đột biến bằng tia gamma mà còn rất hữu ích để nhận dạng chính xác các giống hoa hồng đột biến mới phục vụ công tác bảo hộ và đăng kí bản quyền giống. (Chakrabarty, 2010) [49].

Trên đối tượng hoa cúc, khi phân tích đa dạng di truyền của 10 dòng cúc đột biến được tạo ra bằng việc chiếu xạ tia gamma từ giống cúc Richmond bằng kỹ thuật RAPD, Lema đã chỉ ra mức độ đa dạng thấp giữa các dòng đột biến và cho thấy nhóm

giống cúc Lady có thể nhận dạng chính xác chỉ bằng một môi đơn, hoặc một bộ 2 -3 môi (Lema và cs, 2004) [53]. Tiếp đó, Lema cũng đã sử dụng 20 môi RAPD để đánh giá đa dạng di truyền và nhận dạng các giống cúc đột biến từ giống Red Nero và Lilac Wonder. Giống Mini Nero được tạo ra từ giống Red Nero bằng chiếu xạ tia X liều 25 Gy, 2 giống Rad Wonder và Bronze Wonder được tạo ra từ giống Lilac Wonder bằng chiếu xạ tia gamma liều 15Gy. Kết quả đã thu được 7 môi cho các băng đa hình với tổng số 67 băng ADN (2 đến 16 băng/môi), kích thước băng dao động từ 212-2730 bp. Môi OPR-06 và RAPD-09 có các băng đặc trưng để nhận dạng chính xác cả 5 giống nghiên cứu. Các môi còn lại có thể phân biệt từ 2-3 giống. Hệ số tương đồng di truyền cao nhất là 0.829 giữa giống Lilac Wonder và giống đột biến Red Wonder. Hệ số tương đồng di truyền giữa giống Red Nero và giống đột biến được tạo ra từ nó (Mini Nero) là 0.696. Hệ số tương đồng di truyền thấp nhất là 0.511 giữa giống đột biến Mini Nero và giống đột biến Red Wonder. 5 giống cúc nghiên cứu được chia thành 3 nhóm: nhóm I gồm giống Red Nero và giống đột biến Mini Nero; nhóm II gồm giống Lilac Wonder và giống đột biến từ nó (Red Wonder; nhóm III chỉ có duy nhất giống đột biến Bronze Wonder (Lema và cs, 2005) [54]. Bhattacharya cũng đã báo cáo rằng hệ số tương đồng di truyền giữa các giống cúc đột biến là rất cao, dao động từ 0.17 đến 0.90. Các giống cúc đột biến về màu sắc có thể nhận dạng bằng chỉ thị RAPD tương tự như chỉ thị SCAR (Bhattacharya và cs, 2006) [45].

3.3 Kết quả về đánh giá tính ổn định di truyền các thể đột biến tiềm năng tạo ra thông qua chiếu xạ gamma

Cũng sử dụng 9 môi decamer đã dùng để đánh giá đa dạng di truyền các giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng, sau khi thực hiện kỹ thuật RAPD – PCR trên đối tượng là các mẫu *in vitro* qua các thể hệ M1V3, M1V5, M1V7 của hai giống gốc và 6 dòng đột biến tiềm năng từ chúng, chúng tôi thu được kết quả như sau: ghi nhận được tổng số 61band DNA, toàn bộ những band thu được là band đa hình. Kết quả này cũng trùng với kết quả khuếch đại DNA để đánh giá đa dạng di truyền. Xét về khía cạnh kỹ thuật, tuy kỹ thuật RAPD-PCR được sử dụng để làm nảy sinh các đặc trưng nhận dạng DNA (DNA fingerprinting) được cho là có mức độ tái lập kết quả thí nghiệm (producibility) không cao (Kurt Weising và

cộng sự, 2005 – [62]) nhưng trong cùng một lần khuếch đại trong một máy luân nhiệt thì kết quả không thể hiện sai lệch lớn.

Qua xử lý thống kê, nhóm nghiên cứu đã ghi nhận được các kết quả về tính ổn định di truyền qua các thế hệ M1V3, M1V5, M1V7 của các thể đột biến tiềm năng và các giống gốc của chúng thông qua bảng hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ dạng cây về mối quan hệ di truyền được trình bày dưới đây:

Bảng 3.7: Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu *in vitro* qua ba thế hệ thuộc hai giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng

	E2a-a	E2a-b	E2a-c	E2c-a	E2c-b	E2c-c	E28-a	E28-b	E28-c	E29-a	E29-b	E29-c	E-a	E-b	E-c	I7-a	I7-b	I7-c	I8-a	I8-b	I8-c	I-a	I-b	I-c
E2a-a	1.00																							
E2a-b	1.00	1.00																						
E2a-c	1.00	1.00	1.00																					
E2c-a	0.74	0.74	0.74	1.00																				
E2c-b	0.74	0.74	0.74	1.00	1.00																			
E2c-c	0.74	0.74	0.74	1.00	1.00	1.00																		
E28-a	0.77	0.77	0.77	0.84	0.84	0.84	1.00																	
E28-b	0.77	0.77	0.77	0.84	0.84	0.84	1.00	1.00																
E28-c	0.79	0.79	0.79	0.85	0.85	0.85	0.98	0.98	1.00															
E29-a	0.69	0.69	0.69	0.72	0.72	0.72	0.66	0.66	0.67	1.00														
E29-b	0.69	0.69	0.69	0.72	0.72	0.72	0.66	0.66	0.67	1.00	1.00													
E29-c	0.69	0.69	0.69	0.72	0.72	0.72	0.66	0.66	0.67	1.00	1.00	1.00												
E-a	0.67	0.67	0.67	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.89	0.69	0.69	0.69	1.00											
E-b	0.67	0.67	0.67	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.89	0.69	0.69	0.69	1.00	1.00										
E-c	0.67	0.67	0.67	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.89	0.69	0.69	0.69	1.00	1.00	1.00									
I7-a	0.66	0.66	0.66	0.56	0.56	0.56	0.59	0.59	0.61	0.51	0.51	0.51	0.56	0.56	0.56	1.00								
I7-b	0.66	0.66	0.66	0.56	0.56	0.56	0.59	0.59	0.61	0.51	0.51	0.51	0.56	0.56	0.56	1.00	1.00							
I7-c	0.66	0.66	0.66	0.56	0.56	0.56	0.59	0.59	0.61	0.51	0.51	0.51	0.56	0.56	0.56	1.00	1.00	1.00						
I8-a	0.62	0.62	0.62	0.49	0.49	0.49	0.56	0.56	0.57	0.44	0.44	0.44	0.52	0.52	0.52	0.80	0.80	0.80	1.00					
I8-b	0.62	0.62	0.62	0.49	0.49	0.49	0.56	0.56	0.57	0.44	0.44	0.44	0.52	0.52	0.52	0.80	0.80	0.80	1.00	1.00				
I8-c	0.62	0.62	0.62	0.49	0.49	0.49	0.56	0.56	0.57	0.44	0.44	0.44	0.52	0.52	0.52	0.80	0.80	0.80	1.00	1.00	1.00			
I-a	0.62	0.62	0.62	0.56	0.56	0.56	0.52	0.52	0.54	0.48	0.48	0.48	0.52	0.52	0.52	0.80	0.80	0.80	0.87	0.87	0.87	1.00		
I-b	0.62	0.62	0.62	0.56	0.56	0.56	0.52	0.52	0.54	0.48	0.48	0.48	0.52	0.52	0.52	0.80	0.80	0.80	0.87	0.87	0.87	1.00	1.00	
I-c	0.62	0.62	0.62	0.56	0.56	0.56	0.52	0.52	0.54	0.48	0.48	0.48	0.52	0.52	0.52	0.80	0.80	0.80	0.87	0.87	0.87	1.00	1.00	1.00

Có thể nhận thấy không có sự sai lệch đáng kể giữa kết quả về hệ số tương đồng khi so giữa các mẫu không cùng nguồn gốc từ một thể đột biến tiềm năng nhất định nào đó từ bảng này so với bảng Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu thuộc hai giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng.

Trong bảng 3.7, những ô liền nhau được tô màu lập thành vùng có dạng hình tam giác vuông thể hiện mức độ tương đồng trong từng nhóm gồm mẫu DNA của ba thể hệ từng dòng đột biến tiềm năng cùng với các giống gốc của chúng. Quan sát những vùng ô có màu hồng cho thấy tính ổn định di truyền ở mức tuyệt đối giữa các mẫu cùng nguồn gốc qua ba thể hệ *in vitro* của các dòng đột biến tiềm năng và các giống gốc đối chứng (hệ số tương đồng là 1) ngoại trừ các mẫu có cùng nguồn gốc từ thể đột biến E28.

Đối với dòng đột biến E28, mức tương đồng di truyền giữa hai thể hệ M1V3 và M1V5 vẫn là tuyệt đối, tuy nhiên chỉ số này khi so mẫu M1V3 và M1V5 với M1V7 là 98%. Điều này có nghĩa là đã có sự biến động di truyền ở thể hệ M1V7, tuy sự biến động này không lớn (ở mức 2%) nhưng cũng phần nào thể hiện tính chưa ổn định hoàn toàn về mặt di truyền của dòng đột biến. Trong nghiên cứu của tác giả Mohamed Mohamed Abd-Alla, tính tương đồng di truyền giữa các mẫu *in vitro* và cây mẹ của chúng ở đối tượng *Phoenix dactylifera* var. *karama* trong dải 0,82 – 0,97. S. Mohanty, M. K. Panda, S. Sahoo và S. Nayak nghiên cứu tính ổn định di truyền qua các thể hệ *in vitro* ở *Zingiber rubens* cho thấy luôn có sự biến động di truyền ở tất cả các thể hệ. M.J. Prado và M.T. Herrera đã tiến hành vi nhân giống cây Kiwi và tiến hành phân tích biến động di truyền bằng kỹ thuật AFLP, kết quả cho thấy các mẫu ở lần cây chuyển thứ nhất và thứ 5 cho các band có mức độ đa hình đến 57%. Trong một nghiên cứu có trước của cùng nhóm tác giả thực hiện đề tài này trên đối tượng tương tự là hoa cúc Artfarm trắng và Đóa trắng, sự biến động di truyền qua các thể hệ *in vitro* cũng được thể hiện ở mức thấp khoảng 1% tại thể hệ *in vitro* M1V10 – M1V12. (Nhiệm vụ Nghị định thư cấp nhà nước).

Tính ổn định di truyền qua các thể hệ vi nhân giống M1V3, M1V5, M1V7 của các thể đột biến tiềm năng và các giống gốc của chúng có thể được nhận ra một cách trực quan hơn thông qua sơ đồ sau:

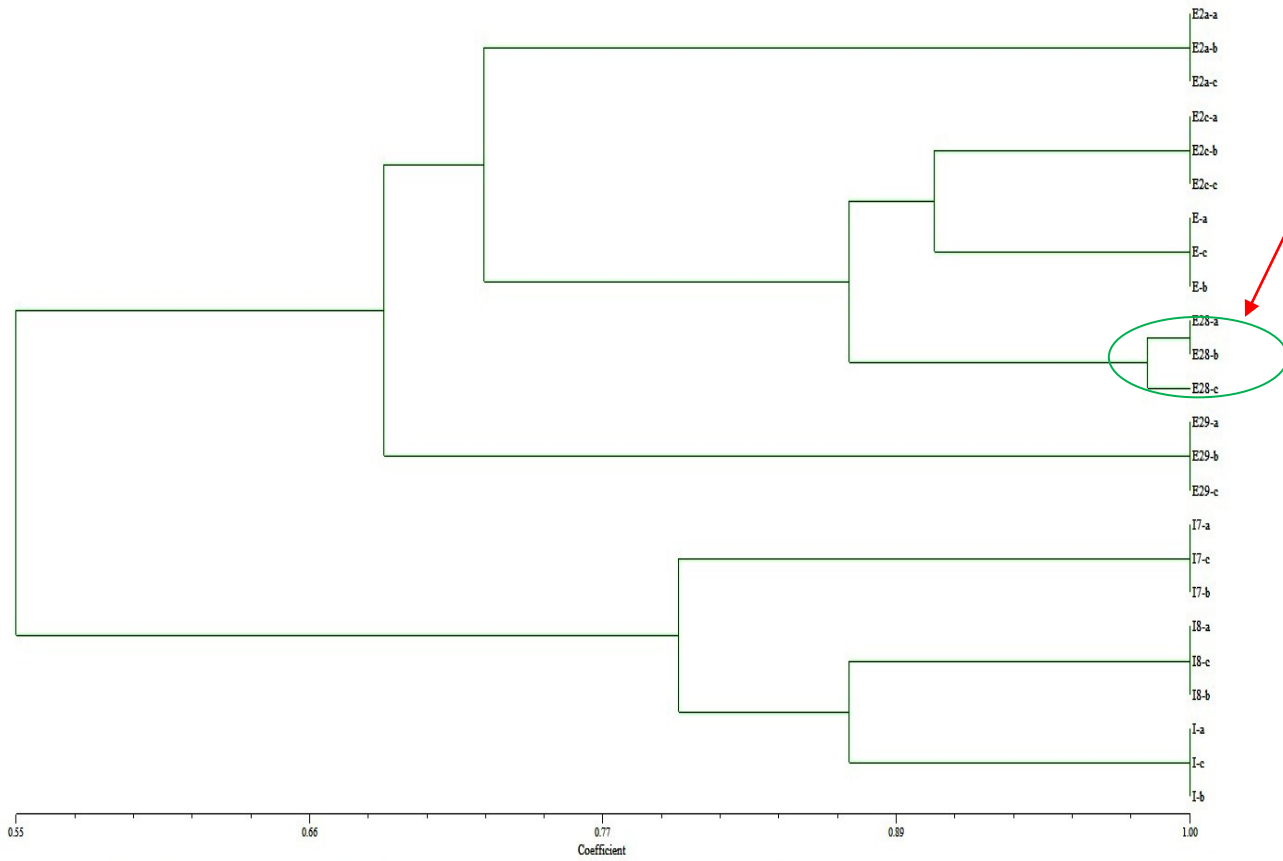
Có thể nhận thấy không có sự sai lệch đáng kể giữa kết quả về hệ số tương đồng khi so giữa các mẫu không cùng nguồn gốc từ một thể đột biến tiềm năng nhất định nào đó từ bảng này so với bảng Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu thuộc hai giống gốc Đóa đồng, Farm tím và các thể đột biến tiềm năng từ chúng.

Trong bảng 3.7, những ô liền nhau được tô màu lập thành vùng có dạng hình tam giác vuông thể hiện mức độ tương đồng trong từng nhóm gồm mẫu

DNA của ba thể hệ từng dòng đột biến tiềm năng cùng với các giống gốc của chúng. Quan sát những vùng ô có màu hồng cho thấy tính ổn định di truyền ở mức tuyệt đối giữa các mẫu cùng nguồn gốc qua ba thể hệ *in vitro* của các dòng đột biến tiềm năng và các giống gốc đối chứng (hệ số tương đồng là 1) ngoại trừ các mẫu có cùng nguồn gốc từ thể đột biến E28.

Đối với dòng đột biến E28, mức tương đồng di truyền giữa hai thể hệ M1V3 và M1V5 vẫn là tuyệt đối, tuy nhiên chỉ số này khi so mẫu M1V3 và M1V5 với M1V7 là 98%. Điều này có nghĩa là đã có sự biến động di truyền ở thể hệ M1V7, tuy sự biến động này không lớn (ở mức 2%) nhưng cũng phần nào thể hiện tính chưa ổn định hoàn toàn về mặt di truyền của dòng đột biến. Trong nghiên cứu của tác giả Mohamed Mohamed Abd-Alla, tính tương đồng di truyền giữa các mẫu *in vitro* và cây mẹ của chúng ở đối tượng *Phoenix dactylifera* var. karama trong dải 0,82 – 0,97. S. Mohanty, M. K. Panda, S. Sahoo và S. Nayak nghiên cứu tính ổn định di truyền qua các thể hệ *in vitro* ở *Zingiber rubens* cho thấy luôn có sự biến động di truyền ở tất cả các thể hệ. M.J. Prado và M.T. Herrera đã tiến hành vi nhân giống cây Kiwi và tiến hành phân tích biến động di truyền bằng kỹ thuật AFLP, kết quả cho thấy các mẫu ở lần cấy chuyển thứ nhất và thứ 5 cho các band có mức độ đa hình đến 57%. Trong một nghiên cứu có trước của cùng nhóm tác giả thực hiện đề tài này trên đối tượng tương tự là hoa cúc Artfarm trắng và Đóa trắng, sự biến động di truyền qua các thể hệ *in vitro* cũng được thể hiện ở mức thấp khoảng 1% tại thể hệ *in vitro* M1V10 – M1V12. (Nhiệm vụ Nghị định thư cấp nhà nước).

Tính ổn định di truyền qua các thể hệ vi nhân giống M1V3, M1V5, M1V7 của các thể đột biến tiềm năng và các giống gốc của chúng có thể được nhận ra một cách trực quan hơn thông qua sơ đồ sau:



Hình 3.9: Sơ đồ dạng cây về tính ổn định di truyền qua các thế hệ *in vitro* của các thể đột biến tiềm năng và các giống gốc của chúng

Trong sơ đồ trên, sự biến động di truyền duy nhất ở các mẫu có nguồn gốc từ thể đột biến E28 được khoanh vùng và chỉ ra bằng mũi tên. Những bộ ba các mẫu có cùng nguồn gốc ở phần tận cùng bên phải của sơ đồ thể hiện tính ổn định di truyền tuyệt đối của các dòng đột biến còn lại và của các giống gốc.

Kết quả vừa được trình bày và bàn luận trên cho thấy rằng về tổng thể thì các dòng đột biến tiềm năng cũng như các giống gốc của chúng thể hiện tính ổn định di truyền qua các thế hệ vi nhân giống ở mức cao và rất cao.

PHẦN 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Những kết quả đạt được của đề tài là phù hợp với nội dung, số lượng sản phẩm khoa học công nghệ và tiến độ đã đăng ký. Đồng thời các kết quả đạt được trong giai đoạn 2 của đề tài cũng đã chứng tỏ được khả năng tạo giống bằng phương pháp đột biến thông qua chiếu xạ Gamma. Tuy nhiên các kết quả nêu trên chỉ là tiền đề cho các khảo sát thí nghiệm sau này để có thể đưa vào sản xuất thực tế.

Trong giai đoạn 2 của đề tài đã đạt các kết quả như sau:

– Ở thế hệ M1V3, các dòng hoa cúc đột biến E2, E28, E29, I7, I8, không phân ly tính trạng đột biến về màu sắc được lựa chọn ngay từ vụ trồng thế nghiệm đầu tiên, tuy nhiên có tỉ lệ phân li khá lớn về đột biến cấu trúc cánh hoa nên chúng tôi tiến hành lấy mẫu trên những cá thể giữ nguyên đặc điểm đột biến để nhân và khảo sát lại, riêng dòng I9 tỉ lệ phân li lớn chúng tôi loại bỏ.

Đánh giá đa dạng di truyền:

Có sự phân tách thành hai nhóm khá rõ: nhóm thứ nhất gồm giống gốc Đóa đồng và các đột biến từ nó (nhóm I); nhóm thứ hai gồm giống gốc Farm tím và các đột biến từ nó (nhóm E). Hai nhóm này tương đồng nhau ở mức khoảng 54%.

Nhóm E có thể chia thành ba phân nhóm chính: phân nhóm thứ nhất chỉ gồm thể đột biến E29, khác biệt khá xa so với tập hợp giống gốc và các đột biến khác; phân nhóm thứ hai cũng chỉ gồm thể đột biến E2a, hình thành nên một nhánh song song với phân nhóm thứ ba; phân nhóm thứ ba gồm giống gốc và hai thể đột biến E2c và E28 vốn có mức độ tương đồng di truyền với giống gốc cao hơn hai thể đột biến còn lại.

Nhóm I có thể chia thành hai phân nhóm chính: phân nhóm thứ nhất chỉ gồm thể đột biến I7, khác biệt so với phân nhóm thứ hai gồm giống gốc và thể đột biến còn lại.

Đánh giá ổn định di truyền:

Các dòng đột biến tiềm năng cũng như các giống gốc của chúng thể hiện tính ổn định di truyền qua các thế hệ vi nhân giống ở mức cao và rất cao.

4.2 Kiến nghị

Nhằm ứng dụng kết quả nghiên cứu của nhiệm vụ vào thực tiễn sản xuất nông nghiệp tại vùng trồng hoa Đà Lạt theo chỉ đạo của Bộ Khoa học và Công nghệ cũng như mong muốn của chính quyền địa phương, chúng tôi xin được kiến nghị như sau:

Trồng thử nghiệm khảo sát thêm 3 vụ để thực hiện thêm các khảo nghiệm đánh giá tính khác biệt (Distinctness), tính đồng nhất (Uniformity), tính ổn định (Stability) của giống cây trồng mới (DUS) cũng như đánh giá giá trị canh tác và giá trị sử dụng (Value of Cultivation and Use - VCU).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Đào Thanh Bằng (2007), “*Kết quả nghiên cứu chiếu xạ in vitro nhằm tạo và tách dòng đột biến hoa cúc (Fuji white standard)*”, Viện di truyền nông nghiệp Hà Nội.
2. Phạm Văn Duệ (2005), “*Giáo trình di truyền và chọn tạo giống cây trồng*”, NXB Hà Nội.
3. Phạm Văn Duyệt (1998), “*Phương pháp vật lý và lý sinh phóng xạ phóng xạ dùng trong nông nghiệp, sinh học và y học*”, NXB Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.
4. Phan Thị Hiền (2006), “*Nghiên cứu ảnh hưởng của bức xạ Gamma lên sự sinh trưởng của cây vừng*”, khóa luận cử nhân khoa học, Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM.
5. Đoàn Phạm Ngọc Ngà (2007), “*Ảnh hưởng của bức xạ Gamma lên sinh trưởng phát triển và chất lượng dầu của cây mè đen (Sesamun indicum L)*”, luận văn thạc sĩ, Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM.
6. Lê Ngọc Triệu (2012), Nhiệm vụ Nghị định thư “*Hợp tác chiếu xạ in vitro, in vivo trong chọn tạo một số giống hoa đột biến ở Việt Nam*”
7. Hoàng Trọng Phán, Trương Thị Bích Phượng (2009), “*Giáo trình cơ sở di truyền và chọn giống thực vật*”, Đại Học Huế.
8. Phạm Hữu Tôn (2010), “*Giáo trình công nghệ sinh học trong chọn giống và sản xuất cây trồng*”, Đại học Nông Nghiệp 1 Hà Nội.
9. Nguyễn T Kim Lý, (2012), Kỹ thuật trồng và chăm sóc cây hoa cúc, nxb Nông nghiệp.
10. Lê Tiến Thành, (2010), “*Quy trình tạo hạt nhân tạo cho hoa cúc*”, Trung tâm ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong công nghiệp, Viện năng lượng nguyên tử Việt Nam.

Tài liệu tiếng nước ngoài

11. A.M. Van Harten (1997) “*Mutation breeding in vegetatively propagated crops*”. 15th IAEA/FAO Interregional training course on advances in technologies for induced mutation in crops.
12. Etsuo Amano (2001), “*Radiation sensitivity of Plants*”, Reviewed of Takashi Yamaguchi Inst. Rad.Breed., N.I.A.R.1989.
13. Etsuo Amano (2004), “*Practical suggestion for Mutation Breeding*”, Fukui Prefectural University, pp.3-14.
14. Cotton R.G.H (1993), “*Current methods of mutation detection*”, Mutation research, Elsevier Science Publishers B.V, pp. 125-144, 285.

15. Florencio I.S., Etsuo Amano, Shigemitsu Tano (2004), “*Mutation breeding Manual*”, Forum for Nuclear Cooperation in Asia.
16. Harding J., F.Singh, J.N.M. Mol (1991), “*Genetics and breeding of Ornamental Spesies*”, Kluwer Academic Publisher, pp. 135-152.
17. Harten A.M.V., (1997), “*Mutation breeding in Vegetatively Propagated Crops*”, Plant breeding and Genetics section, joint FAO/IAEA, pp.48-53.
18. Hitoshi Nakagawa (2009), “*Mutation breeding by Gamma Rays*”, Presentation about Institute of Radiation breeding.
19. Hitoshi Nakagawa (2008), “*Mutation breeding and Biological researchs by the use of Gamma Rays irradiation in Japan*”, Mutation breeding Project Workshop of FNCA.
20. Keichi Takagi, Masanori, Hitashita, Ngoc Trieu Le (2008), “*Internal debudding Effects of proton beams to variegated Petunia*”, Annual report, Wakasa Wan Energy Research Centre.
21. Toshio Takuy (2002), “*Applied Irradiation Protocols*”, Document for Internal circulation only of Institute of Radiation breeding.
22. Takyu T., T.N.Le (2010). “*Study on Acute and chronic irradiation facilities and techniques for Radiation bressding*”, Document for Internal circulation only of Institute of Radiation breeding – NIAS (chapter 7).
23. Kurt Weising, Hilde Nybom, Kirsten Wolff, Gunter Kahl (2005), “*DNA fingerprinting-Principles, methods, and Applications*”, CRC Press-Taylor & Francis Group, second edition.
24. Watson D.J, Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. (2004), “*Molecular biology of the gene*”. Benjamin/Cummings, San Francisco, USA.
25. Zeeshan Abbas, Naheed Ikram, Shahnaz Dawar and Javed Zaki (2010), “*Effect of (60 COBALT) Gamma rays on Growth and root rot diseases in mungbean (Vigna Radiata.L)*, Pak. J. Bot., 42(3): 2165-2170.
26. “*Reactor Concepts Manual -Biological Effects of Radiation*”, USNRC Technical Training Center.
27. Nguyen Q.T and Kozai T., (1998), “*Environmental control and its effects on the growth of plantlets in micropropation*”, Environ. Control in Biol., 36(2): 59-57.
28. Kozai T., (1991), “*Photoautotrophic micropropagation*”. In vitro Cell Bio. Dev. 27:47-51.
29. Kozai T., (1996), “*Environmental control and effects in transplant production under artificial light*”, J. Kor. Soc. Hort. Cont. Sci., 114(2): 12-16.
30. Willmer EN, (1966), “*Cell and tissue in culture, Methods, Biology and Physiology*” 3: 1-825.

31. Zobayed SMA, Aftenn F, Kozai T., (2000), “*Quality biomass Production via photoautotrophic micropropagation*”, Acta Hort.
32. Sonnino A, Ancora G and Locardi C, (1986), “*In vitro mutation breeding of potato. Use of propagation by microcutting. In: Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement*, IAEA/FAO Proc. Symp., Vienna, Aug. 19-23,1985.
33. Novak F. J, (1990), Plant tissue culture techniques for mutation breeding. A training manual. Joint FAO/IAEA program, IAEA, Austria
34. IAEA, 1986, *In vitro* technology for mutation breeding, IAEA-Tecdoc-392, IAEA, Vienna
35. Broertjes, Van Harten, 1988, Applies mutation breeding for vegetatively propagated crops. Amsterdam, New York: Elsevier
36. De jong J. huitema J.B.M, Preil W, 1991, use of *in vitro* techniques for the selection of stress tolerant mutants. In IAEA (ed.): Plant mutation breeding for crop improvement Vol. 2. Joint FAO/IAEA Proc. Inter. Sym., June 18-22, 1990. Vienna, Austria.
37. Thinh N.T et al, 1993, *In vitro* mutation breeding of sweet potato. Report for the 3rd (final) Co-ordination meeting on Impro. Root & Tuber crops in trop. Asian countries. Kumamoto, Feb. 19-23, 1993, Japan
38. Ahloowalia B. S, 1992, *In vitro* radiation induced mutants in Chrysanthemum. Mutation Breeding News Lett., 39:6. IAEA, Vienna, Austria
39. I. Dwimahyani and S. widiarsih, 2008, The effects of Gamma irradiation on the growth and propagation of *in vitro* Chrysanthemum shoot explants (cv. Yellow Puma), Atom indonesia Vol. 36 No2 (2010) 45-49
40. Schum, A. and W. Preil, 1998. Induced mutations in ornamental plants, pp. 333-366. In S. Mohan Jain, D.S. Brar and B.S Ahloowalia.(eds). Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop improvement, Kluwer Academic Publishers.
41. Trieu N.L *et al* (2011), Minute for results and activities recording of research co-operation in radiation breeding between Centre for application nuclear techniques in industry (Vietnam) and Institute of radiation breeding (Japan)
42. Barakat M.N., Rania S.A.S. Badr M. and Torky M.G.E. (2010). *In vitro* mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving Chrysanthemum morifolium. African Journal of Agricultural Research 5 (8): 748-757.

43. Bhattacharya A. and Teixeira da Silva J.A. (2006). Molecular systematics in *Chrysanthemum × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. *Scientia Horticulturae* 109 (4): 379-384.
44. Caetano-Anolles G, Bassam B.J., Gresshoff P.M. (1993). Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicons profiling of endonuclease digested DNA: identification of markers linked to the supernodulation locus in soybean. *Mol. General Genet.* 241: 57-64.
45. Carmen Martín, Uberhuaga E., Pérez C. (2002). Application of RAPD markers in characterisation of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphitica* 127: 247- 253.
46. Chakrabarty D. and Datta K. (2010). Application of RAPD markers for characterization of γ -ray induced rose mutants and assessment of genetic diversity. *Plant Biotechnology reports* 4 (3): 237-242.
47. Chattejee J., Madal A.K.A., Ranade S.A., Datta S.K. (2005). Estimation of genetic diversity of four *Chrysanthemum* mini cultivars using RAPD. *Pakistan Journal of Biotechnology Sciences* 8(4): 546- 549, 2005.
48. Datta S.K., Misra P., Madal A.K.A. (2005). In vitro mutagenesis- a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. *Current Science* 88(1): 155- 158.
49. Lamseejan S., Jompuk P., Wongpiyasatid A., Deeseapan S. and Kwamthammachart P. (2000). Gamma rays induces morphological change in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Kastsart J. (Nat. Sci)* 34: 417- 422.
50. Lema J.R., Zalewska M., Sadoch Z. (2004). Radiomutant of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) of the lady group: RAPD analysis of the genetic diversity. *Plant Breeding* 123 (3): 290-293.
51. Lema J.R., Zalewska M., Sadoch Z. And Jerzy M. (2005). Identification of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) mutants on Nero and Wonder groups using RAPD markers. *Electronic Journal of Polif Agricultural Universities* 8 (2): 1-7.

52. Mandal A.K.A., Chakrabarty D., Datta S.K. (2000). Application of in vitro techniques in mutation breeding of chrysanthemum. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 60: 33-38.
53. Nagatomi. S, Miyahira. E. and Degi. K. (2000). Induction of flower mutation comparing with chronic and acute gamma irradiation using tissue culture techniques in *Chrysanthemum Morifolium* Ramat. . *Acta Hort. (ISHS)* 508:69-74.
54. Obara-Okeyo P. & S. Kako (1998). Genetic diversity and identification of cymbidium cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 99, pp. 95-1001
55. Rohlf, F.J. (2000). NTSYS- PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, New York
56. Senapati S.K., Rout G.R. (2008). Mutagenesis in rose: Early selection through molecular marker. *Indian Journal of Horticulture* 65 (4): 452-460.
57. Teixeira da Silva J.A. (2003). Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetic and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances* 21: 715- 766.
58. Yamaguchi H., Shimizu A., Degi K., Morishita T. (2008). Effects of dose and rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. *Breeding Science* 58: 331- 335.
59. Kurt Weising, Hilde Nybom, Kirsten Wolff, Günter Kahl. 2005. DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and applications (second Edition). Cpc press taylor & Fancies group.

Tài liệu internet

60. <http://vi.wikipedia.org>
61. http://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/mbdb/db/e_database.html
62. <http://vaea.gov.vn/30/news-detail/220798/vat-ly-hat-nhan/mot-so-ket-qua-nghien-cuu-trien-khai-cua-vien-nang-luong-nguyen-tu-viet-nam-trong-linh-vuc-nong-nghiep-va-sinh-hoc..html>
63. <http://www.nri.gov.vn>
64. <http://www.khoahoc.com.vn>
65. <http://www.scribd.com/doc/50353840/Nuclear-Technology-Review-2008>

66. <http://www.tchdkh.org.vn/khcn-trung-uong/102-chon-tao-giong-hoa-cuc-moi-bang-dot-bien-phong-xa.html>
67. <http://www.hoacaycanh.com.vn>
68. <http://vidamdodua.com>
69. <http://www.fao.org.vn/>
70. <http://www.iaea.org/>
71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
72. <http://www.nsl.hcmus.edu.vn/greenstone/cgi-bin/library.cgi>
73. <http://congnghesinhhoc24h.com/tai-lieu>
74. <http://www.springerlink.com/>
75. <http://www.mums.org/chrysanthemum-classes/>

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1

Thành phần môi trường khoáng MS được sử dụng trong thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* cúc Farm tím (*Chrysanthemum* sp.)

Thành phần	Dạng sử dụng	Nồng độ (mg/l)
Khoáng đa lượng (Macro MS)	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	KH ₂ PO ₄	170
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Khoáng vi lượng (Micro MS)	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	KI	0,83
Fe_EDTA	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Vitamine	Myo-Isositol	100
	Nicotinic acid	0,5
	Thiamine-HCl (B ₁)	0,1
	Glycine	2
	Pyridoxine-HCl (B ₆)	0,5