

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC PHƯƠNG PHÁP THỤ PHẤN VÀ THỜI ĐIỂM CỨU PHÔI ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO CON LAI GIỮA CÁC GIỐNG HOA LILY (CHI *LILIUM*)

Trịnh Khắc Quang¹

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là so sánh ảnh hưởng của phương pháp thụ phấn thông thường và phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy (CSM) đến sự tạo thành con lai khác loài F_1 và con lai lại BC_1 của hoa lily. Nghiên cứu này đã sử dụng 12 tổ hợp lai với 6 nhóm lai Asiatic (A), LA (LA), Oriental (O), OT (OT), *L. formolongi* (F) và *L. longiflorum* Thunb. (L). Hai phương pháp nuôi cấy lát cắt bầu nhụy (OSC) và nuôi cấy túi phôi (ESR) được sử dụng để nuôi cấy các noãn đã được thụ tinh hoặc túi phôi sau khi thụ phấn cắt vòi nhụy và thụ phấn thông thường. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng CSM là phương pháp thích hợp và hiệu quả đối với thể hệ con lai F_1 . Tỷ lệ đậu quả đạt cao (30,0-65,0%). Phương pháp thụ phấn thông thường thì thích hợp hơn với thể hệ lai lại BC_1 với tỷ lệ đậu quả đạt 20,0-87,5%. Đối với tổ hợp lai khác loài, sử dụng phương pháp OSC ở thời gian 8-10 ngày sau thụ phấn cho tỷ lệ noãn nảy mầm cao nhất (40,7-50,6%). Khi sử dụng phương pháp ESR, thời gian thu noãn tốt nhất là từ 45-60 ngày sau thụ phấn (tùy thuộc vào tổ hợp lai) và tỷ lệ phôi nảy mầm ở các tổ hợp lai khác nhau dao động từ 8,1-21,3%.

Từ khóa: Thụ phấn thông thường, thụ phấn cắt vòi nhụy, nuôi cấy túi phôi, nuôi cấy lát cắt bầu nhụy, lai khác loài, loài *Lilium*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Lilium* bao gồm khoảng 80 loài, có nguồn gốc ở Bắc bán cầu và được phân loại thành 7 nhóm; trong đó có 3 nhóm lai quan trọng đối với công tác chọn tạo giống lily là nhóm lai Oriental (O), nhóm lai Asiatic (A) và nhóm lai Longiflorum (L). Tuy nhiên một trong những khó khăn gặp phải khi lai xa giữa các loài thuộc chi *Lilium* là hiện tượng bất hợp trước và sau thụ tinh (Van Tuyl & cs, 1991), điều này có thể khắc phục được bằng việc sử dụng các phương pháp thụ phấn (thụ phấn cắt vòi nhụy, thụ phấn in vitro) và cứu phôi khác nhau (nuôi cấy noãn, nuôi cấy lát cắt bầu nhụy, nuôi cấy phôi và túi phôi) (Chi, 2002).

Phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất để vượt qua những rào cản trước thụ tinh ở chi *Lilium*. Juozas Prosevičius và Lidija Strikulyte (2004) đã thu được con lai giữa nhóm Asiatic và *L. pumilum*. khi sử dụng phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy. Lim (2006) đã chỉ ra rằng thụ phấn cắt vòi nhụy là tốt hơn đối với thể hệ lai F_1 và phương pháp thụ phấn thông thường là tốt hơn đối với quần thể lai lại (back-cross). Nuôi cấy lát cắt bầu nhụy và nuôi cấy túi phôi đã được sử dụng thành công để tạo ra các con lai khác loài ở chi

Lilium. Các lát cắt có thể được nuôi cấy thành công ở giai đoạn 40 ngày sau thụ phấn đối với tổ hợp lai giữa *Lilium longiflorum* và *L. xelegance* (Kano & cs, 1988) hoặc là từ 5-8 ngày sau thụ phấn giữa giống Gelria x Indian Summer (Van Tuyl & cs, 1991), từ 10-11 ngày sau thụ phấn giữa *Lilium longiflorum* 'Gerlia' x Asiatic hybrid 'Montblanc' (Chi, 2002). Đối với nuôi cấy túi phôi, thời gian tốt nhất là 38-70 ngày sau thụ phấn tùy thuộc tổ hợp lai (Chi, 2002).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Gồm 1 giống hoa lily thuộc nhóm lai Asiatic (A), 1 giống thuộc nhóm lai LA (LA), 3 giống thuộc nhóm lai Oriental (O), 7 giống thuộc nhóm OT (OT), 1 giống thuộc nhóm lai *L. formolongi* (F) và 1 giống thuộc loài *L. longiflorum* Thunb. (L) được sử dụng để lai tạo. Các củ giống này đã được phá ngủ (chiều dài mầm từ 1-3 cm), sau đó được trồng trong chậu vào tháng 11/2008 tại nhà lưới của Viện Nghiên cứu Rau quả. Nhiệt độ nhà lưới dao động từ 15-25°C.

2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện từ năm 2008-2010 trên 12 tổ hợp lai được kí hiệu lần lượt là: AO, AL, FO, LO, LF, LOT, LAOT, OTLA, ALA, LAA, OOT và OTO.

¹Viện Nghiên cứu Rau quả

Tiến hành khử đực khi hoa chưa nở (bao phấn chưa mở), thường là trước khi hoa nở từ 3-4 ngày. Dùng tay tách nhẹ đầu nụ hoa và ngắt các bao phấn (có thể dùng panh gấp bỏ bao phấn), rồi đựng bao phấn trong các đĩa nhựa petri, để nơi khô ráo, thoáng mát. Khi bao phấn bung thì có thể sử dụng hạt phấn để thụ (Van tuyl, 1991).

Đối với phương pháp thụ phấn thông thường: khi hoa nở từ 1-2 ngày (đầu nhụy tiết dịch) thì tiến hành thụ phấn. Dùng bút lông (hoặc tăm bông) chấm vào đĩa đựng hạt phấn và thụ trực tiếp lên đầu nhụy của cây mẹ. Đối với phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy: dùng dao sắc cắt lên phía trên bầu nhụy, chỉ để lại phần vòi nhụy có chiều dài 1-2 mm. Sau đó, dùng đầu nhụy vừa cắt chấm vào hỗn hợp hạt phấn cần thụ và thụ lên trên phần vòi nhụy còn lại (đỉnh của mặt cắt). Sau khi thụ phấn xong, tiến hành bao cách ly cho hoa bằng giấy nhôm (Van tuyl, 1991).

Đối với các tổ hợp lai xa, tiến hành thu quả ở các giai đoạn 5-7 ngày, 8-10 ngày, 11-13 ngày sau thụ phấn và tiến hành nuôi cấy lát cắt bầu nhụy trên môi trường: MS + 90 g/l sacaroza + 1 mg/l α NAA. Đối với các tổ hợp lai lại, tiến hành thu quả sau thụ phấn ở 3 giai đoạn: 30-45 ngày, 45-60 ngày và 60-75 ngày và nuôi cấy túi phôi trên môi trường Murashige và Skoog (1962) có bổ sung 30 g/l đường sacaroza và α NAA (0,1-0,3 mg/l), pH=5,8 và để trong điều kiện tối ở 25°C cho đến khi phôi nảy mầm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của phương pháp thụ phấn đến khả năng tạo quả ở các tổ hợp lai lily

Bảng 1. Số lượng quả lai thu được của các tổ hợp lai ở phương pháp thụ phấn thông thường và cắt vòi nhụy (sau thụ phấn 10 ngày và 30 ngày)

TT	Tổ hợp lai	Số hoa thụ phấn	10 ngày				30 ngày			
			Thụ phấn thông thường		Thụ phấn cắt vòi nhụy		Thụ phấn thông thường		Thụ phấn cắt vòi nhụy	
			Số quả lai thu được (quả)	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số quả lai thu được (quả)	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số quả lai thu được (quả)	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số quả lai thu được (quả)	Tỷ lệ đậu quả (%)
1	AO	40	5	12,5	21	52,5	0	0	0	0
2	AL	40	5	12,5	24	60,0	0	0	0	0
3	FO	40	7	17,5	26	65,0	0	0	0	0
4	LO	40	6	15,0	12	30,0	0	0	0	0
5	LF	40	12	30,0	20	50,0	0	0	0	0
6	LOT	40	7	17,5	24	60,0	0	0	0	0
7	LAOT	40	0	0	1	2,5	0	0	0	0
8	OTLA	40	0	0	1	2,5	0	0	0	0

Thí nghiệm sử dụng phương pháp thụ phấn thông thường và cắt vòi nhụy. Kết quả ở bảng 1 cho thấy:

Tỷ lệ đậu quả ở các tổ hợp lai đều đạt khá cao ở cả 2 phương pháp thụ phấn thông thường và cắt vòi nhụy. Tuy nhiên, có sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ này ở các tổ hợp lai. Đối với các tổ hợp lai xa (từ 1-8), phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy đạt hiệu quả cao hơn so với phương pháp thụ phấn thông thường; trong khi ở các tổ hợp lai lại (từ 9-12) thì phương pháp thụ phấn thông thường lại đạt hiệu quả cao hơn. Cụ thể như sau:

Ở giai đoạn sau thụ phấn 10 ngày, đối với các tổ hợp lai xa, số quả lai thu được khi áp dụng phương pháp thụ phấn thông thường chỉ đạt từ 5-12 quả (tương ứng với tỷ lệ đậu quả từ 12,5-30,0%), trong khi áp dụng phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy thì tỷ lệ đậu quả đã tăng lên một cách đáng kể (30,0-65,0%). Ngược lại, ở các tổ hợp lai lại, khi áp dụng phương pháp thụ phấn thông thường tỷ lệ đậu quả lại đạt (20,0-87,5%) cao hơn so với khi sử dụng phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy (10,0-57,5%).

Ở giai đoạn sau thụ phấn 30 ngày, quả lai của các tổ hợp lai xa ở cả 2 phương pháp thụ phấn đều không được hình thành (0 quả). Ở các tổ hợp lai lại, đối với phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy, tỷ lệ đậu quả giảm đi (chỉ còn 2,5-37,5%), trong khi áp dụng phương pháp thụ phấn thông thường, tỷ lệ đậu quả vẫn duy trì như giai đoạn 10 ngày sau thụ phấn.

9	ALA	40	8	20,0	4	10,0	8	20,0	1	2,5
10	LAA	40	20	50,0	11	27,5	20	50,0	6	15,0
11	OOT	40	25	62,5	18	45,0	25	62,5	10	25,0
12	OTO	40	35	87,5	23	57,5	35	87,5	15	37,5

Tiếp tục theo dõi sự phát triển của quả lai ở các tổ hợp lai lại ở giai đoạn 50 và 70 ngày sau thụ phấn, nhận thấy:

Bảng 2. Số lượng quả lai thu được của các tổ hợp lai ở phương pháp thụ phấn thông thường (sau thụ phấn 50 và 70 ngày)

Tổ hợp lai	Số hoa thụ phấn	50 ngày		70 ngày	
		Số quả lai thu được (quả)	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số quả lai thu được (quả)	Tỷ lệ đậu quả (%)
ALA	40	6	15,0	4	10,0
LAA	40	17	42,5	13	32,5
OOT	40	20	50,0	12	30,0
OTO	40	31	77,5	16	40,0

Ở giai đoạn 50 ngày sau thụ phấn, số lượng quả lai ở mỗi tổ hợp lai có xu hướng giảm nhẹ và giảm mạnh ở giai đoạn 70 ngày sau thụ phấn. Nguyên nhân là do phôi của các tổ hợp lai này đã bị chết ở giai đoạn non, hạt bị lép và quả bị teo đi (bảng 2).

2. Ảnh hưởng của thời điểm cứu phôi đến khả năng nảy mầm của phôi

Thí nghiệm tiến hành cứu phôi của các tổ hợp lai theo 2 kỹ thuật: nuôi cấy lát cắt bầu nhụy và nuôi cấy túi phôi. Kết quả ở bảng 1 cho thấy đối với các tổ hợp lai xa, ở giai đoạn sau thụ phấn 30 ngày, toàn bộ số quả lai đã bị khô (phôi bị chết ở giai đoạn còn non). Do vậy, đối với các tổ hợp lai này đã áp dụng phương pháp cứu phôi dựa trên kỹ thuật nuôi cấy lát cắt bầu nhụy ở thời điểm từ 5-13 ngày. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các giai đoạn cứu phôi khác nhau đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu nuôi cấy của các tổ hợp lai (sau 4 tuần nuôi cấy)

Tổ hợp lai	Số bầu nhụy nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu p.sinh h.thái (%)			Tỷ lệ mẫu tạo calus (%)			Tỷ lệ mẫu chết (%)		
		5-7nt	8-10nt	11-13nt	5-7nt	8-10nt	11-13nt	5-7nt	8-10nt	11-13nt
AO	6	41,2	45,3	42,4	46,5	43,7	46,1	12,3	11,0	11,5
AL	6	36,7	40,7	39,6	42,3	40,8	40,8	21,0	18,5	19,6
FO	6	47,5	50,6	48,2	33,4	32,4	33,3	19,1	17,0	18,5
LO	6	38,7	47,8	40,8	44,0	36,1	41,9	17,3	16,1	17,3
LOT	6	43,3	47,5	44,4	34,2	32,9	34,0	22,5	19,6	21,6
LAOT	6	39,5	43,3	42,7	45,9	43,7	43,5	14,6	13,0	13,8
OTLA	6	42,4	48,3	44,1	42,6	38,6	41,4	15,0	13,1	14,5

Ghi chú: MT nuôi cấy lát cắt bầu nhụy: MS + 90 g/l sucroza + 1 mg/1a. NAA

nt: ngày tuổi (tính từ sau thụ phấn đến khi đưa vào cứu phôi)

Kết quả ở bảng 3 cho thấy tất cả 7 tổ hợp lai được đưa vào nuôi cấy đều phát sinh hình thái theo quy luật tỷ lệ mẫu phát sinh tăng dần và tỷ lệ mẫu chết giảm dần (theo số ngày thu mẫu từ 5 đến 10 ngày). Tuy nhiên ở giai đoạn từ 10-13 ngày thì tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái giảm và tỷ lệ mẫu chết tăng. Tỷ lệ phát sinh hình thái thấp nhất (36,7%) trên tổ hợp lai (AL) ở thời gian thu mẫu 5-7 ngày và đạt tỷ lệ phát sinh hình thái cao nhất (50,6%) trên tổ hợp lai (FO) ở thời điểm thu mẫu 8-10 ngày.

Đối với các tổ hợp lai lại, tiến hành thu quả ở 3 giai đoạn: 30-45 ngày tuổi, 45-60 ngày tuổi và 60-75 ngày tuổi. Kết quả cho thấy số túi phôi trung bình/bầu nhụy giảm dần qua các giai đoạn (bảng 4). Ở tổ hợp lai ALA, số túi phôi/số bầu nhụy nuôi cấy (giai đoạn 30-45 ngày tuổi) là 4,7 (trung bình là 7 túi phôi/bầu nhụy), nhưng ở giai đoạn 45-60 ngày tuổi và 60-75 ngày tuổi, số túi phôi trung bình/bầu nhụy lần lượt giảm xuống còn tương ứng là: 3,3 túi phôi/bầu nhụy và 2,5 túi phôi/bầu nhụy. Tổ hợp lai OTO có số túi phôi/số bầu nhụy nuôi cấy đạt cao nhất (115/8), tương ứng với 14,4 túi phôi/bầu nhụy.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời điểm cứu phôi đến số lượng túi phôi và thời gian nảy mầm của phôi ở các tổ hợp lai

Tổ hợp lai	Số túi phôi/1 bầu nhụy nuôi cấy			Thời gian nảy mầm của phôi* (ngày)		
	30-45nt**	45-60nt	60-75nt	30-45nt	45-60nt	60-75nt
ALA	4,7	3,3	2,5	37-46	34-42	28-35
OOT	1,2	0,6	0,4	25-38	22-33	21-30
OTO	14,4	13,3	4,2	27-41	22-32	19-28
LAA	3,3	1,9	1,5	30-44	27-35	25-33

Ghi chú: MT nuôi cấy túi phôi: MS + 30 g/l saccharoza + 0,1-0,3 mg/1 α NAA

* Thời gian nảy mầm của phôi: tính từ khi phôi đầu tiên nảy mầm đến phôi cuối cùng nảy mầm kể từ thời điểm bắt đầu đưa vào nuôi cấy; ** nt: ngày tuổi (tính từ sau thụ phấn đến khi đưa vào cứu phôi)

Theo dõi thời gian nảy mầm của phôi cũng cho thấy: khi thu quả ở giai đoạn sớm hơn thì thời điểm bắt đầu nảy mầm của phôi muộn hơn và thời gian nảy mầm của phôi cũng bị kéo dài hơn. Tùy thuộc từng tổ hợp lai mà thời gian nảy mầm của phôi dao động từ 19-46 ngày. Ở tổ hợp lai OTO, thời điểm phôi bắt đầu nảy mầm là 27 ngày (sau khi đưa vào nuôi cấy quả ở 30-45 ngày tuổi) và kéo dài đến ngày thứ 41 (trung bình là 14 ngày). Trong khi thu quả ở giai đoạn 45-60 ngày tuổi, phôi nảy mầm sớm hơn (ngày thứ 22 sau khi đưa vào nuôi cấy) và kéo dài đến ngày thứ 32 (trung bình là 10 ngày). Thu quả ở giai đoạn 60-75 ngày tuổi, phôi nảy mầm sớm nhất (ngày thứ 19 sau khi đưa vào nuôi cấy) và phôi nảy mầm tập trung hơn (trung bình 8 ngày).

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời điểm cứu phôi đến khả năng nảy mầm của phôi ở các tổ hợp lai

Tổ hợp lai	Tỷ lệ phôi sống (%)			Tỷ lệ phôi nảy mầm (%)		
	30-45nt*	45-60nt	60-75nt	30-45nt	45-60nt	60-75nt
ALA	63,5	95,0	96,2	0	0	0
OOT	45,2	65,3	70,0	4,4	8,1	14,3
OTO	84,0	100	100	13,0	21,3	32,0
LAA	55,0	75,6	77,1	0	0	0

Ghi chú: MT nuôi cấy túi phôi: MS + 30 g/l saccharoza + 0,1-0,3 mg/1 α NAA

* nt: ngày tuổi (tính từ sau thụ phấn đến khi đưa vào cứu phôi)

Tỷ lệ phôi sống và phôi nảy mầm ở các tổ hợp lai tăng dần từ giai đoạn 30-45 ngày đến 60-75 ngày tuổi do phôi càng đạt dần đến độ chín sinh lý (phôi và nội nhũ chuyển từ trạng thái lỏng sang trạng thái đông đặc). Trong 4 tổ hợp lai trên thì tỷ lệ phôi sống và phôi nảy mầm đạt cao nhất ở tổ hợp lai OTO ở giai

đoạn 45-60 ngày sau thụ phấn (tương ứng lần lượt là 100% và 21,3%) (Bảng 5).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

- Đã xác định được phương pháp thụ phấn hiệu quả trong lai giống hoa lily là thụ phấn theo phương pháp thông thường (đối với các tổ hợp lai lại) và phương pháp thụ phấn cắt vòi nhụy (đối với các tổ hợp lai xa).

- Thời điểm thu quả thích hợp để đưa vào cứu phôi hoa lily đối với tổ hợp lai xa là 8-10 ngày sau thụ phấn và đối với các tổ hợp lai lại là 45-60 ngày sau thụ phấn.

2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu xác định môi trường cứu phôi thích hợp để tăng tỷ lệ phôi nảy mầm ở các tổ hợp lai lily.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chi, H. S. (2002). *The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of Lilium*. Bot. Bull. Acad. Sin. (2002) 43: 139-146.
2. Juozas Prosevičius, Lidija Strikulyte (2004). *Interspecific hybridization and embryo rescue in breeding of lilies*. Acta Universitatis Latviensis. Biology, 2004. Vol. 676, pp. 213-217.
3. Kazumi Kanoh (1988). *Production of interspecific hybrids between Lilium longiflorum x L. x elegance by ovary slice culture*. Japan. J. Breed. 38:278-282.
4. Ki-Byung Lim (2000). *Introgression breeding through interspecific polyploidisation in lily: a molecular cytogenetic study*. PhD-thesis, 27-11-2000, 120 pp.
5. Ki-Byung Lim & Jaap M. Van Tuyl (2006). *Lily, Lilium hybrids*. Chapter 19, page 517-537. In:

Flower breeding & genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st century, Springer Verlag.

6. Van Tuyt J. M., Van Dil M. P., Van Dreij M. G. M., Van Kleinwee T. C. M., Franken J., Bino R. J.

(1991). *Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific Lilium crosses*. Plant Sci. 74: 115-126.

STUDY ON THE INFLUENCES OF POLLINATION METHODS AND THE EMBRYOGENESIS TIME ON HYBRIDIZATION FROM DIFFERENT LILY VARIETIES

Summary

Trinh Khắc Quang

The purpose of this research was to compare the efficiencies of normal and cut-style pollination methods (CSM) for the production of F_1 and BC_1 interspecific hybrids of lily. This research included twelve combinations of crosses with six groups (Asiatic-hybrids (A), LA-hybrids (LA), Oriental-hybrids (O), OT-hybrids (OT), *L. formolongi* (F) and *L. longiflorum* Thunb. (L)). Two culture methods-ovary slice culture (OSC) and embryo-sac rescue method (ESR) were used to culture the fertilized ovules or embryo-sac after cut-style and normal pollination on plants respectively. The results have indicated that CSM is superior for the generating F_1 hybrids. The rate of viable seedpods is high (30.0-65.0%). Normal pollination method is superior for generating backcrossing populations with the proportion of viable seedpods peaks at 20.0-87.5%. For the interspecific crosses, applying OSC method after 8-10 days after pollination brings the highest rate of germinated ovules (40.7-50.6%). When using the ESR method, ovaries should be harvested at the best time from 45 to 60 days after pollination (depending on the crossing type and combination), and embryo could be germinated from various genotype combinations (8.1-21.3% success).

Keywords: *Normal pollination, cut-style pollination; embryo (sac) culture, ovary slice culture, interspecific hybridization; Lilium species.*

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Thanh Thủy