

HOÀNG TUYẾT MINH



Lúa lai hai dòng



NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

HOÀNG TUYẾT MINH

LÚA LAI HAI DÒNG

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

Hà Nội - 2002

Lúa lai nói đầu

Lúa lai một công nghệ cao đã tạo ra cuộc cách mạng xanh lần thứ hai trên thế giới. Các nước có dân số đông nhất hành tinh như Trung Quốc, Ấn Độ đã chọn công nghệ này làm giải pháp giải quyết vấn đề an toàn lương thực cho quốc gia của họ. Xu thế làm tăng tiềm năng năng suất của lúa trên toàn cầu trong thế kỷ 21 là sử dụng lúa lai kết hợp với công nghệ sinh học, trong đó lúa lai hệ hai dòng đã được đa số các nhà khoa học nổi tiếng thế giới xác định là công nghệ chủ yếu và hữu hiệu nhất.

Đất nước chúng ta trải qua những năm đổi mới, nhờ có sự thay đổi về chính sách quản lý của Nhà nước trong lĩnh vực nông nghiệp đặc biệt là lĩnh vực chọn tạo giống cây trồng, Việt Nam đã đứng vị trí thứ hai về xuất khẩu gạo trên thế giới. Trong mười năm qua, chúng ta đã nghiên cứu và phát triển lúa lai, ở nhiều nơi, nông dân Việt Nam đã trở thành người sản xuất lúa lai giỏi, không thua kém nông dân ở một số nước có quá trình lịch sử phát triển lúa lai vài ba thập kỷ. Lúa lai hai dòng, một công nghệ được lựa chọn cho phát triển lúa lai trong thế kỷ 21 không chỉ ở Trung Quốc mà cả các nước phát triển như Mỹ, Nhật, Hàn Quốc, Ấn Độ... Đối với nước ta, mặc dù mới chỉ bắt đầu với những

nghiên cứu và sản xuất lúa lai chưa đầy một thập kỷ, nhưng lúa lai hai dòng cũng sẽ được lựa chọn là công nghệ ưu tiên. PGS. TS. Hoàng Tuyết Minh, một trong những cán bộ khoa học của nước ta đã bắt tay vào nghiên cứu và phát triển lúa lai từ những ngày đầu, với mong muốn tổng kết những vấn đề lý luận, thực tiễn và kinh nghiệm về lúa lai hai dòng trên thế giới, trong nước và của bản thân. Tác giả đã giành thời gian và công sức để viết cuốn sách "Lúa lai hai dòng" cung cấp cho bạn đọc những tri thức cơ bản và cập nhật nhất về lĩnh vực này. Mong được đồng đạo bạn đọc động viên và khích lệ. Tuy nhiên, sẽ không tránh khỏi những khiếm khuyết chủ quan hoặc khách quan, hy vọng sẽ được góp ý để hoàn thiện.

PGS. TSKH. Bùi Bá Bổng



Thư trưởng

Bộ Nông nghiệp và PTNT

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

BP	Base pair (cặp ba zơ)
BSA	Bulked segregant analysis (phân tích theo nhóm)
BPH	Brown plant hopper (rầy nâu)
CFP	Critical fertile point (điểm chuyển hoá hữu dục)
CMS	Cytoplasmic male sterility (bất dục đực tế bào chất)
CSP	Critical sterile point (điểm chuyển hoá bất dục)
DNA	Deoxyribonucleic acid (axít deoxyribonucleic)
FIS	Fertilization independent seed (hạt thụ phấn tự do)
IAA	Indolacetic acid (axít indolacetic)
LMTB	Lớp mỏng tế bào (thin cell layer)
MAS	Marker assisted selection (chọn giống trợ giúp của chỉ thị phân tử)
MS	Murashig skoog (môi trường nuôi cấy cơ bản MS)
NIL	Near isogenic line (các dòng gần kề nhau)
NST	Nhiễm sắc thể (chromosome)
NMS	Nuclearous male sterile (bất dục đực nhân)
PCR	Polymerase chain reaction (phản ứng chuỗi)
PGMS	Photoperiodic-sensitive genic male sterility (bất dục đực mẫn cảm với chu kỳ quang)
QTL	Quantitative trait loci (tính trạng số lượng)
RI	Recombinant inbred (nội phối)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (đa hình độ dài mảnh phân cắt DNA)

RAPD	Rapid analysis polymorphysm DNA (phân tích nhanh đa hình độ dài mảnh phân cắt DNA)
SNP	Single nucleotide polymorphysm (đa hình nucleotide đơn)
SSR	Single sequence repeated (trùng hợp đơn)
SST	Single Sequence treatment (xử lý mạch đơn)
SSB	Tripe stem borer (sâu đục thân có sọc)
TGMS	Temperature sensitive genic male sterility (bất dục đực mẫn cảm với nhiệt độ)
UTL	Ưu thế lai
WCG	Wide compatibility gene (gen tương hợp rộng)
YSB	Yealow stem borer (sâu đục thân vàng)

Chương I

HIỆN TƯỢNG ƯU THỂ LAI

Nhờ những phát minh về hiện tượng bất dục đực ở lúa, vấn đề khai thác ưu thế lai trên đối tượng cây trồng này đã tạo ra cuộc cách mạng về cải tiến năng suất và sản lượng. Các nghiên cứu đã phát hiện tính trạng bất dục đực có liên kết chặt với tính trạng thờ vôi nhụy ra ngoài vỏ trấu của các cây bất dục đực. Đây là hiện tượng cây trồng tự thích nghi để duy trì nòi giống bằng thụ phấn chéo với phấn của cây khác. Do vậy khái niệm lúa là loài tự thụ nghiêm ngặt cũng nên hiểu một cách tương đối. Ý tưởng về khai thác ưu thế lai ở lúa được Jones công bố vào năm 1926, Anonymous (1977), Li (1977), và Yuan (1980). Mặc dù có thể thụ phấn chéo, song do cấu tạo hoa rất đặc biệt: hoa nhỏ, vôi nhụy bé, do vậy tỷ lệ giao phấn cũng rất thấp, năng suất hạt lai không cao. Hơn thế nữa việc trở trùng khớp giữa hai bố mẹ và khối lượng phấn bố cũng là những nguyên nhân có tính chất quyết định đến thành công của việc sản xuất hạt lai.

Trung Quốc là quốc gia đầu tiên và duy nhất đã đưa lúa lai vào sản xuất thành công trên diện tích hàng chục triệu hecta trong hai mươi thập kỷ qua. Năm 1997 diện tích trồng lúa lai tại đất nước này đã đạt tới 17.5 triệu hecta, chiếm trên 50% tổng diện tích lúa. Đưa tổng sản lượng lúa tăng từ 129 triệu tấn năm 1975 lên 200 triệu tấn năm 1994. Hiện nay, ngoài Trung Quốc đã có 19 quốc gia tiến hành nghiên cứu và sản xuất lúa lai trong đó phải kể đến Ấn Độ và Việt Nam (bảng 1).

Bảng 1: Các nước trên thế giới đã tiến hành nghiên cứu lúa lai

Nước	Năm bắt đầu
Bangladesh	1993
Brazin	1984
Colombia	1985
A Rập	1987
Ấn Độ	1981
Braxin	1992
Hàn Quốc	1976
Indonesia	1985
Iran	1992
Liên Bang Nga	2000
Malaysia	1985
Mỹ	1985
Myanma	1993
Nhật Bản	1983
Pakistan	1993
Philippin	1988
Sri lanka	1991
Thái Lan	1992
Triều Tiên	1980
Việt Nam	1983

Để hoàn toàn làm chủ công nghệ lúa lai và ứng dụng thành công vào sản xuất ở nước ta, thì các vấn đề mấu chốt như cơ sở khoa học, phương pháp chọn tạo giống, kỹ thuật

sản xuất hạt lai F_1 và sản xuất lúa lai thương mại cần phải được hiểu biết một cách sâu sắc.

I. CƠ SỞ DI TRUYỀN CỦA HIỆN TƯỢNG ƯU THẾ LAI

Việc khai thác ưu thế lai đã làm tăng một cách đáng kể sản lượng của nhiều loài cây trồng trong đó có một số loài có giá trị rất quan trọng như ngô, các loại cải, lúa... Tuy nhiên cơ sở di truyền của hiện tượng ưu thế lai vẫn đang là vấn đề còn nhiều tranh cãi trong suốt quá trình phát triển lịch sử của di truyền học. Một số giả thuyết đã được nêu ra trong thế kỷ 20 để giải thích hiện tượng ưu thế lai và đã được nhiều người thừa nhận như:

Giả thuyết tính trội:

Theo giả thuyết này thì tính trội được hình thành trong quá trình tiến hoá của sinh vật. Các gen trội có lợi lấn át gen lặn có hại gây hiệu quả xấu. Có nghĩa là gen trội át chế tác động gây hại của gen lặn tương ứng cùng *locus* trên nhiễm sắc thể (NST) tương đồng. Ví dụ khi lai $AAbbCCddEE$ với $aaBBccDDee$ con lai F_1 có kiểu gen $AaBbCcDdEe$ nên có ưu thế lai rõ rệt.

Giả thuyết siêu trội:

Giả thuyết này cho rằng nhiều tính trạng có lợi cho sự sinh trưởng do gen trội kiểm soát còn các gen lặn tương ứng thì có tác dụng ngược lại. Tính dị hợp tử của một alen ở một vị trí nhất định sẽ sản sinh ra các vật chất có ảnh hưởng đến sức sống vượt xa của loại mang alen đồng hợp tử và do tác dụng tương hỗ giữa các alen khác nhau trên cùng vị trí. Theo giả thuyết này thì cơ thể có kiểu gen Aa sẽ có sức sống cao hơn hẳn cơ thể mang kiểu gen AA và aa . Mô hình toán học tổng quát của giả thuyết này là:

$$aa < Aa > AA.$$

Giả thuyết cân bằng di truyền:

Theo giả thuyết này thì mỗi cơ thể sinh vật ở trạng thái cân bằng di truyền nhất định, đảm bảo cho sự hình thành một kiểu hình thích ứng với điều kiện sống. Khi lai các cá thể có kiểu cân bằng di truyền khác nhau, sẽ hình thành cơ thể mới có trạng thái cân bằng di truyền mới, khác cân bằng cũ do vậy con lai xuất hiện những tính trạng mới tốt hơn ở bố mẹ.

Gần đây người ta dựa trên tác động của các gen để giải thích hiện tượng ưu thế lai (CIMMYT, 1990) đưa ra sơ đồ bao gồm: do tương tác giữa các gen có liên quan đến các yếu tố bổ sung (Keeble và Pellow), các yếu tố trội (Collin và Bruce) và các yếu tố liên kết trội (Jones). Quan điểm của các tác giả này chính là giả thuyết về tính trội. Còn theo Jones thì ưu thế lai là các yếu tố liên kết trội và tác động siêu trội.

Mặc dù các giả thuyết trên được nhiều người đồng tình ủng hộ cho đến những năm 1990 và vẫn có rất ít những dẫn liệu đối lập với các giả thuyết trên. Đồng thời cũng chưa có một nghiên cứu nào trước đây đề cập đến đánh giá ưu thế lai bằng lập bản đồ và phân tích di truyền. Nhưng khi kỹ thuật phân tích nhanh bằng chỉ thị phân tử và việc lập bản đồ với mật độ cao của các chỉ thị phân tử trở thành hiện thực, thì các kết quả thu được đã gây ra tranh cãi về việc xác định cơ sở di truyền của hiện tượng ưu thế lai. Thực chất là do tác động của tính trội, siêu trội hay lẩn át gen? Qifa Zhang và Zhikang Li, Phòng thí nghiệm cải tiến cây trồng Quốc gia, Đại học Nông nghiệp Huazhong, Vũ Hán (2001) đã dùng các chương trình máy tính để lập bản đồ và

phân tích di truyền để xác định bản chất của hiện tượng ưu thế lai..

Trong thí nghiệm 1, các tác giả sử dụng quần thể dòng thuần tái tổ hợp ký hiệu là RIL (recombinant inbred line) thu được trong phép lai giữa Lemont và Texing, hai quần thể BCF₁ thu được thông qua lai trở lại các RIL với bố mẹ và hai quần thể vật liệu thử (testcross) thu được do lai giữa các RIL với hai giống không có quan hệ họ hàng. Ưu thế lai và sự thua kém của các dòng thuần trong tất cả các phép lai đã được tính toán trên một số tính trạng đã được xác định. Bản đồ liên kết của các chỉ thị phân tử đã được xác định đối với quần thể RIL. Kết quả của việc lập bản đồ và phân tích di truyền sử dụng số liệu về sự thua kém của dòng thuần và sự vượt trội của con lai F₁ đã chỉ ra rằng tất cả các tính trạng số lượng (quantitative trait *locus*-QTL) liên kết với sự thua kém về sức sống của các dòng thuần và sự xuất hiện ưu thế lai đều thuộc về hiện tượng lấn át gen (epistasis), còn tất cả các QTL tham gia trong việc biểu hiện ưu thế lai đều do tác động siêu trội. Các kết quả này khẳng định bản chất di truyền của ưu thế lai.

Trong thí nghiệm 2, các tác giả cũng sử dụng các quần thể RIL thu được từ phép lai Zhanshan 97/Minghui 63, bố của giống lai này được gieo cấy rất rộng rãi tại Trung Quốc. Trong thí nghiệm này 240 RIL được sử dụng và phân bố tự do thành hai nhóm tạo thành từng cặp bố mẹ để lai. Qua ba lần hoán vị trong quần thể các RIL đã hình thành 360 phép lai tạo ra quần thể F₂ “tương đồng”, vì trong quần thể này các kiểu gen và tần số của các gen tương tự như quần thể F₂ và khi cần thiết có thể tái tạo lại quần thể F₂ “tương đồng”. Gieo quần thể F₂ “tương đồng” xen kẽ với bố mẹ của chúng (RIL) để đo đếm và xác định ưu thế lai cũng như sự duy trì

tác động của các gen với từng tính trạng QTL tham gia tạo ưu thế lai ở con lai F_1 . Từ kết quả phân tích đã rút ra hai kết luận. Một là: tất cả các dạng tác động di truyền bao gồm cả độ dị hợp tử ở các *locus* đơn đều do ảnh hưởng của siêu trội, và cả ba dạng tác động qua lại cặp đôi (cộng tính với cộng tính, cộng tính với trội và trội với trội) đều là cơ sở di truyền của ưu thế lai trong quần thể F_2 “tương đồng”. Hai là: tác động dị hợp tử trên các *locus* đơn và tác động qua lại giữa tính trội và tính trội là cơ sở di truyền của ưu thế lai đời F_1 .

II. ĐÁNH GIÁ ƯU THẾ LAI

Trong nghiên cứu di truyền học, toán học, đặc biệt là thống kê sinh học đã được sử dụng rất mạnh mẽ và rộng rãi. Các công trình nghiên cứu để xác định ưu thế lai đã được tiến hành trên rất nhiều tính trạng của cây trồng và sự biểu hiện ưu thế lai được phân làm ba loại sau: ưu thế lai trung bình, ưu thế lai thực, và ưu thế lai chuẩn.

Các mô hình toán học để đánh giá ưu thế lai được biểu hiện như sau:

$$\text{Ưu thế lai trung bình (H}_{MP}\%) = \frac{F_1 - MP}{MP} \times 100$$

Trong đó *MP* (*mid parents*): là giá trị trung bình của hai bố mẹ.

Ưu thế lai trung bình là biểu hiện sự hơn hẳn của một tính trạng nào đó ở con lai F_1 so với giá trị trung bình của tính trạng đó của hai bố mẹ.

$$\text{Ưu thế lai thực (H}_{BP}\%) = \frac{F_1 - BP}{BP} \times 100$$

Trong đó BP (best parent): là bố hoặc mẹ tốt nhất

Ưu thế lai thực là biểu hiện sự hơn hẳn ở một tính trạng nào đó của con lai F_1 so với giá trị đó của bố hoặc mẹ tốt nhất.

$$\text{Ưu thế lai chuẩn (H}_s\%) = \frac{F_1 - \text{Đối chứng}}{\text{Đối chứng}} \times 100$$

Trong đó S (standar=check): là đối chứng chuẩn.

Ưu thế lai chuẩn là biểu hiện sự hơn hẳn của một tính trạng nào đó ở con lai F_1 so với giá trị của tính trạng đó ở đối chứng chuẩn.

III. HIỆN TƯỢNG BẤT DỤC ĐỤC Ở CÂY TRỒNG

III.1. Khái niệm về tính bất dục đực

Bất dục đực là hiện tượng cây trồng sản sinh ra các hạt phấn bất dục (hạt phấn không có sức sống, không thể nảy mầm và thụ tinh trên núm nhụy cái), nhưng bộ phận cái (noãn) vẫn phát triển bình thường và có khả năng thụ tinh nhờ thụ phấn chéo. Hiện tượng này rất có lợi cho công tác lai giống đối với các cây tự thụ phấn, vì khi tiến hành sản xuất hạt lai không cần phải khử đực dòng mẹ.

Nghiên cứu cơ sở tế bào của hiện tượng bất dục đực, các kết quả thu được cũng có sự khác nhau. Đa số tác giả cho rằng hiện tượng bất dục phấn xảy ra ở giai đoạn đơn nhân sớm. Theo kết quả nghiên cứu của trường đào tạo giáo viên Hồ Nam, Trung Quốc thì có ba cơ chế khác nhau tạo ra bất dục không hạt phấn:

- Do sự phát triển không bình thường trong giai đoạn phân bào giảm nhiễm hình thành giao tử. Quá trình này sẽ tạo ra tế bào mẹ hạt phấn không bình thường và qua phân

bào nguyên nhiễm sẽ tạo ra các tế bào nhỏ, bẹt không đều nhau với nhiều kích cỡ khác nhau. Các tế bào này càng nhỏ dần rồi tự tiêu biến.

- Do sự phát triển không bình thường của tế bào mẹ hạt phấn: tế bào mẹ hạt phấn phát triển để hình thành các giao tử rất khác nhau về hình dạng và kích thước. Không thấy những biến cố khác thường ở tiền kỳ (Prophase) và kỳ đầu (primary meiosis) đồng thời cũng không phân biệt được trung kỳ và hậu kỳ (metaphase và anaphase) trong phân bào giảm nhiễm. Kết quả tạo nên hai tế bào hình lưỡi liềm gắn với nhau (thể dyad) ở cuối kỳ phân bào. Chúng không thể tạo thể tứ (tetrad) nhưng vẫn trải qua phân bào nguyên nhiễm rồi trở nên nhỏ bé dần cho đến khi tự tiêu biến.

- Do quá trình phát triển không bình thường diễn ra sau giai đoạn tetrad. Trong trường hợp này, một vài tế bào mẹ hạt phấn tạo ra các giao tử thể bốn nhưng phát triển theo hướng hình phiến bẹt và nhỏ dần đến khi tự tiêu biến. Những tế bào mẹ hạt phấn khác bước vào giai đoạn hai nhưng có hình dạng nhân nheo, tế bào chất tiêu biến và chỉ còn lại các thành tế bào với các kích cỡ khác nhau.

Nhưng Pan và cộng sự, 1981, lại khám phá ra một cơ chế gây bất dục hạt phấn khác với ba cơ chế trên. Theo ông quá trình phân bào giảm nhiễm để tạo tế bào mẹ hạt phấn xảy ra bình thường và vẫn tạo ra các tiểu bào tử nhưng không có màng bao bọc và cũng không nhìn thấy lỗ hạt phấn. Phần trong hạt phấn phát triển bình thường, một vài hạt trải qua giai đoạn hai nhân nhưng không bước vào phân chia nguyên nhiễm thứ cấp. Các bào phấn chín có những hạt phấn với kích thước rất khác nhau nhưng không có màng và chỉ có các mảnh vụn của tế bào hạt phấn.

III.2. Các kiểu bất dục đực và khả năng sử dụng trong phát triển lúa lai

Dựa vào đặc tính di truyền hoặc nguồn gốc phát sinh của các dạng bất dục đực ở thực vật, người ta phân thành các kiểu bất dục đực sau:

- **Bất dục đực tế bào chất** (Cytoplasmic Male Sterility - CMS)

Bất dục đực xảy ra như là kết quả của sự tương tác giữa gen trong nhân và các thay đổi về gen hoặc cấu trúc của gen ở tế bào chất. Dựa vào nguồn gốc phát sinh người ta chia CMS thành hai loại: trong loài (autoplasmic) và khác loài (alloplasmic), Lacadena, 1968. Autoplasmic CMS là dạng CMS sinh ra bên trong loài do những đột biến tự phát trong tế bào chất và thường là gen ty thể. Alloplasmic CMS là những trường hợp CMS tạo ra bởi các phép lai khác chi và có thể lý giải sự bất dục đực là do bất tương hợp hoặc kết hợp kém giữa hệ gen (genome) của loài này và hệ gen của loài khác. Đa phần các dòng CMS được sử dụng trong nghiên cứu và sản xuất hạt lai ở hầu hết các loài cây trồng đều thuộc loại alloplasmic CMS.

Ở các loài cây lấy hạt, muốn sử dụng các dòng CMS trong sản xuất hạt lai thì cần phải sử dụng ba loại dòng (CMS, B và R).

Dòng CMS hay là dòng A có gen trong tế bào chất bất dục (Sterile-S) và gen trong nhân cũng bất dục (rfrf).

Dòng B là dòng duy trì tính bất dục đực, được sử dụng để nhân dòng CMS. Dòng này có gen trong tế bào chất bình thường (Normal - N), gen trong nhân bất dục (rfrf), có khả năng tự thụ phấn và kết hạt. Về mặt kiểu hình, dòng B hoàn

toàn giống dòng A chỉ có một sai khác duy nhất là dòng B luôn hữu dục, tự thụ phấn và kết hạt.

Dòng phục hồi tính hữu dục được hay gọi là dòng R, dòng này có gen nhân là đồng hợp tử trội ($RfRf$) hay dị hợp tử ($Rfrf$) nên có khả năng phục hồi phấn hữu dục, gen trong tế bào chất bình thường (N). Tuy nhiên cần phải lựa chọn dòng R có khả năng phục hồi hoàn toàn ($RfRf$) để cây lai F_1 đạt tỷ lệ hữu dục phấn cao.

Kiểu bất dục được CMS được sử dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu và phát triển lúa lai ba dòng. Tuy nhiên do bản chất di truyền của kiểu bất dục này là không có khả năng tự phục hồi hữu dục trong mọi điều kiện môi trường, nên khi sử dụng dòng CMS, chúng ta luôn phải dùng cả ba loại dòng như đã mô tả ở trên. Quy trình công nghệ khai thác ưu thế lai hệ ba dòng rất kông kênh vì phải hai lần thụ phấn chéo (để sản xuất hạt dòng CMS và hạt lai F_1) nên rất tốn kém, mặt khác tỷ lệ diện tích sản xuất hạt dòng bất dục, hạt lai F_1 và lúa lai thương mại cũng thấp. Theo Doãn Hoa Kỳ (1997), tỷ lệ nói trên ở lúa lai ba dòng là 1:50:5000. Nguồn bất dục được kiểu CMS rất nghèo nàn về đa dạng di truyền nên lúa lai ba dòng thường hay nhiễm một số sâu bệnh hại chính như bạc lá, đạo ôn, rầy nâu hoặc rầy lưng trắng.

- Bất dục được do xử lý hoá chất

Ở những cây trồng có hoa lưỡng tính, mà việc tìm kiếm các dạng bất dục được CMS và bất dục được nhân có nhiều khó khăn, người ta có thể khai thác ưu thế lai F_1 giữa các dòng và giống thường nếu chúng có khả năng kết hợp cao. Tuy nhiên việc khử dục bằng tay rất khó khăn và tốn kém và cũng không thể khử dục và sản xuất một khối lượng lớn hạt lai bằng tay, người ta sử dụng một số hoá chất để làm mất chức năng của hạt phấn. Loại hoá chất này được

gọi là gametocides (Ethrel, Mendok...). Để tạo kiểu bất dục hoá học, các hoá chất có nồng độ xác định được phun lên hoa lúa vào giai đoạn chuẩn bị nở hoa để giết hạt phấn mà không làm ảnh hưởng đến bộ phận cái, do vậy khả năng nhận phấn, thụ phấn, thụ tinh vẫn bình thường. Tuy phương pháp này đơn giản, ít tốn kém nhưng chúng không thể làm mất chức năng của mọi hạt phấn, mặt khác đôi khi cũng gây hại hoặc tác dụng bất lợi cho môi trường.

- Bất dục đực nhân (Nuclear Male Sterility-NMS)

Kiểu bất dục này, tính trạng bất dục đực được kiểm soát bởi một hoặc hai cặp gen nhân và không chịu sự kiểm soát của gen trong tế bào chất. Nhiều công bố từ trước đến nay đều cho rằng cặp gen lặn trong nhân kiểm soát tính trạng bất dục đực nhạy cảm với điều kiện môi trường. Tuy nhiên công bố mới nhất của Li Rongbai và Yang Xinqing, Viện Hàn lâm khoa học Nông nghiệp Quảng Tây (2002) thì hai gen lặn và một gen trội trong nhân kiểm soát tính trạng bất dục đực nhạy cảm với nhiệt độ của dòng 91-403S. Dòng TGMS này biểu hiện bất dục đực trong điều kiện nhiệt độ cao và hữu dục trong điều kiện nhiệt độ thấp. Để có được các kiểu bất dục nhân người ta có thể sử dụng nhiều con đường khác nhau.

Chọn lọc các đột biến tự nhiên để sàng lọc kiểu bất dục đực nhân, đây là hiện tượng rất phổ biến trong tự nhiên và có tần số đột biến khá cao. Theo Duviek (1966), bất dục đực nhân có thể tìm thấy ở tất cả các loài lương thực. Chỉ riêng ở một số loài như Ngô, Cà chua, Lúa mạch có đến 40 gen không allel gây bất dục đực đã được mô tả (Kaul, 1988).

Dùng các tác nhân đột biến hoá học như Ethyl- Methane - sulphonate (EMS) và Ethylimine (EI) để tạo các dạng bất dục dục nhân ở cây trồng như lúa mì, ngô, lúa nước.

Dùng các bức xạ Ion hoá và tia phóng xạ như gamma Co^{60} (Maruyama , 1989) xử lý để tạo các đột biến bất dục dục nhạy cảm với nhiệt độ TGMS.

Dùng lai hữu tính để chuyển các gen kiểm soát tính trạng bất dục dục sẵn có vào một nền di truyền tốt hơn để có được dòng bất dục dục nhân mới có cùng kiểu gen với dòng cho gen nhưng có nhiều tính trạng ưu việt hơn.

Sử dụng công nghệ sinh học như: chỉ thị phân tử (MAS-Marker asisted selection: chọn giống nhờ trợ giúp của chỉ thị phân tử) để quy tụ gen kiểm soát tính trạng bất dục dục tạo dòng bất dục dục nhân mong muốn.

Sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp DNA hay lai tế bào để tạo nguồn bất dục dục nhân.

Ứng dụng lớn nhất của kiểu bất dục này là việc khai thác ưu thế lai hệ hai dòng. Ưu thế lai hệ hai dòng được ứng dụng khá rộng rãi cả về đối tượng cây trồng lẫn phạm vi ứng dụng trong từng loài. Người ta đã khai thác thành công ưu thế lai hệ hai dòng trên các loài thuộc họ Hành tỏi, Kê, Cao lương, Đậu tương, Bông... Đặc biệt trong một số năm gần đây ưu thế lai hệ hai dòng được ứng dụng rất rộng rãi và đạt kết quả cao đối với cây lúa.

Khai thác ưu thế lai hệ hai dòng có nhiều ưu điểm hơn hệ ba dòng. Theo Yuan Long Ping, (1997) hệ thống lai hai dòng có một số ưu điểm so với lúa lai ba dòng là: không cần dòng duy trì bất dục, khả năng tìm dòng cho phấn tốt là rất lớn, năng suất hạt của dòng mẹ (dòng bất dục EGMS luôn cao hơn dòng CMS và không chịu tác động xấu của

hiện tượng nghèo nàn về di truyền như các dòng CMS. Hơn thế nữa, theo Doãn Hoa Kỳ thì tỷ lệ diện tích giữa sản xuất dòng bất dục, hạt lai F_1 và lúa lai thương mại là 1:100:15.000, cao hơn hẳn so với tỷ lệ này của lúa lai ba dòng. Trong khai thác ưu thế lai hệ hai dòng, người ta sử dụng chủ yếu các dạng bất dục đực nhạy cảm với điều kiện môi trường (Environment sensitive Genic Male Sterility - EGMS) bao gồm kiểu bất dục đực nhạy cảm với độ dài ngày PGMS và bất dục đực nhạy cảm với nhiệt độ TGMS. Bản chất di truyền và sự sai khác giữa chúng chủ yếu là điều kiện gây bất dục đực và chuyển hoá hữu dục đực.

Kiểu bất dục đực PGMS (Photoperiodic-sensitive Genic Male Sterility): là các gen trong nhân kiểm soát tính bất dục đực phản ứng rất chặt với độ dài chiếu sáng trong ngày. Kết quả nghiên cứu của nhiều phòng thí nghiệm khẳng định nếu số giờ chiếu sáng trong ngày dài hơn 14 giờ ở giai đoạn phân hoá dòng từ bước 4 đến bước 6 (giai đoạn phân bào giảm nhiễm để hình thành tế bào mẹ đại bào tử và tiểu bào tử) thì các dòng PGMS thuận sẽ sản sinh ra hạt phấn bất dục và người ta sử dụng dòng PGMS để sản xuất hạt lai F_1 . Ngược lại nếu cũng ở giai đoạn phát dục nói trên của cùng dòng PGMS mà thời gian chiếu sáng ngắn hơn 13 giờ 45 phút thì dòng PGMS đó sẽ sản sinh ra hạt phấn hữu dục và khi đó người ta thực hiện việc nhân hạt tự thụ của dòng PGMS. Ngược hẳn với các dòng PGMS thuận là các dòng PGMS nghịch. Dòng PGMS nghịch là loại dòng sẽ bất dục phấn khi thời gian chiếu sáng trong ngày dưới 13 giờ 45 phút và hữu dục phấn khi độ dài chiếu sáng trên 14 giờ. Các dòng PGMS chỉ sử dụng trong nghiên cứu và sản xuất lúa lai ở những nơi có đủ sai khác về độ dài chiếu sáng trong ngày.

Kiểu bất dục đực di truyền nhân nhạy cảm nhiệt độ (Thermo-sensitive Genic Male Sterility-TGMS). Gen nhân của dòng TGMS phản ứng chặt với nhiệt độ, do vậy người ta sẽ sản xuất hạt lai khi nhiệt độ không khí ở giai đoạn giảm nhiệt luôn cao hơn 28°C đến 32°C và sản xuất hạt dòng mẹ trong điều kiện nhiệt độ bình quân dưới 24°C. Đối với dòng TGMS cũng có dạng thuận và nghịch. Dòng thuận là hữu dục ở điều kiện nhiệt độ thấp và bất dục ở điều kiện nhiệt độ cao, còn dòng TGMS nghịch thì có phản ứng ngược với dòng thuận, có nghĩa là hữu dục khi nhiệt độ cao và bất dục khi nhiệt độ thấp.

Ngoài hai kiểu bất dục chính TGMS và PGMS, còn tồn tại các kiểu (T)PGMS và (P)TGMS, có nghĩa là các dòng này mẫn cảm với cả nhiệt độ và thời gian chiếu sáng. Tác nhân nào là chủ yếu sẽ được viết trước. Ví dụ (P)TGMS có nghĩa là dòng này mẫn cảm với độ dài ngày mạnh hơn.

Nghiên cứu cơ sở di truyền của hiện tượng bất dục đực di truyền nhân nhạy cảm với môi trường, nhiều nhà nghiên cứu lúa lai đều kết luận: các dòng khác nhau thì phản ứng khác nhau với thay đổi của nhiệt độ và thời gian chiếu sáng ở giai đoạn nhạy cảm. Nếu nhiệt độ trung bình là 23-24°C kéo dài liên tục 3 ngày thì hầu hết các dòng TGMS thuận sẽ chuyển từ bất dục sang hữu dục. Các nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc và một số nước khác trên thế giới đã chỉ ra rằng: nhiệt độ chuyển hoá của các dòng TGMS rất khác nhau tùy thuộc vào bản chất gen của mỗi dòng (Lu và cộng sự, 1994). Dòng bất dục TGMS IVA được tạo ra tại tỉnh Vân Nam Trung Quốc bất dục phấn ở nhiệt độ 24°C và hữu dục ở nhiệt độ cao hơn 27°C.

Wu và cộng sự đã sử dụng 2 dòng TGMS có tên là 90336S và 90338S có cùng nguồn gốc để nghiên cứu bản

chất di truyền của sự thay đổi nhiệt độ tối hạn cho bất dục phấn. Với 3 ngưỡng nhiệt độ dưới 23°C và lớn hơn 23°C liên tục 3 ngày, nhỏ hơn 25°C và lớn hơn 25°C liên tục 3 ngày; nhỏ hơn 27°C và lớn hơn 27°C liên tục 3 ngày. Tác giả kết luận: nhiệt độ chuyển hoá bất dục của 90336S thấp hơn 90338S. Nhiệt độ chuyển hoá thấp là tính trạng trội. Tỷ lệ phân ly trong đời F_2 về số cây hữu thụ có thể kết luận tính trạng ngưỡng chuyển hoá bất dục thấp được kiểm soát bởi 2 gen trội L_1, L_2 . Dòng 90336S có kiểu gen là $L_1L_1 L_2L_2$ và dòng 90332S có kiểu gen là $l_1l_1 l_2l_2$. Hai gen L_1 và L_2 có khả năng làm giảm ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá bất dục của dòng TGMS AnnongS-1. Lý do để giải thích tại sao sự phân ly về độ bất dục phấn trong ngày 18/3 từ 31% - 90% là do các cây có kiểu gen là $L_1- l_2l_2$ và $l_1l_1 L_2$ nên nó chuyển từ hữu dục sang bất dục. Nhưng các cây có kiểu gen $l_1l_1 l_2l_2$ vẫn duy trì tính hữu dục.

III.3. Hiện tượng thay đổi ngưỡng chuyển hoá của các dòng EGMS

Như trình bày ở phần trên: Gen kiểm soát tính trạng bất dục đực kiểu EGMS là gen nhân và hầu hết các nhà nghiên cứu đều kết luận là gen lặn. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu gần đây của Li Ronghai và Yang Xinqing, Viện Hàn lâm khoa học Nông nghiệp Quảng Tây, Trung Quốc (2002) thì hai gen lặn và một gen trội trong nhân kiểm soát tính trạng bất dục đực nhạy cảm với nhiệt độ của dòng 91-403S. Nếu là đơn gen kiểm soát tính trạng bất dục đực thì về mặt di truyền các gen kiểm soát tính trạng EGMS hoàn toàn tuân thủ các định luật của Mendel về một cặp đối tính trạng. Tuy nhiên cần phải xem xét mối quan hệ qua lại giữa kiểu gen-kiểu hình và môi trường (genotype-phenotype-environment)

để phân tích hiện tượng thay đổi ngưỡng chuyển hoá hữu dục hay còn gọi là hiện tượng trượt di truyền.

Mô hình cơ bản biểu thị mối liên hệ giữa trị số di truyền của một kiểu gen với trị số kiểu hình P biểu hiện trong môi trường sống cụ thể. Trị số di truyền là thước đo tiềm năng nội tại của một kiểu gen, tuy nhiên không thể đánh giá thật chính xác. Một cách gián tiếp có thể đánh giá trị số di truyền thông qua trị số kiểu hình trong điều kiện môi trường có tác động theo một hướng. Ví dụ ba kiểu gen *ms1*, *ms2* và *ms3* được gieo trồng trong điều kiện nhiệt độ ở thời kỳ nhạy cảm là 23,5°C. Kết quả thu được tỷ lệ kết hạt tự thụ tương ứng là 40%, 45% và 50%. Cùng ba kiểu gen trên nếu chúng ta gieo trồng và giữ nhiệt độ ở thời kỳ nhạy cảm gây hữu dục là 24,0°C. Các dòng nói trên cho tỷ lệ hạt tự thụ giảm xuống là 30%, 35% và 40% tương ứng với ba kiểu gen. Thứ tự tương đối của tỷ lệ kết hạt của ba kiểu gen *ms1*, *ms2* và *ms3* gieo trong điều kiện ngưỡng chuyển hoá tăng lên vẫn được duy trì và mô hình cơ bản được viết như sau:

$$P = G + E \quad (I)$$

Trong đó E là biến số do môi trường gây ra. E có thể mang giá trị âm hoặc dương. Theo mô hình (I) biểu thị tác động của môi trường độc lập với kiểu gen vì chúng ta thấy thứ tự của ba kiểu gen là không đổi trong điều kiện nhiệt độ ngưỡng chuyển hoá thay đổi. Tuy nhiên có những kiểu gen có khả năng thích ứng cao nên cho trị số kiểu hình cao (ngưỡng chuyển hoá tăng nhưng tỷ lệ kết hạt vẫn cao). Như vậy là kiểu gen có tương tác với môi trường nên mô hình (I) được viết lại như sau:

$$P = G + E + \underline{(GE)} \quad (II)$$

Cần phải đề cập đến van de ngưỡng khi nghiên cứu các dòng EGMS. Có một số gen chỉ thể hiện trong điều kiện nhất định. Ví dụ như gen chịu lạnh ở lúa: nếu nhiệt độ môi trường giảm xuống dưới 8°C thì cây trở nên bạch tạng và khi nhiệt độ tăng trên 8°C thì đặc tính này mất đi. Tính trạng bất dục đực nhạy cảm với điều kiện môi trường cũng thuộc loại các tính trạng ngưỡng. Trong điều kiện nhiệt độ hoặc thời gian chiếu sáng phù hợp thì một dòng EGMS cho hạt phát hữu dục và kết hạt, ngược lại nếu điều kiện thời gian chiếu sáng hoặc nhiệt độ thay đổi thì cũng dòng EGMS đó cho hạt phấn bất dục. Các nhà chọn tạo giống muốn chọn lọc các tính trạng ngưỡng thì bắt buộc phải tạo ra điều kiện phù hợp để tính trạng ngưỡng thể hiện. Từ mô hình "II" chúng ta có thể nhận biết rằng mức độ thể hiện của giá trị kiểu hình P của tính trạng ngưỡng còn phụ thuộc vào giá trị (GxE).

Trong lĩnh vực chọn tạo giống lúa lai hai dòng đặc biệt là chọn tạo và duy trì dòng bất dục đực EGMS. Để hạn chế vấn đề, chúng ta chỉ đề cập đến hiện tượng trượt di truyền của các dòng TGMS. Trên cơ sở các phân tích đã nêu, muốn duy trì ngưỡng chuyển hoá của một dòng TGMS chúng ta luôn phải giới hạn giá trị E và đặc biệt là tương tác "GxE". Kinh nghiệm trong chọn tạo và duy trì dòng TGMS cho thấy, để duy trì ngưỡng chuyển hoá hữu dục đực chúng ta luôn phải khống chế ngưỡng nhiệt độ sao cho thấp hơn ngưỡng đã xác định của một dòng khi mới được chọn tạo ra.

Ví dụ dòng TGMS Pei'ai 64S, theo các tác giả của Trung tâm nghiên cứu lúa lai Hồ Nam, Trung Quốc thì dòng này có ngưỡng chuyển hoá hữu dục là 23.5 °C , muốn duy trì ngưỡng chuyển hoá của nó, chúng ta luôn phải chọn lọc

giống đầu dòng hay giống siêu nguyên chủng của Pei'ai 64S ở mức 20 °C đến 22.5 °C. Như vậy các thế hệ tiếp theo của Pei'ai 64S (giống nguyên chủng, giống xác nhận) sẽ có ngưỡng chuyển hoá ổn định.

Cũng cần phải quan tâm đến vấn đề gen bổ sung. Theo nhiều tác giả thì gen kiểm soát tính trạng bất dục đực nhạy cảm với nhiệt độ là đơn gen lặn và có thể có một vài gen biến đổi (modified gen). Bản thân gen biến đổi nếu chỉ một mình nó sẽ không có bất kỳ tác dụng nào nhưng nó lại có tác dụng làm tăng lên hoặc giảm đi sự thể hiện của các gen khác.

III.4. Tiêu chuẩn một dòng bất dục

Từ các nghiên cứu và thực nghiệm để sử dụng các dòng bất dục đực vào phát triển lúa lai thương mại, Yuan Long Ping và cộng sự đã đưa ra tiêu chuẩn của một dòng bất dục đực được coi là đủ các điều kiện để khai thác ưu thế lai như sau:

- Phải đồng nhất và ổn định ở hầu hết các tính trạng nông sinh học và kinh tế.
- Phải bất dục đực hoàn toàn trong mọi điều kiện (nếu là CMS), nếu là các dòng EGMS thì phải bất dục hoàn toàn và kéo dài trên 35 ngày trong ngưỡng bất dục, phải chuyển hoá hữu dục và đạt tỷ lệ kết hạt trên 40% trong ngưỡng hữu dục.
- Có khả năng chống chịu tốt với các loại sâu bệnh ở lúa.
- Phải có tỷ lệ thò vôi nhụy cao để đảm bảo thụ phấn chéo ở các ngày sau khi nở hoa.

Nghiên cứu về tỷ lệ thò vôi nhụy, hầu hết các đánh giá từ trước đến nay đều sử dụng phương pháp truyền thống là quan sát và thu thập số liệu trên cơ sở hình thái của các

dòng. Gần đây nhờ kỹ thuật lập bản đồ các tính trạng số lượng (QTL Mapping), J. Zhou, P. Xu, F. Hu, J. Li, và D. Tao, Viện nghiên cứu cây lương thực Vân Nam Trung Quốc và E. Sacks, Viện làm vườn New Zealand cùng, Z. Li, IRRI (2002), đã xác định cơ sở di truyền của tính trạng này trên cơ sở phân tích đời F_2 của phép lai xa giữa lúa trống và lúa đại (*O. sativa*/*O. longistaminata*). Để xác định bản chất di truyền của 3 loại tính trạng của vòi nhụy: một là thờ một vòi, hai là thờ cả hai vòi và ba là tỷ lệ thờ một vòi và thờ hai vòi cân bằng nhau trong cùng một kiểu gen (một dòng). Các tác giả đã sử dụng bản đồ liên kết thu được từ quần thể F_2 tổ hợp lai xa giữa hai loài lúa đại và lúa trống (RD23/*O. longistaminata*). Bản đồ liên kết này bao gồm 228 cá thể và 155 chỉ thị SSR trải dài 1.666,3 cM (Centimorgan) trên 12 NST của lúa. Kết quả phân tích hệ số tương quan chứng minh rằng mối liên hệ giữa ba tính trạng thờ vòi nhụy là rất chặt chẽ. Tỷ lệ thờ vòi nhụy của con lai F_1 là 54%, chứng tỏ rằng di truyền của tính trạng thờ vòi nhụy là trội không hoàn toàn (tỷ lệ thờ vòi nhụy của lúa trống là 29%, của lúa đại là 100%). Trong tổng số 11 QTL đã được tách cho 3 loại tính trạng bằng kỹ thuật Mapmarker/QTL Version 1.1. Kết quả thu được có 3 QTL thuộc về tính trạng thờ một vòi nhụy; 3 QTL thuộc về tính trạng thờ cả hai vòi và 5 QTL thuộc tính trạng thờ một bên hay thờ cả hai. Kết quả phân tích QTL còn chỉ ra rằng chỉ thị qSE-2 (định vị giữa chỉ thị OSR31 và RM55 trên NST số 3) và qSE-5 (định vị giữa RM20B và RM19 trên NST12) là chung cho cả ba tính trạng phân tích có tác dụng làm giảm hiệu ứng tính cộng và tính trội từ dòng bố là lúa đại (*O. longistaminata*). So sánh với tính trạng thờ một vòi và thờ cả hai vòi, qSE-2 định vị giữa RM213 và RM208 trên NST số 2 được tách ra kiểm soát tính trạng thờ cả hai vòi hoặc tính trạng thứ ba, qSE-3.

định vị giữa RM185 và RM142 trên NST số 4 chỉ kiểm soát tính trạng thò một vòi hoặc tính trạng thứ ba. Chúng có ảnh hưởng làm tăng tác động cộng tính hay tính trội từ dòng bố (*O. longistaminata*). Các QTL khác đã được phát hiện như qSE-4 định vị giữa RM249 và RM164 trên NST số 5 chỉ liên kết với tính trạng thứ 3 với tác dụng làm giảm hiệu ứng tính cộng và tăng hiệu ứng trội từ loài lúa đại. Kết quả nghiên cứu đã khẳng định rằng nếu gán được các chỉ thị qSE-1, qSE-3 từ loài lúa đại (*O. longistaminata*) vào một dòng mẹ nào đó sẽ làm tăng một cách đáng kể tỷ lệ thò vòi nhụy của dòng bất dục dục và sẽ làm tăng tỷ lệ thụ phấn chéo, tăng năng suất hạt lại và giảm đáng kể giá thành sản xuất hạt lại F_1 .

Chương II

CHỌN TẠO GIỐNG LÚA LAI HAI DÒNG

Trong hệ thống lúa lai hai dòng, một trong hai thành phần quan trọng tạo ra các tổ hợp lai mới đó là các dòng bất dục đực nhân nhảy cảm với điều kiện môi trường (EGMS). Các dòng này được sử dụng làm dòng mẹ trong các tổ hợp lai. Còn các dòng bố là các dòng lúa thuần tốt đã ổn định thuộc các loài phụ *Indica*, *Japonica* và *Javanica* trong loài lúa trồng *O. sativa*. Do vậy nói đến việc chọn tạo các dòng bố mẹ mới có nghĩa là chọn tạo các dòng EGMS, còn các dòng cho phấn (dòng bố) thì đã có rất nhiều tài liệu của các tác giả trong và ngoài nước đề cập đến.

Để chọn tạo một dòng EGMS mới, nhà chọn giống có thể sử dụng các phương pháp như lai hữu tính và chọn lọc phá hệ, xử lý đột biến bằng các tác nhân vật lý, hoá học (NMU, NDMU, EL... xem công thức trang 33) hay chọn các đột biến dòng soma; lai xa và cứu phôi kết hợp với lai trở lại (backcross) hoặc dùng các kỹ thuật của sinh học phân tử như MAS, lai xa tế bào, biến nạp gen... Có bao nhiêu con đường dẫn đến bất dục đực nhân, sẽ có bấy nhiêu phương pháp tạo dòng bất dục. Tuy nhiên, trong khuôn khổ của chương này, chỉ giới thiệu một số phương pháp cơ bản.

I. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHỌN TẠO GIỐNG

I.1. Phương pháp đột biến phóng xạ

Là một trong những phương pháp được sử dụng rất rộng rãi trong gây tạo đột biến. Mục đích gây tạo đột biến bằng

phương pháp phóng xạ là tạo ra các đột biến gen kiểm soát tính trạng bất dục đực ở lúa. Đột biến gen là những biến đổi trong cấu trúc DNA. Trên quan điểm hiện đại về gen, người ta cho rằng đột biến gen là đột biến điểm và là những thay đổi về trình tự sắp xếp và thành phần các nucleotit trong phân tử DNA. Đột biến gen có thể bảo toàn sự tái hiện của nó thông qua quá trình phân chia tế bào, do vậy mà có thể di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác. Hầu hết các đột biến gen xuất hiện ở trạng thái lặn. Điều này rất cần thiết cho sự tồn tại của loài vì hầu hết các loại đột biến là có hại. Với tính trạng bất dục đực cũng là tính trạng có hại cho bản thân thực vật hay cây trồng. Song con người đã biết khai thác nó và tìm ra cơ chế di truyền kiểm soát tính trạng để khai thác ưu thế lai. Đồng thời tìm điều kiện môi trường không cho gen lặn hoạt động. Đó chính là giai đoạn nhạy cảm và chuyển hoá hữu dục để sản xuất hạt tự thụ của các dòng EGMS.

Như đã giới thiệu ở mục những con đường tạo ra dạng bất dục đực di truyền nhân, các tác nhân trong đột biến phóng xạ bao gồm:

- + Bức xạ tia cực tím.
- + Bức xạ điện từ: tia X từ máy phát tia X, tia Gamma từ chất đồng vị phóng xạ Coban 60 (^{60}Co) hay Cesium 137 (^{137}Cs).
- + Bức xạ hạt: những hạt Notron từ lò phản ứng hạt nhân, những hạt β (electron) từ những chất đồng vị phóng xạ Photpho 32 (^{32}P) hay Sulphur 35 (^{35}S).

Cơ chế tác động của phóng xạ lên cơ thể sống là trực tiếp hay gián tiếp. Cơ chế của tác dụng trực tiếp được giải

thích bằng thuyết “Bia”. Thuyết về gen và liên kết hoá học giữa các gen. Theo thuyết “Bia” thì các tác nhân hoá học nếu tác dụng đúng vào các gen thì gây nên đột biến gen, còn nếu bắn trúng vào các mối liên kết thì tạo ra sai hình NST. Tuy nhiên hạn chế của thuyết “Bia” là không tính đến ảnh hưởng của môi trường.

Thuyết gốc tự do cho rằng tia phóng xạ gây đột biến một cách gián tiếp sau khi giải phóng trong môi trường các gốc OH[•] và HO₂[•] tự do, chính các gốc này mới gây tác động lên NST. Vật chất chủ yếu trong mô là nước, khi phân tử H₂O bị ion hoá sẽ mất đi một điện tử nó trở nên không ổn định và giải phóng ra đôi ion H⁺ và OH⁻.

Các điện tử được giải phóng có thể kết hợp với phân tử nước khác tạo thành ion âm H₂O⁻, sau đó ion này phân ly tạo thành OH[•] và gốc tự do H[•], các gốc tự do có thể tương tác với nhau tạo nên các phân tử H₂, H₂O, H₂O₂. Các gốc tự do có hoạt tính cao sẽ tác động qua lại với DNA làm cho chúng biến đổi. Ngày nay, vấn đề đã được khẳng định sự xuất hiện đột biến là do cả hai tác động ion hoá trực tiếp lên phân tử DNA của các tác nhân phóng xạ, đồng thời do tác động gián tiếp qua tương tác của các gốc tự do với phân tử DNA.

Vấn đề gây tạo đột biến phóng xạ đã mở ra triển vọng lớn trong công tác tạo giống. Nhiều quốc gia trên thế giới đã thành lập những trung tâm phóng xạ để phục vụ cho công tác này. Trung Quốc là quốc gia đi đầu trong lĩnh vực ứng dụng bức xạ nguyên tử vào nông nghiệp. Trung Quốc đã sử dụng bức xạ nguyên tử gây đột biến gen tạo ra được 325 giống của 29 loài cây trồng trong đó có một số giống cây ăn quả và giống lúa mì cao sản. Nhờ gây đột biến bằng

phương pháp phóng xạ người ta có thể cải tiến những tính trạng khác nhau như thấp cây, phân cành nhiều, chín sớm, tăng sản lượng, tăng tính chống chịu, tạo dòng bất dục...

Các bước trong chọn dòng bất dục dục kiểu EGMS bằng tác nhân phóng xạ (hình 1).

1. Chọn tác nhân đột biến và xác định liều lượng xử lý: Tùy thuộc vào bản chất di truyền của loài cây trồng sử dụng làm vật liệu để gây tạo đột biến mà người ta lựa chọn tác nhân và liều lượng xử lý. Đối với lúa, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng để tạo các đột biến gen gây bất dục dục nhạy cảm với điều kiện môi trường (EGMS) người ta thường sử dụng phóng xạ γ Co⁶⁰ với liều lượng 20 đến 25 Krad sẽ thu được tần số đột biến bất dục dục cao.

2. Xác định đối tượng xử lý và bộ phận xử lý: Sau khi đã chọn được tác nhân đột biến, bước quan trọng tiếp theo của gây tạo đột biến là xác định đối tượng hay là bộ phận xử lý. Đối với cây trồng, các bộ phận dùng trong xử lý phóng xạ là khá phong phú (hạt khô, hạt ướt, hạt nảy mầm, chồi ngủ, chồi non, đỉnh sinh trưởng, hom, cây con, hoa hoặc ống phấn...). Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả đã chỉ ra rằng, để tạo đột biến gen kiểm soát tính bất dục dục ở lúa, bộ phận xử lý thường được sử dụng là hạt khô, hạt ướt hay hạt nảy mầm. Sử dụng ba đối tượng kể trên vừa dễ làm, khối lượng cá thể xử lý lớn, và các bước thí nghiệm sau xử lý đơn giản. Khi xuất hiện các biến dị di truyền thì dễ tách và hiệu quả của phân lập các biến dị thường chính xác hơn.

3. Sàng lọc đột biến: Việc sàng lọc các đột biến là khâu rất quan trọng trong công tác tạo các dòng đột biến bất dục dục kiểu EGMS. Cơ sở để chọn lọc đó là kiểu bất dục hạt

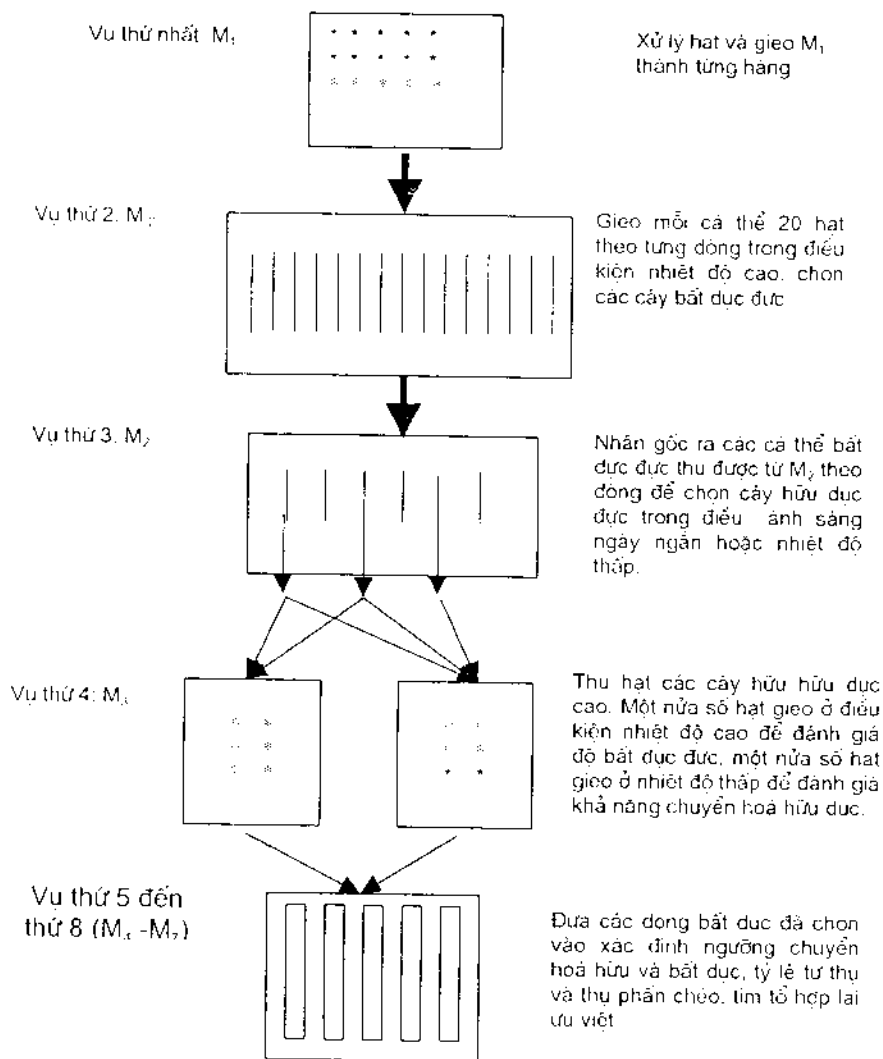
phấn. Tuy nhiên khó phát hiện bằng mắt các hạt phấn bất dục, chúng ta phải chọn các cá thể có chiều cao cây thấp, trổ không thoát và phải nhuộm màu hạt phấn bằng dung dịch IKI 1% rồi quan sát dưới kính hiển vi quang học. Hạt phấn nào có hình không tròn và không nhuộm màu của IKI là bất dục.

Ở thế hệ M_1 cũng như các tính trạng khác, các cá thể tồn tại ở trạng thái dị hợp tử nên chúng ta không tiến hành chọn lọc ở đời này. Chúng ta phải thu riêng từng cá thể rồi gieo mỗi cá thể 20 hạt thành từng dòng để có quần thể M_2 . Để chọn lọc các đột biến nhảy cảm với điều kiện môi trường, chúng ta phải sàng lọc các đột biến trong điều kiện thời gian chiếu sáng và nhiệt độ phù hợp ở giai đoạn nhảy cảm. Ví dụ để chọn dòng TGMS thì yếu tố gây bất dục là nhiệt độ. Nếu sàng lọc dòng PGMS thì yếu tố môi trường là độ dài ngày.

4. Đánh giá các thể đột biến: Việc đánh giá các thể đột biến được tiến hành sau khi đã thu được các đột biến bất dục có khả năng di truyền cho các đời sau.

5. Tùy vào mục đích chọn dòng mà điều kiện đánh giá là khác nhau. Nếu chọn dòng TGMS thì phải dùng yếu tố nhiệt độ để đánh giá. Nếu chọn dòng PGMS thì phải lấy thời gian chiếu sáng trong ngày làm điều kiện chọn lọc. Có thể đánh giá và chọn lọc dòng EGMS trong điều kiện tự nhiên hay điều kiện nhân tạo (đánh giá trong phytotron hay nhà khí hậu nhân tạo).

6. Nhân và sử dụng các thể đột biến: Để rút ngắn thời gian chọn tạo giống, bên cạnh việc lựa chọn phương pháp chọn tạo vật liệu khởi đầu, việc ứng dụng hợp lý các giải

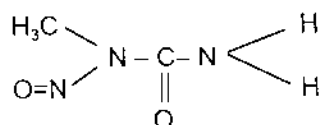


Hình 1: Sơ đồ tạo dòng EGMS bằng phương pháp phóng xạ

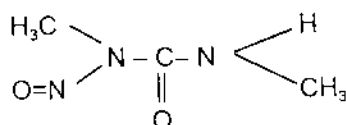
© Hoàng Tuyết Minh, 1998

pháp nhân giống đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình khai thác và sử dụng các dòng EGMS mới chọn tạo ra trong phát triển lúa lai hai dòng. Bên cạnh việc nhân giống truyền thống từ hạt, có thể ứng dụng các phương pháp vi nhân giống để tăng hệ số nhân mà vẫn giữ được đặc tính di truyền của dòng EGMS.

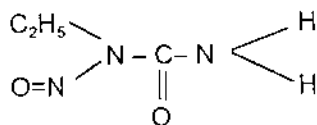
Một số chất siêu đột biến thường dùng để tạo các đột biến hoá học:



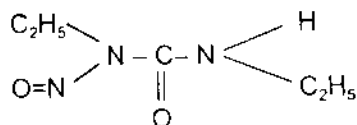
NitrozomethylUrê
(NMU)



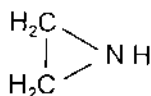
NitrozodimethylUrê
(NDMU)



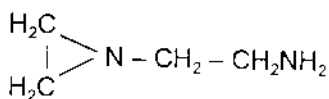
NitrozoethylUrê
(NEU)



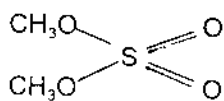
NitrozodiethylUrê
(NDEU)



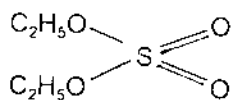
Ethylenimin
(EI)



Diethylenimin
(DEI)



Dimethylsunfat
(DMS)

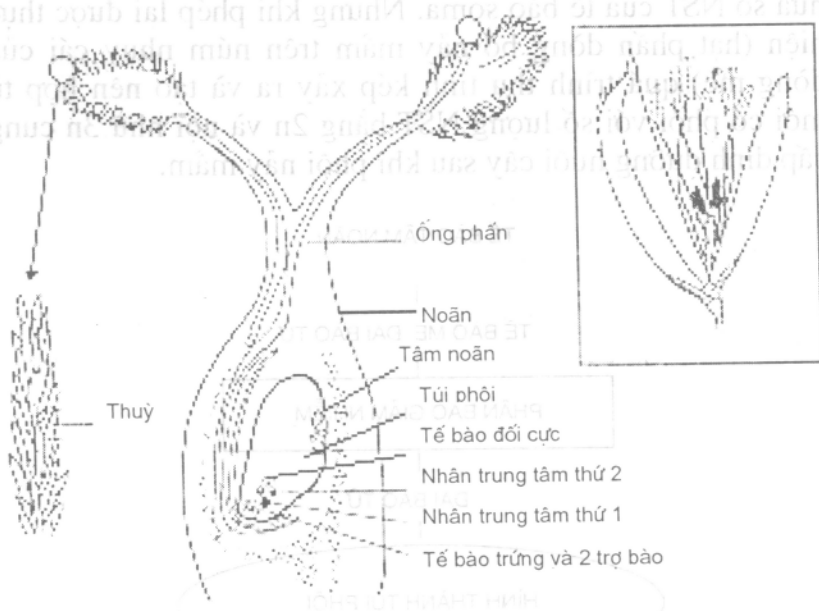


Diethylsunfat
(DES)

I.2. Sử dụng lai hữu tính để tạo các dòng EGMS mới

I.2.1. Quá trình thụ phấn, thụ tinh ở lúa

Trước hết cần phải có hiểu biết về quá trình thụ phấn thụ tinh và hình thành hạt ở lúa. Thụ phấn là bước đầu tiên trong sinh sản. Các hạt phấn rơi ra từ các bao phấn và rơi vào hai vòi nhụy cái. Thụ tinh là bước thứ hai trong quá trình hình thành hạt. Khi hạt phấn rơi vào núm nhụy, quá trình nảy mầm diễn ra và hình thành ống phấn chứa nhân của bộ phận đực, sự dung hợp với tế bào trứng ở trong noãn (hình 2).

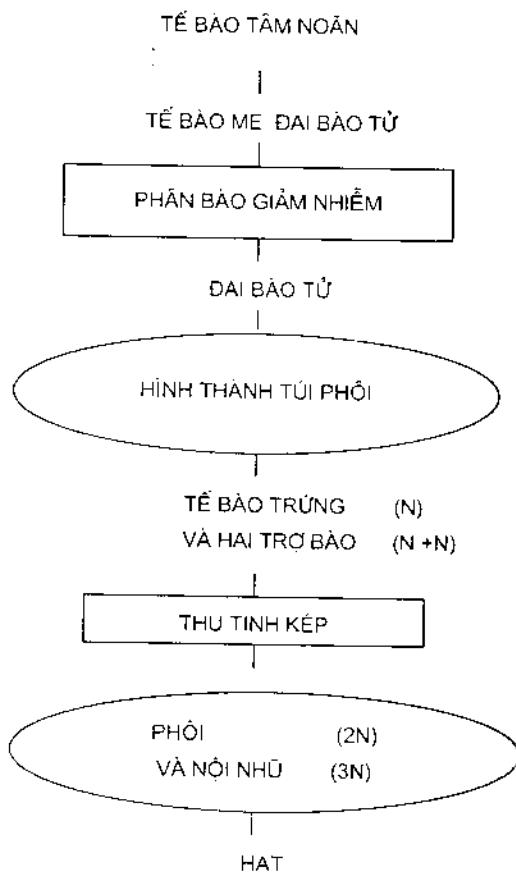


Hình 2: Sự thụ tinh ở lúa

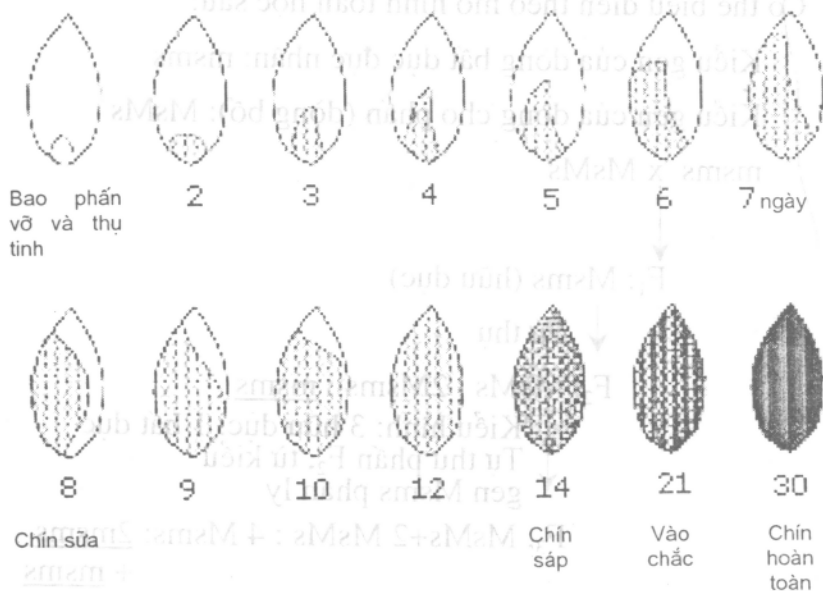
Quá trình từ thụ phấn đến thụ tinh diễn ra từ 18 đến 24 giờ, sau đó là các giai đoạn hình thành hạt: Tế bào trứng đã thụ tinh bắt đầu phát triển trong vòng 12 giờ sau khi thụ tinh. Nội nhũ của hạt đang phát triển bắt đầu chín sữa trong khoảng 8 ngày sau thụ tinh. Phôi hình thành rõ sau thụ tinh 10 ngày. Nội nhũ ở thể sáp 14 ngày sau thụ tinh và vào chắc ở 21 ngày sau thụ tinh. 25-30 ngày sau thụ tinh, noãn chín và chín hoàn toàn thành hạt (hình 3 và 4).

Lai hữu tính là thực hiện tái tổ hợp gen thông qua quá trình thụ phấn chéo. Trong quá trình hình thành giao tử đực và giao tử cái ở thực vật có sự phân chia hình thành các tế bào hạt phấn và tế bào túi phôi với số lượng NST bằng một

nửa số NST của tế bào soma. Nhưng khi phép lai được thực hiện (hạt phấn dòng bố nảy mầm trên núm nhụy cái của dòng mẹ) quá trình thụ tinh kép xảy ra và tạo nên hợp tử mới có phôi với số lượng NST bằng $2n$ và nội nhũ $3n$ cung cấp dinh dưỡng nuôi cây sau khi phôi nảy mầm.



Hình 3 : Quá trình tạo hạt do sinh sản hữu tính



Hình 4: Quá trình hình thành hạt

Về mặt nguyên lý, lai hữu tính là thực hiện việc tái tổ hợp gen thông qua sự kết hợp giữa giao tử đực và giao tử cái của hai cơ thể có đặc tính di truyền khác nhau. Trong mỗi một giao tử (hạt phấn và tế bào trứng) đều mang một bộ nhiễm sắc thể cơ bản (n) từ hai phía bố và mẹ. Vì vậy cơ thể lai F_1 là đồng nhất và vẫn là cơ thể nhị bội ($2n$) nhưng một nửa là của dòng mẹ và một nửa là của dòng bố. Nếu cho F_1 tự thụ phấn sẽ cho tỷ lệ phân ly kiểu gen F_2 là $1:2:1$ và phân ly kiểu hình là $3:1$.

Có thể biểu diễn theo mô hình toán học sau:

Kiểu gen của dòng bất dục đực nhân: $msms$

Kiểu gen của dòng cho phấn (dòng bố): $MsMs$

$msms \times MsMs$



$F_1: Msms$ (hữu dục)



Tự thụ

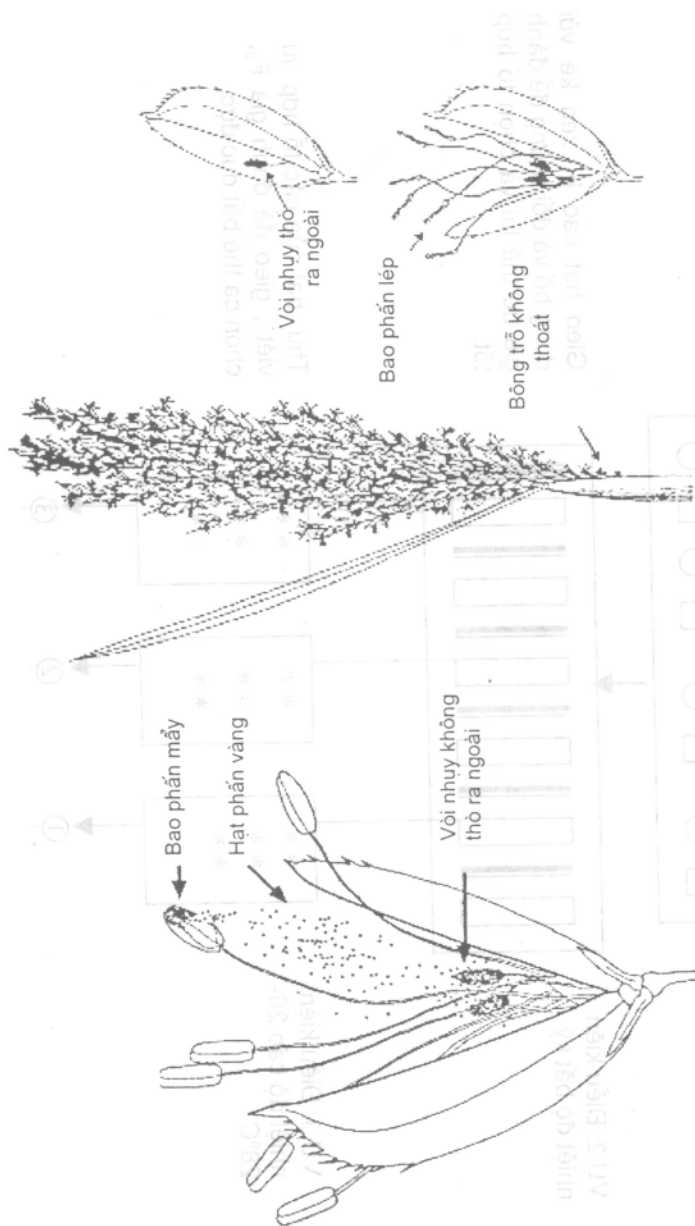
$F_2: MsMs : 2Msms : \underline{msms}$

↓ Kiểu hình: 3 hữu dục: 1 bất dục
Tự thụ phấn F_2 , từ kiểu gen $Msms$ phân ly

$F_3: MsMs + 2 Msms : 4 Msms : \underline{2msms} + \underline{msms}$

1.2.2. Lai và chọn lọc qua phân ly đời sau

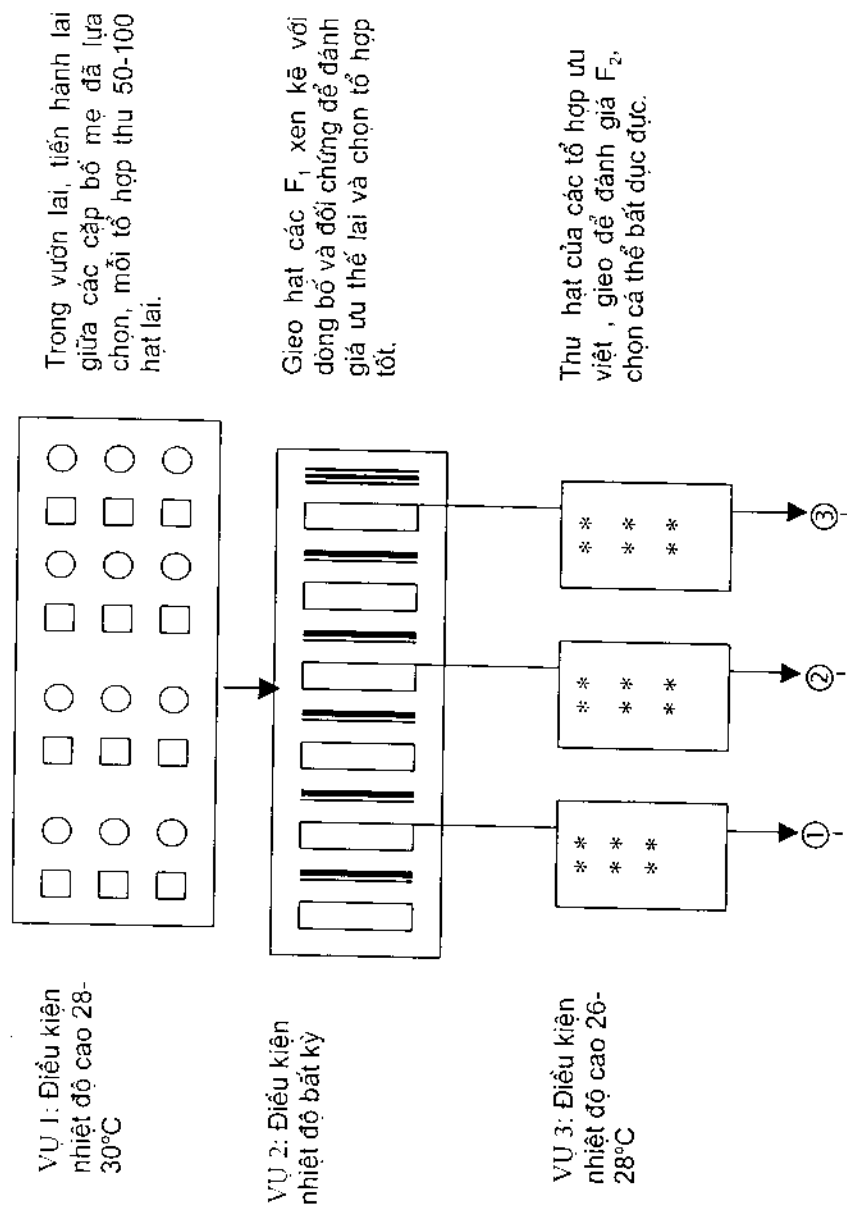
Như vậy bằng con đường lai hữu tính và chọn lọc phả hệ, nhà chọn giống có thể chuyển các gen bất dục sẵn có vào các giống mong muốn để tạo ra các dòng EGMS mới (hình 6). Nhà chọn giống sẽ lựa chọn các cá thể có kiểu hình bất dục phấn nhưng có các tính trạng nông sinh học và kinh tế đáp ứng mục tiêu chọn giống đã đề ra. Sự khác biệt của một số tính trạng kiểu hình làm cơ sở quan trọng cho sàng lọc dòng bất dục đực là kiểu bông, hoa, vòi nhụy và hạt phấn (hình 5). Kết quả của quá trình là tạo ra các dòng EGMS mới có đồng allel ms với các dòng cho gen nhưng trên nền di truyền mới. Thành tựu chọn tạo các dòng EGMS trên thế giới được giới thiệu tại bảng 2.



Kiểu hoa và hạt phấn của cây hữu dục

Kiểu bông, hoa của dòng bất dục

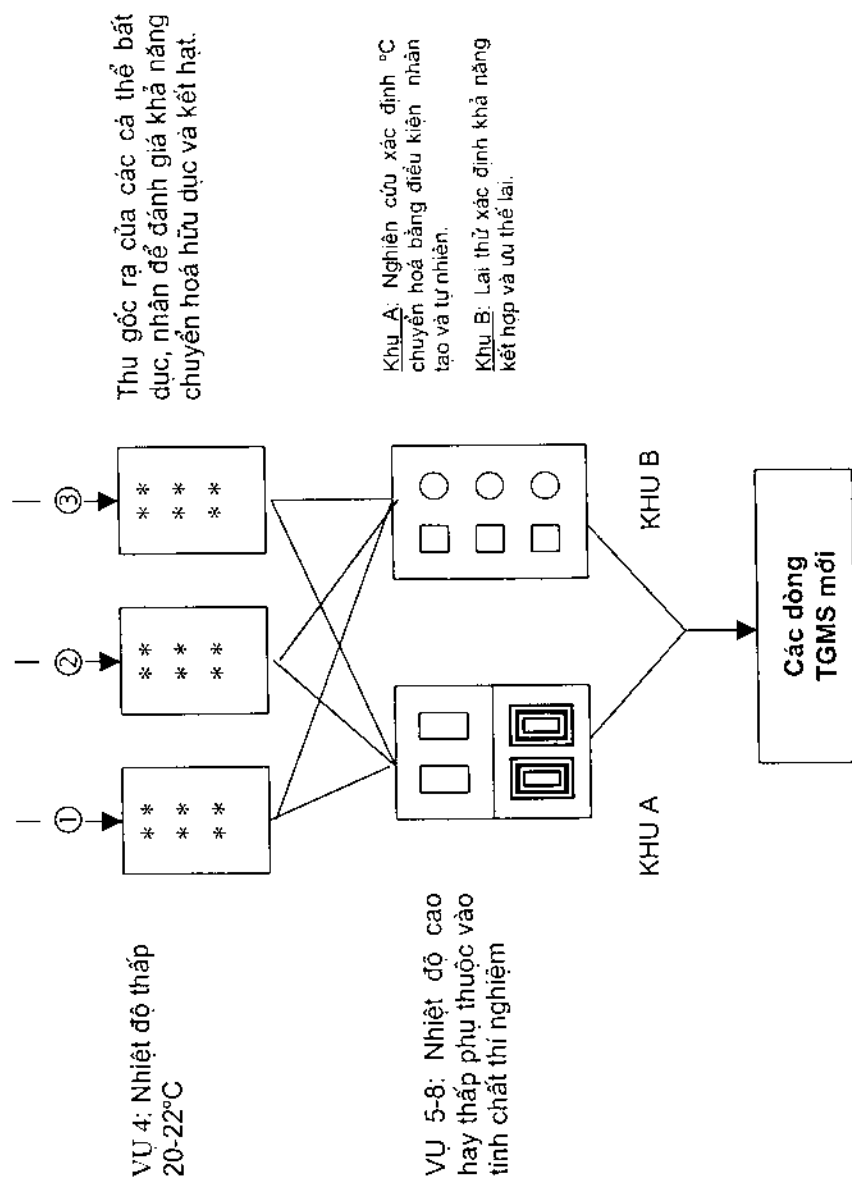
Hình 5: Kiểu hình hoa, bông của cây lúa hữu dục và cây bất dục



Trong vườn lai, tiến hành lai giữa các cặp bố mẹ đã lựa chọn, mỗi tổ hợp thu 50-100 hạt lai.

Gieo hạt các F_1 xen kẽ với dòng bố và đối chứng để đánh giá ưu thế lai và chọn tổ hợp tốt.

Thu hạt của các tổ hợp ưu việt, gieo để đánh giá F_2 , chọn cá thể bất dục đực.



Hình 6: Sơ đồ chọn tạo dòng TGMS bằng lai hữu tính

© Hoàng Tuyết Minh, 1998

Tuy nhiên, trong thực tế sản xuất không phải các dòng EGMS biểu hiện hoàn toàn như lý thuyết đã nêu. Một vấn đề thường gặp phải trong sản xuất hạt dòng mẹ và lúa lai thương mại là vẫn tồn tại một tỷ lệ nào đó hạt tự thụ của dòng mẹ làm ảnh hưởng đến độ thuần và năng suất của lúa lai. Để giải quyết vấn đề này, Wu đã đưa ra quan điểm về khả năng cạnh tranh yếu. Theo ông có sự khác biệt lớn về sự cạnh tranh giữa các giống và các cây trong quần thể chọn giống (Jennings và cộng sự, 1979). Giống có khả năng cạnh tranh yếu không thể phát triển tốt khi gieo cấy cùng các giống khác. Vì sự cạnh tranh mạnh mẽ của một giống sẽ tạo ra sức cạnh tranh chung cao.

Thông thường, giống có khả năng cạnh tranh yếu sẽ có thân nhỏ, mảnh mai và sinh trưởng chậm, đẻ nhánh chậm, lùn, lá ngắn và hẹp, giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng đầu tiên yếu. Nếu 1 dòng TGMS có khả năng kết hợp cao thì khả năng cạnh tranh sẽ yếu hơn con lai trong tổ hợp do nó tham gia làm dòng mẹ. Sự giảm năng suất do hạt tự thụ của dòng bất dục trong ruộng sản xuất hạt lai khi nhiệt độ ở một năm nào đó không thuận lợi, thấp hơn ngưỡng chuyển hoá hữu dục (CFP) rơi vào giai đoạn nhạy cảm mạnh sẽ làm giảm mạnh năng suất và độ thuần. Từ phân tích trên, tác giả đã đưa ra quan điểm chọn tạo dòng TGMS với khả năng cạnh tranh yếu.

Rất dễ tìm thấy một vật liệu chọn giống có khả năng cạnh tranh yếu nhưng rất khó có thể tìm thấy loại vật liệu vừa có khả năng cạnh tranh yếu vừa có khả năng kết hợp cao. Chúng ta đã biết, mức độ ưu thế lai phụ thuộc vào sự đa dạng di truyền giữa hai dòng bố mẹ. Do vậy, sự sai khác lớn giữa 2 bố mẹ sẽ có khả năng nhận được con lai có ưu

thể lai cao. Bằng cách chuyển các tính trạng (gen) từ lúa *Japonica* vào dòng TGMS rồi sử dụng dòng *Indica* làm dòng cho phần sẽ tạo nên sự sai khác di truyền lớn giữa hai bố mẹ và như vậy sẽ tăng mức độ ưu thế lai. Về mặt lý thuyết mà nói, nếu một cây hay một dòng được tạo ra bằng lai giữa *indica* và *japonica* mà sức sống cao hơn bố mẹ nó hoặc ngược lại bằng lai giữa *indica/japonica* cũng có thể tạo ra một cây hay một dòng sức sống kém hơn bố mẹ và khả năng cạnh tranh yếu.

Bên cạnh quan điểm về sức cạnh tranh yếu, một số nhà khoa học đã triển khai các nghiên cứu về quy tụ một số gen gây chết chọn lọc vào các dòng mẹ nhằm đảm bảo độ thuần của quần thể cây lai F_1 trong sản xuất lúa lai hai dòng. Năm 2002 tại Hội nghị Lúa lai Quốc tế, Zhang Jiwen, Wu Xiaozhi và Qi Huaxiong Viện nghiên cứu trồng trọt và chọn giống cây trồng, Viện Hàn lâm khoa học Nông nghiệp Vũ Hán - Trung Quốc; Xu Jinbi, Friendwood, Texas Mỹ và các cộng sự đã công bố kết quả lập bản đồ đầu tiên của gen gây chết chọn lọc (Bentazon- *bel* gene) từ dòng bất dục đục đột biến có tên là 8077S định vị trên NST số 3, cách chỉ thị phân tử vi vệ tinh (Microsatellite) RM168 là 7,1cM. Bằng cách sử dụng 91 cây đồng hợp tử nhạy cảm với Bentazon từ quần thể F_2 của tổ hợp lai 8077S/Pei'ai64S. Trên nền di truyền của Pei'ai64S, một dòng TGMS -Pei'ai64S mới có gen *bel* đã được tạo ra sau ba đời lai trở lại liên tục với Pei'ai64S khởi đầu. Dòng Pei'ai64S mới này được sử dụng tạo các tổ hợp lai hai dòng, các cây bất dục đục phát triển do tự thụ của dòng TGMS đã tự bị loại thải toàn bộ trong quần thể cây lai F_1 khi phun Bentazon mà không cần phải khử lẫn.

1.3. Gen tương hợp rộng trong tạo giống lúa lai

Khát khao của các nhà chọn giống lúa lai là nâng cao tiềm năng năng suất và năng suất của các tổ hợp lúa lai. Ý tưởng tạo ra các tổ hợp lai có năng suất siêu cao (trên 15 tấn/hecta) đã trở thành hiện thực tại Trung Quốc và IRRI. Tuy nhiên một trong những yếu tố tiên quyết để tạo ra tổ hợp lai có kiểu hình cây lúa mới (New Plant type) chúng ta không thể không quan tâm đến các gen tương hợp rộng (Wide compatibility gene-WCG).

Nhiều nghiên cứu đã tập trung vào xác định các WCG và quy tụ vào các vật liệu chọn giống bằng các kỹ thuật truyền thống và công nghệ sinh học.

Theo C.H.M. Vijayakuma, M. Ilyas Ahmed, S. Sing và các cộng sự Viện Nghiên cứu lúa, Hyderabad Ấn Độ (2002), các gen tương hợp rộng thường có mặt trong các giống thuộc loài phụ *javanica* nhưng chúng hầu như không mang gen phục hồi hữu dục phấn (*Rf*). Ngược lại các giống thuộc loài phụ *indica* không có gen tương hợp rộng nhưng lại có nguồn tài nguyên di truyền phong phú về khả năng phục hồi phấn. Do vậy một trong những giải pháp hữu hiệu là thực hiện phép lai giữa *indica* với *javanica* để nạp các gen WC tạo ra các dòng thuần mang gen này và sử dụng làm dòng bố trong phát triển các tổ hợp lúa lai hai hay ba dòng giữa các loài phụ khác nhau cho ưu thế lai cao. Từ 210 tổ hợp lai giữa 30 dòng thuần với 7 giống mang gen WC, có 50 trong số 800 dòng chọn ra từ thế hệ F_7 đã được lai thử với các vật liệu thử thuộc loài phụ *indica* và *japonica* để kiểm tra sự biểu hiện của các gen *rf*, *Rf* và WC. Kết quả có 11 dòng mang cả hai gen *Rf* và WC., 4 dòng chỉ mang

gen *Rf*, 19 dòng mang gen *rf* và một dòng mang gen *WC*. Một số tổ hợp lai trong đó sử dụng các dòng mới chọn tạo làm dòng bố đã cho năng suất cao hơn đối chứng (IR64) từ 25-30%. Một số dòng CMS được nạp gen *WC* từ các giống thuộc loài phụ *javanica* là vật liệu quý để phát triển các tổ hợp lai giữa hai loài phụ cao sản.

Trong một nghiên cứu khác của các tác giả trên đã rút ra kết luận nếu một gen *WC S-5"* không thể khắc phục được hiện tượng lép hạt cao trong các phép lai giữa các dòng có khoảng cách di truyền xa nhau. Sử dụng các chỉ thị phân tử SSR/STS để lập bản đồ quần thể với mục đích là giải quyết vấn đề lép hạt cần phải quy tụ một dãy các *WC* gen (*S-5"*, *S-7"*, *S-8"*, *S-9"*, *S-15"*, *S-18"*...)

I.4. Ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống lúa lai

Trong vài thập kỷ qua, các kỹ thuật công nghệ sinh học đã có sự tiến bộ nổi bật, đặc biệt là kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào và chỉ thị phân tử. Công nghệ sinh học đã có đóng góp to lớn trong việc thúc đẩy công tác chọn tạo giống cây trồng, tạo ra nhiều sản phẩm mới đồng thời rút ngắn thời gian chọn tạo giống. Các lĩnh vực được giới thiệu dưới đây là những kỹ thuật then chốt được sử dụng trong chọn tạo giống lúa và lúa lai hai dòng.

I.4.1. Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào trong chọn tạo và nhân giống lúa lai

Trong nghiên cứu và phát triển lúa lai, trở ngại lớn nhất cho việc mở rộng diện tích lúa lai thương mại vào sản xuất là việc sản xuất hạt các dòng bất dục dục và sản xuất hạt lai

F₁. Năng suất của hai loại hạt giống trên thường rất thấp nên giá thành cao. Bằng công nghệ tế bào, người ta đã có thể nhân nhanh các dòng mẹ, góp phần hạ giá thành sản xuất, góp phần đẩy nhanh tốc độ chọn giống và sản xuất lúa lai.

Các công nghệ như nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (meristem culture), nuôi cấy lớp mỏng tế bào (thin cells layer culture), nuôi cấy hoa non (young spikles culture), nuôi cấy bao phấn (anther culture), công nghệ hạt nhân tạo (synthetic seed technique)... đã trở thành các giải pháp rất hữu hiệu trong làm thuần và nhân nhanh các dòng bất dục đực.

Trong công bố gần đây nhất (2002) của giáo sư V. Krishnasamy, Khoa Khoa học và công nghệ hạt giống, Trường đại học Nông nghiệp Tamil Nadu, Ấn Độ về thành công trong sản xuất hạt giống nhân tạo của giống lúa lai CORH₂. Lợi thế của việc sản xuất hạt nhân tạo là không cần đất canh tác, chủ động hoàn toàn về thời vụ và tránh được những khó khăn do thời tiết gây ra. Phôi tổng hợp được bao bọc bởi lớp vỏ nhân tạo trong đó có các thành phần như CaCl₂ và NaOH cùng với nội nhũ nhân tạo có chứa chất dinh dưỡng, các chất điều hoà sinh trưởng và các chất kháng sâu bệnh cần thiết. Quy trình kỹ thuật thúc đẩy tự tách vỏ và nảy mầm của loại hạt nhân tạo cũng đã được xây dựng bằng cách ngâm hạt nhân tạo trong dung dịch KNO₃ trước khi gieo, cho tỷ lệ nảy mầm đạt trên 50%.

1.4.2. Nghiên cứu phát hiện và lập bản đồ gen

Sử dụng chỉ thị di truyền và bản đồ di truyền để phát hiện và lập bản đồ gen, đặc biệt là những gen có ý nghĩa kinh tế cao, bao gồm một số gen chính và cả những *locus*

kiểm soát những tính trạng số lượng (QTL) gây ra bởi sự tương tác của một số gen chính.

Thông thường, để phát hiện và lập bản đồ gen, người ta thường sử dụng các dòng tương đồng gen (near isogenic line-NILs). Tuy vậy, để tạo ra được các dòng NILs đòi hỏi phải có nhiều thời gian và phải tiến hành nhiều phép lai liên tiếp. Chính vì vậy, Michelmores và cộng sự, 1991 đã đưa ra một phương pháp mới cho phép phát hiện và định vị nhanh chóng những gen quan tâm. Đó là phương pháp phân tích thể phân ly theo nhóm (Bulked Segregant Analysis-BSA). Ngoài ra, các dòng nội phối tái tổ hợp (RI) cũng được một số tác giả sử dụng để lập bản đồ gen. Ngày nay, với sự hỗ trợ của các chương trình máy tính, các phương pháp trên đã cho phép lập bản đồ hàng loạt các gen và các *locus* kiểm soát tính trạng số lượng có ý nghĩa trong nông nghiệp. Ví dụ: các gen kháng bệnh đạo ôn, các gen kháng bệnh bạc lá, các gen kháng sâu đục thân, các gen kháng rầy nâu, gen kháng sâu cuốn lá, gen quy định hình thái của cây - gen lùn *sd-1*, các gen quy định đặc điểm sinh lý: gen kiểm soát chu kỳ quang, các QTL quy định khả năng sống sót của cây con, quy định thời gian nở hoa, gen chịu mặn, gen chịu úng, các QTL chịu hạn, những QTL quy định tiềm năng năng suất cũng đã được lập bản đồ. Gần đây, những gen có ý nghĩa quan trọng trong công nghệ sản xuất lúa lai cũng lần lượt được phát hiện và lập bản đồ.

Như vậy, chỉ thị di truyền và bản đồ di truyền có ý nghĩa rất quan trọng trong di truyền chọn giống. Nó cho phép nhà chọn giống hiểu được mối quan hệ giữa: Gen-tính trạng-môi trường, trên cơ sở đó họ có thể đề ra một phương pháp chọn tạo thích hợp.

1.4.2.1. Lập bản đồ thực thể của hệ gen (Physical map)

Bản đồ thực thể của hệ gen là một loại bản đồ cho chúng ta biết được những mốc xác định trên phân tử DNA. Trong bản đồ này, khoảng cách giữa hai chỉ thị di truyền được đo bằng số cặp nucleotit. Đơn vị của nó là số cặp bazơ (bp).

Nếu một NST có thể chia nhỏ thành những mảnh thì người ta có thể lập bản đồ thực thể của hệ gen, mà không cần sự trợ giúp của những tái tổ hợp tự nhiên hoặc những biến dị di truyền. Toàn bộ quá trình đó nhất thiết phải có sự chọn lọc lớn những mẫu dò có khả năng nhận biết những vị trí đặc biệt trên phân tử DNA. Chỉ thị di truyền và bản đồ di truyền phân tử sẽ cung cấp cho chúng ta một bộ mẫu dò và cho phép sắp xếp những mảnh NST thành một trật tự xác định. Trật tự ấy chính là bản đồ thực thể của hệ gen.

Bản đồ thực thể của hệ gen cung cấp cho chúng ta một số lượng không giới hạn các chỉ thị DNA từ bất kỳ vùng NST nào để đánh giá phát hiện gen, tách chiết gen và nghiên cứu di truyền. Nó cũng sẽ cung cấp một bức tranh tổng thể, phục vụ nghiên cứu trong cấu trúc phân tử, tổ chức hệ gen, sự tiến hoá của gen, quá trình điều khiển và tương tác gen. Sự tìm kiếm, tách chiết, xác định và thao tác di truyền của các gen sẽ nhanh chóng hơn nhiều so với trước đây. Bản đồ thực thể của hệ gen sẽ là trung tâm của tất cả các vấn đề về di truyền học, sự thao tác di truyền, khảo sát hệ gen ở mức độ phân tử: phân tích hệ gen, tách chiết gen và cải tiến các giống cây trồng.

Để thiết lập bản đồ thực thể hệ gen ở lúa, người ta đã lập thư viện NST nhân tạo của nấm men-YAC và thư viện

NST nhân tạo của vi khuẩn- BAC. Chỉ thị RFLP được sử dụng để sắp xếp những YAC hoặc BAC thành một trật tự liên kế nhau. Ngày nay, người ta đã sử dụng tới 1200 chỉ thị RFLP để thiết lập bản đồ thực thể ở lúa. Với số lượng chỉ thị như vậy, nó đã phủ được hơn 50% toàn bộ hệ gen của lúa. Đây là cơ hội rất thuận lợi để tách chiết những gen quan tâm và tiến tới giải mã di truyền toàn bộ hệ gen của lúa.

1.4.2.2. Nghiên cứu tách dòng gen

Tổng chiều dài hệ gen thực vật khoảng 10^8 - 10^{10} bp, chúng chứa khoảng 10.000 đến 100.000 gen. Mỗi một gen thực vật có chiều dài khoảng $\approx 10^3$ bp. Chỉ thị phân tử ADN có thể sử dụng để lập bản đồ của những gen đơn hoặc QTLs trên một vị trí NST với độ dài khoảng 1-2% và thậm chí 0.1% tổng chiều dài hệ gen. Do vậy, tìm một gen có độ dài khoảng 10^3 bp trong tổng số 10^8 - 10^{10} bp chiều dài hệ gen bằng kỹ thuật lập bản đồ sẽ có độ tin cậy là 99.9%. Trên cơ sở đó, người ta đã đề xuất kỹ thuật nhân bản gen dựa trên cơ sở lập bản đồ. Quá trình này được coi như là quá trình di truyền ngược và nó dựa trên cơ sở liên kết vật lý giữa gen cần tách với các chỉ thị phân tử. Nó bao gồm các bước sau:

Bước 1: Sử dụng chỉ thị phân tử để lập một bản đồ chi tiết của gen đang quan tâm sao cho có được 2 chỉ thị nằm ở 2 phía và càng gần gen cần tách càng tốt. Khoảng cách thực giữa gen và chỉ thị được xác định bằng kỹ thuật điện di trên gel có điện trường gián đoạn.

Bước 2: Sử dụng hai chỉ thị liên kết chặt với gen đã được phát hiện ở bước một làm mẫu dò để tìm những mảnh DNA có chứa gen quan tâm hoặc chứa những trình tự tương đồng với gen quan tâm trong các thư viện YAC, BAC.

Bước 3: Biến nạp mảnh DNA có chứa gen cần tìm vào một cơ thể nào đó để kiểm tra sự có mặt của gen này.

Bằng phương pháp tách gen nói trên, người ta đã tách thành công hàng loạt các gen ở cây mô hình *Arabidopsis*, ở cà chua. Đặc biệt Keven và cộng sự, 1996 đã sử dụng phương pháp tách gen dựa trên cơ sở bản đồ để tách thành công các QTL kiểm soát tính trạng khối lượng quả ở cà chua. Đây là trường hợp đầu tiên một QTL ở thực vật đã được tách chiết. Lần đầu tiên ở lúa, cũng bằng phương pháp nói trên, người ta đã tách thành công gen *Xa-21* là một gen kháng bệnh bạc lá và tiếp sau đó là gen *Xa-1* và gen *Pi-b*.

Ngày nay, một phương pháp tách gen hoàn toàn mới đã được đề xuất. Phương pháp này dựa trên cơ sở bản đồ thực thể của hệ gen. Nó cho phép tách chiết nhanh chóng gen quan tâm hơn bất kỳ phương pháp tách gen nào khác. Đó là phương pháp “gene golfing”.

1.4.3. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử

Trong chọn tạo giống, để tạo vật liệu khởi đầu mới, các nhà chọn giống truyền thống phải đánh giá vật liệu khởi đầu thông qua các chỉ thị hình thái, đánh giá khả năng kết hợp chung, riêng, lai thử hàng loạt các cặp lai, đánh giá ưu thế lai, chọn lọc phả hệ trong phân ly ở các đời sau, đánh giá UTL F_1 trên đồng ruộng để tìm ra cặp lai tốt nhất, hoặc thực hiện backcross để quy tụ một gen nào đó vào một giống đã xác định. Cách làm này đòi hỏi nhiều thời gian, công sức.

Bằng kỹ thuật phân tích đa hình DNA, người ta xác định được khoảng cách di truyền (genetic distance) để chọn

tổ hợp cho ưu thế lai cao. Kết quả này còn chỉ ra hạn chế của thuyết siêu trội là nếu chỉ ở mức trội lặn thì không thể lý giải nổi tại sao lai giữa các cặp bố mẹ quá xa về di truyền ở mức phân tử, con lai F_1 lại có tỷ lệ lép hạt rất cao. Arli, Shenoy và Sharma (1996) đã công bố kết quả phân tích xác định đặc tính di truyền của hai dòng bất dục đực kiểu CMS (IR58025A và IR62829A) bằng phản ứng chuỗi PCR (Polymerase chain reaction) và kỹ thuật RAPD với 20 mẫu dò (primer) có ký hiệu là OPA-7, OPA-12, OPA-20, OPB-19, OPU-17 và OPW-4... Sử dụng kỹ thuật RAPD tương đối đơn giản, nhanh và cho kết quả khá chính xác về sự sai khác di truyền giữa các dòng bố mẹ để lai tạo ra những tổ hợp mới.

O.U.K. Reddy, E.A. Siddig và cộng sự đã lập bản đồ phân tử của 65 con lai trong đó 31 là con lai *indica/indica*, 34 là *indica/japonica* (WC) con lai giữa 24 dòng TGMS và nhiều dòng thuần khác. Đã sử dụng 10 mẫu dò có tên là OPD-3, OPU-7, OPU-14, OPZ-18, OPZ-19, OPZ-20, OPA-7+OPA-6 và OPA-12+OPA-15. Đã thiết lập đồ thị hình cây (Dendrogram) về khoảng cách di truyền giữa các bố mẹ. Kết quả phân tích cho thấy khoảng cách giữa các bố mẹ lớn hơn 0,7 thì độ hữu dục thấp và năng suất giảm. Sự sai khác nằm trong khoảng 0,4-0,7 thì khả năng kết hợp cao và ưu thế lai cao.

Lì Rongbai và Yang Xinqing, Viện Hàn lâm khoa học Nông nghiệp Nam Ninh, Quảng Tây, Trung Quốc (2002), đã dùng kỹ thuật RAPD trong chọn tạo giống lúa lai hai dòng. Các tác giả đã sử dụng 15 chỉ thị RAPD để nghiên cứu dấu vết (fingerprinting) của 4 dòng TGMS và 15 dòng cho phấn, các dòng bất dục đực đã lai với các dòng cho

phân và đánh giá ưu thế lai F_1 trên đồng ruộng. Mười trong 15 chỉ thị RAPD biểu hiện tính đa hình rất cao trong nghiên cứu dấu vết. Khoảng cách di truyền từ 0.22 đến 0.75 có liên kết chặt chẽ và tương quan chặt đến ưu thế lai về năng suất F_1 . Nếu khoảng cách di truyền giữa các dòng bố mẹ vượt 0.75 thì hệ số tương quan với năng suất không chặt. Các tổ hợp có khoảng cách di truyền là 0.72 đều cho ưu thế lai chuẩn là 28.5%.

* Chỉ thị di truyền và bản đồ di truyền cho phép nhà chọn giống thấy rõ mối quan hệ: “Tính trạng-Gen(QTLs)-Môi trường”. Do vậy, họ sẽ dễ dàng đưa ra một chiến lược thích hợp và chuẩn xác trong chương trình chọn giống của mình nhằm tìm kiếm, phát hiện những biến dị di truyền trong số các cá thể, giữa các giống trong loài.

* Chỉ thị di truyền giúp các nhà chọn giống chọn lọc chính xác các tổ hợp gen quan tâm. Họ có thể quy tụ một số gen quý vào một giống đã xác định (MAS).

Cả ba lĩnh vực trên, chỉ thị di truyền và bản đồ di truyền đều có khả năng hỗ trợ một cách đặc lực. Những chỉ thị di truyền liên kết chặt với những gen sẽ được sử dụng để chọn lọc các cá thể ngay ở giai đoạn rất sớm mà không phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Quá trình này gọi là quá trình chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử (MAS) hay còn gọi là chọn giống phân tử. Nhờ kỹ thuật MAS mà nhà chọn giống có thể thực hiện chọn lọc một số tính trạng trong thời gian ngắn mà chọn giống cổ điển không thể làm được. Ví dụ: chọn giống kháng bệnh, giống có những đặc điểm sinh lý khác nhau và giống chất lượng. MAS có thể phát hiện sự khác biệt giữa những cây đồng hợp tử (AA) và những cây dị hợp tử (Aa) mà về mặt kiểu hình là hoàn toàn giống nhau.

có khả năng chọn lọc được nhiều tính trạng trong cùng một thời gian của cùng một cây và như vậy cho phép tích gộp các gen khác nhau vào một cây cần tạo (gene pyramiding). Hơn nữa, MAS không những cho các nhà chọn giống chọn lọc những tính trạng đơn gen mà cả với những tính trạng đa gen.

Trong quá trình chọn giống theo phương pháp lai trở lại, MAS sẽ giúp cho quá trình đưa những gen hoặc QTL quan tâm vào các giống có cấu trúc hệ gen khác nhau một cách nhanh chóng. Bởi lẽ, nó cho phép tối ưu hoá số cây cần chọn, số lần cần lai trở lại, loại bỏ các “rác rưởi” không liên quan đến những gen hoặc QTL cần chuyển. Nó cho phép tìm được những tổ hợp (cây) với lượng nhỏ nhất nguồn DNA gần kề gen hoặc QTL quan tâm. Quá trình này đã được sử dụng trong việc chuyển những gen có ý nghĩa nông học quan trọng từ nguồn gen hoang dại vào các giống cây trồng. Ví dụ gen *Tm-2a* ở cà chua dại (*Lycopersicum peruvianum*) được đưa vào giống cà chua đang được trồng phổ biến (*Lycopersicum esculentum* Mill.).

Ở lúa, MAS đã được tiến hành với gen kháng bệnh bạc lá, đạo ôn và ruồi đục thân. Như chúng ta đã biết, tính trạng kháng bạc lá, kháng đạo ôn và ruồi đục thân ở lúa được kiểm soát bởi các gen kháng khác nhau theo quy luật đơn gen. Hiện nay, ít nhất có 19 gen kháng bệnh bạc lá, 30 gen kháng bệnh đạo ôn đã được phát hiện ở lúa. Mỗi một gen chỉ có khả năng kháng 1 đến 2 chủng nào đó trong một vùng nhất định. Do vậy, tác giả Huang và cộng sự, 1997 đã sử dụng MAS để tạo ra một dòng lúa mang bốn gen kháng bạc lá (*Xa-4*, *Xa-5*, *Xa-13*, *Xa-21*). Dòng lúa này có khả năng kháng hầu hết các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá.

mức độ kháng cao hơn hẳn khi các giống lúa chỉ mang một trong số bốn gen kháng trước đây. Bằng con đường MAS, người ta cũng chuyển và quy tụ thành công ba gen kháng bệnh đạo ôn: *Pi-1*, *Pi-z⁵* và *Pi-ta* từ ba giống khác nhau vào một dòng lúa mới. Dòng lúa mới chứa ba gen kháng này có khả năng kháng bệnh đạo ôn cao hơn rất nhiều so với ba giống gốc ban đầu. Ngoài ra ở lúa, các gen kháng ruồi đục thân *Gm2*, *Gm4t* cũng được đưa vào các dòng lúa có tiềm năng năng suất cao bằng con đường MAS. Trong chiến lược phát triển lúa lai, Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI) đã sử dụng kết quả nghiên cứu phát hiện và lập bản đồ gen *tms(1)-3* của các tác giả Subudhi, 1997 để thiết kế một loại chỉ thị phân tử dựa trên cơ sở PCR nhằm phục vụ cho việc chọn tạo các dòng TGMS mới bằng con đường MAS.

Trên đây là một số bằng chứng, chứng minh vai trò của bản đồ di truyền và chỉ thị di truyền trong công tác chọn tạo giống mới mà cho tới nay không có kỹ thuật biến nạp gen nào đạt được. Chọn giống dưới sự trợ giúp của chỉ thị phân tử là một hướng nghiên cứu đầy triển vọng. Nó như một nhịp cầu gắn kết giữa công nghệ sinh học với phương pháp chọn giống cổ điển. Nó đã trở thành một hợp phần phổ biến của các quá trình lai trở lại. Quá trình lập bản đồ cũng như quá trình chọn lọc các tính trạng đơn gen hoặc đa gen có giá trị cao về mặt di truyền và kinh tế. Các kỹ thuật chỉ thị phân tử được sử dụng để trợ giúp và bảo đảm sự chính xác cho các nhà chọn tạo giống nhận diện đúng và thiết lập được ranh giới bản quyền của những loài mới được phát hiện.

1.4.4. Chỉ thị phân tử và ứng dụng trong chọn tạo giống lúa lai

Chỉ thị phân tử được phát minh và sử dụng từ những năm 1980, là một kỹ thuật quan trọng được ứng dụng trong nghiên cứu di truyền và chọn tạo giống thực vật. những thành quả gần đây nhờ phát triển kỹ thuật vi vệ tinh (microsatellites) và trình tự số liệu phân tích thu được từ phân tích trình tự genôm đã cung cấp một số lượng lớn không có giới hạn chỉ thị PCR trên hệ gen của lúa như SSRs (Single sequence repeated), SNPs (Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)... sẽ thúc đẩy tốc độ của chọn tạo giống lúa. Đối với lúa lai, chỉ thị phân tử có ba ứng dụng lớn: xác định các tính trạng cụ thể và bảo vệ nguồn tài nguyên di truyền của các dòng bố mẹ; lập bản đồ genôm và trợ giúp của chỉ thị phân tử trong công tác chọn giống (MAS - Marker assisted selection).

Các chỉ thị phân tử liên kết chặt với các tính trạng kiểu hình đã được sử dụng để xác định các đặc trưng của các dòng bố mẹ trong nghiên cứu lúa lai và để xác định tiềm năng ưu thế lai ; Chỉ thị phân tử đã được sử dụng để lập bản đồ một số gen quan trọng và định vị một số tính trạng số lượng QTLs (Quantitative trait loci) thông qua liên kết di truyền. Một số gen vô cùng quan trọng đối với nghiên cứu và phát triển lúa lai như gen kiểm soát tính trạng phục hồi hữu dục; gen tương hợp rộng; gen kiểm soát tính trạng bất dục dục nhạy cảm với nhiệt độ, tính trạng bất dục dục nhạy cảm với độ dài chiếu sáng... đã được đánh dấu phân tử. Ngoài ra nhiều nghiên cứu đã triển khai để lập bản đồ các QTL có ảnh hưởng tổng hợp đến các tính trạng hình thái như là bất dục dục ở con lai, tỷ lệ thụ phấn chéo và ưu thế lai ở lúa đồng thời tăng thêm hiểu biết của chúng ta về cơ

sơ di truyền của các tính trạng tổng hợp nêu trên. Nhờ kỹ thuật MAS chúng ta đã thu được nhiều kết quả trên lĩnh vực cải tiến tính trạng kháng vi khuẩn và chất lượng hạt trong một số giống lai quan trọng nhất.

Li Chengquan và cộng sự. Viện Nghiên cứu lúa thuộc Viện Hàn lâm khoa học Nông nghiệp An Hội, Trung Quốc, đã sử dụng kỹ thuật MAS để quy tụ gen *Xa21* vào dòng PGMS 3418S. Dòng bất dục này rất ổn định và có khả năng kháng bệnh bạc lá vi khuẩn tương đương giống IRBB21.

Ngoài ra MAS đã trở thành kỹ thuật thông dụng trong quy trình chọn tạo các dòng phục hồi tại IRRI.

Các tác giả Wan Bingliang, Yang Guacai, Qi Huaxiong, Trung tâm nghiên cứu và phát triển lúa lai, Viện Hàn lâm khoa học Hồ Bắc và Cheng Hongmei, Viện Nghiên cứu công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học Trung Quốc và Mou Tongmin, Trường tổng hợp Huazhong, Vũ Hán - Trung Quốc (2002) đã chuyển thành công gen kháng bệnh khô vằn (*Rhizoctonia solani*) vào giống lúa thuần 905, dòng bố của tổ hợp lai hai dòng.

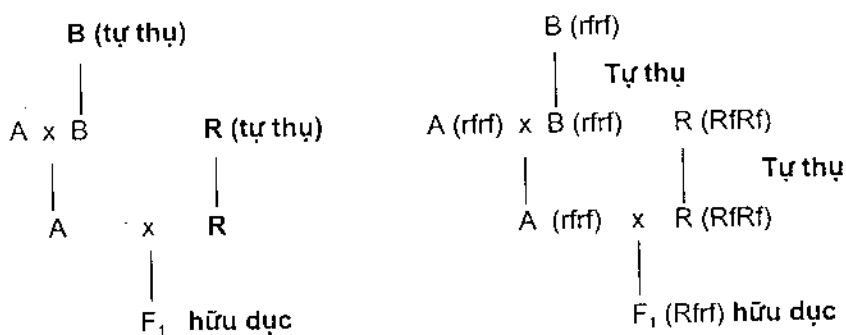
II. ƯU VIỆT CỦA HỆ THỐNG LAI HAI DÒNG

II.1. Lúa lai hệ ba dòng

Trong vấn đề khai thác ưu thế lai ở lúa, ưu thế lai hệ ba dòng được phát hiện và sử dụng sớm nhất trong lịch sử nghiên cứu và phát triển lúa lai.

Để khai thác ưu thế lai hệ ba dòng, người ta phải sử dụng dòng CMS làm dòng mẹ, dòng B để duy trì và sản xuất dòng CMS và dòng R là dòng cho phần để sản xuất hạt

lai F_1 . Trong hệ thống sản xuất hạt lai kiểu này, cùng một lúc phải duy trì 3 dòng A, B và R và phải tiến hành thụ phấn chéo hai lần (sản xuất hạt dòng CMS và sản xuất hạt lai) do vậy hệ thống lai ba dòng là công kênh và tốn kém. Một khác giữa các dòng bất dục CMS sự sai khác về mặt di truyền không lớn do nguồn gốc hình thành, chúng ít đa dạng về mặt di truyền nên khả năng chống chịu kém. Đối với các dòng CMS, rất ít dòng hoặc giống lúa thuần có khả năng phục hồi hoàn toàn, vì vậy tốn rất nhiều thời gian để lai thử và tìm các dòng phục hồi phân thích hợp cho mỗi dòng CMS (hình 7).



Hình 7: Mối quan hệ kiểu hình và kiểu gen giữa các dòng A, B và R trong hệ thống lúa lai ba dòng khi nhân dòng CMS và sản xuất hạt lai F_1 .

II.2. Trình sinh (apomixis) và lúa lai một dòng

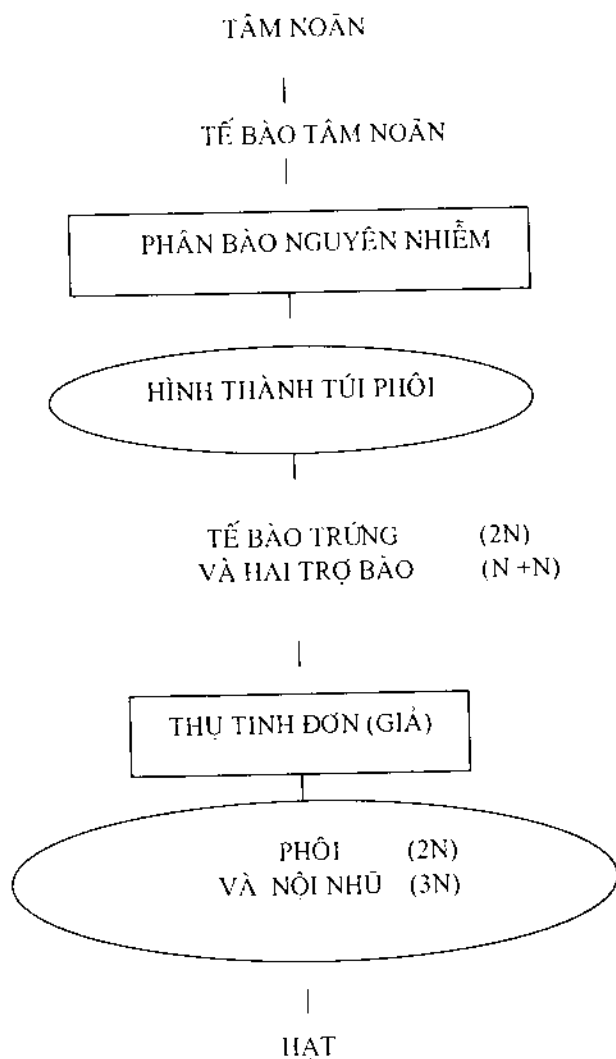
Apomixis là hiện tượng hình thành hạt ở thực vật không qua thụ tinh do vậy còn được gọi là thụ tinh giả. Trong một số trường hợp khác là do sự dung hợp giữa tế bào trứng không qua giảm nhiễm với một nhân không qua giảm

nhằm. Do vậy để hình thành phôi và sự thụ phấn cần thiết phải có sự kích thích của các nhân tố di truyền. Hiện tượng apomixis rất phổ biến ở thực vật có hoa. Trong bất kỳ một họ (family) thực vật nào ít nhất dạng sinh sản vô phôi cũng được tìm thấy ở một số chi (genera) hoặc loài (species) (hình 8). Thường thì apomixis là hiện tượng ngẫu nhiên và phụ thuộc vào từng điều kiện di truyền và môi trường sống nhất định, song trong một số trường hợp người ta lại thấy apomixis xuất hiện không phải là ngẫu nhiên. Loại sau này tồn tại trong một thời gian ngắn và nó bị loại thải trong quá trình tiến hoá của loài.

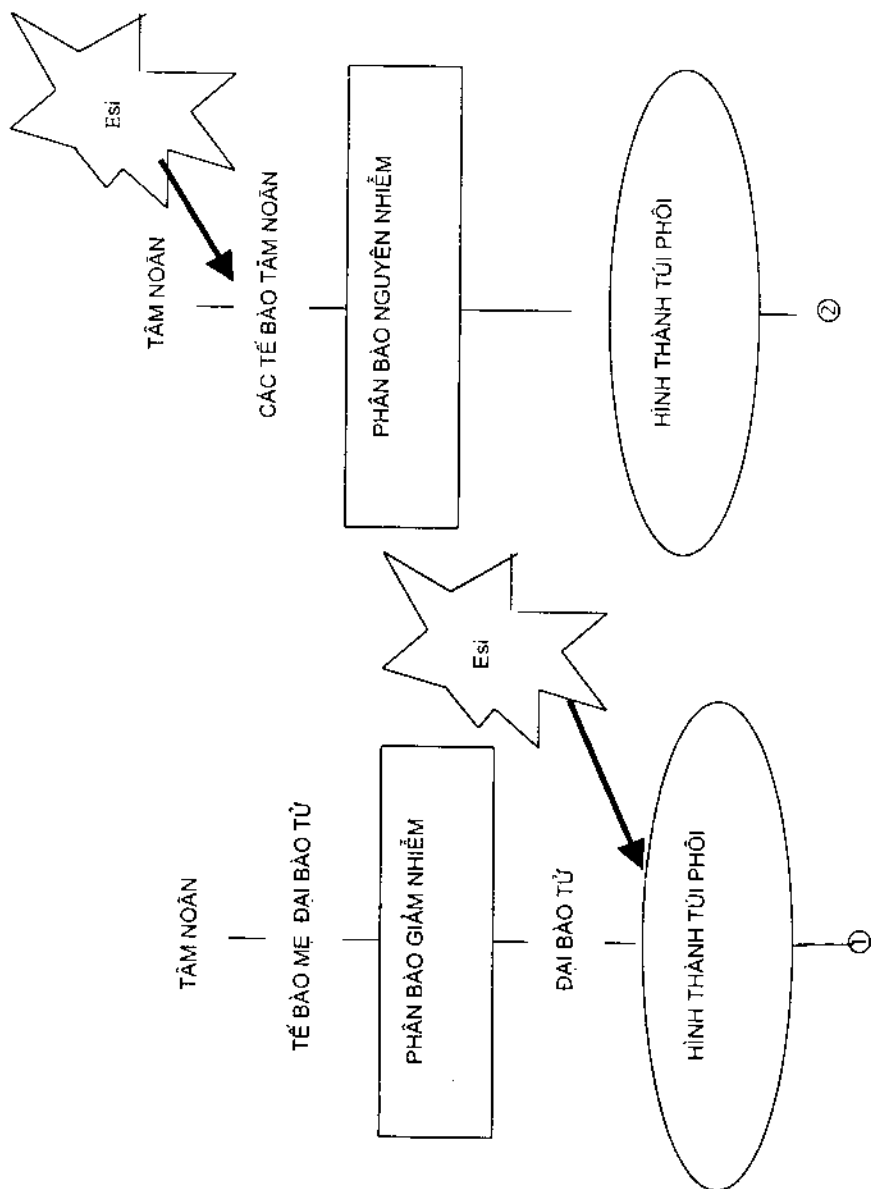
Bằng kỹ thuật di truyền và đột biến có thể tạo apomixis một cách hữu hiệu ở lúa.

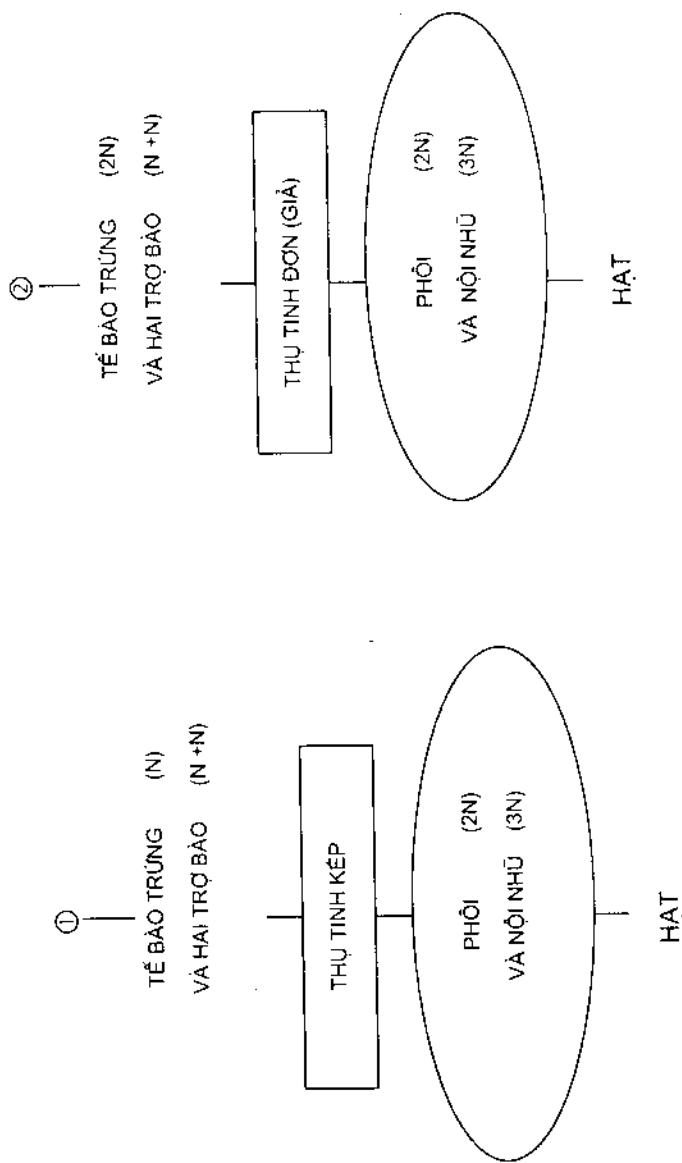
Theo Jim Peacock, phòng Công nghiệp thực vật, CSIRO Canberra, Australia có thể lai để chuyển gen kiểm soát tính trạng vô phôi hoặc xử lý đột biến để tạo thể vô phôi (hình 9 và 10). Các tác giả cho rằng, những tín hiệu đầu tiên của quá trình hình thành túi phôi bình thường được phát đi từ sau khi phân bào giảm nhiễm để hình thành bào tử và gọi chúng là gen kiểm soát tính trạng tạo túi phôi (embryo sac induction – Esi). Trong trường hợp apomixis, các tín hiệu này đóng vai trò tiền xúc tác cho hoạt động của các gen ở trong một hoặc vài tế bào tâm noãn tạo ra túi phôi mà không qua phân bào giảm nhiễm.

Một trong những cơ chế tạo apomixis là hiện tượng hình thành giao tử giả (apospory). Các tác giả trên đã tiến hành lai giữa các dạng apomixis tự nhiên với các dòng sinh sản hữu tính trong họ một lá mầm (*Gramineae*) và họ hai lá mầm (*Ranunculaceae*). Tổ hợp lai là đa bội thể, tuy nhiên



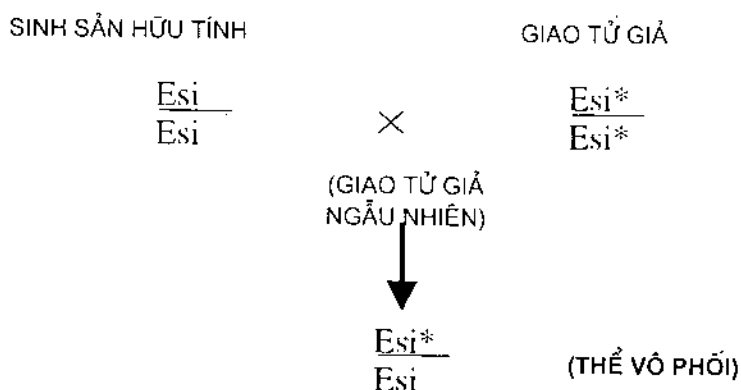
Hình 8: Quá trình tạo hạt do sinh sản vô phôi





Hình 9: Sự biểu hiện sớm của gen kiểm soát tinh trạng tạo túi phôi vô phôi.
Ghi chú: Esi – Gen kiểm soát tinh trạng tạo túi phôi

trong tất cả các phép lai, kiểu hình apomixis đều di truyền theo tính trội và biểu hiện do một hoặc vài gen ở trên các *locus* kiểm soát (hình 10).



Hình 10: Mô hình gen trội kiểm soát tính trạng giao tử giả

Những phát hiện và những kết quả nghiên cứu về hiện tượng thụ tinh giả đã đưa đến ý tưởng khai thác ưu thế lai hệ một dòng. Ngoài việc sản xuất hạt thông qua Apomixis, người ta còn có thể thực hiện thông qua các dạng vô tính khác (asexual).

Theo J. Bennett và cộng sự (IRRI), A. Chaudhury (Phòng Công nghiệp cây trồng CSIRO, Canberra, Australia) 2002, thì hiện tượng apomixis (sinh sản vô phôi-hay thụ tinh giả) đã tìm thấy trong 300 loài thực vật như Ngô, Lúa mì, Cao lương, Kê... nhưng không thấy ở lúa và họ hàng thân thuộc của lúa. Cơ chế tạo ra apomixis đã được xác định đó là sự tạo thành giao tử lưỡng bội, giao tử giả và phôi bất định. Các tác giả cũng cho rằng cơ sở tế bào của sự

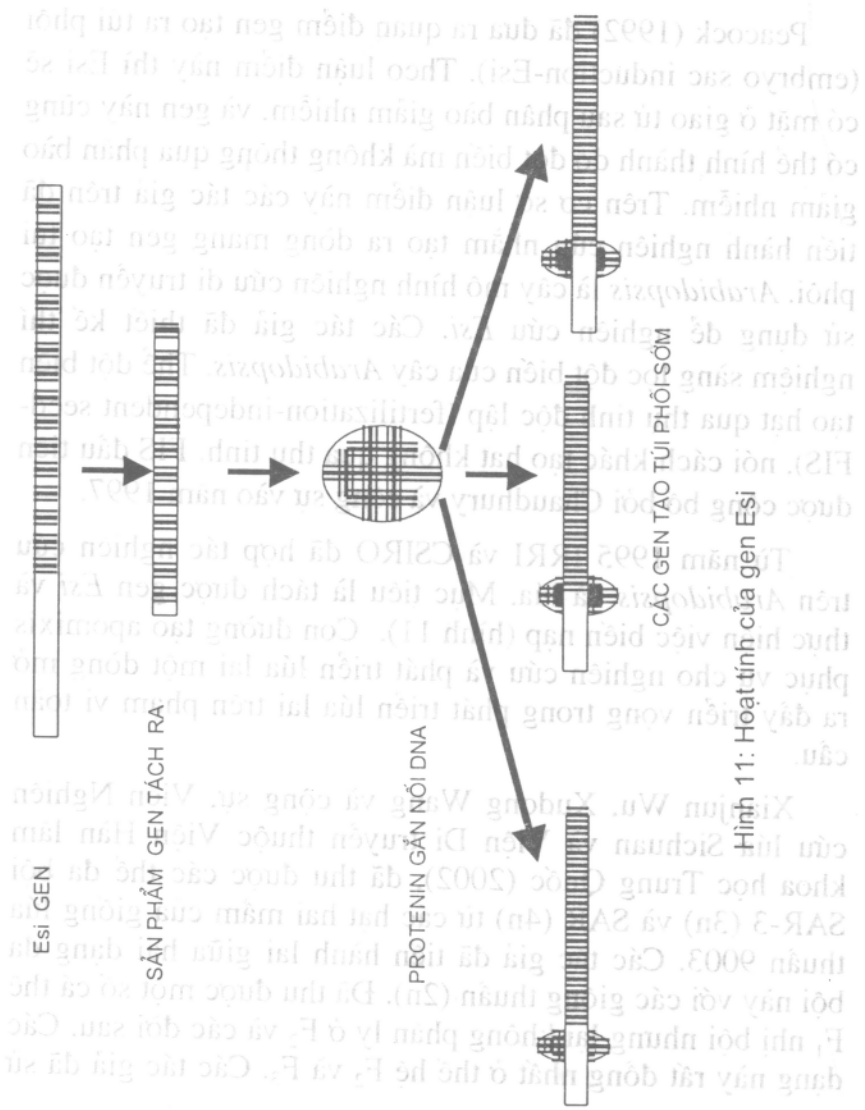
hình thành các loại giao tử nói trên là do quá trình phân bào giảm nhiễm không bình thường.

Peacock (1992) đã đưa ra quan điểm gen tạo ra túi phôi (embryo sac induction-Esi). Theo luận điểm này thì Esi sẽ có mặt ở giao tử sau phân bào giảm nhiễm, và gen này cũng có thể hình thành do đột biến mà không thông qua phân bào giảm nhiễm. Trên cơ sở luận điểm này các tác giả trên đã tiến hành nghiên cứu nhằm tạo ra dòng mang gen tạo túi phôi. *Arabidopsis* là cây mô hình nghiên cứu di truyền được sử dụng để nghiên cứu Esi. Các tác giả đã thiết kế thí nghiệm sàng lọc đột biến của cây *Arabidopsis*. Thể đột biến tạo hạt qua thụ tinh độc lập (fertilization-independent seed-FIS), nói cách khác tạo hạt không qua thụ tinh. FIS đầu tiên được công bố bởi Chaudhury và cộng sự vào năm 1997.

Từ năm 1995 IRRI và CSIRO đã hợp tác nghiên cứu trên *Arabidopsis* và lúa. Mục tiêu là tách được gen Esi và thực hiện việc biến nạp (hình 11). Con đường tạo apomixis phục vụ cho nghiên cứu và phát triển lúa lai một dòng mở ra đầy triển vọng trong phát triển lúa lai trên phạm vi toàn cầu.

Xianjun Wu, Xudong Wang và cộng sự, Viện Nghiên cứu lúa Sichuan và Viện Di truyền thuộc Viện Hàn lâm khoa học Trung Quốc (2002), đã thu được các thể đa bội SAR-3 (3n) và SAR (4n) từ các hạt hai mầm của giống lúa thuần 9003. Các tác giả đã tiến hành lai giữa hai dạng đa bội này với các giống thuần (2n). Đã thu được một số cá thể F_1 nhị bội nhưng lại không phân ly ở F_2 và các đời sau. Các dạng này rất đồng nhất ở thế hệ F_2 và F_3 . Các tác giả đã sử

hình thành các loại giao tử mới trên là do quá trình phân bào giảm nhiễm không bình thường.



Hình 11: Hoạt tính của gen Esi

dụng kỹ thuật phân tử SSR để phân tích quần thể thu được từ giống 9003. Kết quả cho thấy quần thể các cá thể ổn định ngay từ F_2 là đồng hợp tử và di truyền từ các dòng bố mẹ. Các đồng hợp tử thu được ngay từ thế hệ F_1 . Trên cơ sở của kết quả nêu trên, các tác giả đã xây dựng quy trình cho

Esi* GEN



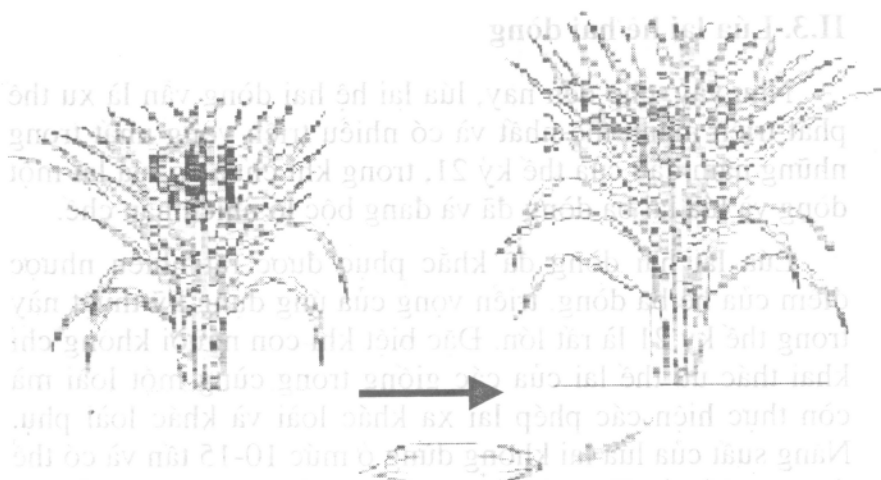
BIẾN NẠP

CÂY LÚA CHUYỂN GEN APOMIXIS

Esi*



BIẾN NẠP



Hình 12: Mô hình lý tưởng biến nạp gen Esi

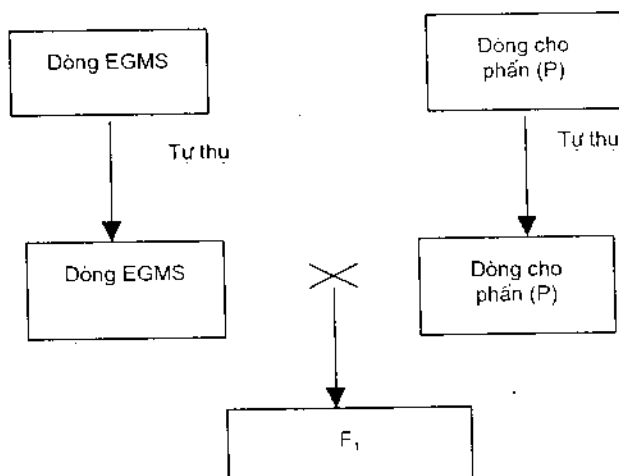
chọn tạo giống lai cố định ưu thế lai sớm. Đã có hai giống được công nhận ở Sichuan và ba giống khác đang tham gia thử nghiệm sinh thái. Kết quả bước đầu này là những tín hiệu rất đáng mừng cho nghiên cứu và phát triển lúa lai một dòng. Tuy nhiên để phát triển thành công loại lúa lai này vẫn còn phải tiếp tục nghiên cứu, tìm kiếm. Nếu chúng ta có được apomixis để tạo lúa lai một dòng thì quy trình sản xuất hạt lai, duy trì ưu thế lai rất đơn giản và không có gì sai khác đối với việc nhân giống lúa thuần. Như vậy người nông dân không phải mua hạt lai từ người sản xuất mà họ tự để giống cho mình như giữ giống các giống lúa thuần khác.

Nhiều nhà khoa học trong lĩnh vực kỹ thuật di truyền có ý tưởng chuyển gen Apomixis từ các cây trồng khác hoặc cỏ vào lúa (hình 12). Tuy nhiên chúng ta cần phải kiên trì và chờ đợi thành công trong thế kỷ 21 này.

II.3. Lúa lai hệ hai dòng

Như vậy, cho đến nay, lúa lai hệ hai dòng vẫn là xu thế phát triển mạnh mẽ nhất và có nhiều triển vọng nhất trong những năm đầu của thế kỷ 21, trong khi chưa có lúa lai một dòng và lúa lai ba dòng đã và đang bộc lộ nhiều hạn chế.

Lúa lai hai dòng đã khắc phục được rất nhiều nhược điểm của hệ ba dòng, triển vọng của ứng dụng kỹ thuật này trong thế kỷ 21 là rất lớn. Đặc biệt khi con người không chỉ khai thác ưu thế lai của các giống trong cùng một loài mà còn thực hiện các phép lai xa khác loài và khác loài phụ. Năng suất của lúa lai không dừng ở mức 10-15 tấn và có thể đạt trên 15 tấn. Tuy nhiên công nghệ sản xuất hạt F_1 vẫn rất phức tạp và phụ thuộc rất lớn và yếu tố thời tiết.



Hình 13: Sơ đồ sản xuất hạt F_1 lúa lai hệ hai dòng

Để khai thác ưu thế lai hệ hai dòng, các nhà khoa học đã tìm kiếm sáng tạo các dạng bất dục đực nhạy cảm với điều kiện môi trường (EGMS). Hai loại vật liệu chính được sử dụng trong hệ thống này là các dòng TGMS và PGMS.

- Trong hệ thống hai dòng chỉ cần chọn lọc và duy trì hai loại dòng: một là dòng TGMS hoặc PGMS, hai là dòng cho phấn (dòng bố trong sản xuất hạt lai). Thực chất là không cần đến gen duy trì bất dục cũng như dòng B. Trong khi chọn dòng cho phấn cũng không cần quan tâm đến gen phục hồi hữu dục (hình 13). Muốn sản xuất hạt của các dòng mẹ chỉ cần điều chỉnh thời vụ gieo cấy để cho chúng trải qua giai đoạn phân bào giảm nhiễm vào lúc có thời gian chiếu sáng ngày ngắn (với dòng PGMS) và nhiệt độ dưới 24°C (với dòng TGMS) là có thể thu hạt tự thụ.

- Cơ hội chọn các dòng bố lớn hơn nhiều so với hệ ba dòng.

- Tính trạng bất dục đực mẫn cảm với điều kiện môi trường (EGMS) chủ yếu do một cặp gen lặn điều khiển, do vậy chúng dễ dàng được chuyển vào các giống có nền di truyền tốt hơn bằng cách lai hữu tính và chọn lọc qua các thế hệ phân ly đời sau.

- Không có hiệu ứng đồng tế bào chất nên ít bị nhiễm sâu bệnh hơn hệ ba dòng. Năng suất bình quân của hệ hai dòng cao hơn lúa lai hệ ba dòng từ 5 đến 10%.

- Chất lượng gạo của lúa lai hệ hai dòng dễ được cải thiện hơn lúa lai hệ ba dòng, vì cơ hội lựa chọn dòng bố rất lớn.

Theo hình 13, thì hệ thống lúa lai hai dòng đơn giản hơn nhiều so với lúa lai ba dòng trong sản xuất hạt lai và nhân dòng bất dục. Do vậy giá thành sản xuất hạt lai sẽ thấp hơn và hiệu quả kinh tế của lúa lai thương mại cũng cao hơn.

III. KẾT QUẢ CHỌN TẠO LÚA LAI HAI DÒNG

III.1. Thành tựu lúa lai hai dòng trên thế giới

Kỹ thuật lúa lai đã thành công tại Trung Quốc 25 năm trước đây, từ đó đến nay diện tích gieo cấy lúa lai đã đạt 50% tổng diện tích lúa tại nước này. Kỹ thuật lúa lai đã ứng dụng tại hơn 20 nước khác nhau trên phạm vi toàn cầu (bảng 1). Hàng năm khoảng 700.000 hecta được gieo cấy lúa lai tại Việt Nam, Ấn Độ, Philippin, Bangladesh, Myanmar và Mỹ. Kỹ thuật lúa lai đã góp phần làm tăng

năng suất và thu nhập của người nông dân, tạo thêm công ăn việc làm cho nông dân thông qua sản xuất hạt giống lúa lai. Lúa lai đã góp phần bảo đảm an ninh lương thực và bảo vệ môi trường tại Trung Quốc và hy vọng cũng mang lại lợi ích tương tự cho các quốc gia khác ngoài Trung Quốc.

Năng suất lúa lai tại Trung Quốc đạt bình quân 6,9 tấn/ha vượt năng suất lúa thuần 1,5 tấn/ha. Tính đến năm 2001, diện tích lúa lai hai dòng tại Trung Quốc đạt 2,5 triệu ha và năng suất cao hơn lúa lai ba dòng 5-10%. Diện tích sản xuất hạt giống lúa lai hai dòng là 115.000 hecta với năng suất hạt lai F_1 bình quân đạt 2,7 tấn/hecta. Thông qua chương trình cải tiến các tính trạng hình thái và khai thác ưu thế lai giữa hai loài phụ (*indica/japonica*), năm 2000 đã nhận được một số giống lai siêu năng suất (10,5 tấn/hecta trên diện tích 67 ha và đạt 9,2 tấn/ha trên diện tích 1,2 triệu hecta). Mục tiêu của Trung Quốc là đưa năng suất lên 12 tấn/hecta trên diện rộng vào năm 2005 với các giống lúa lai hai dòng thuộc loài phụ *japonica* cho vùng Yangtze. Thành công mới trong thời gian gần đây (2000-2002) đã tạo ra các tổ hợp lai hai dòng năng suất siêu cao, trong phạm vi thí nghiệm đã đạt 12-14 tấn/ha.

Bằng con đường khai thác ưu thế lai hệ hai dòng, đã chọn tạo ra các giống lai chín sớm (thời gian sinh trưởng 105-110 ngày), ưu thế lai cao và có chất lượng gạo tốt hơn. Các giống lai hai dòng này đã được gieo cấy cho vụ xuân tại vùng trồng lúa chính của Trung Quốc (Thung lũng Yangtze). Tại vùng này, trước đây do không có các giống lai phù hợp nên diện tích lúa lai chỉ chiếm 10% trên tổng diện tích lúa vụ xuân là 4,5 triệu ha. Các giống lai mới đã chiếm 15% diện tích nói trên trong năm 2001.

Chỉ riêng với dòng TGMS Peiai64S (PA64S) là dòng TGMS đầu tiên đưa vào sản xuất lúa lai hai dòng thương phẩm tại Trung Quốc. Dòng PA64S đã được nhận giải thưởng khoa học kỹ thuật cao nhất tại quốc gia này trong năm 2001. PA64S là tái tổ hợp gen bất dục đực nhạy cảm với độ dài chiếu sáng (PGMS) từ dòng bất dục đực Nongken58S thuộc loài phụ *japonica* với gen tương hợp rộng (WC) của giống lúa *Indica* Peiai64 (PA64). Từ Peiai64S cho phép tạo giống lúa lai siêu năng suất nhờ lai giữa hai loài phụ. Sự chuyển đổi bất dục đực và hữu dục đực của PA64S do tác động của nhiệt độ thấp (LCT-low critical temperature), như vậy đảm bảo độ thuần của hạt lai F_1 khi sản xuất trong điều kiện nhiệt độ cao. Các tổ hợp lai có PA64S tham gia cho kiểu hình cây lúa mới: có năng suất sinh học cao và hệ số kinh tế cao. Để nhân dòng PA64S, người ta đã sử dụng kỹ thuật tưới nước mát để duy trì nhiệt độ chuyển hoá hữu dục phù hợp cho PA64S để ổn định năng suất sản lượng hạt tự thụ của PA64S.

Kết quả nghiên cứu của Xiao Guoying, Yuan Long Ping và các cộng sự tại Viện Nghiên cứu và phát triển lúa lai quốc gia, Changsha, Trung Quốc. Các tác giả đã giới thiệu các tính trạng nông học và ưu thế lai của các giống thuộc loài phụ *javanica* và các giống lai giữa *indica* với *javanica*. Các giống thuộc loài phụ *javanica* có bông dài, hạt bầu, đẻ nhánh yếu, thời gian sinh trưởng dài và có chiều cao cây cao hơn khi gieo cấy tại Changsha. Các con lai giữa Peiai 64S có ưu thế lai dương về chiều cao cây, chiều dài bông, số bông trên khóm, số hoa trên cây, số hạt trên cây, năng suất cá thể và năng suất thực thu trên hecta. Ưu thế lai âm thể hiện trên các tính trạng thời gian từ gieo đến trổ, tỷ lệ

kết hạt, và khối lượng 1000 hạt. Có quan hệ tuyến tính giữa chiều cao cây của con lai với chiều dài bông của các dòng bố, chiều dài bông của con lai và chiều dài bông của dòng bố, số hạt trên bông của con lai và số hoa trên bông của dòng bố, khối lượng ngàn hạt của con lai và số hoa trên bông của dòng bố. Nhìn chung không có sự sai khác đáng tin cậy giữa số hạt trên bông và năng suất lý thuyết trên hecta của con lai và đối chứng, nhưng có sự sai khác đáng kể ở mức 1% của các tính trạng khác. So sánh với đối chứng, các con lai giữa *indica/javanica* có ưu thế lai dương về chiều cao cây, chiều dài bông, số hoa trên bông, số hạt trên bông, tỷ lệ kết hạt, năng suất lý thuyết và năng suất thực thu trên hecta. Đối với từng cá thể, có 11,1% số con lai có ưu thế lai chuẩn về năng suất lý thuyết trên hecta cao hơn 40%; 3,7% số con lai có ưu thế lai chuẩn về năng suất thực thu cao hơn 40%.

Để nhân hạt giống gốc của PA64S, một trong những yếu tố quan trọng là phải duy trì một cách ổn định ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá hữu dục nhằm ngăn ngừa hiện tượng trượt di truyền của các dòng sau nhiều đời nhân liên tiếp.

Đã có 17 tổ hợp lai khác nhau của PA64S được chọn tạo ra và gieo cấy trên 5 triệu ha tại Trung Quốc, trong đó 2,6 triệu ha ở vùng lúa của phía Nam Trung Quốc. Các tổ hợp này có năng suất cao hơn các tổ hợp ba dòng từ 5-10% và chất lượng gạo cũng cao hơn lúa lai ba dòng. Một số tổ hợp lai của PA64S có năng suất siêu cao là Peiai64S/9311, Peiai64S/E32, Peiai64 S/*javanica* (770).

Các nhà khoa học Trung Quốc, Nhật Bản, Viện lúa Quốc Tế (IRRI) và Ấn Độ đã xác định được 3 gen kiểm soát tính trạng bất dục nhạy cảm với thời gian chiếu

sáng - PGMS (*pms1*, *pms2*, *pms3*) và 5 gen có ký hiệu là *tms1*, *tms2*, *tms3*, *tms4(t)*, *tms5* kiểm soát tính trạng bất dục đực nhạy cảm với nhiệt độ - TGMS. Các gen *pms* này nằm trên các nhiễm sắc thể (NST) tương ứng là 7, 3 và 12; Các gen *tms* định vị trên 5 NST tương ứng là 8, 7, 6, 4, và số 2. Ngoài việc xác định vị trí các gen trên các NST, các chỉ thị phân tử liên kết với các gen bất dục đực nhạy cảm với môi trường (EGMS) nói trên cũng đã được xác định.

Guangqia Zhou, Xunzhen Li và Jianlin Zhou (2002), Viện Khoa học đời sống Hồ Nam - Trung Quốc đã xử lý đột biến nguồn Gamma Co⁶⁰ liều lượng 350 GY với dòng bất dục đực TGMS Shuangdis có giá trị CFP rất thấp, đã thu được 7 thể đột biến có cổ bông dài từ quần thể M₂. Sau quá trình gico trồng và chọn lọc trong điều kiện tự nhiên và nhân tạo tại đảo Hải Nam, các tác giả đã thu được 3 dòng TGMS mới ổn định là Shuangdipeies-1, Shuangdipeies-7 và Shuangdipeies-8. Sử dụng các dòng TGMS này trong sản xuất hạt lai đã không phải phun GA₃ và chúng rất ổn định về ngưỡng chuyển hoá hữu dục.

Cũng bằng phương pháp đột biến Zhang Shubiao, Huang Ronghua và các cộng sự, Viện Di truyền và Chọn giống cây trồng Phúc Kiến (2002), đã tạo ra dòng Peiai64es1 mang gen *euil(t)* kiểm soát tính trạng cổ bông dài và nhạy cảm với GA₃. Sử dụng dòng này trong sản xuất hạt lai chỉ cần phun một lượng rất thấp hoặc không cần phun GA₃. Dòng Peiai64es1 có chiều cao cây là 97,0cm, cổ bông dài 1,1cm trong khi đó dòng Peiai64s chỉ cao 75,6cm và cổ bông áp bẹ tới -7,1cm. Ngoài ra các tính trạng như chiều dài hoa, tỷ lệ thò vòi nhụy, tuổi thọ vòi nhụy cũng tăng nên đã làm tăng tỷ lệ thụ phấn chéo của Peiai64es1.

Các tính trạng như độ hữu dục phấn, độ nhạy cảm với nhiệt độ và thời gian chiếu sáng không tìm thấy sự sai khác giữa Peiai64S và Peiai64es1. Các tổ hợp lai giữa Peiai64S và Peiai64es1 với cùng dòng bố đều có các tính trạng tương tự nhau nhưng một số tổ hợp có dòng Peiai64es1 làm mẹ còn cho năng suất cao hơn 3-8%, vì khối lượng ngàn hạt lớn hơn và số hạt trên bông nhiều hơn. Như vậy việc tạo ra các đột biến gen *eui* đã làm tăng tỷ lệ thụ phấn chéo, giảm lượng dùng GA₃ nên giá thành sản xuất hạt lai giảm hẳn.

Cho đến nay (2002), tại Trung Quốc có trên 10 dòng EGMS đã được sử dụng để tạo ra các tổ hợp lúa lai hai dòng dùng cho sản xuất lúa lai thương mại. Đến năm 2001 đã có 32 tổ hợp lúa lai hai dòng được gieo trồng trên nhiều vùng trồng lúa khác nhau.

Để sản xuất hạt tự thụ các dòng EGMS, thời vụ gieo cấy đã được xác định vào các vụ Thu-Đông, vụ Đông hay dùng kỹ thuật tưới nước mát. Năng suất hạt tự thụ đạt từ 2 đến 5 tấn/ha. Kỹ thuật sản xuất hạt lai F₁ lúa lai hai dòng đã được hoàn thiện.

Tại IRRI, chương trình nghiên cứu tập trung vào phát triển lúa lai cho vùng nhiệt đới, các gen *tms2* từ giống Norin PL.12 và *tms3* từ dòng đột biến IR32364S đã được sử dụng để tạo ra các dòng TGMS mới. Như dòng ID24 được đưa vào Ấn Độ đã được sử dụng để chọn tạo và sản xuất lúa lai hai dòng. Các dòng TGMS IR73827-23S và IR73824S được chọn ra từ ID24 đã ổn định về tính trạng bất dục đực. Tuy nhiên các dòng này cần phải thử nghiệm đồng ruộng trong vụ Mùa khi có nhiệt độ thấp hơn vụ Xuân tại IRRI từ 1-2 °C. Việc nhân hạt tự thụ của các dòng này được thực hiện tại các vùng có vĩ độ cao.

Cũng tại Viện Nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI) những năm cuối của thế kỷ 20, các nghiên cứu được tập trung vào cải tiến mức ưu thế lai ở lúa từ 15-20% lên trên 40%. Các nghiên cứu của họ đã xác định cần tập trung vào hướng ưu thế lai hai dòng giữa các dòng TGMS (*indica*)/ các dòng thu được từ phép lai *indica/japonica* nhiệt đới (*javanica*). Các tổ hợp lai này thích ứng hơn với điều kiện khí hậu nhiệt đới và cho năng suất cao hơn. Ngoài ra các tổ hợp lai này có kiểu hạt dài của *indica* và có chất lượng hạt tốt hơn, (P.S. Virk; G.S. Khush; và S.S. Virmani, 2002).

Sử dụng kỹ thuật SSR (Simple Sequence Repeat) đã xác định chỉ thị phân tử *RM11* liên kết chặt với gen *tms2* định vị trên NST số 7. Các gen *tms* cũng đang được chuyển vào các giống thuộc loài phụ *indica* hoặc giống lai *indica/japonica* nhiệt đới (*javanica*) thu được tại IRRI hoặc các nước trong chương trình hợp tác với IRRI như Bangladesh, Philippin và Sri Lanka.

Hak Soo Suh, Dong Sun Lee và Lijuan Chen, Trường Tài nguyên Di truyền Thực vật và ShinJe Kim Viện Khoa học Đời sống và Nông nghiệp, Đại học tổng hợp Seoul, CHND Triều Tiên (2002), sử dụng các dòng PGMS và TGMS đã được biến nạp gen kháng thuốc trừ cỏ *Bar* (gọi là GMS lines). Hạt của dòng mẹ và dòng cho phấn được trộn lẫn và gieo chung với tỷ lệ 4:1 và thực hiện việc cấy chuyển bằng máy. Sau khi kết thúc nở hoa và thụ phấn tự nhiên, tiến hành phun thuốc trừ cỏ Basta, toàn bộ các cây bố bị tiêu diệt do mang gen *bar* nên mẫn cảm với Basta, chỉ các cây của dòng PGMS hay TGMS còn sống và người ta thu hoạch hạt lai trên các cây dòng mẹ kháng Basta. Tỷ lệ kết hạt của các dòng này đạt từ 10,6-24,5%.

Tại Viện lúa quốc tế (2002), B.C. Viraktamath và S.S. Virmani đã đánh giá 16 dòng TGMS trong những điều kiện nhiệt độ khác nhau để xác định ngưỡng chuyển hoá bất dục (Critical sterile point -CSP) và ngưỡng chuyển hoá hữu dục (Critical fertile point-CFP). Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng hầu hết các dòng TGMS nghiên cứu có ngưỡng nhiệt độ hữu dục là 27/21 °C. Các dòng Norin PL12, IR68939-2-4-40 và IR68301-11—6-4-4-3 có ngưỡng chuyển hoá hữu dục thấp hơn (26/20 °C). Các tác giả còn tìm ra mối tương quan giữa ngưỡng chuyển hoá hữu dục và bất dục như sau: dòng có giá trị CFP thấp thì giá trị CSP cũng thấp và ngược lại dòng có CFP cao thì CSP cũng cao. Năm dòng TGMS được gieo và đánh giá trong điều kiện tự nhiên tại Los Banos chỉ có 2 dòng có thể sử dụng để sản xuất hạt lai F₁ trong mùa khô, còn ba dòng Norin PL12, ID 24 và IR68949-11-5-31 có thể sản xuất cả hai vụ khô và ướt. Nhưng việc sản xuất hạt tự thụ của dòng ID 24 có khó khăn vì giá trị CFP thấp. Từ kết quả đánh giá các dòng trong điều kiện tự nhiên cũng tương tự như trong phytotron các tác giả đã cho rằng việc sàng lọc các dòng TGMS có thể thực hiện tốt ở Los Banos, ngay cả những nơi không có thiết bị phytotron. Điều này đã mở ra triển vọng cho việc sử dụng các dòng TGMS trong nghiên cứu và phát triển lúa lai hai dòng tại Philippin.

M. Ilyas Ahmed Viện Nghiên cứu lúa Hyderabad Ấn Độ, và D. Sanchez, R.S. Toledo, S.S. Virmani IRRI đã chọn tạo các dòng TGMS mới từ nguồn gen *tms* của IRRI bằng nhiều giải pháp khác nhau. Các tác giả đã đưa ra quy trình chọn tạo như sau: từ nguồn gen nhân bất dục đực (*ms*) của dòng IR.58025B cho lai với 4 dòng TGMS thuần của IRRI có kiểu gen là *tms2*. Quần thể F₂ của 4 tổ hợp lai này đã

được gieo cấy trong điều kiện nhiệt độ cao và nhiệt độ mát khi trải qua phân bào giảm nhiễm. Trong điều kiện như vậy sẽ không cho phép các cá thể mang gen trội *Tms₂* thể hiện (gen này đã nạp vào từ vật liệu cho gen IR58025B). Bước tiếp theo là gieo trong điều kiện nhiệt độ mát cho các cây mang tính trạng TGMS thể hiện để chọn lọc cá thể. Thực hiện phép lai giữa cây bất dục có kiểu gen *tms₂tms₂msms* và cây hữu dục có kiểu gen *tms₂tms₂Msms* để thu hạt lai. Đã thu được tỷ lệ phân ly 1:1 từ quần thể thụ phấn tự do của cây bất dục được gieo trong điều kiện nhiệt độ mát để tạo hạt tự thụ. Còn có thể nhận các dòng TGMS từ trong quần thể chọn lọc các cây hữu dục có kiểu gen *MsMstms₂tms₂* được gieo trong điều kiện mát.

Theo công bố của M. Ilyas Ahmed và các cộng sự Viện nghiên cứu lúa Hyderabad Ấn Độ (2002), các tác giả đã tiến hành đánh giá ngưỡng chuyển hoá bất dục, hữu dục, tỷ lệ thò vòi nhụy, tỷ lệ thụ phấn chéo và các tính trạng nông sinh học khác của 31 dòng TGMS chọn tạo tại IRRI và trên 50 dòng TGMS khác của Ấn Độ. Kết quả thu được các dòng TGMS có triển vọng biểu hiện bất dục hoàn toàn ở nhiệt độ 25°C (tháng 7), hữu dục và kết hạt khi nở hoa vào tháng 9 đến tháng 3 tại Hyderabad là IR68945-11S, IR68948-12S, IR68949-11S, TS.29 (ID24), IR68294-7-1S và IR68297-1S. Dòng IR32364-120 kết hạt ở nhiệt độ rất thấp. Các tác giả đã rút ra kết luận điều kiện khí hậu của vùng Hyderabad hoàn toàn phù hợp cho việc nhân các dòng TGMS và sản xuất hạt lai F_1 lúa lai hệ hai dòng.

Cũng tại Hyderabad, 4 dòng TGMS DRIRTG-1, DRIRTG-2, DRIRTG-3 và MLT-4 được sử dụng để lai tạo ra 289 tổ hợp lai hai dòng sử dụng trong nghiên cứu tìm tổ

hợp cho ưu thế lai cao. Đã xác định các tổ hợp có năng suất cao vượt xa đối chứng là DRIRTG-2/IR64, DRIRTG-3/Krishna Hamsa, MLTG-4/INJAV-99, MLTG-4/SC5-2-2-21 và MLTG-4/PLYT-317. Tổng số có 10 tổ hợp lai hai dòng đang được sản xuất hạt lai trên diện rộng để tham gia khảo nghiệm quốc gia và mở rộng vào sản xuất.

Bảng 2. Các dòng EGMS được chọn tạo ở Trung Quốc và một số quốc gia khác tính đến năm 2002

Dòng	Loài phụ	Điều kiện hữu dục: thời gian chiếu sáng (TGCS) và nhiệt độ (°C)	Phương pháp chọn tạo
(1)	(2)	(3)	(4)
Nongken 58S	<i>japonica</i>	TGCS=13,75 giờ	Đột biến tự nhiên
Norin PL12	<i>japonica</i>	Nhiệt độ <24 °C	Đột biến nhân tạo
Annong S-1	<i>indica</i>	Nhiệt độ 24 °C	Đột biến tự nhiên
Annong 810S	<i>indica</i>	Nhiệt độ <24 °C	AnnongS-1/Sweon 287
Hengnong S	<i>indica</i>	Nhiệt độ < 24 °C	Lai giống
5460S	<i>indica</i>	Nhiệt độ < 24 °C	Phóng xạ
R 59TS	<i>indica</i>	Nhiệt độ < 24 °C	Phóng xạ
IR32364-20-1-3-2S	<i>indica</i>	Nhiệt độ < 24 °C	Phóng xạ
Norin PL 12	<i>japonica</i>	Nhiệt độ < 24 °C	Phóng xạ
ID 24S	<i>indica</i>	Nhiệt độ >24 °C	Đột biến
IVA	<i>indica</i>	Nhiệt độ < 24 °C	Lai giống
Diannong S-1	<i>indica</i>	Nhiệt độ <24°C	Zimi/Dianyu No1/ Annong
EGMS ^b	<i>japonica</i>	TGCS<13 giờ	Lai giống
X 88	<i>japonica</i>	TGCS<13,75 giờ	Lai giống
M201S	<i>japonica</i>	TGCS = 12 giờ	Đột biến bằng EMS
5088 S	<i>japonica</i>	Nhiệt độ 24 °C	Lai giống Annong S
7001S	<i>japonica</i> PGMS	Nhiệt độ 24 °C	Nongken 58/917

Bảng 2: (Tiếp theo)

(1)	(2)	(3)	(4)
Pei'ai 64S	<i>javanica</i> (P/TGMS)	Nhiệt độ 23,5 °C	Lai giống, Nongken 58 S
Pei ai64es1	TGMS	Nhiệt độ <23,5 °C	Đột biến Gamma Co ⁶⁰
GD2S	<i>indica</i> (P/TGMS)	Nhiệt độ 23 °C	Lai giống, Nongken 58 S
W91607S	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 24 °C	W6154S/ CP_SLO17
W9451S	<i>indica</i> PGMS	Nhiệt độ < 24 °C	8902S/Yuhong 231-8
AnxiangS	<i>indica</i> P/TGMS	Nhiệt độ <24 °C	Annong S-1/ Xiangxiang B
Xiang 125S	<i>indica</i>	Nhiệt độ <23,5 °C	Lai giống Annong S-1
87N123S	<i>indica</i>	Nhiệt độ <24 °C	Lúa đại /Ro183/Ce 64
Calrose 76S	<i>indica</i> P/TGMS	Nhiệt độ <24 °C	Calrose 76, Nuôi cấy bao phấn
822S	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ 24,5 °C	Từ giống Ấn Độ, đột biến tự nhiên
90332S	TGMS	Nhiệt độ < 24°C	Annong-S-1/Bi8
90336S	TGMS	Nhiệt độ < 24°C	Annong -S-1/Bi8
90338S	TGMS	Nhiệt độ < 24°C	Annong-S-1/820
90341S	TGMS	Nhiệt độ < 24°C	Annong-S-1 /Xiang- 1
133S	TGMS	Nhiệt độ< 23,5°C	(<i>Indica/Japonica</i>)
W6154S	<i>indica</i> (P)TGMS	Nhiệt độ < 24°C	(<i>Indica/Japonica</i>) Nk.58 S
W7415S	<i>indica</i> (PTGMS)	Nhiệt độ < 24°C	(<i>Indica/Japonica</i>) Nk. 58 S
N12S	<i>indica</i> (PTGMS)	Nhiệt độ < 24°C	(<i>Indica/ Japonica</i>) NK.58 S
3N18S	<i>indica</i> (PTGMS)	Nhiệt độ < 24°C	(<i>Indica/Japonica</i>) NK.58 S

Bảng 2: (Tiếp theo)

(1)	(2)	(3)	(4)
N18S	<i>indica</i> (PTGMS)	Nhiệt độ < 24°C	(<i>Indica/Japonica</i>) NK. 58S
Shuangdipeies-1	TGMS	Nhiệt độ < 23°C	Đột biến từ Shuangdis
Shuangdipeies-7	TGMS	Nhiệt độ < 23°C	Đột biến từ Shuangdis
Shuangdipeies-8	TGMS	Nhiệt độ < 23°C	Đột biến từ Shuangdis
Shuguang 612S	<i>indica</i> P/TGMS	Nhiệt độ < 23°C	Lai giống, Nongken S
Ce.64S	<i>indica</i>	Nhiệt độ < 23°C	Annong S
GB028S	<i>japonica</i> (P/TGMS)	Nhiệt độ < 23°C	Nongken 58 S
2877S	<i>indica</i> (P(T)GMS)	Ngây ngắn, nhiệt độ > 23°C	(<i>Indica/Japonica</i>)
TS-6-5-12	TGMS	Nhiệt độ < 26,6 °C	RP2161-106-1-1
TS6-6-12	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,6 °C	RP2161-106-1-1
TS7-2-8	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,6 °C	BC ₁ F ₂ của IR62829A/ <i>O.nivara</i> /IR62829B
TS7-3-8	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,3 °C	BC ₁ F ₂ của IR62829A/ <i>O.nivara</i> /IR62829B
TS7-1-19-7	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,3 °C	BC ₁ F ₂ của IR62829A/ <i>O.nivara</i> / IR62829B
TS7-2-6-7	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,3 °C	BC ₁ F ₂ của IR62829A/ <i>O.nivara</i> /IR62829B
TS10-5-9	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,6 °C	<i>Indica/japonica</i> C12 Japonica tím
TS15	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 22,0 °C	IR32364
TS16	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 22,0 °C	IR68945
TS32	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,0 °C	Lai giống, C41
TS33	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ < 26,6 °C	Lai giống, C42

Bảng 2: (Tiếp theo)

(1)	(2)	(3)	(4)
TS35	<i>indica</i> TGMS	Nhiệt độ <22,0 °C	Lai giống, C44
DRIRTG-1	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
DRIRTG-2	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
DRIRTG-3	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
MLT-4	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR32364S	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR73824S	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR73827-23S	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR68301-11—6-4-4-3	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR68939-2-4-40	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR68949-11-5-31	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR32364-120	<i>indica</i> TGMS	ngưỡng chuyển hoá hữu dục rất thấp	Lai giống
IR68297-1S	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR68294-7-1S	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
TS.29 (ID24)	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR68948-12S,	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống
IR68945-11S	<i>indica</i> TGMS	Bất dục hoàn toàn ở 25°C	Lai giống

III.2. Thành tựu chọn tạo giống lúa lai hai dòng ở Việt Nam

Việt Nam khởi đầu những thử nghiệm về lúa lai vào năm 1992 bằng việc sản xuất thử một vài tổ hợp lúa lai ba dòng được nhập nội từ Trung Quốc. Cũng năm 1992, đề tài độc lập cấp Nhà nước về nghiên cứu lúa lai được thực hiện và sau đó vấn đề nghiên cứu lúa lai được triển khai trong khuôn khổ của chương trình KN-01 và KHCN-08.

Đội ngũ các cán bộ nghiên cứu lúa lai của nước ta chủ yếu là tự đào tạo hoặc đào tạo ngắn hạn trong nước, chỉ có rất ít cán bộ được đào tạo dài hạn tại Ấn Độ hoặc IRRI. Do vậy phải khẳng định rằng lực lượng nghiên cứu về lúa lai còn thiếu cả về số lượng và chất lượng.

Về điều kiện nghiên cứu hay cơ sở vật chất cho nghiên cứu lúa lai của Việt Nam còn quá thiếu và không đồng bộ. Kinh phí cho nghiên cứu còn quá thiếu nên đã hạn chế đến kết quả cũng như tốc độ phát triển lúa lai ở Việt Nam.

Tuy nhiên trong vòng 10 năm qua, chúng ta đã thu được một số kết quả trên lĩnh vực chọn tạo giống lúa lai góp phần phát triển lúa lai ở nước ta.

Trong mạng lưới các đơn vị tham gia nghiên cứu lúa lai bao gồm Trung tâm nghiên cứu lúa lai, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện cây lương thực và cây thực phẩm, Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long và trường Đại học Nông nghiệp I.

Các nghiên cứu của các đơn vị đã tập trung vào việc thu thập, nhập nội các dòng bất dục để đánh giá, khai thác

và lưu giữ làm vật liệu cho nghiên cứu và chọn tạo giống lúa lai. Sử dụng các phương pháp chọn tạo giống truyền thống như đột biến, lai hữu tính để tạo các dòng bất dục đực mới. Sử dụng các kỹ thuật của công nghệ sinh học để làm thuần hoặc nhân nhanh các nguồn vật liệu mới chọn tạo ra. Các thành tựu của nghiên cứu lúa lai trong nước được liệt kê theo các lĩnh vực dưới đây:

III.2.1. Kết quả chọn tạo các dòng bất dục đực kiểu TGMS

Phải khẳng định rằng hầu hết các vật liệu chọn giống lúa lai hai dòng đang được sử dụng tại Việt Nam đều có nguồn gốc nhập nội hoặc các dòng mới chọn tạo ra cũng mang các gen *tms* từ vật liệu nhập nội được chuyển vào các giống địa phương hoặc vật liệu mới chọn tạo trong nước. Số lượng các dòng TGMS được chọn tạo tại Việt Nam được liệt kê trong bảng 3. Các dòng TGMS đã được sử dụng trong nghiên cứu để xác định ngưỡng chuyển hoá hữu dục và bất dục, lai thử để tìm tổ hợp lai cho ưu thế lai cao...Số lượng các tổ hợp lai hai dòng chọn tạo trong nước đang được đánh giá tại các cơ sở nghiên cứu, một số tổ hợp đang tham gia trồng mạng lưới khảo nghiệm quốc gia. Một tổ hợp lai hai dòng do bộ mô Di truyền Tế bào và Lai xa, Viện Di truyền Nông nghiệp chọn tạo, được công nhận giống khu vực hoá (VN-01/D.212) năm 1999. Ngoài ra còn một vài tổ hợp có triển vọng như Việt Lai 20... đang thử nghiệm sản xuất trên diện rộng.

Bảng 3: Các dòng TGMS được chọn tạo tại Việt Nam

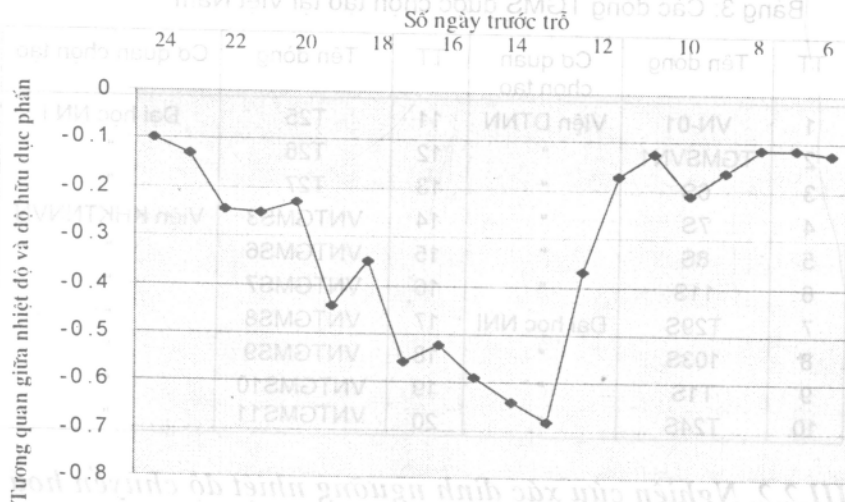
TT	Tên dòng	Cơ quan chọn tạo	TT	Tên dòng	Cơ quan chọn tạo
1	VN-01	Viện DTNN	11	T25	Đại học NN I
2	TGMSVN1	"	12	T26	"
3	6S	"	13	T27	"
4	7S	"	14	VNTGMS3	Viện KHKTNNVN
5	8S	"	15	VNTGMS6	"
6	11S	"	16	VNTGMS7	"
7	T29S	Đại học NNI	17	VNTGMS8	"
8	103S	"	18	VNTGMS9	"
9	T1S	"	19	VNTGMS10	"
10	T24S	"	20	VNTGMS11	"

III.2.2. Nghiên cứu xác định ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá của các dòng TGMS

Để sử dụng các dòng TGMS vào phát triển lúa lai, việc nghiên cứu xác định ngưỡng chuyển hoá hữu dục và bất dục là vô cùng cần thiết. Chỉ sau khi xác định được các thông số nói trên chúng ta mới có cơ sở để xác định thời vụ nhân dòng TGMS hay sản xuất hạt lai F_1 .

Tại Viện Di truyền Nông nghiệp, Bộ môn Di truyền Tế bào và Lai xa đã triển khai nghiên cứu ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá của các dòng TGMS trong các thời vụ khác nhau với các ngưỡng nhiệt độ khác nhau ở thời kỳ phân bào giảm nhiễm. Vật liệu cho thí nghiệm này là các dòng TGMS 11S, VN-01, do chính bộ môn chọn tạo ra.

Thông qua đánh giá hệ số tương quan giữa nhiệt độ và tỷ lệ hạt phấn hữu dục đã xác định được ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá hữu dục của các dòng nghiên cứu. Số liệu bảng 4 và hình 14 thể hiện phản ứng của dòng 11S với yếu tố nhiệt độ ở giai đoạn giảm nhiễm.



Hình 14: Giai đoạn nhạy cảm nhiệt độ của dòng 11S

Theo đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nhiệt độ và tỷ lệ phần hữu dục thì dòng 11S có giai đoạn nhạy cảm mạnh vào ngày thứ 19 đến ngày 13 trước trở. Trong giai đoạn này trị số tuyệt đối của “r” là lớn nhất.

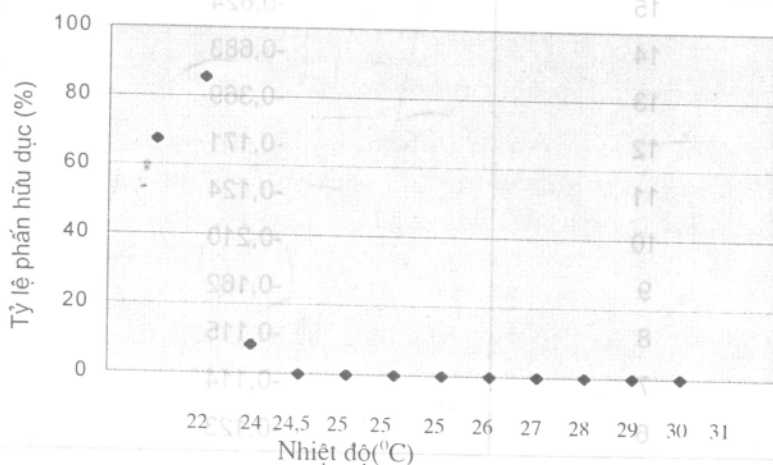
Về ngưỡng chuyển hoá hữu dục của dòng 11S là 24,5°C. Tại điểm nhiệt độ này, dòng TGMS 11S bắt đầu cho hạt phần hữu dục và đạt tỷ lệ cao ở 24°C đến 23°C. Sử dụng các biện pháp đánh giá đã nêu như với dòng 11S, các dòng TGMS do chúng tôi chọn tạo ra đã được xác định ngưỡng chuyển hoá hữu dục và sử dụng trong chọn tạo các tổ hợp lai.

Bảng 4: Hệ số tương quan giữa nhiệt độ trung bình và tỷ lệ hạt phần hữu dục của dòng 11S giai đoạn 6 đến ngày 25 trước trở

Số ngày trước trở	Hệ số tương quan giữa nhiệt độ và tỷ lệ phần hữu dục
25	-0,100
24	-0,132
23	-0,246
22	-0,252
21	-0,231
20	-0,444
19	-0,351
18	-0,557
17	-0,523
16	-0,590
15	-0,624
14	-0,683
13	-0,369
12	-0,171
11	-0,124
10	-0,210
9	-0,162
8	-0,115
7	-0,114
6	-0,123

Bảng 5: Tỷ lệ hạt phần hữu dục của dòng 11S và nhiệt độ không khí giai đoạn phân bào giảm nhiễm

Thời điểm gieo mạ (Ngày/tháng)	Thời điểm trổ (30%)	Nhiệt độ trung bình ngày thứ 10 đến ngày 20 trước trổ	Tỷ lệ phần hữu dục (%)
01/01	24/04	24,31	8,25
10/01	29/04	26,16	0
20/01	06/05	25,40	0
30/01	10/05	24,90	0
10/02	14/05	24,90	0
20/02	19/05	30,72	0
02/03	22/05	31,30	0
25/08	06/10	26,39	0
05/09	17/10	26,90	0
15/09	05/11	27,62	0
25/09	13/11	22,40	85,40



Hình 15: Ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá hữu dục của dòng 11S

III.2.3. Xây dựng quy trình nhân dòng TGMS ở Việt Nam

Như đã trình bày ở các phần trên, một trong những cản trở lớn, hạn chế việc phát triển lúa lai thương mại là do năng suất hạt dòng bất dục và hạt lai F_1 còn rất thấp. Để góp phần giải quyết vấn đề này, từ năm 1994 đến nay chúng tôi đã nghiên cứu xây dựng quy trình nhân dòng TGMS trong điều kiện khí hậu phía Bắc Việt Nam.

a) Vật liệu nghiên cứu

Là các dòng TGMS do bộ môn Di truyền Tế bào và Lai xa chọn tạo ra, đã và đang sử dụng trong nghiên cứu chọn tạo các tổ hợp lai hoặc đang sản xuất thử hạt lai F_1 ở các địa phương phía Bắc như VN-01, 6S, 7S, 8S, 11S và 12S...

b) Nội dung nghiên cứu

Đánh giá các tính trạng nông sinh học, kinh tế, đặc biệt chú ý thời gian từ gieo đến phân bào giảm nhiễm, gieo đến trổ của mỗi dòng trong 4 thời vụ chính (xuân sớm, xuân muộn, mùa sớm và thu đông) để xác định thời vụ gieo thích hợp cho từng dòng sao cho quá trình phân hoá dòng ở bước IV đến VI rơi vào thời điểm có nhiệt độ trung bình phù hợp cho tỷ lệ hạt phấn hữu dục cao nhất, hoặc an toàn cho sản xuất hạt F_1 . Bên cạnh việc đánh giá trong điều kiện tự nhiên, các thí nghiệm còn được tiến hành trong nhà khí hậu (phytotron).

c) Kết quả nghiên cứu

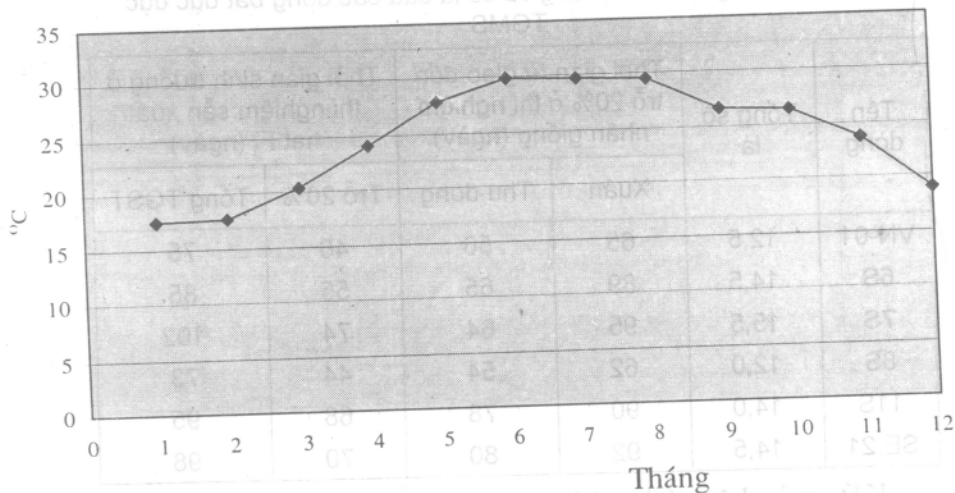
* Kết quả nghiên cứu của nhiều vụ đã xác định thời gian sinh trưởng của các dòng được thể hiện trong bảng 6. Số liệu bảng 6 cho thấy thời gian từ gieo đến trổ 20% của các dòng biến động từ 62 đến 92 ngày trong vụ xuân, từ 56 đến 80 ngày trong vụ thu đông.

* Tổng số lá trên cây của các dòng biến động từ 12 và 12.5 ở dòng 8S và VN-01; 15.5 ở dòng 7S. Trên cơ sở số lá và thời gian sinh trưởng, chúng tôi luôn gieo dòng 7S trước, tiếp sau đó đến 11S, SE.21 rồi đến dòng 6S, VN-01 và 8S. Theo cách bố trí thời vụ như vậy các dòng TGMS đều trở cùng vào thời điểm đã xác định.

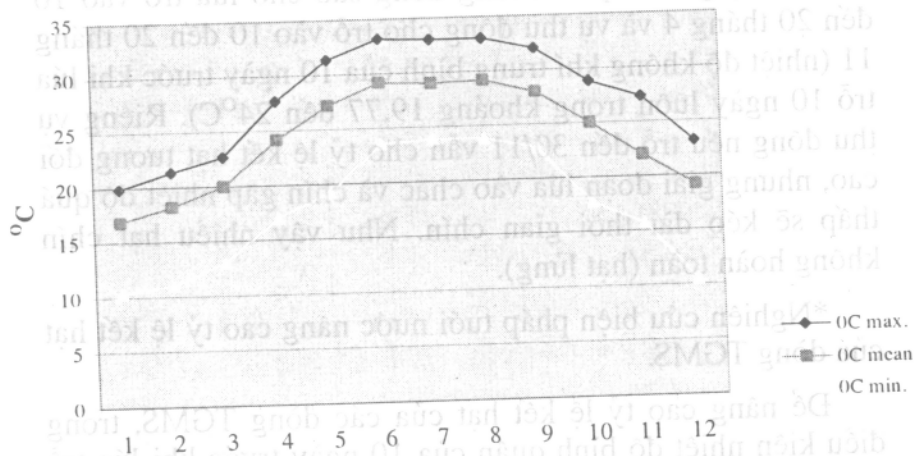
Cũng từ các thí nghiệm thời vụ ở cả hai điều kiện xuân sớm và thu đông, theo dõi số liệu nhiệt độ trung bình 10 ngày liên tục (giai đoạn giảm nhiễm) và theo dõi độ hữu dục phần của các dòng ở mỗi thời vụ. Đã tìm ra được quan hệ giữa nhiệt độ và độ hữu dục và xác định được ngưỡng chuyển hoá hữu dục của các dòng TGMS. Từ kết quả nghiên cứu nhiều năm, chúng tôi xác định được ngưỡng chuyển hoá của các dòng TGMS đã được chọn tạo và sử dụng trong nghiên cứu và phát triển lúa lai (bảng 7). Ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá thấp nhất của các dòng là $23,5^{\circ}\text{C}$ và cao nhất là $26,5^{\circ}\text{C}$. Tuy nhiên các dòng có ngưỡng chuyển hoá cao sẽ khó được sử dụng ở nước ta vì khi sản xuất hạt lai sẽ gặp khó khăn do nhiệt độ cao và tỷ lệ lép sẽ cao.

* Thu thập số liệu nhiệt độ và nghiên cứu quy luật diễn biến nhiệt độ nơi nghiên cứu.

Đây là một khâu vô cùng quan trọng, có ảnh hưởng lớn đến nghiên cứu lúa lai hai dòng, đặc biệt là việc nhân dòng TGMS. Số liệu khí tượng đã thu thập của Trạm Khí tượng Thủy văn tại khu vực Láng, Hà Nội và quan trắc trên đồng ruộng. Nhìn chung nhiệt độ thuận lợi cho nhân dòng bất dục ở phía Bắc nước ta rơi vào hai thời điểm là xuân muộn và thu đông (hình 16, 17).



Hình 16: Diễn biến nhiệt độ tại điểm TN qua nhiệt kế tự ghi 1997-2000



Hình 17: Diễn biến nhiệt độ Max, Min và trung bình khu vực Hà Nội 1984-2001

Bảng 6: Thời gian sinh trưởng và số lá của các dòng bất dục đực TGMS

Tên dòng	Tổng số lá	Thời gian từ gieo đến trổ 20% ở thí nghiệm nhân giống (ngày)		Thời gian sinh trưởng ở thí nghiệm sản xuất hạt F ₁ (ngày)	
		Xuân	Thu đông	Trổ 20%	Tổng TGST
VN-01	12,5	65	56	46	75
6S	14,5	89	65	55	85
7S	15,5	95	64	74	102
8S	12,0	62	54	44	73
11S	14,0	90	78	68	95
SE.21	14,5	92	80	70	98

Kết quả phân tích số liệu nhiệt độ của Trạm Khí tượng Thủy văn Láng và số liệu ghi chép tại khu thí nghiệm cho thấy: để nhân các dòng TGMS trong vụ xuân muộn phải bố trí thời vụ gieo cấy của từng dòng sao cho lúa trổ vào 10 đến 20 tháng 4 và vụ thu đông cho trổ vào 10 đến 20 tháng 11 (nhiệt độ không khí trung bình của 10 ngày trước khi lúa trổ 10 ngày luôn trong khoảng 19,77 đến 24°C). Riêng vụ thu đông nếu trổ đến 30/11 vẫn cho tỷ lệ kết hạt tương đối cao, nhưng giai đoạn lúa vào chắc và chín gặp nhiệt độ quá thấp sẽ kéo dài thời gian chín. Như vậy nhiều hạt chín không hoàn toàn (hạt lửng).

*Nghiên cứu biện pháp tưới nước nâng cao tỷ lệ kết hạt của dòng TGMS.

Để nâng cao tỷ lệ kết hạt của các dòng TGMS, trong điều kiện nhiệt độ bình quân của 10 ngày trước khi lúa trổ 10 ngày cao hơn hoặc rất thấp và kéo dài so với ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá hữu dục, có thể dùng giải pháp sau:

Bảng 7: Ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá hữu dục của các dòng TGMS

Dòng TGMS	Trung bình nhiệt độ 10 ngày trước trổ 10 ngày
VN-01	24,0
6S	24,5
7S	23,5
8S	23,5
9S	24,5
11S	25,0
12S	25,0
15S	25,5
16S	26,5

Phải nghiên cứu xác định độ dài bông non ở giai đoạn nhẩy cảm để quyết định mức nước cần tưới.

Từ kết quả nghiên cứu với dòng VN-01 độ dài lớn nhất của bông chính ở giai đoạn bước IV-V là 8,05 cm, có mức biến động 5,4 đến 9,7. Thời điểm bước VI, độ dài bông chính là 13,76 cm và mức tối đa là 19,0 cm (bảng 8).

Dựa vào kết quả này chúng tôi đã dùng nước giếng khoan để tưới với mức 19 cm cho ruộng nhân dòng TGMS khi gặp nhiệt độ cao. Kết quả của xử lý nước mát được trình bày trong bảng 9. Rõ ràng, tưới nước mát đã làm giảm nhiệt độ trong ruộng và lớp không khí trên bề mặt nên đã tạo nhiệt độ phù hợp cho chuyển hoá hữu dục và tăng tỷ lệ kết hạt của các dòng TGMS.

Việc nhân các dòng TGMS đã được tiến hành thường xuyên tại Viện Di truyền Nông nghiệp và các trạm, trại xung quanh Hà Nội và khu vực ĐBSH. Trong quá trình nhân các dòng TGMS, điều kiện nhiệt độ cao khi các dòng

Bảng 8. Kích thước bóng non của dòng VN - 01 ở giai đoạn phân bào giảm nhiễm trong quá trình phát triển đồng

Đối tượng quan sát	Các giai đoạn phát triển bóng	Chiều dài bóng (cm)		Khoảng cách từ đỉnh bóng đến mặt ruộng (cm)		Khoảng cách từ đỉnh bóng đến đáy đốt thứ nhất (cm)	
		Trung bình	Mức độ biến động	Trung bình	Mức biến động	Trung bình	Mức biến động
Thân chính	I	0,017	0,01 ~ 0,02	-0,05	-0,4 ~ -0,2	3,2	2,5 ~ 3,5
	II	0,035	0,02 ~ 0,05	0,08	-0,2 ~ 0,2	3,5	2,5 ~ 4,1
	III	0,100	0,05 ~ 0,20	0,50	-0,2 ~ 1,5	4,0	3,0 ~ 5,0
	IV	0,650	0,20 ~ 1,50	2,56	0,5 ~ 5,5	6,1	3,5 ~ 8,9
	V	3,550	1,50 ~ 5,00	8,05	5,4 ~ 9,7	11,8	9,0 ~ 14,2
	VI	8,340	5,00 ~ 11,00	13,76	9,7 ~ 19,5	19,0	14,0 ~ 23,5
	VII	14,500	11,00 ~ 16,00	29,75	19,3 ~ 35,0	32,5	25,0 ~ 41,0
	VIII	17,650	16,00 ~ 21,00	40,60	35,6 ~ 48,3	43,5	41,0 ~ 52,0
Nhánh cấp I	I	0,015	0,01 ~ 0,02	-2,20	-3,5 ~ -1,1	2,0	1,5 ~ 3,0
	II	0,030	0,02 ~ 0,05	-1,90	-2,0 ~ -0,3	2,1	1,7 ~ 3,2
	III	0,100	0,05 ~ 0,20	-1,00	-2,0 ~ 0,8	2,8	1,8 ~ 4,5
	IV	0,550	0,20 ~ 1,50	1,20	-0,5 ~ 5,3	5,3	2,4 ~ 8,7
	V	3,100	1,50 ~ 4,80	7,50	5,6 ~ 9,0	11,0	7,9 ~ 13,5
	VI	8,140	4,80 ~ 11,00	12,30	9,6 ~ 15,6	17,2	13,5 ~ 20,5
	VII	14,300	11,00 ~ 16,20	22,75	15,6 ~ 31,5	29,0	22,1 ~ 37,6
	VIII	17,180	16,20 ~ 20,00	32,50	30,0 ~ 40,5	38,3	37,6 ~ 43,6
Nhánh cấp II	I	0,010	0,01 ~ 0,02	-3,80	-4,2 ~ -1,9	1,9	1,4 ~ 2,6
	II	0,020	0,02 ~ 0,05	-2,70	-3,1 ~ -1,1	2,0	1,6 ~ 3,0
	III	0,08	0,05 ~ 0,20	-0,90	-2,5 ~ 0,4	2,4	1,9 ~ 4,1
	IV	0,450	0,20 ~ 1,40	1,10	-1,1 ~ 3,6	5,1	2,3 ~ 7,6
	V	2,000	1,40 ~ 4,20	6,90	5,0 ~ 7,8	10,5	8,9 ~ 11,0
	VI	7,500	4,20 ~ 9,50	11,50	9,0 ~ 14,6	15,8	10,8 ~ 18,7
	VII	13,600	9,50 ~ 11,20	21,20	14,6 ~ 28,3	27,1	21,5 ~ 35,1
	VIII	17,000	11,20 ~ 17,8	29,60	27,7 ~ 33,5	35,0	32,6 ~ 39,2

trải qua giai đoạn phân bào giảm nhiễm, chúng tôi đã chủ động tưới theo quy trình đã xây dựng nên vẫn đảm bảo cho các dòng chuyển hoá hữu dục và kết hạt. Bảng 9 là kết quả nhân một số dòng TGMS tại khu vực Hà Nội.

Bảng 9: Kết quả xử lý nước mát cho các dòng TGMS

Thời gian thí nghiệm và phương pháp thử nghiệm	Thời điểm phân bào giảm nhiễm của các dòng	Nhiệt độ trung bình giai đoạn giảm nhiễm	Tỷ lệ kết hạt (%)	
			VN-01	8S
Vụ thu đông 1997 không tưới mát	15-12/10	27,73	0	0
Vụ thu đông 1997 có tưới nước mát	15-22/10	23,50	65,0	60,0
Vụ xuân 1998 không tưới mát	10-17/4	26,10	0	0
Vụ xuân 1998 có tưới nước mát	10-17/4	22,70	58,3	69,5
Vụ thu đông 1998 không tưới mát	1-10/11	23,08	62,0	64,7

LSD: 0,05

3,04 4,25

Ghi chú : Mật độ cấy 65 khóm/m²

Số liệu bảng 9 chứng minh tác dụng của việc tưới nước mát đã làm thay đổi hẳn khả năng kết hạt. Ở các thời vụ không có tưới khi gặp nhiệt độ cao đã không cho thu hoạch hạt tự thụ.

Bảng 10: Tỷ lệ kết hạt và năng suất của các dòng TGMS trong điều kiện tự nhiên vụ thu đông 1999

Tên giống	Bông/ khóm	Σ hạt/ bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	Khối lượng 1000 hạt (g)	NSLT (tấn/ha)
VN-01	8,80	79,10	61,28	29,50	6,01
7S	7,40	115,30	39,10	25,60	4,88
10S	6,20	119,40	47,80	21,00	4,09
11S	7,60	89,90	40,97	26,00	4,95
12S	8,60	95,00	42,90	24,00	4,63
15S	9,20	89,90	36,70	21,00	3,50
16S	12,60	95,20	47,70	22,00	6,92
19S	10,20	89,90	36,70	20,50	3,79
Hương 125	7,20	67,00	48,30	22,50	2,88
Peiai 64S	8,40	95,20	47,60	20,00	4,19

Chú thích: Mật độ cấy: 55 khóm/m², Thời điểm Meios: 1-10/11
Nhiệt độ trung bình 10 ngày trước trổ 12 ngày: Min: 17,5°C, Max: 24°C

II.3. Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô trong tạo giống lúa lai hai dòng ở Việt Nam

Từ thực tiễn nghiên cứu và phát triển lúa lai của Việt Nam, thừa hưởng các thành tựu lúa lai mà nhân dân Trung Quốc đã giành được trong nhiều thập kỷ qua, các cán bộ khoa học và cán bộ nghiên cứu của nước ta đã đi sâu nghiên cứu chọn tạo giống lúa lai hai dòng. Để đa dạng nguồn gen bất dục mẫn cảm với nhiệt độ, mau chóng tạo ra vật liệu bất dục dục phù hợp cho tạo giống lúa lai ở Việt Nam. Bên cạnh việc sử dụng các phương pháp như đột biến bằng phóng xạ, hoá chất, phương pháp lai hữu tính rồi chọn lọc để chuyển các gen TGMS sẵn có vào các giống lúa

thuần có nền di truyền tốt, khả năng thích ứng cao để tạo ra dạng bất dục mới thông qua chọn lọc phả hệ các thế hệ F_2 ... F_7 . Phương pháp này là rất có hiệu quả song thời gian chọn tạo khá dài. Hơn thế nữa điều kiện khí hậu ở miền Bắc nước ta không phù hợp cho chọn lọc và sử dụng các dòng PGMS, mà chỉ cho phép sản xuất hạt dòng bất dục mẫn cảm với nhiệt độ (TGMS) vào hai thời vụ (Xuân sớm và Thu-Đông). Thời tiết lại luôn thay đổi nên sản xuất hạt dòng mẹ cũng không an toàn. Để rút ngắn chu kỳ chọn tạo, chúng tôi đã nghiên cứu và ứng dụng một số kỹ thuật nuôi cấy mô như cứu phôi, nuôi cấy bao phấn, nuôi cấy lớp mỏng tế bào và nuôi cấy hoa tự non để làm thuần và nhân nhanh các dòng mẹ cho chọn tạo các tổ hợp lúa lai hai dòng.

III.3.1. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu

Chúng tôi sử dụng dòng bất dục TGMS 8S, 40S và hai dòng VN-01, SE.21 là các dòng cho gen *tms* (gen donor). Các giống tiếp nhận các gen *tms* là các giống địa phương, giống nhập nội cùng các giống mới chọn tạo đã ổn định có nhiều tính trạng quý như năng suất cao, chất lượng tốt, chống chịu một số sâu bệnh chính, có chiều cao cây thấp hoặc trung bình. Sau khi nghiên cứu đánh giá khả năng kết hợp của các dòng TGMS và các dòng cho phấn. Chúng tôi đã tiến hành lai để thu hạt lai F_1 .

Một số tổ hợp lai dưới đây đã được thực hiện:

VN-01/D212	SE.21/ MH-86
6s/QC1.	7s/QC1.
11s/MH-86	11s/ QC1

Tiến hành gieo các con lai F_1 của các tổ hợp này và thu 1/2 số đồng đủ tiêu chuẩn để nuôi cấy bao phấn. Một nửa còn lại để cho trổ và thu hạt gieo đánh giá F_2 .

* Môi trường tạo mô sẹo cho nuôi cấy bao phấn N6 có bổ sung 2.4D 2mg/l + 0.5mg kinetin/l và dịch chiết của nấm men 0,1% (Yeast extract).

* Môi trường tái sinh: Các mô sẹo cũng như phôi vô tính được hình thành từ các loại mẫu nuôi cấy khác nhau được cấy riêng rẽ lên môi trường MS có thêm 2mg/l Kinetin, 1mg/l NAA và 0,25 mg/l BAP.

* Môi trường ra rễ : chúng tôi sử dụng MS hoặc LS.

* Điều kiện nuôi: tối hoàn toàn cho tạo mô sẹo và 8/16 giờ sáng/tối cho tái sinh cây, nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

III.3.2. Kết quả nghiên cứu

Sau hàng loạt nghiên cứu để xác định môi trường nuôi cấy, tuổi của phôi sau khi thụ tinh. Chúng tôi đã đi đến các kết luận sau:

+ Mẫu để sử dụng cho cứu phôi có thể lấy ở giai đoạn sau khi thụ phấn thụ tinh từ 6-14 ngày. Kết quả này góp phần quan trọng trong việc tận thu hạt các dòng TGMS được nhân trong vụ Thu đông khi quá trình vào chắt của hạt gặp nhiệt độ thấp. Nhờ cứu phôi, chúng tôi đã làm tăng hệ số nhân dòng TGMS từ 10-15% so với không dùng cứu phôi. Cây non thu được từ cứu phôi ngoài việc đưa ra trồng ngoài tự nhiên còn được sử dụng trực tiếp cho nuôi cấy lớp mỏng mà không phải khử trùng.

- Khả năng hình thành mô sẹo:

+ Đối với nuôi cấy LMTB và hoa non:

Trong ba tuần nuôi cấy đầu các mô sẹo và phôi vô tính đã xuất hiện và tăng dần về kích thước. Khi độ lớn của các loại mô này đạt tiêu chuẩn cấy chuyển sẽ được đưa sang môi trường tái sinh. Chúng tôi đã thu được mô sẹo, phôi hạt và phôi soma với tỷ lệ là 33,66 - 73,60%. Các loại mẫu cấy khác nhau (cây mọc từ hạt hoặc chồi chết), các dòng bất dục khác nhau cho kết quả khác nhau về tỷ lệ mô sẹo và phôi vô tính. Đối với nuôi cấy hoa non số mô sẹo và phôi vô tính đạt 52,2-87,5%, tỷ lệ này cũng phụ thuộc rất lớn vào tuổi của mẫu cấy, loại mẫu cấy và kiểu gen của vật liệu nuôi cấy (bảng 11).

Bảng 11 : Khả năng phát sinh mô sẹo và phôi vô tính

Tên dòng và loại mẫu cấy	Lớp mỏng tế bào			Hoa non		
	Mô sẹo (%)	Phôi vô tính (%)	Σ (%)	Mô sẹo (%)	Phôi vô tính (%)	Σ (%)
VN-01						
Chồi chết	18,0	32,25	50,25	25,8	26,4	52,2
Cây mọc từ hạt	34,1	37,50	73,60	47,2	40,3	87,5
40S						
Chồi chết	15,70	24,80	39,85	23,9	31,7	55,6
Cây mọc từ hạt	9,0	24,66	33,66	37,3	41,9	79,2
8S						
Chồi chết	12,40	27,80	40,20	23,2	52,25	82,45
Cây mọc từ hạt	19,20	30,05	49,25	---	---	---

+ Khả năng hình thành mô sẹo từ bao phần các con lai F_1 : trên nhiều đợt nuôi cấy đối với các tổ hợp lai khác nhau tỷ lệ tạo mô sẹo biến động từ 0.97% đến 3%. Cao nhất ở tổ hợp lai 11s/MIH-86.

- Khả năng tái sinh:

Từ tuần thứ 4, các mô sẹo và phôi vô tính đạt tiêu chuẩn được chuyển lên môi trường tái sinh và nuôi trong điều kiện 8 giờ chiếu sáng, 16 giờ tối, cường độ chiếu sáng 2000 Lux, nhiệt độ phòng nuôi là $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Sau 4 tuần đã thu được tỷ lệ tái sinh cây từ mô sẹo là 100% và 62 - 87% từ phôi vô tính (bảng 12). Khi cây con đạt 3 - 4 lá được chuyển sang môi trường LS để cho ra rễ và sau đó cấy chuyển ra đồng.

Bảng 12 : Khả năng tái sinh cây của mô sẹo và phôi vô tính trên môi trường nuôi cấy

Loại mô tái sinh	Dòng VN-01		8S		40S	
	Chồi chết	Cây mọc từ hạt	Chồi chết	Cây mọc từ hạt	Chồi chết	Cây mọc từ hạt
Mô sẹo	100	100	100	100	96,8	100
Phôi vô tính	85-87	62-73	64,5	69,7	80-82	75-77

Kết quả quan sát trên đồng ruộng và đánh giá độ ổn định di truyền cho thấy các dòng bất dục phát triển bình thường và ổn định, đặc biệt là ngưỡng chuyển hoá bất dục

và hữu dục. Từ nguồn gen dòng bất dục VN-01, SE.21 chúng tôi đã chuyển vào một số giống khác và thu được một số dạng bất dục mới. Trong số đó có hai dòng đã được sử dụng để lai thử và sản xuất hạt lai F_1 trên diện tích nhỏ đó là dòng 6s và 11s.

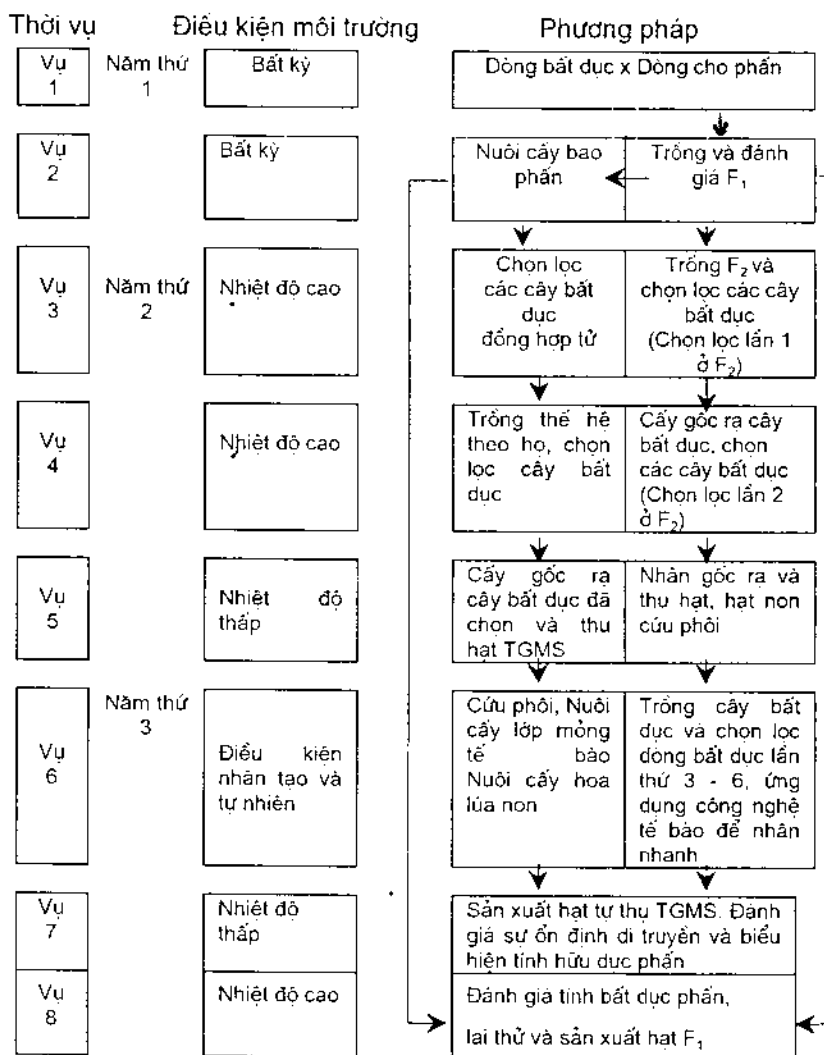
III.3.3. Tính ưu việt của nuôi cấy mô tế bào trong chọn tạo giống lúa lai

Trong quá trình chọn tạo giống lúa lai, sau khi thu được các dạng TGMS mới hoặc dòng thuần mới chúng ta còn phải tiến hành hàng loạt các đánh giá trong các ngưỡng nhiệt độ khác nhau. Về mặt thời gian phải mất ít nhất 5-6 năm. Nhờ sự trợ giúp của các kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào nhà tạo giống không những có thể tạo ra dòng TGMS và dòng thuần mới có độ thuần di truyền cao hơn mà còn rút ngắn được thời gian từ 1 đến 2 năm (hình 18).

Nhờ nuôi cấy mô tế bào có thể nhân và sản xuất hàng loạt cây con của các dòng bất dục TGMS và các dòng lúa thuần tốt.

Sử dụng kỹ thuật cứu phôi đã làm tăng hệ số nhân giống của các dòng TGMS đồng thời cung cấp vật liệu sạch cho các kỹ thuật nuôi cấy khác. Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào và hoa non đã thu được tỷ lệ tái sinh khá cao: 100% tỷ lệ tái sinh từ mô sẹo và 62-87% từ phôi vô tính. Các thế hệ cây tái sinh từ các phương pháp nuôi cấy khác nhau cho độ đồng đều cao và ổn định.

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO TRONG CHỌN GIỐNG LÚA LAI HAI DÒNG



Hình 18: Sơ đồ ứng dụng nuôi cấy mô trong chọn tạo giống lúa lai

III.4. Xây dựng quy trình nhân dòng TGMS ở Việt Nam

Trong việc khai thác ưu thế lai ở lúa, lúa lai hai dòng đã tỏ ra có nhiều ưu điểm hơn lúa lai hệ 3 dòng về khả năng tìm dòng cho phần cao, ưu thế lai cao hơn từ 5-15% đặc biệt là khi sản xuất hạt dòng TGMS không cần phải thụ phấn chéo. Tuy nhiên, biểu hiện của tính trạng bất dục đực lại phụ thuộc rất chặt vào điều kiện nhiệt độ của môi trường, do vậy cần phải nghiên cứu tìm ra quy luật phát triển của mỗi dòng trong điều kiện diễn biến nhiệt độ tại từng thời điểm cụ thể của mỗi vùng, để đảm bảo sản xuất thành công hạt dòng TGMS.

C.X. Mao và S.S. Virmani (2002), trong nghiên cứu về sản xuất hạt lai và nhân các dòng bố mẹ đã đưa ra nhận xét: để nâng cao năng suất và độ thuần của hạt lai F_1 và các dòng bất dục cần phải đặc biệt quan tâm các vấn đề dưới đây:

- * Phải xây dựng quy trình sản xuất phù hợp với điều kiện của từng vùng hoặc từng nước.

- * Phải tìm ra vùng sản xuất phù hợp để có thể sản xuất hạt F_1 hoặc nhân dòng bất dục đực trên diện rộng.

- * Phải đào tạo nâng cao kỹ xảo cho người sản xuất hạt giống hoặc các kỹ thuật viên.

- * Phải lựa chọn kỹ thuật sản xuất hạt trên cơ sở điều kiện môi trường của từng nước hay từng vùng.

- * Phải cải tiến phương pháp quản lý chăm sóc ruộng sản xuất hạt giống bao gồm cả việc quản lý sâu bệnh hại.

- * Phải chọn tạo ra các dòng bất dục bao gồm cả CMS và TGMS có tỷ lệ thụ phấn chéo cao và có khả năng chống chịu sâu bệnh.

* Phải luôn chọn thuần dòng mẹ và cả dòng cho phấn.

* Phải xây dựng tiêu chuẩn quốc gia về độ thuần của giống.

Tiếp thu các thành tựu khoa học của thế giới, đặc biệt là của Trung Quốc trong lĩnh vực lúa lai. Dựa vào kết quả nghiên cứu nhiều năm của bộ môn, chúng tôi đưa ra quy trình kỹ thuật để nhân dòng TGMS. Tuy nhiên, để đảm bảo sự thành công cho việc nhân dòng bất dục và sản xuất hạt lai F_1 , cần phải nghiên cứu nắm bắt các nội dung sau và áp dụng một cách linh hoạt cho từng dòng trên từng điều kiện cụ thể.

Quy trình sản xuất hạt TGMS tại khu vực đồng bằng sông Hồng

a) Nghiên cứu và nắm vững các tính trạng di truyền và nông sinh học của các dòng TGMS. Đặc biệt là số lá, thời gian từ gieo đến trổ, tỷ lệ thờ vôi nhụy.... để sử dụng chúng một cách hợp lý.

b) Phải bố trí thí nghiệm với nhiều thời vụ khác nhau (mỗi thời vụ nên cách nhau 5 hoặc 10 ngày) để xác định ngưỡng chuyển hoá hữu dục. Không nhất thiết phải gieo cấy quanh năm (đối với các dòng TGMS thuần) mà chỉ cần cho lúa trổ vào 15/3-30/4 và từ ngày 1-30/11 hàng năm. Kết hợp theo dõi nhiệt độ hàng ngày tại khu vực và tại lô thí nghiệm (nhiệt độ tối đa, nhiệt độ trung bình và nhiệt độ tối thiểu).

c) Nghiên cứu quy luật phát triển bông non và độ dài bông non của đánh chính để quyết định mức tưới nước phù hợp, nếu giai đoạn phân bào giảm nhiễm có nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp so với ngưỡng chuyển hoá hữu dục.

- Thời gian xử lý nước cho ruộng sản xuất TGMS ít nhất phải kéo dài 7 ngày và tối đa là 10 ngày. Sau khi mức nước đạt độ cao của bông non dành chính thì tiến hành cho tưới theo cách cấp lớn hơn thoát. Nếu mức thoát nhanh hơn, mức tưới sẽ ở dưới đầu bông, ảnh hưởng đến phần đầu bông non dành chính. Hàng ngày chỉ tưới khi nào nhiệt độ cao hơn ngưỡng chuyển hoá hữu dục. Thường từ 10 giờ -16 giờ mỗi ngày.

d) Trong điều kiện đồng bằng sông Hồng nên sản xuất hạt TGMS vào vụ xuân như vậy lúa trải qua giảm phân (meios) vào lúc nhiệt độ mát, trở vào lúc nhiệt độ tương đối cao thuận lợi cho làm hạt. Thời vụ này dễ dàng cách ly thời gian với các trà lúa khác, bớt bị tấn công bởi chim, chuột...vụ thu đông lúa sẽ trở vào lúc nhiệt độ thấp hơn do đó quá trình chín rất chậm. Thời vụ này đặc biệt khó khăn cho bảo vệ vì trên đồng ruộng không có giống nào tồn tại nên chịu sự phá hoại của côn trùng, động vật hoang dại và vật nuôi.

e) Phương pháp nuôi cấy mô là công cụ hữu hiệu để làm tăng hệ số nhân của các dòng TGMS, đặc biệt là các dòng mới chọn tạo.

*, *Cứu phôi*: Môi trường tốt nhất là sử dụng 1/2 MS không có điều hoà sinh trưởng. Tuổi phôi dùng cho nuôi cấy từ 8-14 ngày sau thụ tinh. Cứu phôi để tận dụng các hạt non khi thu hoạch để cung cấp vật liệu cho chu kỳ gieo trồng tiếp theo đặc biệt là cung cấp vật liệu sạch cho nuôi cấy lớp mỏng tế bào (LMTB).

*, *Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng*: Môi trường nuôi cấy là MS +4 mg/l BAP + 2mg/l Kinetin. Bằng kỹ thuật này có thể thu tỷ lệ tái sinh là 500000 lần trong thời gian 8 tuần.

*, *Nuôi cấy hoa lúa non*: Môi trường tạo mô sẹo là MS + 2mg/l 2,4D + 0,2mg/l IAA + 0,2 mg/l Kinetin + 500mg Casein Hidrolyrate. Môi trường tái sinh là MS +2mg/l Kinetin +0,2 mg/l IAA + 800mg Casein Hidrolyrate. Tất cả các hoa non của các dòng ở giai đoạn bước II đến IV đều có thể tận dụng để nuôi cấy. Hệ số nhân rất lớn, từ 1 hoa có thể cho 3 đến 5 chồi sau 8 tuần nuôi cấy.

*, *Nuôi cấy lớp mỏng tế bào (LMTB)*: Toàn bộ phần thân non của cây con, chồi non đều được sử dụng làm mẫu vật cho nuôi cấy. Môi trường để tạo mô sẹo và phôi vô tính là môi trường MS +2 mg/l 2,4D + 1mg/l IAA + 500mg Casein Hidrolyrate +100mg/l Myo-Inositol. Môi trường tái sinh chúng tôi sử dụng giống như nuôi cấy hoa non. Đây là toàn bộ các khâu chính cần thiết cần phải áp dụng để nhân và sản xuất hạt TGMS đạt năng suất trên 40%.

f) Có thể kéo dài thời gian nuôi cấy cây con hoàn chỉnh trong buồng nuôi với nhiệt độ là $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ trong thời gian 60 ngày với tất cả các dòng TGMS. Sau khi đưa ra đồng các dòng cho tỷ lệ kết hạt trên 90%, tuy nhiên khả năng đẻ nhánh rất kém, lúa đi vào phát triển bông và trổ ngay.

Với các giải pháp trên, từ năm 1996 đến nay, tất cả các dòng bất dục TGMS của Bộ môn chúng tôi đều được nhân trong điều kiện tự nhiên và cho tỷ lệ kết hạt từ 35% đến 70%. Kết quả nghiên cứu này đã được Hội đồng Khoa học bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận là tiến bộ kỹ thuật và cho phép ứng dụng rộng rãi tại Hội nghị Khoa học toàn quốc tháng 8 năm 2000.

III.5. Chọn tạo các tổ hợp lúa lai hai dòng

Từ năm 1992, lúa lai đã được gieo trồng ở nước ta và năng suất được nâng lên qua các năm. Nhưng các giống được dùng trong sản xuất chủ yếu vẫn là các tổ hợp lai hệ 3 dòng, chỉ có một vài tổ hợp lai 2 dòng được gieo cấy trên diện hẹp ở một số tỉnh trong năm 1999-2002. Tuy nhiên lúa lai hai dòng đã thể hiện một số ưu điểm hơn lúa lai ba dòng về năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu. Để mau chóng có được một số tổ hợp hai dòng phục vụ sản xuất, trong những năm qua các cán bộ khoa học và cán bộ nghiên cứu thuộc các đơn vị trong và ngoài Bộ Nông nghiệp và PTNT đã tiến hành nghiên cứu, chọn tạo các dòng TGMS và phát triển một số tổ hợp lai có triển vọng (bảng 14). Giống lúa lai hai dòng mang tên TM4 là một trong những giống lai có triển vọng nhất. Những số liệu trình bày tại đây là kết quả chọn tạo giống lai TM4.

- Dòng TGMS 11S do Bộ môn Di truyền Tế bào và Lai xa chọn tạo ra được dùng làm dòng mẹ trong tổ hợp lai.

- Dòng MH86, một dòng nhập nội được dùng làm dòng cho phấn. Cả hai dòng đều thuộc loài phụ *indica*.

III.5.1. Đánh giá các đặc tính nông sinh học của dòng mẹ

III.5.1.1. Đánh giá đặc tính nông sinh học các dòng mẹ chọn tạo trong nước

Các đặc tính di truyền của dòng bắt dục được quan sát cẩn thận qua các vụ trong nhiều năm. Số liệu bảng 13 cho thấy chiều cao của dòng 11S là 75,8cm, tổng số lá 14, thời

gian sinh trưởng dao động từ 68-90 ngày. Năng suất hạt tự thụ đạt 4,5 tấn/ha trong điều kiện vụ thu đông và vụ xuân năm 1999-2001. Giai đoạn nhạy cảm nhiệt độ là ngày thứ 13 đến 19 trước khi trổ. Ngưỡng chuyển hoá hữu dục là 25°C. So sánh với tiêu chuẩn của một dòng TGMS do Viện Long Ping đưa ra thì dòng VN-01 và 11S hoàn toàn đáp ứng và là các dòng có triển vọng. Đặc biệt dòng 11S có dạng hạt dài, trong, chất lượng gạo cao nên các tổ hợp lai có 11S tham gia đều có chất lượng gạo cải thiện hơn các giống lai khác.

Bảng 13: Các tính trạng chính của một số dòng TGMS

Các tính trạng	11S	VN-01	103S
Chiều cao cây (cm)	75,8	69,7	70,0
Số lá	14,0	11,5-12,5	-
Thời gian từ gieo đến trổ			
- Trong sản xuất hạt TGMS tự thụ	78 - 90	55-59	-
- Trong sản xuất F1	68	45	-
Giai đoạn nhạy cảm (số ngày trước khi trổ)	13 - 19	12-18	-
Ngưỡng chuyển hoá hữu dục (°C)	25,0	24	24
Số bông trên khóm	7,6	8,5	-
Số hoa trên bông	99,9	75,5	160
Tỷ lệ thụ phấn chéo (%)	63,8	50-57	>90
Tỷ lệ tự thụ trong nhân dòng TGMS (%)	40,97	38,0	>80
Năng suất hạt tự thụ (tấn/ha)	4.5	2,7	4,25

Bảng 14: Các giống lúa lai hai dòng được chọn tạo tại Việt Nam

TT	Tên tổ hợp	Cơ quan chọn tạo	TGST (ngày/vụ mùa)	Tiềm năng năng suất (tấn/ha)
1	VN-01/D212	Bộ môn Di truyền Tế bào và Lai xa, Viện DTNN	95-100	7,5
2	11S/MH86 (TM4)	"	100-105	9,3
3	7S/QC1 (TM3)	"	110-115	9,5
4	6S/ MH86 (TM2)	"	90-95	7,5
5	11S/DT.122 (TM9)	"	90-95	7,8
6	Việt Lai 20	Đại học Nông nghiệp I	90-95	8,0

III.5.1.2. Đánh giá dòng Peiai 64S

Trong mấy năm qua, lúa lai hai dòng được nhập nội và sản xuất tại Việt Nam với tốc độ khá nhanh. Các tổ hợp lai hai dòng chủ yếu là có Peiai64S làm dòng mẹ. Kết quả nghiên cứu và đánh giá của nhiều tổ chức và cá nhân cho thấy, dòng Peiai64S tương đối đa dạng về kiểu hình và di truyền. Để sử dụng dòng TGMS này một cách hiệu quả, chúng tôi đã triển khai một số nghiên cứu và các kết quả thu được sẽ giới thiệu dưới đây:

Nguồn giống được thu thập từ nhiều nơi khác nhau như Đại học Nông nghiệp I, Trung tâm Khuyến nông Nam Định, Bộ môn Di truyền và Công nghệ Lúa lai, Dự án với A15, tỉnh Quảng Ninh. Sau khi thu thập, mẫu hạt được nghiên cứu, nhận dạng trên cơ sở hình thái của hạt (màu sắc, kích thước, màu vỏ hạt, độ mở vỏ trấu, khối lượng

1000 hạt...) và phân thành 3 dạng chính được đặt tên là Peiai64s-1, 2 và 4.

Thí nghiệm đồng ruộng được tiến hành theo phương pháp đánh giá tập đoàn, cấy một dảnh theo phương pháp tuần tự không nhắc lại. Thí nghiệm được tiến hành trong hai thời vụ xuân sớm và mùa sớm để khẳng định ngưỡng chuyển hoá hữu dục của dòng Peiai64s.

Đánh giá các tính trạng hình thái bằng quan trắc và đo đếm trên đồng ruộng.

Kiểm tra độ hữu dục phần bằng nhuộm màu hạt phần trong dung dịch I-K I 1% rồi soi và chụp ảnh dưới kính hiển vi quang học.

Sau khi quan sát, thu thập số liệu và đánh giá, chúng tôi xác định được các nguồn đã thu thập gồm 3 dạng:

Peiai 64s-1: Gồm nguồn từ Đại học Nông nghiệp I + Nguồn do Viện Di truyền tự thu thập + nguồn từ Trung tâm Khuyến nông Nam Định. Đây là dạng điển hình của Peiai 64s.

Bảng 15: Thời gian trải qua các giai đoạn sinh trưởng của các dòng Peiai64S

	Ngày gieo	Ngày cấy	Ngày trở 30%	Tổng TGST
Peiai64s-1	3-1-99	26-2-99	15-4-99	132
	3-3-99	17-3-99	19-5-99	110
Peiai64s-2	3-1-99	26-2-99	14-4-99	135
	3-3-99	17-3-99	19-5-99	107
Peiai64s-4	3-1-99	26-2-99	17-4-99	132
	3-3-99	17-3-99	20-5-99	109

Peiai 64s-2: Nguồn từ A15.

Peiai 64s-4: Nguồn từ Quảng Ninh.

Các kết quả sẽ được giới thiệu theo 3 dạng đã mô tả trên.

Bảng16: Một số tính trạng nông sinh học của các dạng nghiên cứu

Tính trạng theo dõi	Peiai64s-1	Peiai64s-2	Peiai64s-4
Cao cây (cm)	67	67	64
Tổng số lá	14,0	14,5	13
Dài lá đồng (cm)	35,7	27,5	27,0
Màu thân non	Xanh đậm	Xanh đậm	Xanh đen
Màu bẹ lá đồng	Xanh đậm	Xanh đậm	Xanh
Màu tai lá	Tím	Tím	trắng
Màu thìa lia lá	Trắng	Trắng	Trắng
Màu mỏ hạt	Tím	Tím	Tím
Màu vôi nhụy	Tím	Tím	Tím
Mức độ ấp bẹ (%)	30-40	30-40	>60
Khối lượng 1000 hạt (g)	15,5-16,0	17,0-18,0	14,0

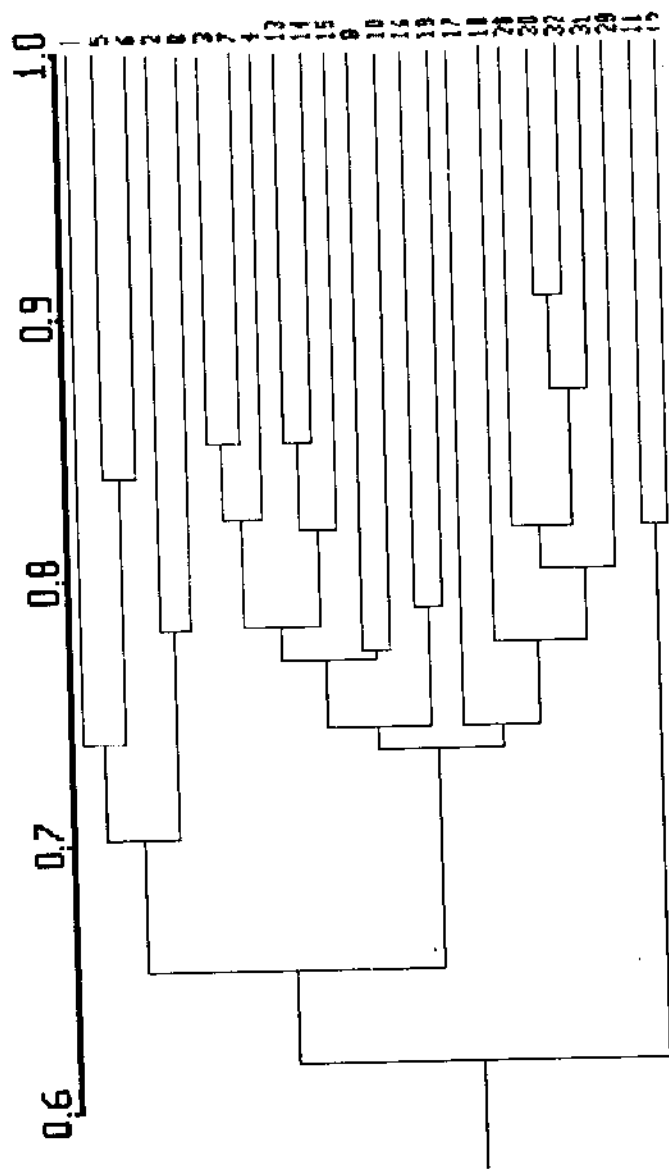
III.5.2. Phân tích khoảng cách di truyền bằng chỉ thị phân tử (RAPD)

Bên cạnh việc đánh giá các dòng bất dục đực TGMS và các dòng cho phấn bằng cách quan sát các tính trạng hình thái, chúng tôi còn sử dụng chỉ thị phân tử để phân tích khoảng cách di truyền giữa các vật liệu chọn giống làm cơ sở chọn các cặp lai. Phân tích sự đa dạng di truyền bằng các

chỉ thị hình thái không thể mang lại độ chính xác cao, đôi khi chúng ta không thể phân biệt một số sai khác giữa các vật liệu chọn giống bằng phương pháp này. Mặt khác với trợ giúp của chỉ thị phân tử, cùng một lúc có thể phân tích nhiều mẫu mà thời gian phân tích chỉ cần vài ngày.

Kết quả phân tích DNA của các dòng lúa có kiểu di truyền khác nhau: Độ tương đồng di truyền của 24 dòng giống lúa bố mẹ khác nhau được phân tích bằng kỹ thuật RAPD với 16 môi khác nhau. Kết quả của phản ứng PCR đã chỉ ra rằng mỗi mẫu cho 6-10 băng ADN có độ dài từ 100 đến 4.000 cặp bazơ và tổng số đã thu được 270 chỉ thị RAPD. Kết quả phân tích bằng chương trình NTSYS-pc đã cho thấy độ tương đồng từ 0.6 đến 0.8 cho các tổ hợp lai có ưu thế lai cao. Nhìn vào sơ đồ hình cây (dendogram), chúng ta có thể thấy rất rõ mối quan hệ di truyền giữa các vật liệu phân tích. Từ đó chúng ta chọn các cặp lai có khoảng cách di truyền phù hợp cho ưu thế lai cao (hình 19).

Trong vòng 10 năm tiến hành nghiên cứu và chọn tạo giống lúa lai, các nhà nghiên cứu và chọn tạo giống Việt Nam đã chọn tạo được một số tổ hợp lai đang được thử nghiệm và sản xuất ở một số vùng sinh thái khác nhau trong cả nước (bảng 14). Tuy vẫn còn nhiều vấn đề cần phải tiếp tục giải quyết và hoàn thiện, song nhìn lại quãng đường 10 năm qua, chúng ta cũng thấy rằng tốc độ và thành tựu về lúa lai hai dòng của Việt Nam là nhanh hơn hẳn lúa lai ba dòng.



Hình 19: Đồ thị hình cây biểu thị quan hệ di truyền giữa các vật liệu nghiên cứu

III.6. Sản xuất thử hạt lai F_1 và năng suất

Trên cơ sở kết quả đánh giá của thí nghiệm so sánh cơ bản một số tổ hợp trong vụ xuân và mùa năm 1997, 1998, 1999. Năm 2000-2002, chúng tôi tiến hành sản xuất hạt lai F_1 của một số tổ hợp có triển vọng 11S/MH86 và 7S/QC1 năng suất hạt F_1 của các cặp lai đều đạt trên 2 tấn /hecta. Đặc biệt do thời gian sinh trưởng của các dòng bố và mẹ tương tự nhau nên dễ điều khiển cho trổ trùng khớp và giảm mức sử dụng một số chất điều tiết nở hoa.

Quy trình sản xuất hạt F_1 của một số tổ hợp có triển vọng đã được hoàn thiện và năng suất hạt lai của các tổ hợp đạt khá cao. Tuy nhiên việc sử dụng chúng trong điều kiện sản xuất lớn vẫn cần phải nghiên cứu hoàn thiện.

III.7. Năng suất và yếu tố năng suất của các tổ hợp lai hai dòng

III.7.1. Năng suất và các yếu tố năng suất trong thí nghiệm so sánh cơ bản

Trong thí nghiệm so sánh giống, chúng tôi sử dụng tổ hợp hai dòng (Bồi tập Sơn Thanh) của Trung Quốc làm đối chứng.

Kết quả thu được cho thấy, TM4 và một số tổ hợp chọn tạo trong nước có các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất tương tự như Bồi tập Sơn thanh. Sự chênh lệch chỉ nằm trong phạm vi sai số. Riêng đối chứng có số hạt/ bông cao hơn nhưng khối lượng ngàn hạt lại quá thấp so với TM4 và các tổ hợp khác. Các tổ hợp chọn tạo trong nước có hạt gạo dài, trong, chất lượng gạo vượt xa một số tổ hợp nhập nội.

Bảng 17: Các dòng giống sử dụng phân tích đa hình DNA

TT	Tên dòng	Nguồn gốc
1	29.1	Dòng thuần chọn từ phép lai <i>indica/japonica</i>
2	34.1.2	Dòng thuần chọn từ phép lai <i>indica/javanica</i>
3	56.1	Dòng thuần chọn từ phép lai D.4 x D.18
4	122	Dòng thuần chọn từ phép lai <i>indica/japonica</i>
5	221.3	Dòng thuần chọn từ phép lai <i>indica/indica</i>
6	221.4	Dòng thuần chọn từ phép lai <i>indica/indica</i>
7	291.1	Dòng thuần <i>indica/japonica</i>
8	372	Dòng thuần thuộc loài phụ <i>javanica</i>
9	18	<i>indica/javanica</i> (dòng thuần)
10	QC1	Dòng thuần (<i>indica</i>)
11	Cosihicari	Dòng thuần (<i>japonica</i>)
12	Akitacomachi	Dòng thuần (<i>japonica</i>)
13	VN-01	(TGMS) <i>indica</i>
14	116	Dòng thuần (<i>japonica</i>)
15	212	Dòng thuần (<i>indica</i>)
16	12A	Dòng thuần (<i>japonica</i>)
17	271	<i>indica</i>
18	DV.108	Dòng thuần (<i>indica</i>)
19	D.77	Dòng thuần (<i>indica</i>)
26	11S/ MH.86	Con lai F1
28	6S	TGMS (<i>indica</i>)
29	8S	TGMS (<i>indica</i>)
31	11S	TGMS (<i>indica</i>)
32	12S	TGMS (<i>indica</i>)

Các giống lúa lai hai dòng TM2 (6S/Q), TM3 (11S/QC1), TM4 (11S/MH86) đã tham gia mạng lưới khảo nghiệm quốc gia năm 2000, 2001. Trên tất cả các điểm khảo nghiệm, TM4 đều có năng suất cao và các yếu tố cấu

**Bảng 18. Ma trận tương đồng NTSYS-SIMQUAL của 24 mẫu giống
sử dụng 16 mối khác nhau**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	26	28	29	31	32
1.	1.000																							
2.	0.735	1.000																						
3.	0.778	0.654	1.000																					
4.	0.728	0.646	0.695	1.000																				
5.	0.695	0.728	0.654	0.695	1.000																			
6.	0.782	0.798	0.765	0.765	0.840	1.000																		
7.	0.753	0.630	0.852	0.802	0.630	0.749	1.000																	
8.	0.626	0.782	0.543	0.527	0.658	0.654	0.510	1.000																
9.	0.691	0.601	0.774	0.790	0.609	0.679	0.774	0.514	1.000															
10.	0.728	0.638	0.791	0.778	0.630	0.675	0.735	0.519	0.774	1.000														
11.	0.609	0.642	0.642	0.658	0.617	0.613	0.167	0.605	0.646	0.658	1.000													
12.	0.609	0.634	0.609	0.626	0.601	0.580	0.584	0.613	0.630	0.634	0.819	1.000												
13.	0.741	0.634	0.823	0.807	0.658	0.745	0.815	0.531	0.770	0.774	0.663	0.588	1.000											
14.	0.741	0.650	0.774	0.765	0.675	0.753	0.790	0.572	0.753	0.741	0.646	0.580	0.852	1.000										
15.	0.712	0.613	0.753	0.770	0.621	0.691	0.745	0.535	0.782	0.770	0.634	0.609	0.840	0.798	1.000									
16.	0.691	0.609	0.749	0.749	0.634	0.687	0.758	0.506	0.720	0.708	0.679	0.671	0.737	0.737	0.741	1.000								
17.	0.733	0.658	0.765	0.741	0.675	0.753	0.716	0.597	0.761	0.700	0.630	0.613	0.745	0.737	0.716	0.728	1.000							
18.	0.737	0.654	0.761	0.728	0.638	0.700	0.753	0.576	0.700	0.745	0.601	0.576	0.765	0.757	0.679	0.683	0.741	1.000						
19.	0.671	0.572	0.753	0.761	0.646	0.617	0.720	0.519	0.774	0.753	0.700	0.642	0.765	0.774	0.753	0.790	0.683	0.720	1.000					
20.	0.744	0.703	0.786	0.761	0.637	0.724	0.761	0.600	0.748	0.728	0.641	0.617	0.773	0.748	0.736	0.683	0.724	0.753	0.695	1.000				
28.	0.733	0.683	0.741	0.741	0.683	0.737	0.716	0.556	0.712	0.757	0.597	0.564	0.770	0.753	0.733	0.748	0.761	0.798	0.708	0.732	1.000			
29.	0.715	0.625	0.724	0.724	0.617	0.195	0.699	0.539	0.687	0.724	0.604	0.596	0.769	0.744	0.716	0.703	0.736	0.765	0.724	0.705	0.823	1.000		
31.	0.732	0.63	0.740	0.740	0.683	0.736	0.716	0.555	0.711	0.757	0.596	0.563	0.769	0.753	0.732	0.711	0.761	0.798	0.707	0.781	0.814	0.851	1.000	
32.	0.707	0.650	0.798	0.773	0.658	0.736	0.773	0.547	0.744	0.740	0.596	0.572	0.777	0.753	0.732	0.720	0.728	0.806	0.699	0.823	0.888	0.851	0.773	1.000

Bảng 19: Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của các tổ hợp lai
(Vụ mùa năm 2000 và 2001 tại Hà Nội)

Tổ hợp lai	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Cao cây (cm)	Số bông/ khóm	Chiều dài bông (cm)	Chiều dài lá đồng (cm)	Tổng số hạt chắc/ bông	% hạt lép	Khối lượng 1000 hạt (g)	NS hạt (T/ha)
11S/MH86	105	95,0	5,5	23,2	28,6	108,0	4,5	30,0	9,80
7S/QC1	115	98,0	5,8	24,5	29,0	115,0	5,2	29,7	10,32
11S/DT.122	90	100	7,5	24,0	25,1	120,5	5,7	26,3	8,72
6S/QC1	105	100	5,8	25,0	30,4	119,5	5,9	28,7	8,80
Peia164S/ DT.122	90	90,8	8,2	22,1	24,5	135,2	6,8	23,4	8,60
Peia164S/ Sơn thanh	105	93,7	5	25,7	32,0	164,3	11,4	23,2	10,48
LSD: 0.05									0,42

Ghi chú: mật độ cây 55 khóm/m²

thành năng suất cũng tốt hơn các giống lai khác trong cùng điều kiện canh tác (bảng 20). So với giống đối chứng TG1 (lúa lai ba dòng), giống TM4 có năng suất xấp xỉ. Về khả năng chống chịu TM4 thuộc loại kháng vừa một số sâu bệnh hại chính ở lúa. Riêng về chất lượng gạo, TM4 có chất lượng gạo hơn hẳn, có kiểu hạt dài, trong và hàm lượng amiloza trung bình nên cơm mềm không dính.

Bảng 20: Năng suất của các tổ hợp lai tại các điểm khảo nghiệm (tạ/hecta)

Tổ hợp lai	Hưng Yên	Hải Dương	Thanh Hóa	Vĩnh Phúc	NSTB
TG1 đối chứng (ba dòng)	67,9	59,7	68,2	60,0	64,0
6201	49,1	61,0	57,8	41,0	52,2
6111	56,8	54,0	64,0	46,0	55,2
HYT82	58,6		67,0	56,0	60,5*
TM2	45,3				45,3
TM3		52,0	63,3	50,0	55,1
TM4	67,6	62,2		52,0	60,6*
ĐV4	48,5	58,0		41,0	49,2
B.ưu ĐV1		40,0		45,0	42,5
Việt lai 55		69,0*	55,0	39,7*	54,6
TH1	34,0	62,0*	59,8	46,0*	50,6
CV%	4,5	3,3	7,6	5,2	
LSD 0,05	4,27	3,21	7,80	4,63	

III.7.2 Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất trong khảo nghiệm quốc gia

Tổ hợp TM4 đã tham gia các thí nghiệm so sánh chuẩn của Trung tâm Nghiên cứu lúa lai, Viện KHKTNNVN và cũng đã được đánh giá là một trong những tổ hợp có triển vọng nhất.

Tổ hợp lai hai dòng TM4 (11S/MH.86) là một trong các con lai có triển vọng nhất qua đánh giá trong các thí nghiệm so sánh giống cũng như đánh giá của Trung tâm khảo Kiểm nghiệm Giống cây trồng Trung ương. Các đặc tính ưu việt của nó là năng suất cao, thời gian sinh trưởng ngắn, khả năng chống chịu sâu bệnh khá, chất lượng gạo cao, đặc biệt là dễ sản xuất hạt F_1 . TM4 đã được bộ môn Di truyền Tế bào và Lai xa chọn tạo và hoàn thiện công nghệ sản xuất dòng TGMS và hạt lai F_1 , trong thời gian tới chắc chắn sẽ được mở rộng vào sản xuất.

Bảng 21: Khả năng chống chịu sâu bệnh của các con lai

Tổ hợp lai	Sâu cuốn lá	Bệnh đạo ôn	Bệnh khô vằn	Bệnh bạc lá	Khả năng chống đổ	Khả năng chịu rét
TG1 đ/c	1-3	0-1	3-5	1-3	3	1
6201	1-3	0-1	3-5	3-5	3	1
6111	1-3	0-1	3-5	1-3	3	3
HYT82	1-3	0-1	1-3	1-3	3	3
TM2	3-5	0-1	3-5	3-5	1	3
TM3	1-3	0-1	5-7	3-5	3	1
TM4	1-3	0-1	3-5	3-5	5	1
ĐV4	1-3	0-1	5-7	3-5	3	3
B.ưu ĐV1	1-3	0-1	5-7	0-1	3	3
Việt lai 55	1-3	0-1	5-7	0-1	1	1
TH1	1-3	0-1	1-3	1-3	1	3

Nguồn: TT. Khảo kiểm nghiệm giống

Chương III

KỸ THUẬT SẢN XUẤT HẠT LAI F_1

Sản xuất hạt lai F_1 là một khâu vô cùng quan trọng mang tính quyết định đến sự thành công của việc phát triển lúa lai thương mại. Kỹ thuật sản xuất hạt lai F_1 là một quy trình công nghệ phức tạp liên quan đến nhiều lĩnh vực như trồng trọt và canh tác, sinh lý và mối tương tác giữa cơ thể thực vật với môi trường. Do vậy trong quy trình sản xuất hạt F_1 cần phải đề cập tương đối toàn diện đến các lĩnh vực có ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng hạt giống.

I. NHỮNG LỰA CHỌN CHIẾN LƯỢC TRONG SẢN XUẤT HẠT LAI F_1

Để thực hiện việc sản xuất hạt lai F_1 thành công trong một quốc gia hay trong một địa phương, thì việc xác định phương hướng sản xuất là rất cần thiết. Từ những kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học IRRI và Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam... người ta xác định các khâu trong chiến lược sản xuất hạt lai F_1 đạt năng suất cao như sau:

1. Chọn các dòng bố và mẹ có thời gian nở hoa trùng khớp.
2. Chọn dòng mẹ có vòi nhụy cái dài và tỷ lệ vươn ra ngoài vỏ trấu cao, thời gian nở hoa kéo dài và độ mở vỏ trấu lớn.
3. Chọn các dòng cho phần có số lượng hạt phần trong một bao phần nhiều và để đạt yêu cầu trên thì mật độ hoa lúa/m² là 2000-3000.

4. Điều khiển thời gian gieo sao cho dòng mẹ và dòng bố trổ, nở hoa trùng khớp.

5. Trồng hàng bố và hàng mẹ có tỷ lệ hợp lý sao cho tỷ lệ hoa mẹ và hoa bố trên đơn vị diện tích là 3,5:1

6. Dùng các dòng mẹ và dòng cho phấn có lá dòng ngắn hoặc nằm ngang, nếu không có thể dùng biện pháp cắt bớt lá dòng để tăng khả năng thụ phấn chéo.

7. Sử dụng GA₃ với liều lượng hợp lý để kéo dài thời gian nở hoa và kéo dài cổ bông để trổ thoát.

8. Trồng hàng bố, mẹ vuông góc với hướng gió để tăng khả năng thụ phấn chéo. Tiến hành thụ phấn bổ khuyết bằng kéo dây hoặc rung bằng gậy khi tốc độ gió nhỏ hơn 2,5 m/giây.

9. Chọn thời điểm nở hoa tốt nhất cho ruộng sản xuất hạt lai.

Các bước chính trong sản xuất hạt lai F_1 :

1. Chọn ruộng sản xuất hạt lai F_1

Để gieo cấy bất kỳ giống lúa nào, thì yêu cầu về ánh sáng, độ phì của đất và nước đều như nhau. Tất cả các giống lúa đều đòi hỏi:

Đất tốt.

Tưới tiêu phù hợp.

Ánh sáng đầy đủ.

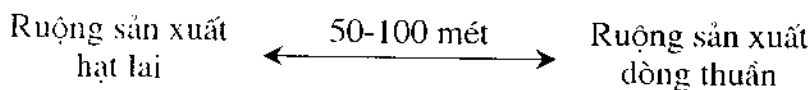
Quản lý sâu và bệnh tốt.

Ruộng cho nhân dòng bất dục hoặc sản xuất hạt lai cần thêm một điều kiện quan trọng nữa là phải được cách ly với

ruộng sản xuất các giống khác để đảm bảo độ thuần di truyền của hạt giống. Hạt phấn của các giống khác cạnh ruộng nhân dòng EGMS hoặc sản xuất hạt lai sẽ làm giảm chất lượng của hạt giống. Ruộng sản xuất hạt giống phải được cách ly với các giống khác bằng các phương pháp sau:

Cách xa ruộng sản xuất các giống khác (cách ly không gian). Thời gian nở hoa lệch với các giống khác (cách ly thời gian). Có bức chắn tự nhiên hoặc nhân tạo.

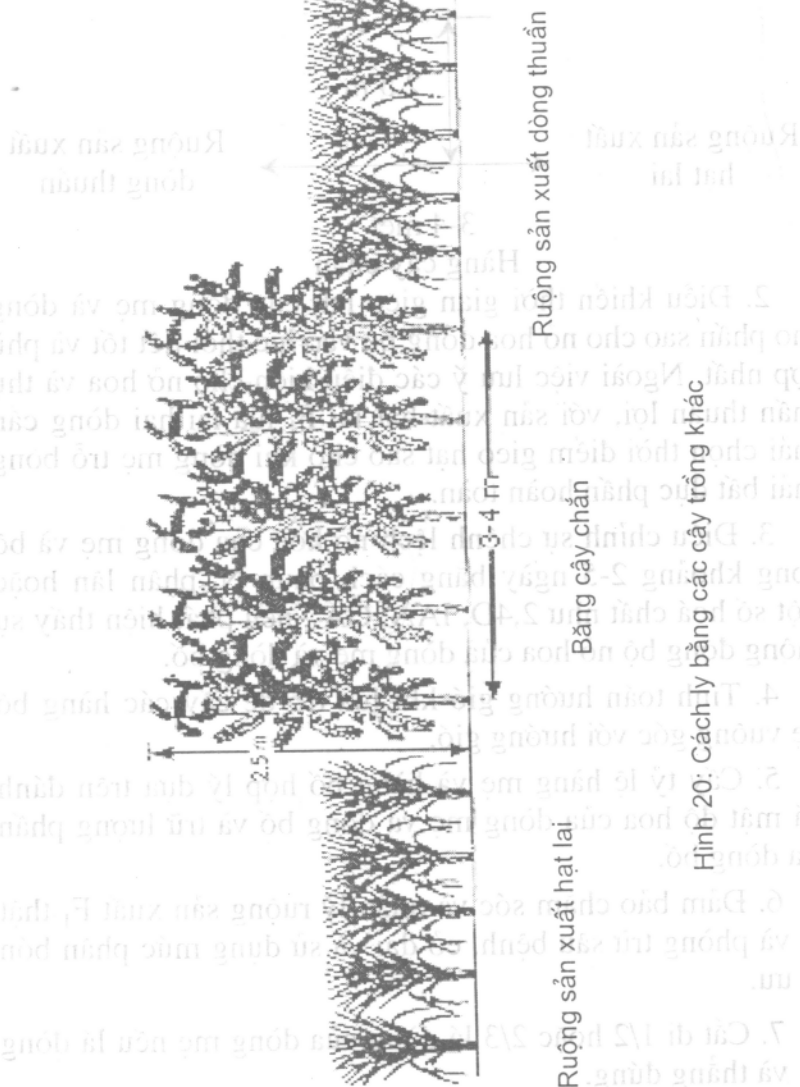
Cách ly không gian: Vì hạt phấn lúa nhỏ, nhẹ nên có thể bay đi xa hàng trăm mét trong không khí và duy trì sức sống từ 3-5 phút. Do vậy không được trồng các giống lúa khác cách ruộng sản xuất hạt lai dưới 100 mét. Có thể rút khoảng cách trên xuống 50 mét nếu ít nhất có 10 hàng xung quanh ruộng sản xuất hạt lai được cấy dòng cho phấn. Có thể cách ly bằng việc trồng dòng bố xung quanh dòng mẹ trong phạm vi 100 mét.



Cách ly thời gian: Xác định thời gian gieo để thời kỳ nở hoa của các dòng bố mẹ không trùng với các giống thuần khác ít nhất 3 tuần trong khoảng cách 100 mét. Như vậy sẽ tránh được lẫn tạp. Nếu giống mẹ và các giống xung quanh trở trùng thì khoảng cách 100 mét để cách ly buộc phải giữ.

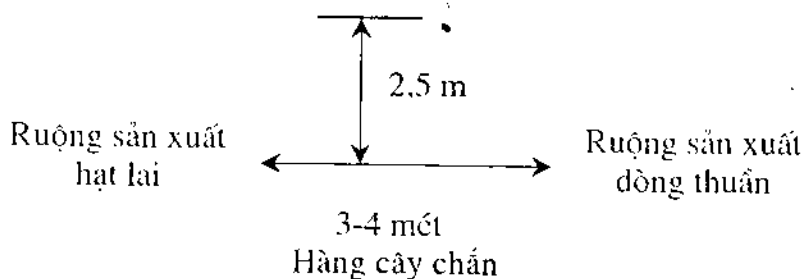
Cách ly bằng vật chắn: Có thể dùng bất kỳ hàng rào chắn tự nhiên, nhân tạo hay cây trồng khác cao 2,5 mét để ngăn cản sự lẫn tạp phấn của các giống lúa khác trong phạm vi 100 mét. Nếu dùng đai cây trồng để cách ly cần có bề rộng 3-4 mét tùy thuộc vào các loại cây trồng khác nhau.

Như ngô cao cây, cây các loại khác là những hàng rào cách ly phân hợp (hình 20).



Hình 20: Cách ly bằng các cây trồng khác

Như ngô cao cây, cây cao lương, cây kê là những hàng rào cách ly phù hợp (hình 20).



2. Điều khiển thời gian gieo hạt của dòng mẹ và dòng cho phấn sao cho nở hoa đồng bộ vào lúc thời tiết tốt và phù hợp nhất. Ngoài việc lưu ý các điều kiện cho nở hoa và thụ phấn thuận lợi, với sản xuất hạt lai F_1 lúa lai hai dòng cần phải chọn thời điểm gieo hạt sao cho khi dòng mẹ trở bông phải bắt đực phấn hoàn toàn.

3. Điều chỉnh sự chênh lệch nở hoa của dòng mẹ và bố trong khoảng 2-5 ngày bằng cách phun N, phân lân hoặc một số hoá chất như 2,4D, IAA, GA_3 , nếu phát hiện thấy sự không đồng bộ nở hoa của dòng mẹ và dòng bố.

4. Tính toán hướng gió khi lúa trở để cấy các hàng bố mẹ vuông góc với hướng gió.

5. Cấy tỷ lệ hàng mẹ và hàng bố hợp lý dựa trên đánh giá mật độ hoa của dòng mẹ và dòng bố và trừ lượng phấn của dòng bố.

6. Đảm bảo chăm sóc và quản lý ruộng sản xuất F_1 thật tốt và phòng trừ sâu bệnh, cỏ dại và sử dụng mức phân bón tối ưu.

7. Cắt đi 1/2 hoặc 2/3 lá dòng của dòng mẹ nếu lá dòng dài và thẳng đứng.

8. Phun GA_3 với bình phun sương kích thước hạt rất nhỏ. Ngày đầu phun 1/3 lượng GA_3 khi 15-20% lúa trổ. Ngày sau đó phun tiếp lượng còn lại. Nếu sau 24 giờ mới mưa thì không phải phun lại.

9. Thụ phấn bổ khuyết khi thấy dòng bố tung phấn, chú ý không đánh gãy cổ bông.

10. Loại bỏ nghiêm khắc các cây lẫn ở thời kỳ đẻ nhánh, nở hoa và thu hoạch để đảm bảo không bị lẫn tạp ngay từ khi thụ phấn.

11. Thu hoạch riêng dòng bố, dòng mẹ kể cả khi đập, phơi và bảo quản.

II. NHỮNG KHÂU KỸ THUẬT THEN CHỐT ĐỂ SẢN XUẤT HẠT GIỐNG F_1 NẶNG SUẤT SIÊU CAO

Để sản xuất hạt lai F_1 của một tổ hợp nào đó thành công trước hết phải nắm vững thời gian sinh trưởng, tổng số lá và tổng tích ôn của mỗi giống bố mẹ rồi quyết định thời điểm gico hạt của từng dòng sao cho dòng bố và dòng mẹ trổ trùng khớp.

Vụ xuân, cơ sở để quyết định thời gian gico dòng bố và dòng mẹ dựa vào số lá là chính và sử dụng công thức dưới đây để tính thời gian gico chênh lệch giữa dòng bố và dòng mẹ:

$$Y = [R_n - (A_n - 3.5) \times X]$$

Trong đó:

Y: Khoảng thời gian giữa gieo dòng bố và dòng mẹ

R_n : Tổng số lá của dòng bố

A_n : Tổng số lá của dòng mẹ

X: Tỷ lệ ra lá (không thay đổi)

Vụ mùa chủ yếu dựa vào thời gian sinh trưởng của lúa bố và lúa mẹ mà quyết định thời điểm gieo mạ cho mỗi dòng.

Trên cơ sở nghiên cứu và phát hiện hai quy luật thời kỳ tung phấn cao điểm của lúa bố và thời kỳ nhạy cảm liên quan đến tỷ lệ thò vòi nhụy cao hay thấp của hoa mẹ, mà sử dụng các biện pháp kỹ thuật tương ứng để nâng cao tỷ lệ kết hạt một cách nhanh chóng, đưa năng suất hạt F_1 mỗi hecta lên trên 4.500 kg. Những khâu kỹ thuật then chốt là:

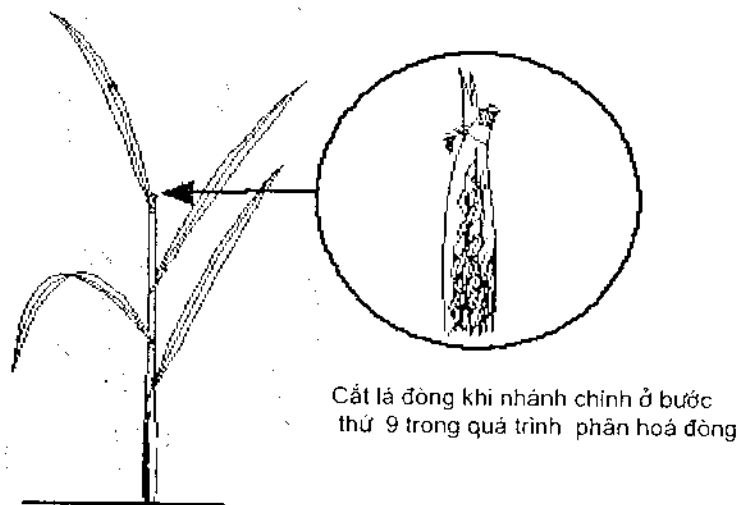
1. Điều chỉnh thời kỳ hoa nở

Trong thời kỳ hoa nở, tốt nhất là lúa mẹ nở hoa trước lúa bố 2 ngày. Nói chung, khái niệm trở trùng khớp nhiều người cho rằng trong sản xuất giống lúa lai F_1 tốt nhất là bố mẹ trở hoa cùng ngày, hay lúa mẹ nở hoa sớm hơn lúa bố một ngày. Thực tiễn sản xuất chứng minh tuyệt đại bộ phận cây bố ngay ngày trở bông đã lập tức nở hoa tung phấn và cơ bản kết thúc nở hoa ngay trong buổi sáng, còn cây mẹ thì ngay trong ngày trở bông chưa nở hoa mà ngày hôm sau tỷ lệ nở hoa chưa cao, lại thường nở hoa vào buổi chiều. Nếu như cây bố và cây mẹ bắt đầu trở bông cùng lúc, thì có nghĩa là lãng phí mất toàn bộ số hạt phấn của những hoa bố nở ngay hôm đó và phần lớn số hạt phấn của những hoa bố nở vào ngày hôm sau. Nếu ngay cả cây mẹ trở sớm hơn cây bố 1 ngày cũng vẫn lãng phí rất nhiều phấn bố (phấn của những hoa bố nở ngày đầu tiên). Ngoài ra hoa mẹ còn có tập tính thò vòi nhụy ra ngoài, ruộng giống lúa lai F_1 kết hạt chủ yếu là nhờ vòi nhị thò ra ngoài chờ thụ phấn. Để cho lúa mẹ trở sớm hơn lúa bố 2 ngày mới là phù hợp thời kỳ nở

hoa tốt nhất. Một mặt cây mẹ có thể dựa vào vòi nhị của những hoa nở trước và hoa nở vào ngày lúa bố trở bông để tiếp nhận số phấn hoa của số hoa bố nở và tung ra ngay hôm đó. Mặt khác còn dựa vào số vòi nhụy thò ra ngoài của hoa mẹ nở ngày hôm trước để tiếp nhận số phấn hoa của những hoa bố nở và tung ra trong cùng ngày. Từ đó mà nâng cao tỷ lệ lợi dụng hạt phấn bố đến mức cao nhất. Nghĩa là xác suất thụ phấn sẽ cao do diện tích núm nhụy được gia tăng trên quần thể lúa dòng mẹ. Ngoài ra tập tính nở hoa của dòng EGMS và dòng bố ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ kết hạt do vậy dòng EGMS và dòng bố phải nở hoa cùng lúc, dòng mẹ và dòng bố phải tung phấn cùng lúc trong ngày của giai đoạn nở hoa. Khả năng thụ phấn sẽ tăng nếu cả dòng mẹ và dòng bố có số lượng hoa nở lớn nhất trên một đơn vị diện tích trong một ngày, đảm bảo có số lượng hạt phấn tối đa rơi vào vòi nhụy để thụ tinh.

2. Loại bỏ trở ngại thụ phấn, tạo tư thế thụ phấn tốt nhất

Một nguyên nhân chủ yếu khiến tỷ lệ kết hạt thấp trong sản xuất giống lúa lai F_1 là do tình trạng áp bức của bông bất dục dục và sự cản trở truyền phấn của lá dòng. Những năm 70, ở Trung Quốc biện pháp để loại bỏ các trở ngại thụ phấn là cắt lá và bóc dòng. Ngày nay chúng ta vẫn có thể sử dụng kỹ thuật cắt lá dòng đối với các dòng mẹ có lá dòng đứng, cứng và dài (hình 21), mô tả giai đoạn cắt lá dòng tốt nhất khi đánh chính của mỗi khóm lúa đang ở bước 9 trong quá trình phân hoá dòng.



Hình 21: Thời điểm cắt lá đồng

Giữa những năm 80, nhờ tăng thêm lượng dùng axit giberrellic (GA_3), đã giải quyết được vấn đề áp bẹ và rút ra được bài học kinh nghiệm để xây dựng kỹ thuật không cắt lá, không bóc đồng, nâng cao nhanh chóng năng suất hạt lai F_1 . Nhưng góc lá đồng nhỏ của bông mẹ cản trở nghiêm trọng việc tung phấn của hoa bố vào hoa mẹ. Đây là vấn đề vẫn chưa được giải quyết hoàn toàn, nên ruộng sản xuất hạt lúa lai F_1 chưa thể đạt năng suất tối đa. Trên cơ sở tổng kết kinh nghiệm nhiều năm, tại Hồ Nam người ta đã giải quyết tương đối thành công vấn đề kỹ thuật rất khó khăn này. Một mặt thông qua biện pháp trồng trọt khống chế chiều dài lá đồng khoảng 17 ± 2 cm. Mặt khác dùng hoá chất kích thích tế bào của mô phân sinh biểu bì trên và dưới gối lá phân chia với tốc độ nhanh và rất khác nhau. Nên khi tế bào phân chia thì khối lượng mô biểu bì trên lớn hơn mô biểu bì

dưới, do tác dụng sức nặng bản thân của phiến lá, lá đồng sẽ tự động rủ xuống. Từ đó loại bỏ cản trở của lá đồng đối với việc tung phấn của hoa bố, tạo nên tư thế thụ phấn tốt nhất: với chiều dài lá đồng mẹ đạt khoảng 17 ± 2 cm, góc lá đồng $\geq 90^\circ$, cây bố cao hơn cây mẹ 15-20 cm.

3. Nâng cao tỷ lệ thò vòi nhụy và thể tích vòi nhụy

Tỷ lệ kết hạt do thụ phấn của vòi nhụy thò ra ngoài chiếm trên 75% tổng số hạt được thụ phấn. Là bộ phận cấu thành chủ yếu của năng suất ruộng giống lúa lai F_1 . Tỷ lệ vòi nhụy thò ra ngoài cao hay thấp có quan hệ rất chặt với nhân tố di truyền của bản thân dòng mẹ, lại là một tính trạng rất dễ bị ảnh hưởng ngoại cảnh. Ví dụ những năm cuối thập kỷ 80, các cơ quan nghiên cứu của Trung Quốc liên tiếp tạo được những dòng lúa bất dục dục như BoA có tỷ lệ thò vòi nhụy ra ngoài trong điều kiện tự nhiên đạt tới trên 60%, dòng Pei'ai64S đạt trên 65%. Các dòng bất dục dục V20A và Zhanshan 97A đang cấy phổ biến trong sản xuất đại trà, tỷ lệ thò vòi nhụy ra ngoài trong trạng thái tự nhiên chỉ đạt khoảng 30%. Khi áp dụng các biện pháp thông thường thì chỉ có thể nâng tỷ lệ này lên 40-50%. Nhưng sau khi xử lý bằng những biện pháp kỹ thuật đặc biệt vào các thời kỳ nhạy cảm, tỷ lệ thò vòi nhụy ra ngoài đạt trên 60%, có khi đạt đến 80-85%. Ảnh hưởng của cây mẹ đến tỷ lệ thò vòi nhụy là suốt cả thời kỳ sinh trưởng sinh dục, nhưng ảnh hưởng lớn nhất là sau khi trở bông 3 ngày. Thứ hai là vào lúc đồng non phân hóa từ bước 5 đến bước 8. Người ta gọi thời kỳ trước là thời kỳ nhạy cảm chính đến tỷ lệ thò vòi nhụy và thời kỳ sau là thời kỳ nhạy cảm thứ yếu. Dùng các biện pháp kích thích tổng hợp trong hai thời kỳ

này có thể nâng cao tỷ lệ thò vòi nhụy, tăng thêm tỷ lệ thò vòi nhụy ra cả hai bên và chiều dài của mỗi vòi nhụy, từ đó nâng cao một cách đáng kể tỷ lệ thò vòi nhụy và thể tích của vòi nhụy. Đặc biệt nếu sử dụng các biện pháp tác động vào thời kỳ nhạy cảm chính sẽ đạt hiệu quả cao nhất.

4. Thụ phấn bổ sung bằng tay vào lúc cao điểm cây bố tung phấn

Khi đạt được mục đích trở trùng khớp, có nghĩa là hoa của dòng mẹ đã nở và vòi nhụy đã thò ra ngoài. Việc thụ phấn bổ sung bằng tay sẽ tạo thêm cơ hội thụ phấn cho vòi nhụy hoa mẹ là phương pháp có hiệu quả nhất để nâng cao tỷ lệ kết hạt. Từ khi có lúa lai trên toàn đất nước Trung Quốc người ta phổ biến biện pháp thụ phấn bổ sung ngay sau khi bố mẹ nở hoa và dòng mẹ bắt đầu nở hoa rõ, cứ 30 phút một lần cho đến khi kết thúc thời kỳ nở hoa rõ. Rõ ràng phương pháp này trong một chừng mực nhất định đã bỏ lỡ thời kỳ cao điểm tung phấn của cây bố, dẫn đến lãng phí một số lớn hạt phấn bố. Đó cũng là một nguyên nhân chủ yếu khiến năng suất hạt lai F_1 không được cải thiện. Sau khi nghiên cứu người ta đã xác định nguyên nhân chính là chưa tác động để tăng tỷ lệ thò vòi nhụy hoa mẹ, có ảnh hưởng lớn đến sự kết hạt và năng suất hạt lúa lai F_1 . Mặt khác do chỉ quan tâm đến sự nở hoa trùng khớp giữa bố và mẹ, và việc thực hiện gạt phấn một cách máy móc, đã bỏ lỡ thời điểm tung phấn nhiều nhất của hoa bố. Trong sản xuất hạt lai, Trung Quốc đã phát hiện sau khi cây bố nở hoa, xuất hiện một thời kỳ cao điểm tung phấn liên tục khoảng 30 phút, đó là thời gian cây bố tung phấn nhiều nhất trong ngày. Lượng phấn tung trong thời kỳ cao điểm chiếm

khoảng từ 70-90% lượng phấn cây bố tung ra trong ngày. Từ phát minh này người ta đã cải tiến phương pháp thụ phấn bổ sung bằng tay truyền thống trước đây. Người ta đã lựa chọn người chỉ huy việc gạt phấn thống nhất trên toàn khu sản xuất hạt lai F_1 . Gạt phấn vào thời gian cao điểm cây bố tung phấn để tạo nên một đám bụi hạt phấn dày đặc trùm lên tầng bông mẹ của ruộng sản xuất hạt lai F_1 , nâng cao tỷ lệ sử dụng hạt phấn của hoa bố. Phương pháp này so với kỹ thuật truyền thống vừa đỡ tốn nhân công, lại nâng cao được tỷ lệ thụ phấn của vòi nhụy hoa mẹ và lượng phấn được thụ phấn. Năm 1991, tại Trung Quốc đã tiến hành khảo sát hạt phấn trong quần thể ruộng sản xuất hạt lai để xác định mật độ phấn hoa (hạt phấn/cm²) trên đồng ruộng khi thụ phấn bổ sung trong thời kỳ cao điểm cây bố tung phấn cũng như trước và sau thời kỳ cao điểm đó. Các chỉ tiêu lượng phấn được vòi nhụy hoa mẹ nhận và tỷ lệ thụ tinh cũng được điều tra.

Người ta đã khẳng định rằng nếu nắm được thời kỳ cao điểm tung phấn của cây bố, và thụ phấn bổ sung bằng tay, có thể nâng cao tỷ lệ và hiệu quả sử dụng phấn hoa của cây bố lên nhiều lần.

III. NHỮNG LỰA CHỌN QUYẾT ĐỊNH ĐẾN SẢN XUẤT HẠT LAI F_1 ĐẠT NĂNG SUẤT SIÊU CAO

1. Chọn vùng sản xuất hạt lúa lai F_1 lý tưởng.

Chọn nơi đất tốt, đầy đủ ánh nắng, tưới tiêu thuận lợi để làm vùng sản xuất hạt lai F_1 . Căn cứ vào điều kiện khí hậu địa phương mà sắp xếp thời kỳ trổ bông, nở hoa tốt nhất. Khiến cả lúa bố, lúa mẹ trổ bông, nở hoa, thụ phấn, kết hạt

an toàn trong điều kiện khí hậu đảm bảo nhiệt độ bình quân ngày từ 20-30°C với lúa lai hệ ba dòng và 27-30°C với lúa lai hệ hai dòng dùng dòng TGMS thuận làm dòng mẹ. Nếu dùng dòng PGMS thuận làm dòng mẹ thì độ dài chiếu sáng trong ngày ở thời kỳ nhạy cảm và nở hoa phải trên 14 giờ. Độ ẩm tương đối từ 70-80%. Chênh lệch nhiệt độ giữa ngày và đêm 8-9°C, không có mưa liên 3 ngày tốt nhất là 12 ngày, không có gió mạnh trên cấp 3, nắng nhẹ, trời quang và tốt nhất là xung quanh 25-30/4 (khu 4 cũ), 1-10/5 (đồng bằng sông Hồng), 5-15/5 (miền núi) với lúa lai ba dòng. Với sản xuất hạt lai hai dòng thời điểm trở bông tốt nhất ở các tỉnh phía Bắc là 25 tháng 8 đến trước 10 tháng 9.

2. Bố trí thời vụ gieo bố mẹ để cho lúa mẹ trở trước lúa bố 2 ngày

Thành công của việc sản xuất hạt lai phụ thuộc vào sự nở hoa trùng khớp giữa dòng mẹ và dòng cho phấn. Để điều tiết nở hoa trùng khớp, chúng tôi cho rằng các dòng mẹ và các dòng cho phấn phải nở hoa cùng lúc trên đồng ruộng mặc dù chúng có thời gian sinh trưởng khác nhau. Điều tiết nở hoa trùng khớp là quan trọng vì chúng ta muốn hạt phấn dòng bố thụ được cho dòng mẹ trong lúc dòng mẹ nở hoa.

Điều tiết nở hoa trùng khớp có thể dùng 2 cách:

- Xác định thời kỳ gieo hạt của các dòng bố và mẹ để chúng nở hoa cùng lúc. Đây là cách điều chỉnh thời gian gieo mạ. Thời điểm gieo mạ phụ thuộc vào thời gian sinh trưởng của các dòng bố và mẹ trong sản xuất hạt lai.

- Điều chỉnh ngày nở hoa bằng xử lý trên đồng ruộng trong quá trình chăm bón ở các vụ gieo cấy. Vấn đề này sẽ giải thích kỹ ở phần xác định ngày nở hoa.

Cần xem xét tổng hợp cả các phương pháp tính tuổi lá, tích ôn hữu hiệu và thời gian sinh trưởng để bố trí lịch gieo bố mẹ, khiến mẹ bắt đầu trở bông sớm hơn bố 2 ngày. Nếu dựa vào số lá để xác định ngày gieo bố mẹ thì dựa trên chênh lệch số lá đã xác định cho từng tổ hợp nhưng rút bớt 0.3-0.5 lá.

a) *Lượng giống gieo*: Tùy thuộc vào khối lượng ngàn hạt, thời gian sinh trưởng và sức sinh trưởng của mỗi dòng mà quyết định khối lượng hạt giống bố và mẹ cần gieo cho mỗi hecta ruộng cấy, lượng giống bố mỗi hecta từ 11.5-15 kg, lượng giống mẹ mỗi hecta từ 32.0-65.0 kg.

b) *Kỹ thuật ngâm ủ*: Trước khi ngâm phải tách ra làm 2 loại, hạt lửng ngâm riêng, hạt đầy ngâm riêng. Thời gian ngâm khoảng 20-24 giờ với dòng mẹ và 36-40 giờ với dòng bố. Cần phải khuấy và loại bỏ các hạt lép nổi trên mặt nước, cứ 3-4 giờ thay nước 1 lần. Có thể áp dụng kỹ thuật vớt hạt giống rồi rửa sạch sau khi ngâm dòng mẹ 8 giờ, hong cho ráo nước sau đó lại tiếp tục ngâm nước sạch đến 12 giờ rồi tiến hành ủ giống. Trong quá trình ủ cần lưu ý: ủ hạt giống 24 giờ, nơi ủ phải ẩm nhưng thoáng gió. Ủ để cho hạt nảy mầm, kích thích phát triển của phôi tạo ra các mầm đồng đều. Nếu hạt được ủ trong các bao tải đay ẩm thì phải để khoảng trống trong các túi ủ để có đủ độ thoáng cho hạt nảy mầm trong quá trình ủ. Tốt nhất nên dùng các dụng cụ như thùng, giành hoặc rổ để ủ giống. Có thể trải trên các sàn gỗ, tre có lót bao tải gai để ủ thành luống nhưng độ cao của luống giống không quá 15 cm và luống không rộng quá 1.2 m để tiện chăm sóc như đảo giống, tưới nước sau khi

hạt giống đã nứt nanh đều. Gieo đều hạt đã nảy mầm theo luống với mật độ 1kg giống/20m². Số đợt gieo mỗi dòng và tỷ lệ hạt giống gieo mỗi đợt có thể áp dụng như sau:

* Gieo 3 trà bố:	Tỷ lệ lượng giống (%)
+ Bố 1:	25
+ Bố 2:	50
+ Bố 3:	25
* Gieo mẹ:	100 (một lần)

Cách xác định ngày gieo của dòng mẹ và dòng bố:

Trong sản xuất hạt lai, chúng ta thường gieo dòng bố thành 3 lần. Thời gian gieo mỗi lần cách nhau 3 ngày. Dòng mẹ thường gieo 1 đợt.

Thời gian gieo dòng mẹ và dòng bố đợt 2 cách nhau phụ thuộc vào số ngày sai khác về thời gian sinh trưởng giữa chúng.

Nếu thời gian sinh trưởng dòng mẹ ngắn hơn thì bố 2 sẽ được gieo trước dòng mẹ.

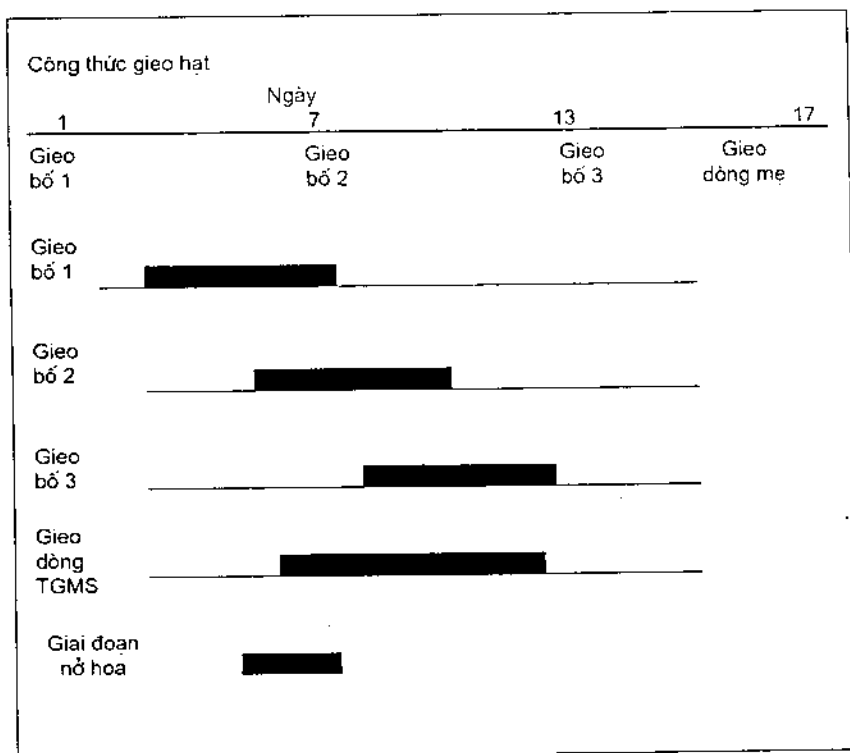
Ví dụ 1:

Thời gian sinh trưởng của dòng bố là 100 ngày	Thời gian sinh trưởng của dòng mẹ là 90 ngày
--	---

Thời gian sinh trưởng của dòng mẹ ngắn hơn dòng bố 10 ngày. Do vậy, bố 2 sẽ được gieo trước dòng mẹ 10 ngày. Có thể mô hình hoá việc gieo mạ của ví dụ 1 như sau:

Số đợt hạt gieo dòng mẹ 1 lần, dòng bố 3 lần: bắt đầu gieo bố 1 trong ngày thứ nhất, gieo bố 2 sau 6 ngày, gieo bố 3 sau bố 2 là 6 ngày, gieo dòng mẹ sau bố 2: 10 ngày. Cả ba

đợt bố sẽ cung cấp hạt phấn kéo dài cho cả quá trình nở hoa của dòng mẹ (hình 22).



Hình 22. Thời điểm gieo dòng mẹ và dòng bố khi thời gian sinh trưởng dòng mẹ ngắn hơn dòng bố 10 ngày

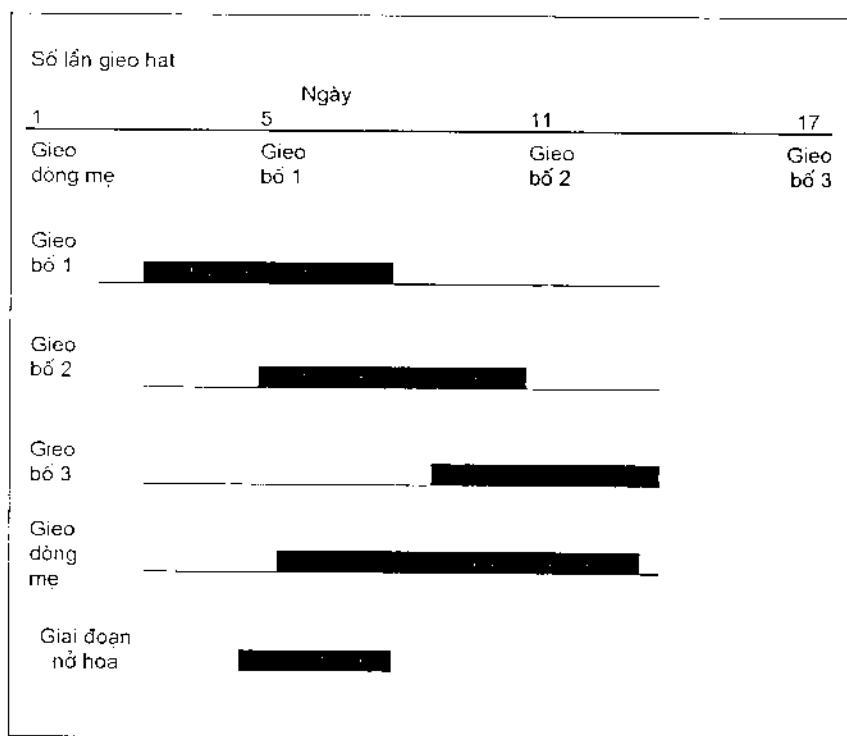
Nếu thời gian sinh trưởng dòng mẹ dài hơn, thì bố 2 sẽ được gieo sau dòng mẹ.

Ví dụ 2:

Thời gian sinh trưởng
của dòng bố là 90 ngày

Thời gian sinh trưởng
của dòng mẹ là 100 ngày

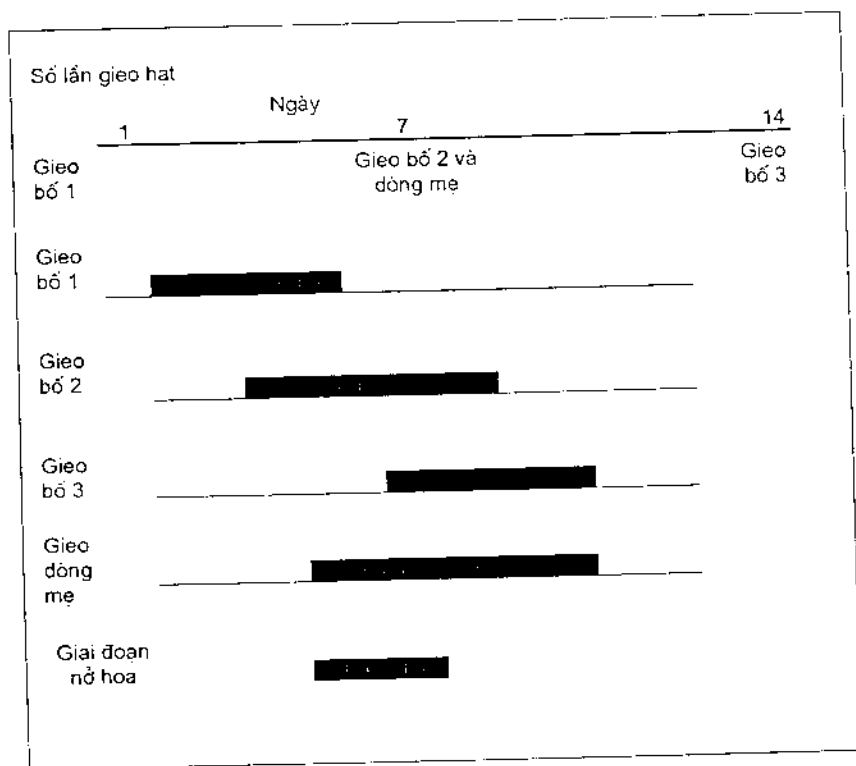
Thời gian sinh trưởng dòng mẹ dài hơn dòng bố 10 ngày. Do vậy, bố 2 sẽ được gieo sau dòng mẹ 10 ngày. Gieo dòng mẹ 1 đợt, dòng bố : 3 đợt. Bắt đầu gieo dòng mẹ đầu tiên, gieo bố 1 sau dòng mẹ 4 ngày, gieo bố 2 sau bố 1: 6 ngày, gieo bố 3 sau bố 2: 6 ngày. Cả ba đợt bố sẽ cung cấp hạt phấn kéo dài cho cả quá trình nở hoa của dòng mẹ (hình 23).



Hình 23. Thời điểm gieo dòng mẹ và dòng bố khi thời gian sinh trưởng dòng mẹ dài hơn dòng bố 10 ngày

Ví dụ 3: Bố mẹ có thời gian sinh trưởng bằng nhau:

Nếu bố mẹ có thời gian sinh trưởng như nhau thì dòng mẹ và bố 2 sẽ gieo cùng ngày. Chúng ta gieo bố 1 sớm hơn bố 2 là 6 ngày, gieo bố 3 sau bố 2 là 6 ngày. Cả ba bố sẽ cung cấp hạt phấn kéo dài cho cả quá trình nở hoa của dòng mẹ (hình 24).



Hình 24. Thời điểm gieo dòng mẹ và dòng bố khi hai dòng có thời gian sinh trưởng bằng nhau

c) *Chuẩn bị ruộng gieo mạ*: Ruộng gieo mạ có độ phì khá, bằng phẳng, tưới tiêu chủ động và phải thực hiện tốt các khâu sau đây.

Làm đất: Ruộng phải nhuyễn bùn, thường phải làm nhuyễn đất hai lần trong thời gian 7 ngày để diệt hạt của giống vụ trước hoặc hạt cỏ. Làm thành luống, mặt luống bằng phẳng, mặt luống rộng 1.0 m, luống cao 5-10 cm, với chiều dài luống phụ thuộc vào kích thước của ruộng. Tạo rãnh giữa các luống để thoát và cấp nước.

Gieo hạt: Khi gieo cần chia đều cho từng luống, gieo đều. Gieo hạt thành luống đảm bảo cho sự mọc mầm hoàn toàn của hạt bố mẹ, gieo luống để cho cây mạ khoẻ, sức sống cao. Dặm mạ cần cho 1 hecta ruộng cấy: dòng bố là 500-670m²; dòng mẹ là 3000-3300m².

Phủ nilon: Theo số liệu của Khí tượng thủy văn thường sẽ rét đậm vào cuối tháng 1, đầu tháng 2 do vậy, sau khi gieo mạ xong phải tiến hành che nilon 100% diện tích mạ dòng bố và dòng mẹ để tránh rét và tránh sự phá hoại của chim và chuột.

Chăm sóc mạ: Tưới nước vào các luống với độ sâu 2-3 cm, phải tháo nước thường xuyên để đảm bảo cho mạ khoẻ. Thực hiện việc tăng mức nước đến 5 cm để diệt cỏ. Ngoài ra cần nhổ các cỏ còn sót lại bằng tay vì cỏ dại cạnh tranh với mạ về ánh sáng, nước và dinh dưỡng.

d) *Phân bón cho ruộng mạ (cho 1 hecta)*:

* Lượng phân bón:

+ Phân chuồng: 8-10 tấn

+ Urê: 175 kg

+ Lân: 415 kg

+ Kali: 130 kg

* Cách bón:

+ Bón lót: Toàn bộ phân chuồng + 100% phân Lân + 55 kg Urê + 55kg Kali.

+ Bón thúc: 2 lần

Lần 1: Khi mạ được 2,5-3 lá bón 60 kg Urê + 75 kg Kali.

Lần 2: Khi mạ được 4,5-5 lá bón 60 kg Urê.

e) Chăm sóc ruộng mạ:

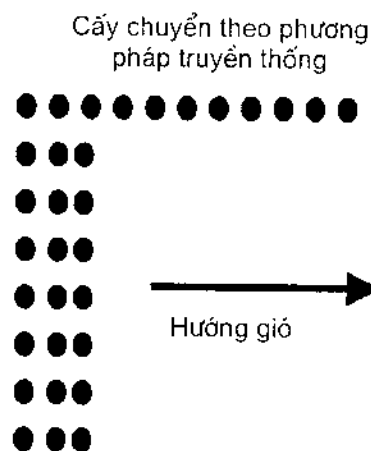
* Tưới nước: Sau khi gieo mạ, ruộng mạ luôn được giữ ẩm, không được để nước đọng thành vũng trên mặt ruộng. Khi mạ được 1,5 lá, tưới ẩm và giữ một lớp nước mỏng trên mặt ruộng. Tuyệt đối không được để ruộng mạ khô và nứt nẻ.

* Phòng trừ sâu bệnh: Kiểm tra thường xuyên, phòng trừ sâu bệnh kịp thời. Cần tiến hành phun định kỳ phòng trừ sâu bệnh. Trước khi nhổ mạ cấy 3 ngày, phải tiến hành phun thuốc phòng đạo ôn, dòi đục nõn.

* Phun thuốc kích thích đẻ nhánh: Dùng thuốc MET 20% phun với lượng 60g nguyên chất /hecta. Khi phun cần tháo cạn nước; sau phun cho nước vào ruộng và luôn giữ một lớp nước mỏng trên mặt ruộng. Nồng độ phun là 1 phần nghìn khi mạ được 1,5-2 lá.

3. Cấy và các biện pháp sáng tạo dàn lúa bố mẹ trên ruộng sản xuất hạt lai F_1

Trong sản xuất hạt lai cần phải cấy chuyển để đảm bảo mật độ, để quần thể phát triển đồng đều. Cấy chuyển sẽ cho cây khỏe, tạo năng suất tối đa. Cấy chuyển để làm đất, phun thuốc trừ cỏ, bón phân và khử lẫn dễ dàng. Dành mạ sẽ được cấy thẳng đứng để nhanh đứng vững. Dành mạ sẽ được cấy với độ sâu 2-3 cm để mau hồi xanh và đẻ nhánh tốt. Tuổi mạ khi cấy là 21 ngày để đảm bảo cho lúa bố mẹ trở và nở hoa đúng thời gian. Nếu cấy già hơn thì số ngày lúa sẽ trở muộn lại bằng $1/2$ tổng số ngày cấy muộn hơn so với 21 ngày tuổi. Nếu cấy mạ dưới 21 ngày thì lúa sẽ trở sớm hơn và bằng $1/2$ số ngày cấy sớm hơn so với 21 ngày. Nếu cấy chuyển dòng mẹ chậm lại thì dòng bố cũng được cấy chậm như dòng mẹ để cho chúng nở hoa đồng bộ.



Sau khi cấy xong giữ nước sâm sấp trong vòng 4-5 ngày, sau đó tăng mức nước lên 5 cm. Cần phải tiến hành cấy dặm toàn bộ cây chết vào ngày thứ 7 sau khi cấy. Trong khi cấy dặm không được làm lẫn giữa dòng mẹ và dòng bố.

Số dặm cấy từ 1-2 dặm. Kinh nghiệm cho thấy không có sai khác về năng suất giữa cấy 1 dặm hoặc 2 dặm trên khóm trừ khi cấy 1 dặm bị chết. Cấy 1 đến 2 dặm/khóm

đối với dòng EGMS, nếu 1 danh bị chết thì danh còn lại có thể đẻ đủ số nhánh cần thiết.

Khi cấy theo hàng và theo một hướng, các hàng song song với nhau. Hướng của hàng cấy vuông góc với hướng gió vào thời kỳ lúa trổ.

a) *Mở rộng tỷ lệ hàng bố mẹ*: Phải đảm bảo mật độ và tỷ lệ hàng bố mẹ của các tổ hợp lai có thời gian sinh trưởng ngắn (chín sớm) và vừa (trung bình) là 2: 14-18; các tổ hợp có thời gian sinh trưởng dài (chín muộn) là 2: 16-18 hoặc 1: 14-16. Số danh cấy cơ bản của lúa bố mỗi hecta tổ hợp chín sớm và chín trung bình là 45-52,5 vạn danh, tổ hợp chín muộn là 3,75-4,5 vạn danh. Số danh cấy cơ bản của lúa mẹ mỗi hecta là 2,7-3 triệu danh.

b) *Số danh và kỹ thuật cấy*:

+ Mỗi khóm bố cấy 2-3 danh (một danh một hạt thóc), mỗi khóm mẹ cấy 3-4 danh.

+ Mạ nhỏ đến đâu cấy đến đó, không được nhổ mạ để qua đêm, cấy nông tay, không được đập đất ở rễ mạ, mạ cấy phải có bùn.

Tuỳ thuộc vào sự chênh lệch thời gian sinh trưởng giữa dòng mẹ và dòng cho phần mà áp dụng công thức cấy khác nhau.

Phương thức cấy trong sản xuất hạt lai với dòng mẹ có thời gian sinh trưởng ngắn hơn dòng cho phần 10 ngày:

Cấy một lần dòng mẹ, một lần dòng bố.

Tuổi mạ đối với dòng mẹ là 21 ngày, dòng bố là 15, 21, 27 ngày.

Tỷ lệ hàng bố và hàng mẹ là 2:14.

Cấy dòng bố khi tuổi mẹ của bố 2 (dòng bố gico đợt 2) đạt 21 ngày như vậy tuổi mẹ của bố 1 là 27 ngày và bố 3 là 15 ngày. Cấy dòng bố 1 trên 2 hàng, hàng cách hàng 15cm, cây cách cây 45 cm. Khoảng cách giữa các băng hàng bố là 225cm để cấy 14 hàng dòng mẹ. Cấy bố 2 và bố 3 cùng ngày với bố 1. Cấy bố 2 và bố 3 vào các hàng bố 1 và giữa hai cây bố 1 với mật độ cây cách cây 15 cm.

Trường hợp dòng mẹ và dòng bố có thời gian sinh trưởng như nhau

Số lần cấy: dòng mẹ 1 lần, 3 lần dòng bố.

Tuổi mẹ đối với dòng mẹ là 21 ngày, dòng bố là 15, 21, 27 ngày.

Tỷ lệ hàng bố và hàng mẹ là 2:14.

* Cách cấy: Cấy dòng bố khi bố 2 đạt 21 ngày tuổi mẹ, có nghĩa là mẹ bố 1 đạt 27 ngày và bố 3 đạt 15 ngày. Cấy bố 1 với khoảng cách cây cách cây 45 cm trên 2 hàng cách nhau 15cm. Khoảng cách giữa các băng hàng bố là 225cm để cấy 14 hàng dòng mẹ. Cấy bố 2: 4 ngày sau bố 1, cấy bố 3 sau bố 2 là 3 ngày, cấy bố 2 và bố 3 vào giữa 2 cây bố 1 với khoảng cách giữa các cây là 15cm.

Cấy dòng mẹ thành 14 hàng với mật độ: Cây cách cây 15cm, hàng cách hàng 15cm. Dòng mẹ cấy cùng ngày với bố 2. Để khoảng cách giữa hàng bố và hàng mẹ cạnh dòng bố là 20cm.

Chú ý: Dòng bố và dòng mẹ cấy cùng ngày nên cần đặc biệt lưu ý là không được để lẫn mẹ giữa hai loại.

c) *Sử dụng phân bón cho ruộng cấy (1 hecta):* Cần áp dụng công thức và liều lượng bón cho đất lúa thuần trên đất có tuổi với ruộng sản xuất giống lai. Nhưng chú ý :

- Không dùng các loại phân tổng hợp như NPK mà dùng các loại N, P, K riêng rẽ.

- Bón lót P và K trước khi bừa cấy.

- Phân N bón riêng cho bố và mẹ theo 3 đợt. Cách bón thông dụng là: 1/3 bón vào ngày thứ 5-7 sau khi cấy; 1/3 bón vào ngày thứ 20-25 sau lần 1; 1/3 bón vào lúc đẻ nhánh tối đa.

- Trong ruộng sản xuất hạt lai, cấy chuyển dòng mẹ và dòng bố không cùng một lúc. Do vậy, phải tính toán để xác định thời điểm bón. Không được bón N cho dòng bố khi mà đợt bố cuối cùng cấy chưa đủ 5-7 ngày. Chia lượng bón lần 1 cho riêng dòng bố và dòng mẹ để đảm bảo đủ phân cho cả mẹ và bố.

- * Lượng phân bón/hecta: + 10 tấn phân chuồng.

- + 310 kg Urê.

- + 415 kg Super lân.

- + 189 kg Kali

- * Cách bón:

- + Bón lót cho dòng bố: Chia lô định vị trí cho hai hàng bố, bón toàn bộ lượng phân chuồng trước khi cấy dòng bố + 50 kg Super lân + 12-15 kg Urê + 10-12 kg Kali.

- + Bón lót cho dòng mẹ: 360 kg Super Lân + 96 kg Urê - 70 kg Kali.

- + Bón thúc cho dòng bố:

- Lần 1: Sau khi dòng bố cấy bén rễ hồi xanh bón 15 kg Urê.

Lần 2: Sau khi bón lần 1 khoảng 4-5 ngày, bón 15kg Urê + 12kg Kali.

+ Bón thúc cho cả đồng bố và đồng mẹ:

Lần 1: Sau khi đồng mẹ cấy bén rễ hồi xanh bón 120 kg Urê.

Lần 2: Sau khi bón lần 1 khoảng 4-5 ngày, bón 64 kg Urê + 96 kg Kali.

d) Tưới nước: Sau khi cấy giữ lớp nước nông 1-2cm, khi đồng mẹ đạt số dảnh 350-400 dảnh/m² phải khơi rãnh xung quanh ruộng để rút cạn nước phơi ruộng đến nứt chân chim. sau đó tưới ẩm bằng biện pháp tưới tiêu xen kẽ. Khi lúa phân hoá đồng ở bước 2-3 giữ mực nước 3-5cm liên tục đến khi lúa vào chắc, trước khi thu hoạch 10 ngày rút cạn nước.

d) Phòng trừ sâu bệnh: Tăng cường kiểm tra, phát hiện kịp thời sâu bệnh, phòng trừ sớm và triệt để. Chú ý phòng trừ dòi đục nõn, bọ trĩ, sâu nân, sâu cuốn lá, sâu đục thân và một số bệnh đạo ôn, khô vằn...

Theo nguyên tắc lúa bố lấy dảnh cấy cơ bản làm chính, kết hợp với nhánh đẻ, còn lúa mẹ chủ yếu là dựa vào dảnh cấy cơ bản. Dùng biện pháp mạnh mẽ tạo một đàn lúa đảm bảo mỗi hecta lúa mẹ có 364-420 triệu hoa. Lúa bố có 105-120 triệu hoa, tỷ lệ hoa bố/hoa mẹ là 1/3,5-4.

4. Tạo tư thế thụ phấn khác nhau giữa bố và mẹ tốt nhất

a) Tư thế thụ phấn khác hoa giữa bố và mẹ tốt nhất gồm có:

- Tư thế truyền phấn: đàn bông bố phải cao hơn đàn bông mẹ 15-20 cm.

- Lúa mẹ bắt đầu trổ sớm hơn lúa bố 2 ngày.
- Tư thế thụ phấn của lúa mẹ: lúa mẹ trổ thoát không áp bẹ, không có hiện tượng uốn câu giả, góc của lá đồng $\geq 90^\circ$.
- Tỷ lệ vôi nhụy hoa mẹ thò ra ngoài đạt trên 60%
- Lúa bố mẹ khi trổ bông, nở hoa phải phát triển mạnh.

b) Phương pháp tạo tư thế thụ phấn khác hoa tốt nhất:

- Điều chỉnh lịch gieo bố mẹ (phần trên đã trình bày) sau khi cấy căn cứ vào chỉ số tuổi lá mà dự báo thời kỳ trổ bông, nở hoa, xúc tiến sự sinh trưởng bình thường của bố mẹ. Phải thực hiện kiểm tra dự đoán và điều chỉnh ngày nở hoa. Giao động của thời tiết có thể đưa đến bố mẹ trổ không trùng khớp. Bố mẹ trổ không trùng khớp làm năng suất hạt lai giảm. Cần phải lưu ý rằng chỉ kiểm tra dự đoán ngày nở hoa của dòng mẹ và dòng bố khi đã kết thúc đẻ nhánh. Vì không dự đoán được ngày trổ của dòng mẹ và dòng bố nếu các dòng chưa qua giai đoạn đẻ nhánh tối đa.

- Dự đoán ngày nở hoa: Chúng ta dự đoán ngày nở hoa trên cơ sở hình thành bông. Vì bông bắt đầu hình thành ở giai đoạn đẻ nhánh tối đa ở tất cả mọi giống lúa. Hoa sẽ nở sau khi phân hoá đồng 30 ngày ở hầu hết các giống lúa. Thời điểm để quan sát thấy bông non ở các giống có thời gian sinh trưởng khác nhau như sau:

40-45 ngày ở giống có thời gian sinh trưởng 95-100 ngày.

50-52 ngày ở giống có thời gian sinh trưởng 105-110 ngày.

60-62 ngày ở giống có thời gian sinh trưởng 115-120 ngày.

65-70 ngày ở giống có thời gian sinh trưởng 125-130 ngày.

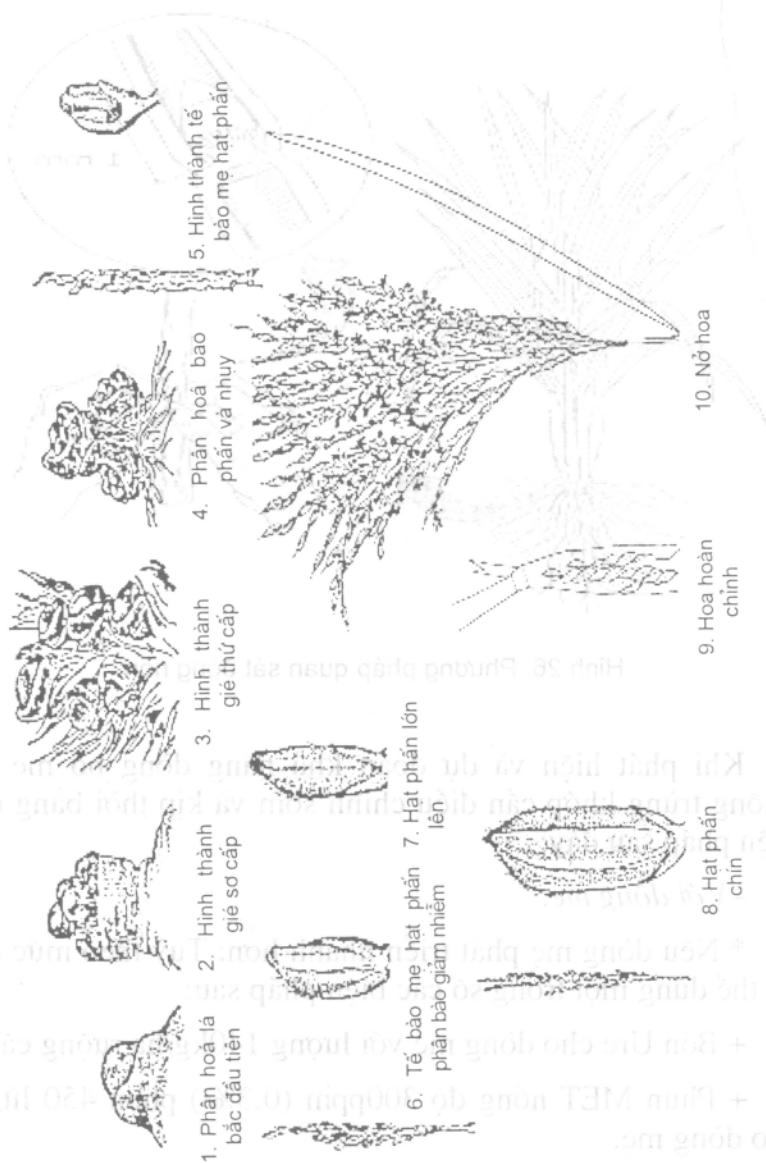
c) *Phương pháp quan sát phân hoá đòng được áp dụng phổ biến là:* Chọn nhánh cao nhất (nhánh chính) cắt lấy đòng tại điểm nối giữa đốt và rễ, bóc lấy đòng từ dưới gốc trở lên, mở đòng non ngay lập tức ở phía trên đốt thân, quan sát sự phát triển của bông non bằng lupa có thể đo được độ lớn của bông khoảng 1mm (hình 25).

Có thể tổng hợp 10 bước phát triển bông non đến nở hoa.

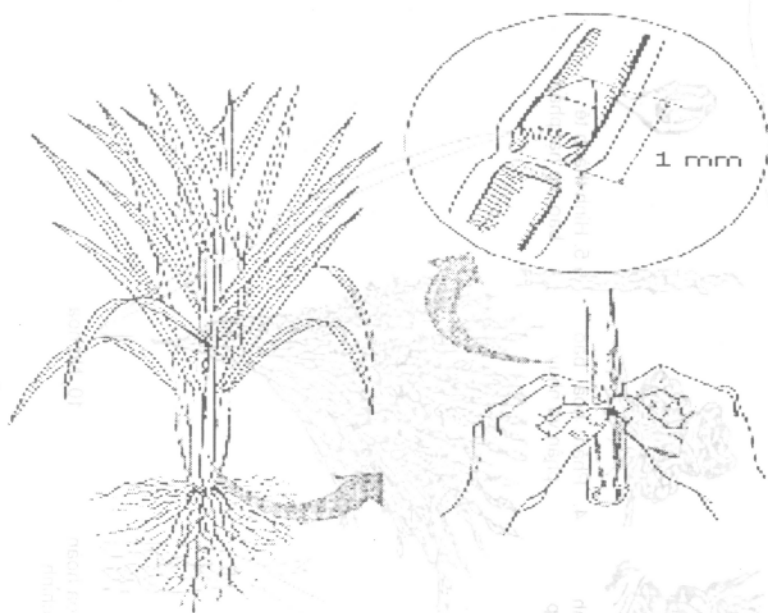
Bảng 22: Đặc điểm các bước phân hoá hình thành bông non

Tên các bước	Giai đoạn phát triển	Số ngày trước trổ	Chiều dài bông (mm)
I	Hình thành bông	30	0,2
II	Hình thành gié sơ cấp	27	0,4
III	Hình thành gié Thứ cấp	24	1,5
IV	Hình thành bao phấn và nhụy	20	2
V	Hình thành tế bào mẹ hạt phấn	17	10 - 25
VI	Phân bào giảm nhiễm	12	80
VII	Hạt phấn chín	6	190 - 250
VIII	Giai đoạn phấn chín	4	260
IX	Hoàn chỉnh cả bông	2 - 1	270
X	Nở hoa		

Khi đòng bố và đòng mẹ bước vào thời kỳ phân hoá đòng cần theo dõi chặt chẽ để điều chỉnh kịp thời. Khi thấy xuất hiện lá thất co ở gần đỉnh lá là lúc cây lúa bắt đầu phân hoá đòng. Lúc này, bắt buộc thực hiện 2 ngày một lần bóc đòng để kiểm tra. Trong 3 bước đầu, nếu đòng bố phát triển sớm hơn đòng mẹ 1 bước là có khả năng trổ trùng khớp.



Hình 25. Các bước phân hóa đồng ở lúa



Hình 26: Phương pháp quan sát dòng non

Khi phát hiện và dự đoán khả năng dòng bố mẹ trở không trùng khớp cần điều chỉnh sớm và kịp thời bằng các biện pháp sau đây:

- Với dòng mẹ:

* Nếu dòng mẹ phát triển nhanh hơn: Tùy theo mức độ, có thể dùng một trong số các biện pháp sau:

+ Bón Urê cho dòng mẹ với lượng 140kg/ha ruộng cấy.

+ Phun MET nồng độ 300ppm (0,3‰) phun 450 lít/ha cho dòng mẹ.

* Nếu dòng mẹ phát triển chậm hơn:

+ Dùng phân KH_2PO_4 với nồng độ 1% phun lên lá cho dòng mẹ, lượng phun 450 lít/ha, phun trong 3 ngày liền hoặc dùng phân Kali bón cho dòng mẹ với lượng 100kg/ha (KCl).

- Với dòng bố:

Muốn kim hãm hay thúc đẩy dòng bố cũng sử dụng các biện pháp như đối với dòng mẹ, nhưng với lượng bằng 1/3 dòng mẹ.

Nếu dòng bố nhanh thì rút nước để ruộng nẻ chân chim, nếu dòng bố chậm thì giữ nước đầy đủ.

Khi dòng non phân hoá bước 1-2, bóc dòng kiểm tra tình hình phát dục của dòng non để dự báo thời kỳ nở hoa. Nếu phát hiện có vấn đề thì dùng nước, phân để điều chỉnh, đảm bảo cho lúa mẹ bắt đầu trổ trước lúa bố 2 ngày.

- Các biện pháp chăm sóc trong thời kỳ nhạy cảm chính và phụ: Đây là các khâu kỹ thuật rất quan trọng ảnh hưởng đến việc nâng cao tỷ lệ thò vòi nhụy và thể tích của vòi nhụy.

+ Khi dòng non phân hoá bước 5-6, bón phân bảo vệ hoa mỗi hecta 112 kg KCl và 75 kg đạm Urê.

+ Bón một lượng phân Bo vừa phải, mỗi hecta dùng 900g axit Boric pha với 450 lít nước phun lên lá sau khi phun GA_3 lần thứ nhất.

+ Dùng GA_3 liều cao để kích thích vòi nhụy hoa mẹ thò ra ngoài và tăng thêm sức sống của vòi nhụy.

+ Tưới nông, năng tưới để cải thiện tiểu khí hậu đồng ruộng.

+ Làm tốt công tác bảo vệ thực vật, phòng chống các bệnh đạo ôn, khô vằn và rầy nâu.

- Nâng cao kỹ năng sử dụng GA₃ với chỉ tiêu cao, lượng thuốc cao, nồng độ cao.

Chỉ tiêu cao: Là tỷ lệ nhú bông khi phun thuốc. Trước đây thường áp dụng khi tỷ lệ này đạt là 3-5% cho lần phun thứ nhất và 30-40% cho lần thứ 2. Hiện nay tỷ lệ nhú bông khi phun thuốc được xác định là 15-20% cho lần thứ nhất và 60-70% cho lần thứ 2.

Lượng thuốc cao: Là chỉ lượng GA₃ dùng cho 1 hecta. Trước đây lượng dùng là 150-180 g. Hiện nay đã nâng lên 240-270g có thể dùng tới trên 350g/hecta đối với tổ hợp lai có dòng Pei'ai 64S là dòng mẹ.

Nồng độ cao: Chỉ lượng thuốc pha đem phun cho mỗi hecta mỗi lần không quá 375 lít. Nồng độ lần phun thứ nhất là 240-320 ppm, lần thứ hai là 400-800 ppm.

Trước nhẹ sau nặng: Chỉ lượng thuốc dùng cho mỗi hecta lần thứ nhất là 90-120 g, lần thứ hai là 150-180 g.

Chú trọng lúa bố: Khi các giống lúa bố có chiều cao hơi thấp, thì mỗi lần phun thuốc đều phun tăng cho lúa bố 1 lần, đồng thời phải xem cây mà phun, để phòng cây bố vóng đổ.

5. Thụ phấn bổ sung bằng tay vào thời kỳ cao điểm tung phấn

a) Dự báo thời kỳ cao điểm tung phấn. Lấy hình dạng tự nhiên của khu ruộng làm đơn vị, chọn thửa có tính đại diện để quan sát. Mỗi ngày định điểm theo dõi 10 bông, cứ 8-10

phút thì ghi số hoa nở một lần (dùng phương pháp lấy kéo cắt các hoa đã nở, hoặc dùng bút xóa để đánh dấu). Nếu trong vòng 8-10 phút số hoa nở bình quân của mỗi bông lớn hơn 5 hoa, thì có thể xem là cây lúa bố đã bước vào thời kỳ cao điểm tung phấn. Từ đó có thể tính ra thời gian thụ phấn bổ sung bằng sức người tốt nhất là khoảng 30 phút tính từ khi quan sát trở đi.

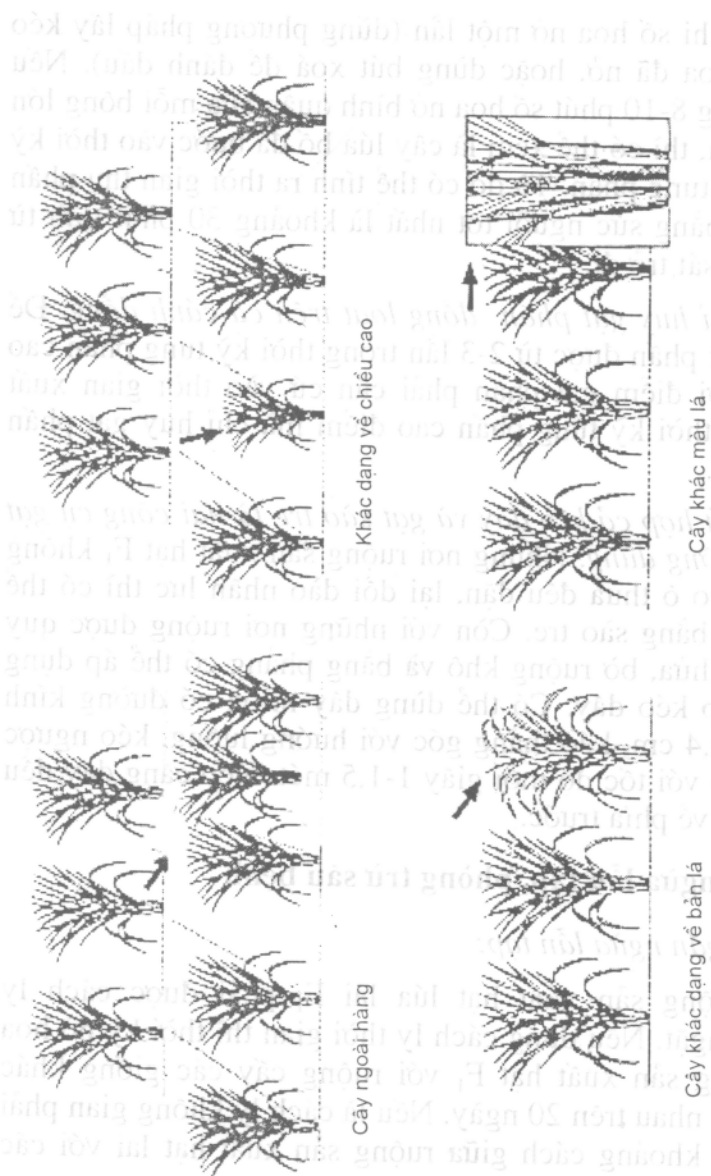
b) Chỉ huy gạt phấn đồng loạt trên cả cánh đồng. Để có thể gạt phấn được từ 2-3 lần trong thời kỳ tung phấn cao điểm, thời điểm gạt phấn phải căn cứ vào thời gian xuất hiện của thời kỳ tung phấn cao điểm mà chỉ huy gạt phấn đồng loạt.

c) Kể hợp cả kéo dây và gạt sào tre là hai công cụ gạt phấn thường dùng. Những nơi ruộng sản xuất hạt F_1 không bố trí theo ô thửa đều đặn, lại dôi dào nhân lực thì có thể gạt phấn bằng sào tre. Còn với những nơi ruộng được quy hoạch ô thửa, bờ ruộng khô và bằng phẳng có thể áp dụng biện pháp kéo dây. Có thể dùng dây nilon có đường kính khoảng 0,4 cm, kéo thẳng góc với hướng luồng, kéo ngược chiều gió với tốc độ mỗi giây 1-1,5 mét. Kéo căng dây đều đi hướng về phía trước.

6. Ngăn ngừa lẫn tạp, phòng trừ sâu bệnh

a) Ngăn ngừa lẫn tạp:

- Ruộng sản xuất hạt lúa lai F_1 phải được cách ly nghiêm ngặt. Nếu dùng cách ly thời gian thì thời kỳ nở hoa của ruộng sản xuất hạt F_1 với ruộng cấy các giống khác phải lệch nhau trên 20 ngày. Nếu là cách ly không gian phải đảm bảo khoảng cách giữa ruộng sản xuất hạt lai với các giống khác trên 100 mét.



Hình 27: Các dạng lẫn tạp cần loại bỏ

- Phải tiến hành loại bỏ và khử các cây khác dạng trong suốt thời kỳ gieo cấy (trên mạ, trên ruộng cấy, khi đẻ nhánh, làm đồng, trước trổ - hình 27). Trước khi thu hoạch phải kiểm tra lại đồng ruộng, phải khử hết cây lẫn (cả những cây kết hạt quá cao), cây xấu, cây nhiễm sâu bệnh.

- Phòng chống lẫn cơ giới một cách nghiêm ngặt trong quá trình thu hoạch, phơi giống, nhập kho, vận chuyển.

b) Phòng trừ sâu bệnh và cỏ dại: Phải trừ sạch mọi loại cỏ dại vì cỏ sẽ cạnh tranh với lúa về nước, dinh dưỡng và ánh sáng. Có thể áp dụng các biện pháp trừ cỏ như: nhổ bằng tay (hình 27), sử dụng dụng cụ cơ học (cào cỏ) hay dùng thuốc trừ cỏ.

Phải thường xuyên quan sát phát hiện và phòng trừ triệt để sâu và bệnh. Trong quá trình phòng trừ phải tuân thủ kế hoạch phòng trừ trên diện tích sản xuất cụ thể. Vì sản xuất hạt giống rất đắt tiền nên phải phòng trừ triệt để tạo năng suất hạt cao nhất.

Trên cơ sở làm tốt công tác phòng trừ tổng hợp, phải nắm chắc các loại sâu bệnh hại chủ yếu trong những thời kỳ then chốt mà phòng trừ như bệnh phấn đen hạt lúa kết hợp với việc phun GA_3 lần thứ hai, liều dùng là 300g Topsin (Tiophanate) (Trung Quốc gọi là Thoát bổ tân) hoặc 3 bao Flutriafol (Trung Quốc gọi là Phân tú linh) dùng 1 lần cho 1 hecta. Nếu dự đoán lúa sẽ bị nhiễm nặng thì sau khi gạt phần xong phun thêm một lần.

7. Thu hoạch và chế biến hạt giống

a) Thu hoạch: Phải chọn ngày và giờ không có mưa để thu hoạch hạt giống lúa lai nhằm đảm bảo hạt không bị nảy

mầm trong suốt quá trình chế biến sau này. Phải thu hoạch riêng và thu trước dòng bố để có không gian thuận lợi cho khử lẫn lẫn cuối dòng mẹ trước khi thu hoạch.

b) Chuẩn bị tuốt hạt:

- Phải tuốt riêng rẽ hạt dòng mẹ và dòng bố. Hạt lai không được lẫn các hạt giống khác còn sót trên sân, trên máy tuốt.

- Phải làm vệ sinh sạch máy, sạch sân trước khi tuốt lúa.

- Bao đựng hạt giống phải là bao mới, nếu không có bao mới thì có thể sử dụng bao cũ đã được khử sạch không còn hạt thóc của giống cũ. Đựng giống trong các bao thì phải tuân thủ các quy định sau:

+ Làm hai thẻ giống (một bỏ vào trong và một để ở ngoài).

+ Nhân giống bao gồm nội dung sau:

Tên của tổ hợp lai.

Nơi sản xuất hạt lai.

Vụ sản xuất.

Tên, địa chỉ người đóng bao.

c) Tuốt hạt:

- Tuốt hạt dòng mẹ trước và không được lẫn với hạt các giống khác. Có thể tuốt bằng dụng cụ tuốt tay hay sử dụng máy tuốt có mô tơ. Sau khi tuốt tiến hành phơi ngay.

- Tuốt hạt dòng cho phấn (dòng bố). Hạt dòng cho phấn phải tuốt riêng để làm thương phẩm, không sử dụng làm giống.

d) *Phơi hạt giống*: Phơi là để giúp hạt giống duy trì khả năng nảy mầm và sức sống dài hơn. Phơi có tác dụng không cho nấm mốc phát triển và hoạt động của các sinh vật khác có khả năng làm giảm chất lượng hạt trong quá trình bảo quản. Phơi làm giảm tốc độ chuyển màu của hạt vì sẽ làm giảm giá trị hàng hoá. Hạt giống phải được bảo quản cẩn thận sau khi được phơi khô với hàm lượng nước trong hạt là 13%.

- Phương pháp phơi bằng ánh nắng mặt trời: Hạt giống có thể được phơi bằng ánh sáng tự nhiên trên sân tuốt lúa. Không được phơi trực tiếp xuống sân bê tông khi trời nắng gắt và nhiệt độ không khí trên 35 °C. Nên phơi trên túi hay trên bạt. Đảo hạt thường xuyên trong quá trình phơi để hạt khô đều.

- Phương pháp làm khô bằng hệ thống quạt thổi khí: Hạt lại có thể được làm khô bằng hệ thống sấy có thổi khí với nhiệt độ từ 40 đến 45°C.

Chú ý không được làm khô quá nhanh hạt giống có độ ẩm từ trên 20% giảm xuống 13%. Độ dày của lớp hạt trên dàn sấy không được cao hơn 45cm. Nếu lớp hạt sấy quá dày, nhiệt độ trong lòng luống sẽ cao và gây tác hại cho sức sống của hạt giống.

***Làm sạch và phân loại hạt.** Mục đích làm sạch là:

Loại bỏ lẫn tạp như rác, lá, hạt gãy, cát sỏi...

Loại bỏ hạt cỏ hoặc hạt cây khác loài.

Loại bỏ hạt xanh, hạt nhân, hạt lửng lép.

Hạt có thể làm sạch bằng sấy tay để loại bỏ các vật nhẹ, hay dùng máy thổi để làm sạch hạt và còn có thể phân loại hạt đồng nhất theo kích thước. Quá trình tách cỡ hạt được

coi là phân loại hạt. Việc thổi hạt và phân loại hạt thường được thực hiện bởi các công ty Nhà nước hay tư nhân, họ có hợp đồng với người nông dân sản xuất giống.

- Thử sức nảy mầm: Trước khi đóng gói để bán hạt lai, hạt giống phải được thử tỷ lệ nảy mầm và độ thuần. Thông thường, công ty Nhà nước phải thực hiện việc đánh giá và cấp chứng chỉ. Tỷ lệ nảy mầm tối thiểu phải được 85% thì mới đạt yêu cầu cấp chứng chỉ.

Trước khi gửi thử nghiệm, chúng ta có thể tự kiểm tra theo các bước sau:

1. Đếm 200 hạt xếp lên túi hoặc miếng vải rồi ngâm trong khay có lớp nước mỏng.

2. Phủ lên trên hạt một miếng vải hoặc một cái túi khác.

3. Nhấc hạt giống ra và để trong râm 7 ngày, luôn giữ ẩm cho túi để giống, không được để hạt giống mất nước.

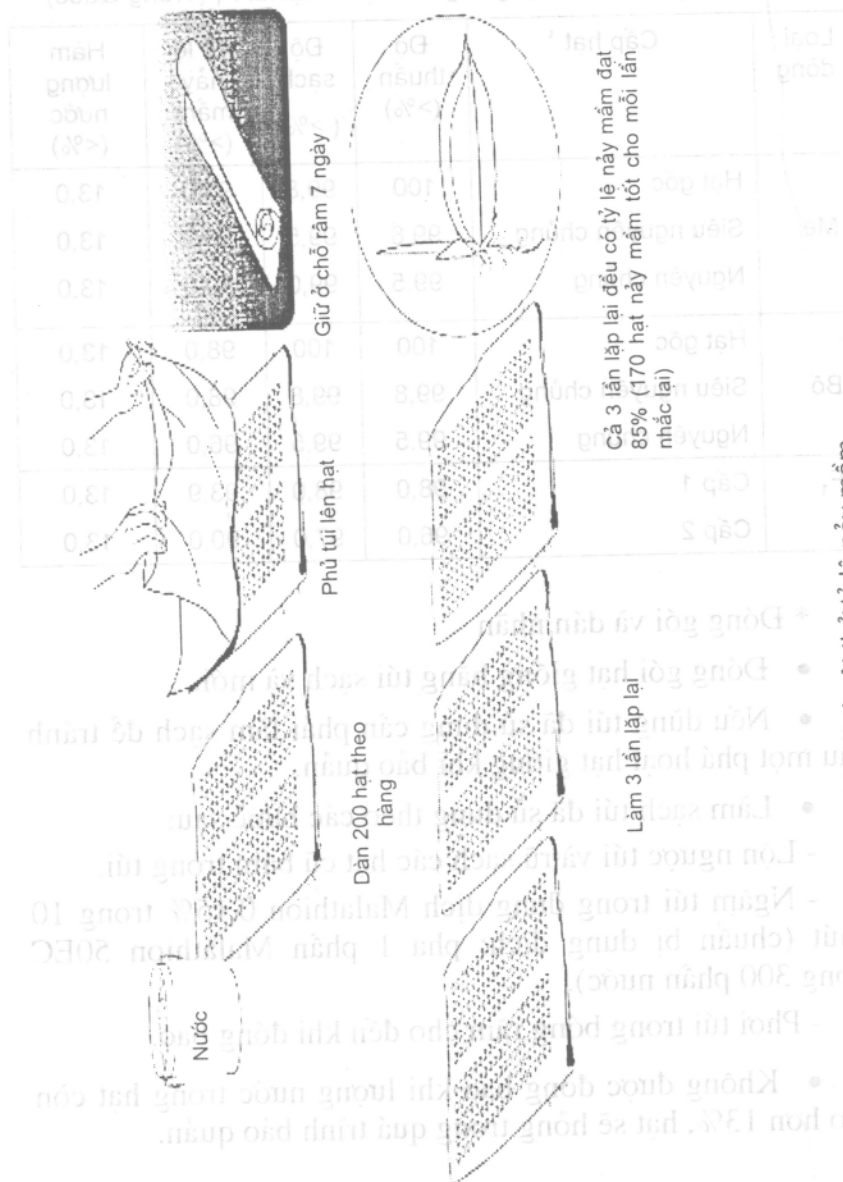
4. Lặp lại 3 lần, mỗi lần 200 hạt.

5. Ngày thứ 7 đếm các mầm phát triển bình thường (hạt được coi bình thường là hạt vừa có mầm và có rễ).

6. Nếu cả 3 lần nhắc lại, tỷ lệ nảy mầm đạt ít nhất là 85%, tức là có 170 hạt nảy mầm bình thường, lô giống đạt tiêu chuẩn.

Nếu tỷ lệ nảy mầm đạt 85% là có thể đóng bao (xem hình 28).

Về tiêu chuẩn hạt giống cho lúa lai, Trung Quốc đã có những quy định rất cụ thể và rất cao (bảng 23). Chúng ta cần phấn đấu trong sản xuất và phát triển công nghệ hạt giống để có thể bắt nhịp với nước bạn.



Hình 28: Kỹ thuật thử tỷ lệ nảy mầm

Bảng 23: Tiêu chuẩn hạt giống bố mẹ và hạt lai F₁ (Trung Quốc)

Loại dòng	Cấp hạt ¹	Độ thuần (>%)	Độ sạch (>%)	Tỷ lệ nảy mầm (>%)	Hàm lượng nước (<%)
Mẹ	Hạt gốc	100	99,8	93,0	13,0
	Siêu nguyên chủng	99,8	99,5	93,9	13,0
	Nguyên chủng	99,5	99,0	90,0	13,0
Bố	Hạt gốc	100	100	98,0	13,0
	Siêu nguyên chủng	99,8	99,8	98,0	13,0
	Nguyên chủng	99,5	99,5	96,0	13,0
F ₁	Cấp 1	98,0	98,0	93,9	13,0
	Cấp 2	96,0	97,0	90,0	13,0

* Đóng gói và dán nhãn

- Đóng gói hạt giống bằng túi sạch và mới.
- Nếu dùng túi đã sử dụng cần phải làm sạch để tránh sâu mọt phá hoại hạt giống khi bảo quản.
- Làm sạch túi đã sử dụng theo các bước sau:
 - Lộn ngược túi và rũ sạch các hạt cũ bám trong túi.
 - Ngâm túi trong dung dịch Malathion 0,15% trong 10 phút (chuẩn bị dung dịch: pha 1 phần Malathion 50EC trong 300 phần nước).
 - Phơi túi trong bóng râm cho đến khi đóng bao.
- Không được đóng bao khi lượng nước trong hạt còn cao hơn 13%, hạt sẽ hỏng trong quá trình bảo quản.

- Làm hai nhãn, một bỏ vào trong bao, một dán ngoài vỏ bao.

- Nội dung ghi trên nhãn:

Tên của tổ hợp lai.

Nơi sản xuất hạt lai.

Vụ sản xuất.

Tên và địa chỉ người đóng bao.

Nếu thực hiện tốt quy trình công nghệ mới này thì ruộng sản xuất hạt lai F_1 sẽ có cây cứng khỏe, bông vàng, hạt mẩy, sản lượng cao và chất lượng tốt. Hạt giống lai F_1 sẽ có độ thuần cao và có chất lượng tốt.

Chương IV

SẢN XUẤT LÚA LAI THƯƠNG MẠI

Ở các chương đầu, đã giới thiệu cơ sở khoa học của hiện tượng ưu thế lai, vấn đề chọn tạo các dòng bố mẹ lúa lai hai dòng, kỹ thuật sản xuất hạt dòng mẹ và hạt lai F_1 . Những thành công của phát triển lúa lai đặc biệt là lúa lai hai dòng lai biểu hiện trên ruộng sản xuất lúa lai thương mại. Trong khuôn khổ của chương này, sẽ đi sâu một số vấn đề liên quan đến năng suất và chất lượng của lúa lai thương mại, có nghĩa là phát huy tối đa tiềm năng ưu thế lai của từng tổ hợp lúa lai.

I. KIỂU HÌNH ĐẶC THÙ CỦA LÚA LAI THƯƠNG MẠI

Do có khả năng kết hợp tốt giữa hai dòng bố và mẹ có nền di truyền khác nhau nên cây lai F_1 có sức sống cao biểu hiện trên hầu hết các tính trạng:

Mầm mạ mọc nhanh (hầu như không có hiện tượng ngủ nghỉ của hạt giống lai), nhiều khi hạt lai mọc mầm ngay trên bông khi còn trong thời kỳ chín của ruộng sản xuất hạt lai F_1 nếu gặp mưa kéo dài .

Mạ lúa lai phát triển nhanh, đẻ nhánh nhiều và đẻ sớm.

Đẻ nhánh nhanh và kết thúc đẻ nhánh sớm.

Thân lúa lai to, mập, bản lá rộng mềm và thường trái dài.

Thời gian trải qua các bước phân hoá đồng rút ngắn hơn lúa thuần từ 2 đến 3 ngày.

Quá trình chín của hạt cũng rút ngắn hơn lúa thuần cùng trà từ 3 đến 5 ngày.

Số hoa trên bông nhiều.

Do vậy thời gian sinh trưởng thường ngắn hơn đồng bố hoặc đồng mẹ có thời gian sinh trưởng dài nhất.

Từ các tính trạng điển hình trên, lúa lai có những nhu cầu quản lý và chăm sóc phù hợp để phát huy tối đa tiềm năng năng suất của nó.

II. NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT SẢN XUẤT LÚA LAI THƯƠNG MẠI

Theo Shaobing Peng, Jianchang Yang IRRI và Trần Thúc Sơn, Viện Nông hoá Thổ nhưỡng (2002), cơ sở sinh lý lúa lai trồng ở vùng nhiệt đới và vùng ôn đới có những sai khác nhất định. Lúa lai có khả năng đẻ nhánh khỏe, bản lá rộng do vậy sinh khối của lúa lai lớn hơn lúa thuần và năng suất cao hơn lúa thuần trong cùng điều kiện. Trong điều kiện canh tác thuận lợi, năng suất của lúa lai cao hơn là do sinh khối lớn hơn. Trong điều kiện canh tác kém hơn (bức xạ nhiệt thấp hơn) chỉ số thu hoạch của lúa lai cao hơn cũng sẽ cho năng suất cao hơn. Hai vấn đề trên sẽ là luận cứ để hướng dẫn về chiến lược quản lý ruộng lúa với việc tối ưu hoá sinh khối trong điều kiện canh tác tối ưu và tăng chỉ số thu hoạch đối với vùng canh tác có khó khăn.

Hiện tại việc điều chỉnh mức sử dụng phân đạm để thu được năng suất tối đa như sử dụng đạm hợp lý cũng làm

giảm sự tấn công của sâu bệnh. Trong sản xuất hạt đồng CMS bản thân diện tích lá, số nhánh đẻ và năng suất sinh khối không thể làm giảm năng suất đồng mẹ nhưng nó cản trở sự thụ phấn chéo.

Trong phát triển lúa lai hai dòng, tỷ lệ lép cao của các giống lai giữa hai loài phụ là một trở ngại lớn cho mở rộng diện tích phát triển loại lúa lai này. Các tác giả Jiangchang Yang, Shaobing Peng, Zhiqin Wang và Qingsen Zhu, Khoa nông học, Trường Đại học Giang Châu, Giang Tô - Trung Quốc đã tiến hành nghiên cứu những nguyên nhân chủ yếu ảnh hưởng đến quá trình vào máy của 6 con lai giữa hai loài phụ *japonicalindica*. Họ tìm thấy sự vào máy của các hoa ở phía trên và phía dưới của một bông diễn ra không cùng lúc của các con lai nghiên cứu. Thời điểm bắt đầu vào máy và đạt độ máy tối đa của các hoa đầu bông diễn ra sớm hơn rất nhiều so với các hoa cuối bông. Sức sống ban đầu, khả năng sinh trưởng, tốc độ vào máy của các hoa ở nửa dưới thấp hơn nhiều so với các hoa ở trên. Trong thời kỳ bắt đầu vào máy, hàm lượng đường của hoa phía dưới bông cao hơn nhiều nhưng hàm lượng tinh bột lại thấp hơn nhiều so với các hoa đầu bông. Hàm lượng Adenosin triptophan (ATP), hoạt tính của Adenosin diphosphate glucose pyrophosphorylase (ADPGP) và enzyme tổng hợp tinh bột ở ngày thứ 9 sau khi thụ phấn của các hoa đầu bông mạnh hơn nhiều so với các hoa dưới bông. Hàm lượng ATP và hoạt tính của ADPG và enzyme tổng hợp tinh bột có tương quan rất chặt với tốc độ vào máy và độ chắc của hạt. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng tốc độ vào máy chậm và nhô của các hoa dưới bông là lý do chính tạo nên tỷ lệ kết hạt thấp ở các giống lai *japonicalindica*. Đó cũng chính là nguyên nhân hoạt tính sinh lý thấp (hoạt tính của ADPGP

và hàm lượng ATP, enzyme tổng hợp tinh bột) ở các hoa dưới bông trong giai đoạn đầu của quá trình vào máy.

V. Bala Subramanian và S.R. Vileti Phòng sinh lý, Viện Nghiên cứu lúa, Hyderabad - Ấn Độ đã nghiên cứu ảnh hưởng của các hoa ở cuống bông và trên đầu bông đến sự vào chắc của hạt lúa lai và lúa thuần. Thí nghiệm được tiến hành vào mùa mưa năm 1999 và 2000 với 5 giống lai (MGR-1, KRH-2, APRH-2, PHB-71 năm 1999 và KRH-2, PHB-71, DRRH-1, PA6201, Sahyadri năm 2000), 5 giống lúa thuần là Triguna, Krishna, IR64, Nidhi và Suraksha trong cả năm 1999 và 2000. Các tác giả đã cắt bỏ một số hoa trên bông của 5 cây trong mỗi lần lặp lại, mục đích để xem có phải sự giảm số hoa đã làm tăng độ kết hạt của lúa. Trong thí nghiệm năm 2000, toàn bộ số hoa được ngắt bỏ đều nằm ở phần bông phía trên của 5 bông trong một lần lặp lại. Kết quả: ở thí nghiệm năm 1999 số hoa trên bông giảm là 20% trên cả lúa thuần và lúa lai. Tuy nhiên khi chín số hạt bình quân trên bông của lúa lai chỉ giảm đi 8% trong khi đó ở lúa thuần là 14%. Điều này chứng tỏ giảm số hoa đã làm tỷ lệ kết hạt ở lúa lai cao hơn lúa thuần (trên bông đối chứng lúa lai là 76%, trên bông lúa thuần là 73%). Trên các bông xử lý của lúa lai tỷ lệ này không đổi (77%). Tuy nhiên cả hai loại bông đối chứng và có xử lý ở lúa lai đều có tỷ lệ kết hạt cao hơn lúa thuần (tương ứng là 87% và 80% của lúa lai, 80% và 69% của lúa thuần). Về khối lượng hạt thì không tìm thấy sự sai khác giữa hai nhóm giống thuần và lai (20,7 mg/hạt). Do khối lượng khô tuyệt đối của hạt lúa lai và hạt lúa thuần là như nhau từ đó có thể suy ra số hoa trên bông không phải là lý do làm giảm độ kết hạt.

Trong thí nghiệm năm 2000, tỷ lệ chắc là 78% ở nửa bông phía trên và 40% ở nửa bông phía dưới của đối chứng lúa lai và tương ứng là 78% và 54% của lúa thuần. Khi số hoa trên bông chỉ giữ lại ở phần trên thì tỷ lệ hạt chắc tăng lên 82% ở lúa lai và 80% ở lúa thuần. Khi chỉ giữ lại các hoa nửa dưới bông thì tỷ lệ hạt chắc ở lúa lai là 80% và lúa thuần là 76%. Kết quả đã chỉ ra rằng ở đầu bông tỷ lệ chắc hơn hẳn cuối bông của cả lúa thuần và lúa lai nhưng lúa lai cao hơn, ngược lại ở nửa bông phía dưới thì tỷ lệ này của lúa lai thấp hơn lúa thuần.

B.C. Viraktamath, S. Sing, M. Ilyas Ahmed và cộng sự, Viện Nghiên cứu lúa, Hyderabad Ấn Độ cũng tiến hành nghiên cứu sự sai khác về tỷ lệ hoa hữu thụ của các phần khác nhau trên bông (nửa bông phía trên và nửa bông phía dưới) của 3 giống lúa thuần và 24 giống lúa lai vào mùa mưa năm 2001. Kết quả cho thấy tỷ lệ hoa hữu thụ của lúa lai biến động từ 75 đến 81% trong khi đó ở lúa thuần là 88 đến 93% trong cùng điều kiện canh tác. Tỷ lệ hữu thụ của các hoa ở nửa bông phía dưới của các giống lai là 48-63%, còn của lúa thuần là 79-87%. Ở nửa bông phía trên, tỷ lệ hoa hữu thụ cao hơn nhiều ở cả lúa thuần và lúa lai, với giá trị tương ứng cho từng loại là 90-95% và 79-87%. Từ đó các tác giả kết luận: tỷ lệ hoa hữu thụ ở lúa lai luôn thấp hơn lúa thuần và ở nửa bông phía trên tỷ lệ hoa hữu thụ cao hơn nửa bông phía dưới ở cả hai loại giống thuần và giống lai. Họ cho rằng cần phải nghiên cứu để tìm ra chiến lược quản lý phù hợp cho năng suất tối đa.

II.1. KỸ THUẬT LÀM MẠ

Vấn đề ngâm ủ và gieo hạt lúa lai F_1 có ảnh hưởng mang tính quyết định đến thành công của sản xuất lúa lai

thương mại. Nếu quá trình ngâm ủ thực hiện tốt, đảm bảo tỷ lệ nảy mầm theo khuyến cáo của người cung cấp hạt giống là chúng ta thực hiện được kế hoạch sản xuất. Nếu hạt giống tốt nhưng kỹ thuật ngâm ủ không tốt sẽ làm giảm tỷ lệ nảy mầm của hạt, lượng mạ gieo sẽ không đủ để cấy theo kế hoạch, có thể sẽ gây nên nhiều khó khăn trong sản xuất.

Kỹ thuật ngâm ủ hạt lai F_1 , theo hướng dẫn của nhiều tác giả trong và ngoài nước chúng ta cần thực hiện như đã trình bày rất kỹ ở chương III (kỹ thuật sản xuất hạt lai F_1). Ở chương này chỉ giới thiệu những nghiên cứu thật đặc thù cho lúa lai thương mại.

Theo Chen Ren-Tian, Deng Guo-Fu Viện Nghiên cứu lúa Quảng Tây, Trung Quốc và Mao Chang-Xiang, Bộ môn Di truyền-Hoá sinh và Chọn giống, IRRI - 2002, các giống lai có tập tính sinh trưởng khác nhau khi phương thức làm mạ khác nhau. So sánh giữa cấy chuyển và gieo thẳng thì lúa lai trong điều kiện gieo thẳng có quá trình đẻ nhánh nhanh, đẻ nhánh nhiều, bước vào giai đoạn phân hoá đồng muộng, thời gian chín rút ngắn, số hoa trên bông giảm so với cùng giống lúa lai trong điều kiện cấy chuyển. Từ kết quả nghiên cứu và sử dụng kỹ thuật này trong sản xuất hạt các dòng mẹ, các tác giả đã ứng dụng với sản xuất hạt lai F_1 và đã thu năng suất cao vì nâng cao được sức sống của mạ trong ruộng gieo thẳng bằng quản lý về phân bón và nước tốt đã tăng chất lượng ruộng lúa gieo thẳng.

Tuy nhiên vấn đề gieo thẳng đối với lúa lai đã tồn tại một vấn đề mấu chốt mà lâu nay các nhà chọn giống, các nhà nông học cũng như người sản xuất không muốn đề cập đến là do giá thành sản xuất hạt lai F_1 vẫn còn rất cao. Nếu dùng gieo thẳng thì nhu cầu hạt giống phải gấp hai đến ba

lân so với cấy chuyển và như vậy đầu tư cho sản xuất sẽ cao không phù hợp với đa số nông dân. Mặt khác để gieo thẳng thì vùng sản xuất lúa lai thương mại phải hết sức chủ động về tưới tiêu, vì chăm sóc lúa gieo thẳng thời kỳ đầu thực chất là chăm sóc mạ. Nếu chúng ta không chủ động điều tiết được nước sẽ có thể gặp hạn hoặc úng làm chết cây con sẽ không đảm bảo mật độ mong muốn. Ngoài một số lý do nêu trên, vấn đề bảo vệ lúa trên diện tích rộng khỏi sự tấn công của chim, chuột, phòng chống rét... cũng là những khó khăn sẽ gặp phải khi dùng kỹ thuật gieo thẳng.

Lợi ích chủ yếu do kỹ thuật gieo thẳng mang lại là giảm được công nhổ mạ và cấy, Song trong điều kiện nước ta, nguồn lao động khá dồi dào, người nông dân có điều kiện để sản xuất lúa lai theo cách cấy chuyển.

II.2. Kỹ thuật cấy

Khác với phương thức làm mạ, kỹ thuật cấy và mật độ cấy có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của lúa lai và năng suất lúa lai. Như đã giới thiệu ở đầu chương, lúa lai có sức sống cao hơn lúa thuần đặc biệt là ở giai đoạn sinh trưởng sinh thực, năng suất sinh khối của lúa lai cũng cao do vậy vấn đề mật độ cấy có ảnh hưởng đến cấu trúc quần thể của ruộng lúa. Nói cách khác cần tạo ra một cấu trúc phù hợp các nhu cầu sinh lý của ruộng lúa cho năng suất cao. Nói đến cấu trúc quần thể là nói đến vấn đề hút và hấp thu nước, các chất dinh dưỡng từ trong đất, quá trình quang hợp, vận chuyển và tích lũy. Ngoài ra còn liên quan đến khả năng chống chịu các tác nhân sinh học và phi sinh học. Do vậy mật độ cấy lúa lai là vấn đề rất tổng hợp có liên quan đến nhiều lĩnh vực khoa học. Tuy nhiên số lượng các công

trình nghiên cứu về vấn đề cấy và mật độ cấy lúa lai thương mại cũng còn chưa nhiều.

Trong công bố gần đây của các tác giả như Yuan Qianhua, Lu Xinggui, Cao Bing và cộng sự, Ban Nghiên cứu tiêu chuẩn và phát triển cây trồng chuyển gen thuộc chương trình Công nghệ cao Trung Quốc (2002) đã sử dụng tổ hợp lai hai dòng PA64S/9311 để nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ cấy đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của tổ hợp lai. Các tác giả sử dụng hai công thức cấy thưa (90.000 khóm/hecta) và công thức cấy truyền thống ở Trung Quốc (300.000 khóm/hecta). Kết quả nghiên cứu cho thấy số nhánh đẻ của công thức cấy thưa giảm đáng kể so với công thức cấy dày vào thời điểm trước 10 tháng 5, nhưng đến sau 25 tháng 5 thì sự sai khác chỉ còn rất nhỏ. Kích thước nhánh đẻ ở công thức cấy thưa lớn hơn cấy dày 6,86%, tỷ lệ kết hạt thấp hơn 2,35% và khối lượng 1000 hạt cũng thấp hơn 0,86g. Năng suất của công thức cấy thưa giảm 17-19%. Trong một thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của yếu tố khí tượng tại Nam Kinh cho kết quả nhiệt độ không khí thấp ở giai đoạn đẻ nhánh mạnh là yếu tố ảnh hưởng chính đến sự sai khác về số hoa giữa hai công thức cấy. Nhiệt độ thấp ở giai đoạn trước và sau trổ 10 ngày, cùng với số hoa trên m^2 lớn, do chỉ số diện tích lá lớn của công thức cấy thưa là những nguyên nhân sinh lý làm giảm tỷ lệ kết hạt. Sự sai khác về khối lượng 1000 hạt có liên quan chủ yếu đến nhiệt độ ở giai đoạn chín sữa (ngày thứ 10 đến 30 sau trổ). Số lượng hạt và số lá có hoạt tính trên m^2 liên quan với nhau rất chặt. Trong thí nghiệm thời vụ (mỗi thời vụ gieo chênh nhau 10 ngày) của công thức cấy thưa để tìm hiểu ảnh hưởng của nhiệt độ trung bình trong điều kiện khí hậu biển của Hải Nam và bờ biển Quảng

Đông, Quảng Tây đã thu được kết quả tương tự như ở Madagascar (độ cao so với mặt biển là 1.500m, có khí hậu mát). Kết quả nghiên cứu về yếu tố khí hậu phù hợp cho mật độ cấy thưa phải ở độ cao thấp hơn (bờ biển Trung Quốc), đó là yếu tố mang tính quyết định cho đẻ nhánh sớm và tránh sự tổn thương của hạt trong giai đoạn chín sữa ở vùng trồng lúa phía Nam Trung Quốc. Đối với vụ lúa muộn của các tỉnh phía Nam nước này do nhiệt độ cao nên rút ngắn thời gian từ gieo đến trổ, mặt khác lại phải cấy chuyển nên năng suất tăng không nhiều. Đối với các vùng dịch dần lên phía Bắc một chút, do nhiệt độ thấp nên không đủ ấm cho loại giống lai này. Vì vậy công thức cấy thưa không thể thực hiện được ở vùng nhiệt độ thấp.

Theo công bố của Shaobing Peng, Jianchang Yang IRRI và Trần Thúc Sơn, Viện Nông hoá Thổ nhưỡng tại Hội nghị lúa lai tổ chức tại Hà Nội từ 14-17 tháng 5 năm 2002 về cơ sở sinh lý của ruộng sản xuất lúa lai đã nêu ra giải pháp mở rộng khoảng cách cấy (20x30cm) và tách các nhánh để khi cấy là con đường tốt nhất giảm lượng hạt gieo cần thiết cho một hecta (25kg) mà không làm giảm năng suất.

II.3. Phân bón và tưới nước

Vấn đề phân bón cho lúa lai đã được một số tác giả tiến hành nghiên cứu và công bố. Tại Viện Nghiên cứu lúa Hyderabad Ấn Độ, S.V. Subbaiah, R.M. Kumar, S.P. Sing và các cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng và vai trò của NPK đối với lúa lai. Các thí nghiệm tiến hành từ năm 1996 đến năm 2001 trên nhiều vùng sinh thái khác nhau. Kết quả cho thấy với giống lai ProAgro

mức sử dụng N vượt quá 150 kg/hecta năng suất giảm. Với ba mức bón N: 100, 150 và 200, giống lai đã cho năng suất tương ứng là 13,13; 12,27 và 11,15.

Khi bón N và P trên nền kali 50kg/hecta trong 24 điểm nghiên cứu đã xác định mức tối ưu là 120N + 60kg P_2O_5 /hecta. Về tương tác giữa N và P, nếu tăng lượng P, thì giảm lượng dùng N (90-120kg/hecta)

Mức bón N và K trên nền P cố định (60kg/hecta), kết quả cho thấy cứ tăng 1kg kali hiệu quả tăng 1kg hạt (mức bón 90kg/hecta). Từ hiệu quả ngược lại của công thức bón N cao, có thể thấy tầm quan trọng của kali trong nền bón N thấp (90N/hecta). Tổng hợp kết quả nghiên cứu của 24 điểm khác nhau, các tác giả đưa ra kết luận mức bón 120N +60 P + 40K là tốt nhất.

Tại Bangladesh M. Sirajul Islam, M.A. Jabbar và cộng sự Viện Nghiên cứu lúa Bangladesh đã tiến hành nghiên cứu về ảnh hưởng của phân bón và biện pháp canh tác đến năng suất lúa lai. Kết quả nghiên cứu với khoảng cách cây 25x20 (20 khóm/m²) và 20x15 (33,34 khóm/m²) với tổ hợp lai Dhan1, tại vùng Gazipur vào mùa khô năm 2000 và 2001, cấy một danh cho năng suất cao nhất. Tuổi mạ khi cấy là 30 ngày. Năng suất cao nhất ở mức phân bón 120kg N/hecta, vượt qua mức trên năng suất không tăng. Năng suất cao nhất thu được ở công thức bón N vào lúc đẻ nhánh mạnh. Riêng bón phân kali, các tác giả không thu được sự khác biệt giữa các công thức bón.

M. Narayana, K. Surekha và cộng sự, Viện Nghiên cứu lúa Hyderabad Ấn Độ (2002), đã nghiên cứu vấn đề sử dụng đạm của lúa lai và lúa thuần. Theo các tác giả sự hút đạm và

sử dụng đạm trong sản xuất phụ thuộc chặt chẽ vào quan hệ hút đạm/vận chuyển đạm/ đồng hoá/ và phân phối trong cây. Sự biểu hiện của các quá trình này là khác nhau đối với các giống lúa khác nhau. Thí nghiệm được tiến hành trong năm 2000 và 2001 ở 4 địa điểm khác nhau với 4 mức bón đạm (không bón, bón 50%, 100% và 150% so với mức khuyến cáo) cho hai giống lai (PHB-71 và KRII-2), hai giống thuần. Các tính trạng quan sát như năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất, sự hút đạm đã được đo đếm khi thu hoạch. Các chỉ tiêu khác như hiệu quả sử dụng đạm, hiệu quả về lý sinh, chỉ số thu hoạch đạm đã được tính toán qua chương trình máy tính. Kết quả về năng suất của các giống theo mức tăng phân đạm là 5.3 đến 6.7 tấn/hecta vượt đối chứng 2.3-3.9 tấn/hecta. Nhưng ở một trong 4 điểm thí nghiệm năng suất chỉ đạt 4.2 tấn/hecta khi mức bón trên 100%. Ở hầu hết các điểm, giống lai cho năng suất cao hơn giống thuần 9-18%, chỉ có một điểm là giống thuần lại cho năng suất cao hơn. Giống lai PHB-71 biểu hiện cao nhất về hiệu quả sử dụng đạm, hiệu quả lý sinh, chỉ số thu hoạch. Về chỉ số diện tích lá, hàm lượng chlorophyll tăng theo mức sử dụng đạm. Các giống lai có chỉ số diện tích lá lớn hơn, các yếu tố cấu thành năng suất như số bông và số hoa trên bông tăng khi lượng bón đạm tăng. Chỉ tiêu số hạt và tỷ lệ hạt chắc trên bông ở các giống lai đều cao hơn. Như vậy vấn đề năng suất hạt cao là một thuộc tính của giống do hiệu quả sử dụng đạm và có thay đổi ở các điều kiện sinh thái khác nhau.

Zhu Defeng, Viện nghiên cứu lúa quốc gia HangZhou, Trung Quốc (2002), đã nghiên cứu vấn đề tưới và dinh dưỡng cho giống lai giữa hai loài phụ Xieyou 9308 tại

Xichang, Zhejang năm 2000 và 2001. Trong điều kiện có tưới giống lai này cho năng suất 11.5 tấn/hecta, cao hơn giống Xieyou 63 là 17%. Sự tăng năng suất là do tăng số hoa hữu thụ trên bông nhưng số bông trên đơn vị diện tích lại không giảm. Giống Xieyou 9308 có hiệu quả hút và sử dụng nitơ, kali và lân cao.

Ngoài ra các tác giả còn quan tâm đến vấn đề quản lý tổng hợp, bao gồm khoảng cách cây rộng hơn, kỹ thuật tưới không liên tục với lượng nước tiết kiệm hơn, sử dụng đạm hợp lý theo nhu cầu của mức năng suất mong muốn. Đã rút ra nhận xét việc giảm mật độ bằng cách dân thưa khoảng cách hàng để tăng sinh khối là do tăng khả năng tổng hợp lân trong đất. Việc áp dụng kỹ thuật tưới không liên tục đã làm tăng sự phát triển và hoạt tính của bộ rễ trong quá trình vào chác của hạt. Sử dụng đạm hợp lý sẽ làm cho thế lá đứng hơn, nên lúa không bị đổ. Bằng Cải tiến quản lý tổng hợp đã làm tăng năng suất và giảm khoảng cách giữa năng suất tiềm năng và năng suất thực thu.

M. Narayana Reddy, K. Surekha, Viện Nghiên cứu lúa Hyderabad, Ấn Độ (2002), đã tiến hành nghiên cứu nhu cầu kali và sự cân bằng giữa nó với kẽm (Zn) trong hai năm 1998 và 1999 tại Mandya và Titabar. Cả hai điểm nghiên cứu đều nghèo kali (87.3 và 83.2 kg/hecta). Thí nghiệm được tiến hành với ba mức bón K_0 , K_1 (bón vào lúc đẻ nhánh) và K_2 (50% kali bón lúc đẻ nhánh và 50% bón khi phân hoá đồng), với hai giống lai và hai giống thuần làm đối chứng.

Kết quả với công thức K_2 đã tăng năng suất hạt 12-30% ở hai điểm thí nghiệm so với đối chứng K_0 . Tại Mandya, công thức K_2 tăng 9% so với K_1 do ở vùng này đất thuộc

loại pha cát nhẹ. Theo các tác giả năng suất của lúa lai hơn hẳn lúa thuần là do tỷ lệ hạt chắc và khối lượng nghìn hạt tăng.

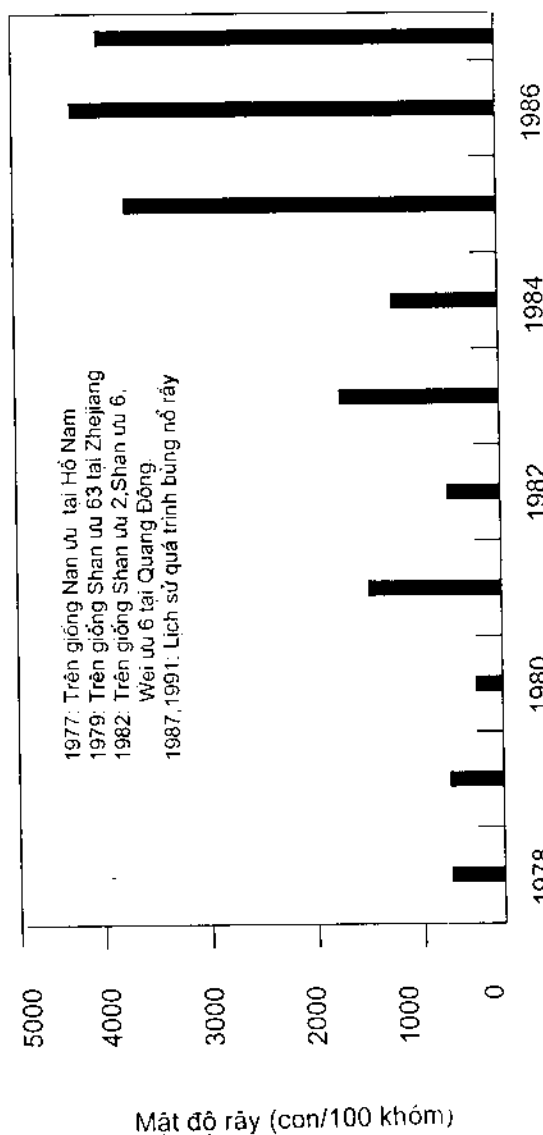
Về vai trò của mangan (Mg), năng suất của lúa lai tăng 22.2% khi sử dụng lượng Mg theo khuyến cáo và bón thêm kali ở mức K_1 năng suất tăng 26.4% khi bón thêm kali ở mức K_2 tại Mandya. Các tác giả đã kết luận lúa lai cần một lượng kali khoảng 50-60 kg/hecta.

II.4. Quản lý sâu bệnh

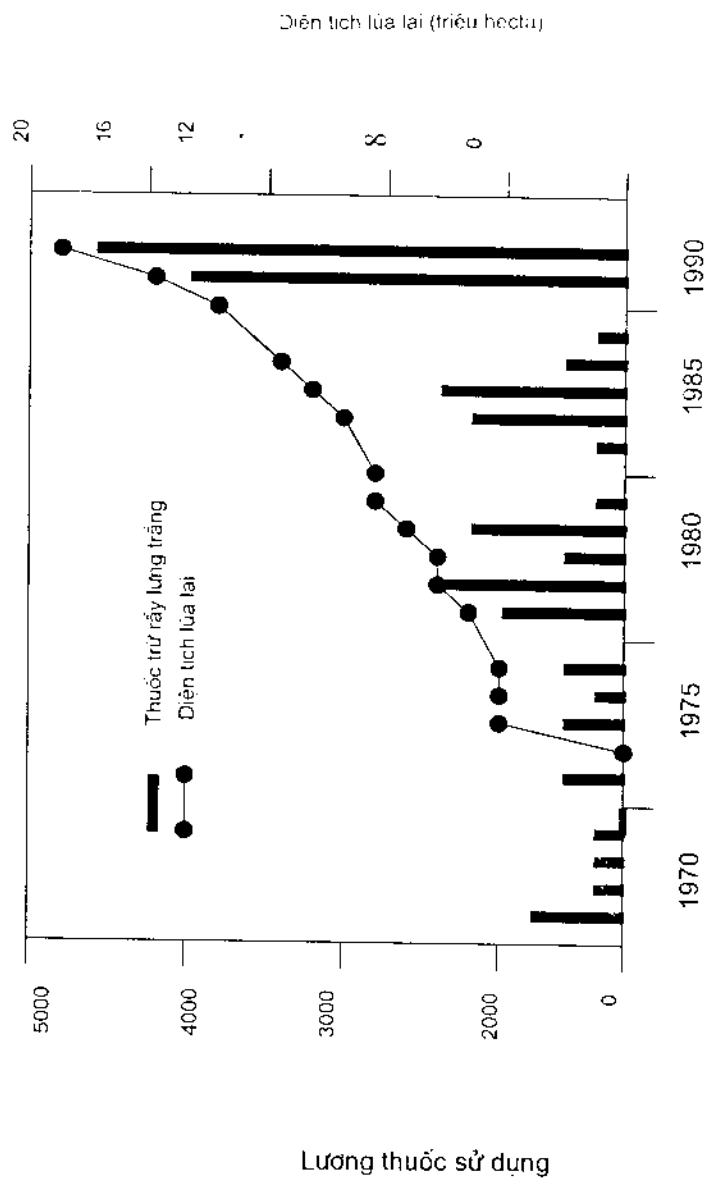
Vấn đề sâu bệnh hại đối với lúa lai nói chung đã trở nên trầm trọng tại Trung Quốc và các quốc gia khác cùng với sự gia tăng diện tích gieo cấy loại lúa này. Tại Hội nghị quốc tế về “Nâng cao mức tiềm năng năng suất lúa bằng sử dụng công nghệ sinh học” Giáo sư Kazushige Sogawa, JIRCAS-CNNRRI, nhà khoa học Nhật Bản đã trình bày một bản báo cáo như rung tiếng chuông báo động về nguy cơ của sự lan tràn dịch hại nói chung và đặc biệt là rầy lưng trắng (Whitebacked planthopper-WBPH) do sản xuất và phát triển lúa lai.

Trước hết là nạn dịch rầy lưng trắng, tác giả đã đưa ra những số liệu về sự bùng nổ của rầy lưng trắng từ năm 1978 đến những năm 1990. Số liệu điều tra trên các giống lai Nam Ưu 2 (tại Hồ Nam), Shan Ưu 6 (tại Zhejiang), Shan Ưu 2, Shan Ưu 6, Wei Ưu 6 (tại Quảng Đông - Trung Quốc). Đồ thị dựng đúng biểu thị mật độ rầy lưng trắng trên khóm điều tra rất cao ở những năm 1985-1987 (hình 29).

Những kết quả điều tra từ năm 1970 đến 1990 về diện tích gieo cấy lúa lai tại Trung Quốc, mức sử dụng các loại thuốc hoá học và sự phát triển của quần thể rầy lưng trắng.



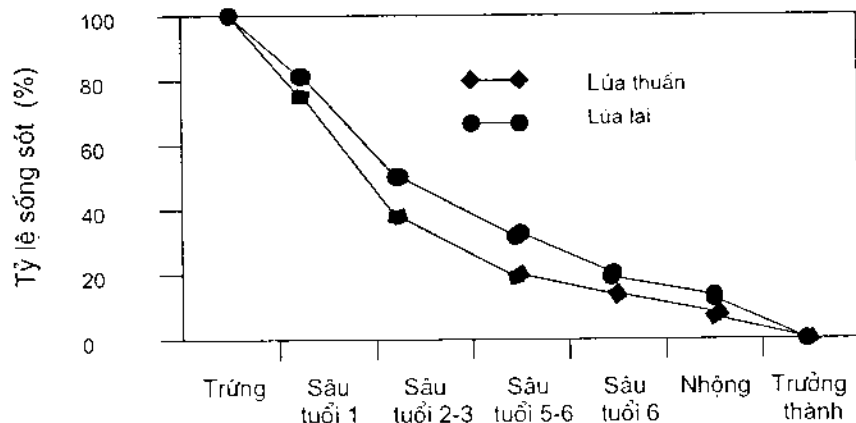
Hình 29: Đồ thị biểu diễn sự tăng mật độ rầy lưng trắng ở Phúc Kiến, Trung Quốc cùng với quá trình phát triển lúa lại



Hình 30: Đồ thị biểu diễn sự gia tăng lượng thuốc hoá học sử dụng

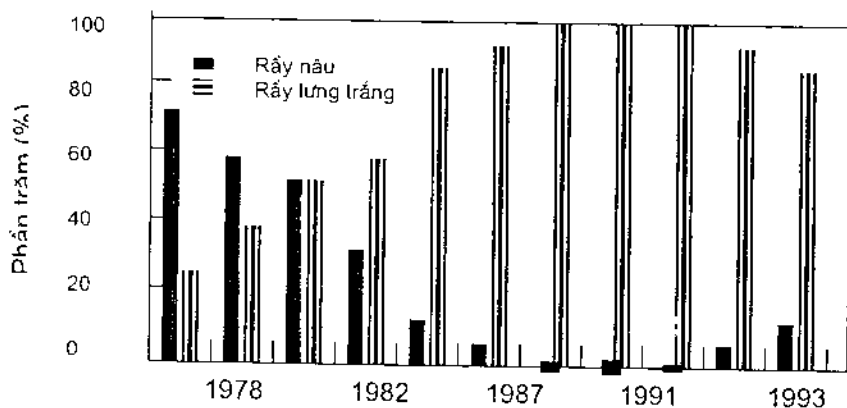
Về diện tích gieo cấy năm 1970 là 3 triệu hecta, đến năm 1990 tăng lên gần 18 triệu hecta. Cùng với sự tăng nhanh về diện tích thì dịch rầy lưng trắng càng trở nên trầm trọng và các loại thuốc hoá học sử dụng càng nhiều. Rầy lưng trắng hại lúa lai đã lan tràn sang cả Nhật Bản (hình 30).

Không chỉ có rầy lưng trắng, sâu đục thân phát triển và đã phá hoại lúa lai và lúa thuần. Công trình nghiên cứu của tác giả và cộng sự còn đánh giá một cách chi tiết mật độ trứng, sâu non và sâu trưởng thành của một số loại sâu như sâu đục thân có sọc hại lúa (*Chilo suppressalis*) ở khu vực miền Trung Trung Quốc đã phá hại trên lúa lai và lúa thuần. Việc điều tra còn thực hiện trên sâu đục thân màu vàng (*Scirphaga incertulas*) ở các vùng phía Nam Trung Quốc. Đường biểu diễn trên hình 31 cho thấy sự khác biệt về mật độ trứng, sâu non, nhộng và con trưởng thành trên lúa thuần và lúa lai. Đồng thời cũng cho biết tỷ lệ sống sót của chúng ở các giai đoạn phát triển trong vòng đời từng loại sâu (hình 31).



Hình 31: Mức độ nhiễm sâu đục thân ở các giai đoạn khác nhau trên lúa lai và lúa thuần.

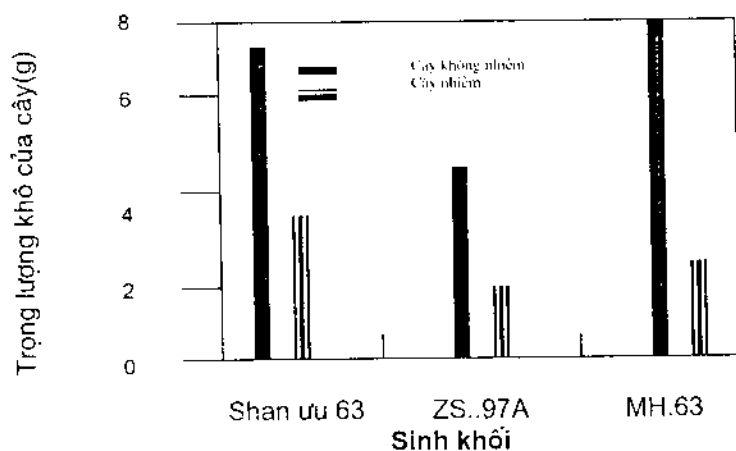
Rầy nâu cũng phát triển rất mạnh và tỷ lệ giữa hai loại rầy nâu (Brown plant hopper) và rầy lưng trắng cũng có những biến động rất lớn. Cùng với sự mở rộng diện tích gieo cấy lúa lai, tỷ lệ rầy lưng trắng phá hại tăng rất nhanh nhưng ngược lại tỷ lệ rầy nâu giảm hẳn. Các tác giả cho rằng đó là hậu quả của việc dùng quá nhiều thuốc hóa học và bản thân rầy nâu và rầy lưng trắng cũng phát sinh các nòi mới (hình 32).



Hình 32: Biểu đồ về sự thay đổi tương quan giữa quần thể rầy lưng trắng và rầy nâu do sử dụng thuốc hoá học ở Shantou, Quảng Đông.

Các tác giả đã điều tra khá tỷ mỉ về ảnh hưởng và hậu quả do rầy nâu và rầy lưng trắng gây ra khi chúng tấn công vào cây lúa. Sinh khối của cả ba dòng (dòng mẹ dòng bố và con lai F_1) đều giảm một cách đáng kể. Hình 33 cho thấy sinh khối của các cây nhiễm chỉ bằng 1/2 cây không nhiễm. Do sử dụng quá nhiều thuốc hoá học nên đã làm

tăng sự lan tràn và phát sinh các nòi mới của rầy lưng trắng và rầy nâu.

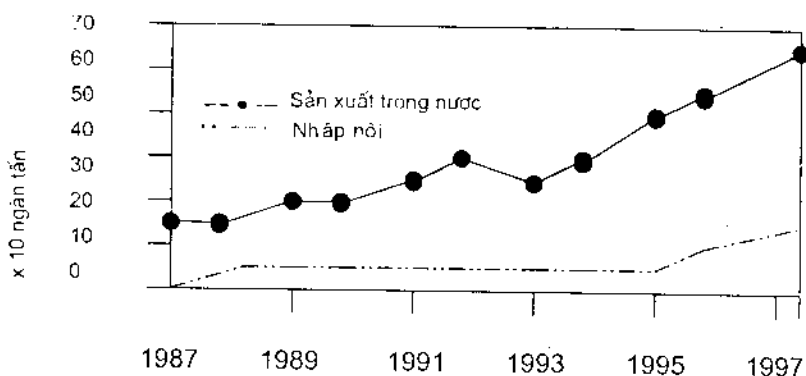


Hình 33: Đồ thị biểu diễn sự thiệt hại do nhiễm rầy của các dòng bố mẹ và con lai tổ hợp Shan ưu 63

Phải đối mặt với vấn đề sâu bệnh nảy sinh trong quá trình sản xuất lúa lai, Trung Quốc đã phải sử dụng nhiều loại thuốc hoá học để phòng và trừ các dịch hại của sâu bệnh nhằm đảm bảo năng suất của lúa lai. Theo thông báo của tác giả, diện tích gieo cấy lúa lai tăng thì lượng thuốc trừ sâu đã sử dụng cũng tăng theo đồ thị dựng đứng, đặc biệt là lượng thuốc trừ sâu sản xuất trong nước (hình 34).

Tất cả các dẫn liệu trên đã khiến chúng ta cần phải xem xét một cách hệ thống và đầy đủ những thách thức và triển vọng của công nghệ lúa lai. Để có thể sử dụng thành công

việc sản xuất loại lúa này ở nước ta. Chúng ta đã thừa hưởng nhiều kinh nghiệm quý báu của Trung Quốc trên cả hai lĩnh vực thành công và thất bại trong việc nghiên cứu và phát triển lúa lai. Để ít phải trả giá, chúng ta cần phải xây dựng chiến lược phù hợp cho vấn đề nghiên cứu và phát triển lúa lai để nó trở thành công nghệ cao của chính chúng ta, là nội lực cho phát triển ngành trồng lúa ở Việt Nam.



Hình 34: Đồ thị biểu diễn lượng thuốc bảo vệ thực vật sản xuất và nhập khẩu tại Trung Quốc trong 10 năm (1987-1997)

II.5. Triển vọng và thách thức khi phát triển lúa lai

II.5.1. Triển vọng

Trước hết chúng ta cần phân tích với thái độ hết sức khách quan về lợi thế của phát triển lúa lai, để có những lựa chọn đúng đắn nhất.

**Về năng suất:* Không còn nghi ngờ gì nữa, lúa lai là con đường tăng năng suất đúng đắn, phá thế kìm hãm của các giống lúa nửa lùn năng suất cao. Đặc biệt với việc phát triển lúa lai hai dòng, mức ưu thế lai của lúa lai hai dòng đã vượt lúa lai ba dòng bình quân 5-15% trong cùng điều kiện chăm sóc. Trong khai thác ưu thế lai hệ hai dòng, các tổ hợp lai khác loài phụ lại cho ưu thế lai cao hơn hẳn các tổ hợp lai giữa các dòng và giống trong cùng loài phụ. Sự chênh lệch về mức ưu thế lai giữa hai loại này đôi khi tới 40-60%.

**Về chất lượng :* Do trong quá trình tìm kiếm các dòng cho phần để tạo các tổ hợp lúa lai hai dòng mong muốn, người ta không phải quan tâm đến vấn đề gen kiểm soát tính trạng phục hồi phần trong dòng cho phần. Cốt lõi của vấn đề là khả năng kết hợp chung và riêng của các dòng bố mẹ tham gia tổ hợp lai. Còn vấn đề đánh giá khả năng kết hợp là chung cho mọi chương trình chọn tạo giống bằng phương pháp lai hữu tính. Đặc biệt trong khoảng một thập kỷ qua, kỹ thuật về chỉ thị phân tử đã rất phát triển và đã áp dụng có hiệu quả vào công tác chọn tạo giống cây trồng (MAS). Do vậy đã giúp các nhà chọn tạo giống chọn lọc các tính trạng mong muốn chính xác hơn với thời gian ngắn hơn so với chọn giống truyền thống. Chính bằng MAS, các nhà khoa học tại IRRI đã quy tụ được một số gen kháng bạc lá vào cùng một giống hay một số gen kháng đạo ôn để tạo ra giống lúa mới mang nhiều gen kháng. Nhờ có những thuận lợi trên nên chất lượng gạo các tổ hợp lúa lai hai dòng dễ dàng cải thiện hơn lúa lai ba dòng. Nói cách khác càng đa dạng nguồn gen các dòng cho phần, cơ hội tạo các tổ hợp có chất lượng gạo ngon càng cao.

* *Về sức đề kháng của các tổ hợp lúa lai hai dòng:* Trong nghiên cứu cũng như thực tiễn của vấn đề chọn tạo và sản xuất lúa lai hai dòng, người ta đã phát hiện, tạo ra và đánh giá hàng loạt nguồn gen kiểm soát tính trạng bất dục đực nhạy cảm với điều kiện môi trường. Đường như trên 12 nhiễm sắc thể của lúa đều chứa các gen *tms* hoặc *pms* và trên từng nhiễm sắc thể thì không chỉ có một gen mà có một số gen. Nhờ sự phong phú của nó mà lúa lai hai dòng không chịu chung số phận như lúa lai ba dòng là rất hấp dẫn các loại sâu bệnh ở lúa đặc biệt các loại sâu hại như đã giới thiệu ở phần trên. Do vậy, còn ít thấy các tài liệu tổng kết về thiệt hại của lúa lai hai dòng do sâu bệnh gây ra.

* *Về công nghệ sản xuất dòng bất dục và hạt lai F_1 :* Khi xem xét vấn đề công nghệ và liên quan giữa công nghệ và giá thành của hạt giống F_1 thì không còn nghi ngờ gì nữa lúa lai hai dòng đơn giản, thuận tiện hơn lúa ba dòng rất nhiều ở khâu sản xuất hạt dòng bất dục đực. Quy trình công nghệ để sản xuất hạt lai F_1 thì yếu tố sai khác duy nhất giữa hai hệ thống là thời vụ sản xuất hạt lai F_1 . Hay nói một cách chính xác hơn là thời điểm các dòng bố mẹ trải qua phân hoá dòng bước 4-6 (giai đoạn phân bào giảm nhiễm) là khác nhau. Với lúa lai hai dòng đây là điều kiện tiên quyết đảm bảo sự thành công và độ thuần của lúa lai. Nói như vậy có nghĩa là thời vụ sản xuất hạt lai F_1 lúa lai hệ hai dòng rất nghiêm ngặt và cơ hội để bố trí sản xuất hạt lai F_1 của các vùng sinh thái khác nhau là rất khác nhau. Ví dụ với điều kiện khí hậu phía Nam Việt Nam, tùy thuộc vào thời gian sinh trưởng của các dòng bố và mẹ mà có thể sản xuất hạt lai 2 đến 3 vụ trong năm. Nhưng ở các tỉnh phía Bắc thì chỉ sản xuất được một vụ. Việc nhân các dòng TGMS cũng tương tự, có những nơi như Lâm Đồng, Đà Lạt, có thể nhân

đồng TGMS quanh năm, nhưng ở các tỉnh vùng đồng bằng sông Hồng thì chỉ có thể sản xuất hạt đồng TGMS trong vụ xuân và thu đông (thời điểm trổ của các dòng TGMS phải rơi vào 5-15 tháng 4 và 10-20 tháng 11 hàng năm). Tuy vấn đề thời vụ có nghiêm ngặt nhưng nếu nhà chọn giống và người sản xuất nắm bắt chính xác đặc tính di truyền của từng tổ hợp lai thì vấn đề này không là trở ngại của sản xuất lúa lai hệ hai dòng.

Từ những ưu thế của lúa lai hệ hai dòng, chúng ta không thể không lựa chọn công nghệ này khi mà sản xuất nông nghiệp của toàn quốc chiếm tỷ trọng lớn trong các thành phần kinh tế quốc dân. Riêng trong trồng trọt thì cây lúa từ bao đời nay đã, đang và sẽ là cây lương thực quan trọng bậc nhất cần được quan tâm đầu tư và phát triển để góp phần đảm bảo an ninh lương thực quốc gia. Chúng ta có an ninh lương thực sẽ góp phần bảo đảm an ninh về chính trị, bảo đảm cho sự nghiệp xây dựng đất nước ngày càng phồn vinh và ổn định. Tuy nhiên với lúa lai hai dòng muốn phát triển thành công chúng ta cần phải nhận thức rằng đó là một công nghệ cao và để trình phục nó chúng ta phải vượt qua các thách thức sẽ đặt ra.

II.5.2. Những thách thức trong phát triển lúa lai và lúa lai hai dòng

Trước khi thảo luận những thách thức, cần phải thống nhất một nhận định là đối tượng mà chúng ta đang nghiên cứu và áp dụng mọi công nghệ là cơ thể sống, nó tồn tại và có tương tác rất chặt với điều kiện môi trường. Vì sự tương tác giữa kiểu gen với môi trường mà điều kiện môi trường

lại luôn thay đổi, đôi khi con người cũng không thể lường trước. Để tồn tại, cây trồng phải tự biến đổi.

Ở mục trên đã đề cập đến những triển vọng to lớn mà lúa lai đặc biệt là lúa lai hai dòng sẽ mở ra trong những năm đầu của thế kỷ này. Trung Quốc, cái nôi của lúa lai thế giới, là nơi sinh ra lúa lai và Giáo sư Yuan Long Ping được thế giới thừa nhận ông là cha đẻ của lúa lai. Yuan Long Ping đã đưa ra chiến lược phát triển của lúa lai tại Trung Quốc ở thế kỷ 21 là tập trung vào phát triển lúa lai hai dòng và chủ yếu là lai giữa các loài phụ. Vì lúa lai hai dòng có rất nhiều ưu điểm. Vì vậy Việt Nam cũng sẽ lựa chọn hướng này. Tuy nhiên cần phải nhận thức đầy đủ những khó khăn mà chúng ta sẽ gặp phải để tìm giải pháp giải quyết hữu hiệu.

* **Về công nghệ:** Dù chúng ta đã khẳng định tính ưu việt của hệ thống lai hai dòng so với lúa hệ ba dòng, tuy nhiên để chọn tạo và nhân các dòng bất dục dục nhạy cảm với điều kiện môi trường (EGMS) cũng không hề đơn giản, như chúng ta đi trên một quãng đường có độ dài xác định với một tốc độ nhất định thì sau một khoảng thời gian nhất định chúng ta sẽ đến đích. Bài học kinh nghiệm của Trung Quốc và của một số cán bộ khoa học Việt Nam đã chỉ ra rằng, không ít các công trình nghiên cứu phải đầu tư khá nhiều tiền của, công sức nhưng không đưa lại kết quả mong muốn. Đôi khi đã thất bại hoàn toàn trong nhân dòng EGMS và sản xuất hạt lai F_1 . Lý do là biến động của thời tiết và hiện tượng trượt di truyền của các dòng bất dục dục kiểu EGMS. Đặc biệt với điều kiện khí hậu của Việt Nam, chúng ta chỉ sử dụng được kiểu bất dục dục TGMS và đi sâu vào khai thác ưu thế lai trong cùng hoặc giữa các loài phụ. Nhưng để đạt ưu thế lai cao nhất, tạo ra giống lai có

năng suất siêu cao thì phải đi sâu nghiên cứu tạo các tổ hợp lai khác loài phụ như *indicaljavanica*, *indicaljaponica* hoặc *japonicaljavanica*. Theo một số công bố gần đây nhất, các tổ hợp lai giữa *indica* và *javanica* ngoài ưu điểm cho năng suất cao còn có chất lượng gạo cao (hạt dài, trong, thơm...) nên được người tiêu dùng chấp nhận. Tuy nhiên nguồn vật liệu thuộc các loài *japonica*, *javanica* thì chúng ta còn rất thiếu và còn rất ít các kết quả nghiên cứu trong nước công bố về hai loài phụ này. Chỉ riêng về tập tính sinh trưởng, phát triển, đặc biệt là tập tính nở hoa của hai loài phụ *japonica* và *javanica* cũng khác xa *indica*. Yêu cầu điều kiện nhiệt độ và ánh sáng cũng không hoàn toàn như loài phụ *indica*. Vì vậy để có công nghệ hoàn thiện chúng ta cần phải đầu tư nghiên cứu bổ sung. Mặt khác cần phải kết hợp hài hòa giữa các công nghệ truyền thống và công nghệ cao (công nghệ sinh học) như các kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào để làm thuần và nhân nhanh các vật liệu chọn giống. Sử dụng chỉ thị phân tử trong đánh giá và chọn cặp bố mẹ để lai, lai xa và cứu phôi để chuyển các tính trạng mong muốn từ lúa đại vào lúa trồng tạo các dòng bố mẹ tốt cho lúa lai hai dòng.

*** Về khả năng chống chịu các tác nhân sinh học và phi sinh học:** Lúa lai hai dòng có lợi thế là rất đa dạng di truyền của các nguồn bố mẹ nên ít nhiễm sâu bệnh hơn. Nhưng mặt yếu của nó là phạm vi thích ứng của mỗi một tổ hợp là rất hẹp nên không thể mở rộng một cách tùy tiện và tràn lan trên các vùng sinh thái khi chưa có thử nghiệm và kết luận. Xin nhắc lại kết quả nghiên cứu của Trung Quốc: Chỉ riêng tổ hợp Pejai64S/9311 các tác giả Yuan Qianhua, Lu Xinggui, Cao Bing và cộng sự, Ban nghiên cứu tiêu

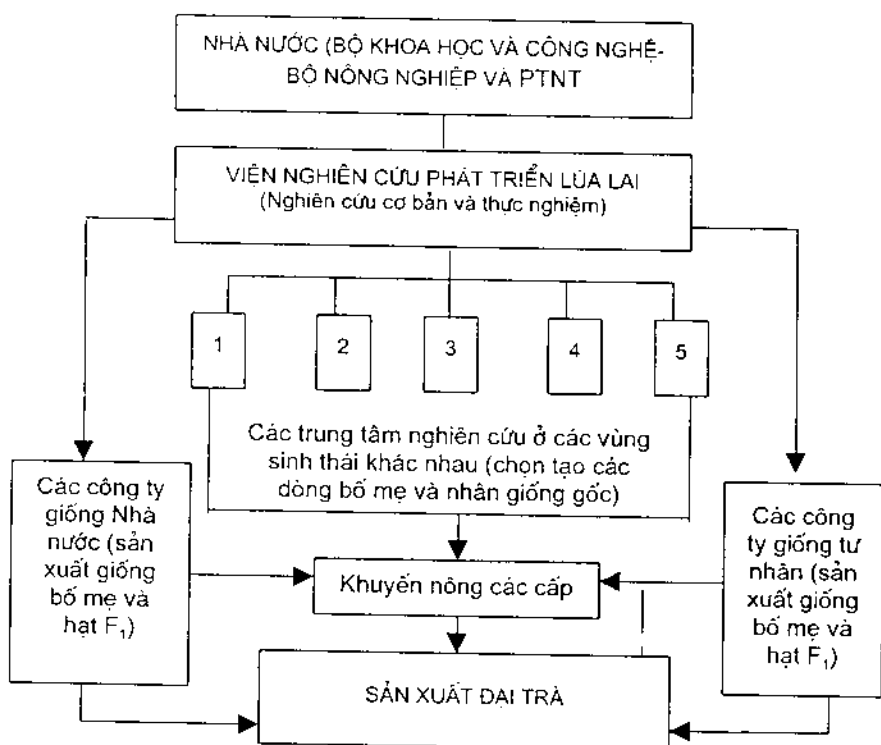
chuẩn và phát triển cây trồng chuyển gen thuộc chương trình Công nghệ cao Trung Quốc. (2002) đã nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ cấy đến các yếu tố năng suất, cũng như tìm chỗ đứng thích hợp cho nó. Kết quả nghiên cứu đã khẳng định yếu tố khí hậu phù hợp cho mật độ cấy thưa trong điều kiện độ cao thấp (ven biển Trung Quốc), đó là yếu tố mang tính quyết định cho đẻ nhánh sớm và tránh sự tổn thương của hạt trong giai đoạn chín sữa ở vùng trồng lúa phía Nam nước này. Đối với vụ lúa muộn của các tỉnh phía Nam Trung Quốc do có nhiệt độ cao nên rút ngắn thời gian từ gieo đến trổ, mật khác do phải cấy chuyển nên năng suất tăng không nhiều. Đối với các vùng dịch dần lên phía Bắc, có nhiệt độ thấp nên không đủ ấm cho sự phát triển của giống lai này và không thể cấy thưa ở vùng có nhiệt độ thấp. Từ bài học này nhắc nhở chúng ta phải thử nghiệm và chọn vùng sinh thái phù hợp cho từng tổ hợp lai. Đưa các tổ hợp vào các vùng có nhiệt độ không phù hợp có thể sẽ không cho thu hoạch.

** Về năng suất và chất lượng hạt:* Dù năng suất bình quân của lúa lai hệ hai dòng cao hơn hệ ba dòng ở mức 5-15 % đã được khẳng định trong rất nhiều công trình nghiên cứu. Tuy nhiên năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất được tạo nên sau hàng loạt các quá trình sinh lý sinh hoá phức tạp như quá trình hút, vận chuyển, đồng hoá và phân phối các nguyên tố đa lượng, vi lượng, nước...trong cây. Các quá trình này đều được kiểm soát bởi các nhân tố di truyền có sự tham gia tích cực của các hệ enzyme. Như vậy để đạt được mức năng suất mong muốn cần phải có các nghiên cứu về cơ sở khoa học của hàng loạt các biện pháp kỹ thuật (gieo, cấy, bón phân, tưới nước, quản lý dịch hại...) từ khi xử lý hạt giống cho đến khi thu hoạch. Thực tiễn sản

xuất ở trong và ngoài nước đã cho thấy chỉ riêng đầu tư N:P:K không hợp lý đã làm cho tỷ lệ hạt lép rất cao trong một số tổ hợp lai của dòng Peiai64S và năng suất thực thu của các tổ hợp lai thua kém rất nhiều so với lúa thuần cùng điều kiện canh tác. Do quy trình quản lý và chăm sóc không phù hợp sẽ dẫn đến sự phát triển của cây lúa lai mất cân đối, nhiễm sâu bệnh nên không chỉ cho năng suất thấp mà chất lượng gạo cũng sẽ không cao, đôi khi chúng ta không thể sử dụng gạo của các tổ hợp nhiễm bệnh làm lương thực. Đặc biệt chú ý đối với các tổ hợp nhiễm bệnh nặng vào giai đoạn sau trổ, để trừ các loại bệnh phát sinh trong giai đoạn này, người sản xuất thường sử dụng các loại thuốc hoá học. Nhiều nơi, nhiều người đã quá lạm dụng trong khi dùng thuốc nên dư lượng tồn đọng trong hạt đã gây nguy hiểm cho môi trường và con người. Đó chính là nguyên nhân khách quan tạo nên khái niệm “gạo sạch” trong một số năm gần đây.

*** Đầu tư cho nghiên cứu lúa lai:** Như chúng ta đã biết, lịch sử nghiên cứu lúa lai bắt nguồn từ Trung Quốc. Để có những thành tựu kỹ diệu như ngày nay, Trung Quốc đã trải qua gần ba thập kỷ đầu tư hàng nhiều tỷ USD cho nghiên cứu lúa lai nói chung và lúa lai hai dòng nói riêng. Vì vậy nước ta, muốn có những kết quả nhanh chóng, đi tắt đón đầu, điều quan trọng là phải tăng cường đầu tư về mọi mặt: đào tạo con người, tăng cường cơ sở vật chất kể cả nhập công nghệ cao từ nước ngoài, tập hợp hết thảy các lực lượng nghiên cứu và sản xuất, kết hợp giữa các cơ quan nghiên cứu với các doanh nghiệp và đông đảo các hộ nông dân tiên tiến. Nhà nước phải tổ chức lại mạng lưới nghiên cứu và phát triển lúa lai (hình 35), phải có chính sách khuyến khích đúng mức những tài năng khoa học của đất nước.

thực sự dân chủ trong nghiên cứu khoa học, cơ chế tài chính lành mạnh, tạo sự kết hợp có hiệu quả giữa các thể hệ làm khoa học làm động lực chắc chắn cho nghiên cứu và phát minh sáng chế.



Hình 35: Mạng lưới nghiên cứu lúa lai

Vấn đề đào tạo là rất cần thiết và cấp bách vì thực trạng đội ngũ cán bộ khoa học và cán bộ nghiên cứu lúa lai của nước ta còn rất thiếu rất yếu, việc bố trí và sử dụng cán bộ cũng như tổ chức các đơn vị tham gia nghiên cứu lúa lai

còn rất tản mạn và trùng lặp. Do vậy cần phải có kế hoạch đào tạo ngắn hạn, dài hạn ở trong nước và nước ngoài để có được đội ngũ cán bộ khoa học trẻ, có trình độ chuyên môn, nhiệt tình đảm nhận và làm chủ công nghệ lúa lai ở Việt Nam.

Đối với những người làm nghiên cứu và phát triển lúa lai cũng đòi hỏi phải có nhận thức đúng đắn về nhiệm vụ và trách nhiệm trước yêu cầu của đất nước, để có tư duy và hoạt động đúng đắn trong quá trình làm khoa học của mỗi người. Như vậy chắc chắn chúng ta sẽ có những đột phá trong vòng mười năm tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Proceeding of the Rice Blast Workshop, International Rice Research Institute, 1979.
2. Statistical Procedures for Agricultural Research 2nd Edition, Kwanchai A. Gomez & Arturo A. Gomez, 1983.
3. Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement, proceeding of a workshop by the Institute of Genetics, Academia Sinica and The IRRI, Science Press, Beijing, China, 1983.
4. Rice Genetics, Proceeding of The International Rice Genetics Symposium 27-31 May, 1985, IRRI.
5. Hybrid Rice, proceeding of the International Symposium on Hybrid Rice, 6-10 October, 1986, Changsha, Hunan, China.
6. Proceeding of The International Workshop on Apomixis in Rice, January 13-15, 1992, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha, China.
7. International Hybrid Rice Training Course, Hunan hybrid Rice Research Center, July, 1993.
8. Kỹ thuật sản xuất hạt lai F_1 năng suất siêu cao (tiếng Trung), Nhà Xuất bản Khoa học Kỹ thuật Bắc Kinh Trung Quốc, tháng 10, 1993.
9. Hybrid Rice, S.S. Virmani, IRRI, 1996.
10. Advances in Hybrid Rice Technology, Proceeding of the 3rd International Symposium on Hybrid Rice, 14-16 November 1996, Hyderabad, India.
11. Chọn giống cây trồng, Chủ biên Trần Đình Long, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội 1997.

12. Proceedings of The International Symposium on Two line System Heterosis Breeding in Crop, Changsha, China, September 6-9, 1997.
13. Progress in The Development and Use of Hybrid Rice Outside China. Proceeding of The International Workshop Held from 28 to 30 May 1997, Hanoi, Vietnam.
14. "East Miracle Rice" Chinese Hybrid Rice and Vulnerability of Chinese Hybrid Rice to WBPH, Dr. Aashi TKITA. Papers presented at The International Conference on Raising rice productivity by using Biotechnology, 29 November- 4 December, 2000, Hangzhou, China.
15. Asian Seed 2001, Country Report of The Japanese Seed Industry, 18 September 2001.
16. Cẩm nang sản xuất hạt giống lúa lai, Hoàng Tuyết Minh, Trình Khắc Quang, Trung tâm Thông tin, Bộ Nông nghiệp và PTNT, năm 2002.
17. Abstracts and Papers Presented at the 4th International Symposium on Hybrid Rice, 14-17 May 2002, Hanoi, Vietnam.

MỤC LỤC

	Trang
LỜI NÓI ĐẦU	3
BẢNG CHỮ VIẾT TẮT	5
CHƯƠNG I: HIỆN TƯỢNG ƯU THẾ LAI	7
I. Cơ sở di truyền của hiện tượng ưu thế lai	9
II. Đánh giá ưu thế lai	12
III. Hiện tượng bất dục đực ở cây trồng	13
III.1. Khái niệm về tính bất dục đực	13
III.2. Các kiểu bất dục đực và khả năng sử dụng trong phát triển lúa lai	15
III.3. Hiện tượng thay đổi ngưỡng chuyển hoá của các dòng EGMS	21
III.4. Tiêu chuẩn một dòng bất dục	24
 CHƯƠNG II : CHỌN TẠO GIỐNG LÚA LAI HAI DÒNG	 27
I. Các phương pháp chọn tạo giống	27
I.1. Phương pháp đột biến phóng xạ	27
I.2. Sử dụng lai hữu tính để tạo các dòng EGMS mới	34
I.2.1. Quá trình thụ phấn, thụ tinh ở lúa	34
I.2.2. Lai và chọn lọc qua phân ly đời sau	38
I.3. Gen tương hợp rộng trong tạo giống lúa lai	44
I.4. Ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống lúa lai	45

1.4.1. Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào trong chọn tạo và nhân giống lúa lai	45
1.4.2. Nghiên cứu phát hiện và lập bản đồ gen	46
1.4.2.1. Lập bản đồ thực thể của hệ gen (Physical map)	48
1.4.2.2. Nghiên cứu tách dòng gen	49
1.4.3. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử	50
1.4.4. Chỉ thị phân tử và ứng dụng trong chọn tạo giống lúa lai	54
II. Ưu việt của hệ thống lai hai dòng	56
II.1. Lúa lai hệ ba dòng	56
II.2. Trùng sinh (apomixis) và lúa lai một dòng	57
II.3. Lúa lai hệ hai dòng	66
III. Kết quả chọn tạo lúa lai hai dòng	68
III.1 Thành tựu lúa lai hai dòng trên thế giới	68
III.2. Thành tựu chọn tạo giống lúa lai hai dòng ở Việt Nam	81
III.2.1. Kết quả chọn tạo các dòng bất dục đực kiểu TGMS	82
III.2.2. Nghiên cứu xác định ngưỡng nhiệt độ chuyển hoá của các dòng TGMS	83
III.2.3. Xây dựng quy trình nhân dòng TGMS ở Việt Nam	87
III.3. Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô trong tạo giống lúa lai hai dòng ở Việt Nam	94
III.3.1. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu	95
III.3.2. Kết quả nghiên cứu	96
III.3.3. Tính ưu việt của nuôi cấy mô tế bào trong chọn tạo giống lúa lai	99

III.4. Xây dựng quy trình nhân dòng TGMS ở Việt Nam	101
III.5. Chọn tạo các tổ hợp lúa lai hai dòng	105
III.5.1. Đánh giá các đặc tính nông sinh học của dòng mẹ	105
III.5.1.1. Đánh giá đặc tính nông sinh học các dòng mẹ chọn tạo trong nước	105
III.5.1.2. Đánh giá dòng Peiai64 S	107
III.5.2. Phân tích khoảng cách di truyền bằng chỉ thị phân tử (RAPD)	109
III.6. Sản xuất thử hạt lai F_1 và năng suất	112
III.7. Năng suất và yếu tố năng suất của các tổ hợp lai hai dòng	112
III.7.1. Năng suất và các yếu tố năng suất trong thí nghiệm so sánh cơ bản	112
III.7.2. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất trong khảo nghiệm quốc gia	117
CHƯƠNG III: KỸ THUẬT SẢN XUẤT HẠT LAI F_1	118
I. Những lựa chọn chiến lược trong sản xuất hạt lai F_1	118
II. Những khâu kỹ thuật then chốt để sản xuất hạt giống F_1 năng suất siêu cao	123
III. Những điều kiện quyết định đến sản xuất hạt lai F_1 đạt năng suất siêu cao	129
1. Chọn vùng sản xuất hạt lúa lai F_1 lý tưởng	129
2. Bố trí thời vụ gieo bố mẹ đảm bảo cho lúa mẹ trổ trước lúa bố 2 ngày.	130

3. Cây và các biện pháp sáng tạo dân lúa bố mẹ trên ruộng sản xuất hạt lai F_1	138
4. Tạo tư thế thụ phấn khác nhau giữa bố và mẹ tốt nhất	142
5. Thụ phấn bổ sung bằng tay vào thời kỳ cao điểm tung phấn.	148
6. Ngăn ngừa lẫn tạp, bảo vệ độ thuần, phòng trừ sâu bệnh	149
7. Thu hoạch và chế biến hạt giống	151

CHƯƠNG IV: SẢN XUẤT LÚA LAI

THƯƠNG MẠI 158

I. Kiểu hình đặc thù của lúa lai thương mại 158

II. Nghiên cứu kỹ thuật sản xuất lúa lai thương mại 159

II.1. Kỹ thuật làm mạ 162

II.2. Kỹ thuật cấy 164

II.3. Phân bón và tưới nước 166

II.4. Quản lý sâu bệnh 170

II.5. Triển vọng và thách thức khi phát triển lúa lai 176

II.5.1. Triển vọng: 176

II.5.2. Những thách thức trong phát triển lúa lai và lúa lai hai dòng 179

TÀI LIỆU THAM KHẢO 186

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

D14 - Phương Mai - Đống Đa - Hà Nội

ĐT: (04)8523887 - 8521940 - 85224506

Fax: 04.5.760.748

CHI NHÁNH NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

58 Nguyễn Bình Khiêm - Q1. T.P Hồ Chí Minh

ĐT: (08) 8297157 - 8299521

Fax: 08.9.101036

Chịu trách nhiệm xuất bản

LÊ VĂN THỊNH

Theo dõi bản thảo: ĐỖ TU

Bìa: LÊ THƯ

In 1000 bản, khổ 15x21cm tại XI Nhà xuất bản Nông nghiệp

Giấy phép số: 12/861 Cục XB cấp ngày 20/6/2002. In xong và nộp lưu chiểu tháng 11/2002

hà lâu hàu dồng



1 004070 800811

19.500 VNĐ

63 - 630
----- - 12/801 - 2002
NN 2003

Giá: 19.500đ