

VKH&CNVN
VCNSH

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

**BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT ĐỀ TÀI:
NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO
VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHỤC VỤ
CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG**

MÃ SỐ: KC.04.08

**CHỦ NHIỆM: PGS. TSKH. LÊ THỊ MUỘI
THƯ KÝ: TS. ĐÌNH THỊ PHÒNG**

HÀ NỘI, 12/2004

Bản quyền 2004 thuộc Viện CNSH

Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng Viện CNSH trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu.

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

**BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT ĐỀ TÀI:
NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO
VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHỤC VỤ
CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG**

**CHỦ NHIỆM: PGS. TSKH. LÊ THỊ MUỘI
THƯ KÝ: TS. ĐÌNH THỊ PHÒNG**

HÀ NỘI, 12/2004

Bản thảo viết xong tháng 12 năm 2004

Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước mã số KC.04.08

LỜI CẢM ƠN

Chủ nhiệm đề tài xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Công nghệ Sinh học, Ban Chủ nhiệm Chương trình KC.04 và các cơ quan phối hợp nghiên cứu đã tạo điều kiện giúp đỡ đề tài trong suốt thời gian thực hiện các nội dung nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2004

Viện CNSH

Chủ nhiệm đề tài

PGS.TSKH. Lê Thị Muội

MỤC LỤC

DANH SÁNH CÁC CƠ QUAN PHỐI HỢP VÀ NGƯỜI THỰC HIỆN.....	1
1. Một số thông tin chính về đề tài.....	1
2. Hoạt động của các tổ chức phối hợp tham gia thực hiện đề tài	1
3. Các cán bộ tham gia.....	3
4. Các đơn vị khác tham gia	4
Bài tóm tắt	6
Mở đầu	8
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC	10
1.1. Nhân nhanh <i>in vitro</i>	10
1.2. Tạo giống bằng công nghệ tế bào thực vật.....	11
1.3. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng mới.....	12
CHƯƠNG II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	14
2.1. Mục tiêu	14
2.2. Nội dung nghiên cứu (như đã đăng ký trong Bản thuyết minh).....	15
2.2.1. Xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ nhân nhanh <i>in vitro</i>	15
2.2.2. Sử dụng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn để tạo giống lúa xuất khẩu, lúa chất lượng cao, kháng bệnh đạo ôn trồng trong nội địa, ngô năng suất kháng bệnh khô vằn và phục tráng giống cây Ngưu tất:.....	15
2.2.3. Khai thác, thiết kế, triển khai kỹ thuật chỉ thị phân tử vào đánh giá đa dạng tập đoàn giống nhằm lựa chọn bố mẹ cặp lai và đánh giá các dòng có triển vọng thành giống	16
2.2.4. Khảo nghiệm và triển khai sản xuất các dòng cây trồng mới tạo được	16
2.2.5. Kết luận được 3 giống mới tạo được:.....	17
2.3. Mở rộng đối tượng nghiên cứu của đề tài	17
2.4. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	17
2.4.1. Vật liệu.....	17
2.4.2. Phương pháp nghiên cứu	18
2.5. Dạng sản phẩm, kết quả tạo ra	20
2.6. Nhu cầu kinh tế - xã hội, địa chỉ áp dụng	20
CHƯƠNG III. CÁC KẾT QUẢ CHÍNH ĐÃ THU ĐƯỢC.....	22
3.1. Nghiên cứu và hoàn thiện quy trình nhân nhanh một số giống cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i>	22
3.1.1. Cây Keo lai và Bạch đàn lai	22
3.1.2. Cây Ba kích	29
3.1.3. Hoa Địa Lan.....	35
3.1.4. Lúa bất dục Nhị 32A và BoA	40
3.1.5. Điều cao sản PN1 và BO1	41
3.1.6. Kết luận về nghiên cứu và hoàn thiện quy trình nhân nhanh một số giống cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i>	43

3.2. Tạo giống mới bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn ở lúa, ngô và cây Ngưu Tất	45
3.2.1. Lúa chất lượng cao dùng trong nước.....	45
3.2.1.1. Kết quả tạo các dòng mô sẹo lúa mang biến dị soma	45
3.2.1.2. Phân tích một số đặc điểm nông học trên đồng ruộng thế hệ RM0.....	48
3.2.1.3. Sự phân ly một số đặc điểm nông học ở thế hệ RM1	50
3.2.1.4. Tóm tắt kết quả tạo các dòng lúa đặc sản dùng trong nước.....	54
3.2.2. Lúa xuất khẩu	55
3.2.2.1. Kết quả khai thác vật liệu di truyền để nuôi cấy tế bào soma và túi phấn	56
3.2.2.2. Chọn tạo dòng lúa bằng kỹ thuật chọn dòng tế bào soma	59
3.2.2.3. Chọn lọc dòng lúa phẩm chất thông qua nuôi cấy túi phấn	60
3.2.2.4. Đánh giá năng suất phẩm chất của các dòng có triển vọng	67
3.2.2.5. Tóm tắt kết quả chọn dòng lúa xuất khẩu bằng công nghệ tế bào thực vật	72
3.2.3. Lúa kháng bệnh đạo ôn.....	73
3.2.3.1. Kết quả nuôi cấy bao phấn.....	74
3.2.3.2. Kết quả theo dõi đặc điểm nông sinh học một số dòng lúa chọn lọc.....	75
3.2.3.3. Kết quả phân tích sinh hoá một số dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn	76
3.2.3.4. Một số dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao tạo được	77
3.2.3.5. Tóm tắt kết quả chọn dòng lúa kháng đạo ôn.....	80
3.2.4. Ngô năng suất kháng ngô vằn	80
3.2.4.1. Tạo dòng thuần bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn	81
3.2.4.2. Tạo cây ngô đơn bội kép	85
3.2.4.3. Đánh giá và khảo nghiệm tác giả các dòng triển vọng	87
3.2.4.4. Kết quả tạo giống ngô mới năng suất kháng khô vằn.....	89
3.2.5. Phục tráng cây Ngưu tất.....	89
3.3. Nghiên cứu kỹ thuật sinh học phân tử vào việc đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn một số giống cây trồng nhằm lựa chọn bố mẹ cặp lai ưu tú và đánh giá sớm các dòng triển vọng thành giống.	91
3.3.1. Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn (<i>Xanthomonas Oryza</i>).....	91
3.3.2. Cây lạc.....	95
3.3.2.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn lạc kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn.....	96
3.3.2.2. Kết quả đánh giá phản ứng kháng bệnh của các giống thu thập.....	96
3.3.2.3. Tối ưu phản ứng PCR	98
3.3.2.4. Phân tích đa dạng tập đoàn lạc kháng bệnh héo xanh với các chỉ thị SSRs.....	98
3.3.2.5. Phân tích đa dạng tập đoàn 33 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt bằng các chỉ thị RAPD.....	104
3.3.2.6. Xác định các chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc	108
3.3.2.7. Lai hữu tính, tạo quần thể và chọn lọc giống lạc kháng bệnh rỉ sắt	115
3.3.2.8. Nghiên cứu sàng lọc sớm các dòng lạc F ₃ cặp lai ICG950166 x L12 với các chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt	115
3.3.2.9. Kết luận chung về tạo giống lạc có sự hỗ trợ của sinh học phân tử.....	121
3.3.3. Cây đậu tương	122

3.3.3.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn	122
3.3.3.2. Nghiên cứu chọn một số chỉ thị RADP và SSR thích hợp cho nghiên cứu	122
3.3.3.3. Kết quả tạo giống đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt có sự phối hợp của chỉ thị phân tử.....	131
3.3.3.4. Kết luận về tạo giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử.....	135
3.3.4. Đánh giá sớm các dòng lúa và ngô chọn lọc được bằng các chỉ thị phân tử liên quan	137
3.3.4.1. Đánh giá sớm các dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao với các chỉ thị STS	137
3.3.4.2. Đánh giá sớm các dòng lúa xuất khẩu với các chỉ thị phân tử liên quan	139
3.3.4.3. Chọn tạo các dòng ngô mới có sự trợ giúp của chỉ thị phân tử	141
3.4. Kết quả khảo nghiệm và triển khai sản xuất thử các dòng lúa, ngô và đậu tương	144
3.5. Mở rộng sản xuất giống lúa mới DR3	146
CHƯƠNG IV. TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC	149
4.1. Kết quả nổi bật	149
4.2. Trình độ công nghệ.....	150
4.3. Khả năng áp dụng	150
4.4. Những đóng góp mới của đề tài	152
4.5. Đào tạo	152
4.6. Sản phẩm của đề tài.....	154
4.6.1. Sản phẩm công nghệ của đề tài.....	154
4.6.2. Sản phẩm giao nộp của đề tài đã ký trong Hợp đồng nghiên cứu với Chương trình KC.04.....	155
4.7. Tồn tại của đề tài	157
4.8. Hợp tác quốc tế	157
4.9. Tình hình sử dụng kinh phí	157
CHƯƠNG V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	158
5.1. Kết luận chính	158
5.2. Kiến nghị.....	160
Các công trình công bố	160
Tài liệu tham khảo	163
Phụ lục.....	171

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

ĐTST:	Điều tiết sinh trưởng
2,4D:	2,4 Dichlorophenoxyacetic acid
AC:	Độ bền gel
AFLP:	Đa hình chiều dài các phân đoạn ADN được nhân bản
AVRDC:	Trung tâm nghiên cứu rau màu châu á
BAP (BA):	Benzylaminopurine
Bộ NN và PTNT:	Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn
CNSH:	Viện Công nghệ Sinh học
CYMMYT:	Chương trình quỹ gen và công nghệ sinh học và lúa mỳ
DDBJ:	Ngân hàng gen Nhật bản
DNA:	Deoxyribonucleic acid
EMBL:	Ngân hàng gen Châu Âu
EU:	Châu Âu
GC:	Độ bền thể gel
GT:	Độ hoá hồ
HTX:	Hợp tác xã
IAA:	Indol Acetic Acid
IBA:	Indol Butiric Acid (Axít Indol Axetic)
IBA:	Indol butyric
ICRISAT:	Viện nghiên cứu cây trồng màu Quốc tế
IRRI:	Viện Nghiên cứu lúa quốc tế
KHCNMT:	Khoa học Công nghệ Môi trường
KHKTTN:	Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp
Kin.	Kinetin
LĐBSCL:	Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long
MAS:	Chọn giống có hỗ trợ của chỉ thị phân tử
MDS:	Biểu đồ đa chiều
MS:	Môi trường nuôi cấy của Murashinge & Skoog
NAA:	A xít Napthalen Acetic
PCR:	Phản ứng trùng hợp chuỗi DNA
PIC:	Hàm lượng thông tin về tính đa hình
PVP:	Polyvinyl Pyrrolone
QTL:	Các locus tính trạng số lượng
RAPD:	Đa hình đoạn DNA được nhân bản ngẫu nhiên
RFLP:	Tính đa hình chiều dài phân đoạn cắt giới hạn

SHNĐ:	Viện Sinh học nhiệt đới
SHNN:	Viện Sinh học Nông nghiệp
SHPT:	Sinh học phân tử
SSR:	Các trình tự lặp lại đơn giản
TGMS:	Tính bất dục nhiệt độ
TGST:	Thời gian sinh trưởng
TTKHSX:	Trung tâm khoa học sản xuất
TTKNGCTTU:	Trung tâm khảo nghiệm giống cây trồng Trung ương

DANH MỤC CÁC BẢNG

- Bảng 1.** Đánh giá khả năng tạo mô sẹo của các giống lúa trên môi trường C_1 và C_2
- Bảng 2.** Tỷ lệ phần trăm mô sống sau 30 ngày chiếu xạ gamma từ nguồn C_0^{60}
- Bảng 3.** Tỷ lệ (%) mô sẹo tái sinh cây sau 60 ngày chiếu xạ
- Bảng 4.** Số cây tái sinh thu được
- Bảng 5.** Kết quả gieo trồng các dòng tái sinh từ mô sẹo xử lý tia gamma thế hệ RM0
- Bảng 6.** Một số đặc điểm nông học của các dòng tái sinh từ mô sẹo xử lý tia gamma thế hệ RM0 của các giống lúa nghiên cứu
- Bảng 7.** Một số đặc điểm nông học các dòng lúa Tám xoan và Tám ấp Bẹ quan tâm thu vụ mùa 2003 - thế hệ RM1
- Bảng 8.** Đặc điểm nông học của các dòng không cảm quang trở vụ Xuân 2004 – thế hệ RM2
- Bảng 9.** Một số đặc điểm các giống trong tổ hợp lai để cấy túi phấn và tế bào soma
- Bảng 10.** Hệ số di truyền (H) và phương sai (sg^2) của quần thể F2 của một số tổ hợp lai
- Bảng 11.** Các thông số di truyền trên các tính trạng AC, GC và GT trên tổ hợp IR 64/ Jasmine 85
- Bảng 12.** Hệ số tương quan của các tính trạng với AC với GC và GT trên hai quần thể F2 và BC2F2 của IR 64/ Jasmine 85
- Bảng 13.** Hệ số tương quan kiểu gen (r_g), kiểu hình (r_p) và môi trường (r_e) trên quần thể F3 của IR 64 /Jasmine 85
- Bảng 14.** Kết quả tạo tế bào soma trên một số giống
- Bảng 15.** ảnh hưởng chuyển túi phấn từ môi trường mô sẹo sang môi trường tái sinh
- Bảng 16.** Tỷ lệ cây tái sinh trên vài tổ hợp lai
- Bảng 17.** Đánh giá tỷ lệ tạo mô sẹo và phát triển cây tái sinh trên tổ hợp giống giàu vitamine
- Bảng 18.** Tỷ lệ tạo mô sẹo trên các môi trường
- Bảng 19.** Khả năng tái sinh cây xanh trên các môi trường
- Bảng 20.** So sánh kết quả một số dòng từ nuôi cấy túi phấn vụ Hè thu năm 2003
- Bảng 21.** Phân tích phẩm chất của một số giống
- Bảng 22.** Các đặc tính hình thái của các dòng nuôi cấy túi phấn từ tổ hợp lai F1
- Bảng 23.** Các thành phần năng suất của các dòng nuôi cấy túi phấn từ tổ hợp lai F1
- Bảng 24.** Phân tích phẩm chất của 4 dòng trên được ghi nhận trên bảng 24
- Bảng 25.** Năng suất và thành phần năng suất của các giống lúa từ túi phấn và tế bào soma Đông xuân 2003
- Bảng 26.** Phẩm chất gạo của các giống lúa từ soma và túi phấn
- Bảng 27.** Năng suất và địa điểm của các giống đưa đi khảo nghiệm
- Bảng 28.** Các tổ hợp lai nghiên cứu chọn tạo giống lúa chất lượng kháng đạo ôn ôn
- Bảng 29.** Kết quả tạo mô sẹo và tái sinh cây từ nuôi cấy bao phấn
- Bảng 30.** Mức độ biến động một số chỉ tiêu hình thái ở các dòng lúa nuôi cấy bao phấn
- Bảng 31.** Kết quả phân tích sinh hoá một số dòng/giống lúa thí nghiệm
- Bảng 32.** Một số dòng lai và dòng đơn bội kép chọn lọc cho các nghiên cứu khảo nghiệm
- Bảng 33.** Kết quả cải tạo nâng cao tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây
- Bảng 34.** Tỷ lệ tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây của một số nguồn vật liệu được chuyển tính cảm ứng (vụ Thu 2003)

Bảng 35. Kết quả thí nghiệm nuôi cấy bao phấn (Vụ Xuân 2004)

Bảng 36. Đặc điểm của một số tổ hợp lai triển vọng

Bảng 37. Kết quả khảo nghiệm một số giống trong sản xuất (Thu Đông 2003)

Bảng 38. Danh sách tập đoàn giống lúa sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 39. Danh sách 35 giống lạc có phản ứng khác nhau với bệnh héo xanh vi khuẩn

Bảng 40. Giá trị PIC của tập đoàn 35 giống lạc kháng bệnh héo xanh vi khuẩn

Bảng 41. Giá trị tương quan kiểu hình theo 3 phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau với 4 kiểu phân nhóm

Bảng 42. Nguồn gốc và mức độ kháng bệnh rỉ sắt của 33 giống lạc

Bảng 43. Trình tự các đoạn motif sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 44. Nguồn gốc sinh thái và điểm kháng bệnh của 42 giống lạc

Bảng 45. Trình tự 23 cặp motif SSR thiết kế

Bảng 46. Số phân đoạn ADN nhân bản và giá trị PIC của tập đoàn 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt

Bảng 47. Các allele có liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

Bảng 48. Trình tự nucleotide của các cặp motif SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt

Bảng 49. Tổng hợp kết quả sàng lọc phân tử của các dòng lạc F3 với bốn cặp motif kiểm soát tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

Bảng 50. Chỉ thị SSR liên quan đến tính chịu hạn ở đậu tương

Bảng 51. Chỉ thị SSR dùng để đánh giá đa dạng tập đoàn giống đậu tương

Bảng 52. Kết quả phân tích sự đa dạng một số giống đậu tương với các chỉ thị SSR

Bảng 53. Thời gian sinh trưởng của các dòng thử nghiệm, vụ xuân 2004 tại Thanh Hà, Hoà Bình

Bảng 54. Năng suất và các yếu tố tạo thành năng suất của các dòng thử nghiệm, vụ xuân 2004 tại Thanh Hà, Hoà Bình.

Bảng 55. Trình tự các chỉ thị STS liên quan đến tính kháng đạo ôn và chất lượng lúa gạo:

Bảng 56. Trình tự các nucleotide của hai chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh khô vằn ở ngô

Bảng 57. Số vụ khảo nghiệm và diện tích sản xuất thử của các dòng cây trồng tạo được

Bảng 58. Thống kê một số đặc điểm nông học của các dòng lúa khảo nghiệm

Bảng 59. Thống kê một số đặc điểm nông học của các dòng ngô khảo nghiệm

Bảng 60. Thống kê diện tích sản xuất giống lúa DR3 trong 10 vụ sản xuất thử (Vụ Đông Xuân 1998-1999, Vụ Mùa 1999, Vụ Đông Xuân 1999-2000, Vụ Mùa 2000, Vụ Đông Xuân 2000-2001, Vụ Mùa 2001, Vụ Đông Xuân 2001-2002, Vụ Mùa 2002, Vụ Đông Xuân 2002-2003 và Vụ Mùa 2003)

DANH MỤC CÁC HÌNH

- Hình 1.** Chồi Bạch đàn lai U29E1 và U29C3
- Hình 2.** Chồi bạch đàn cấy đứng và cấy nằm
- Hình 3.** Chồi bạch đàn lai ra rễ
- Hình 4.** Chồi bất định Keo lai sau quá trình khử trùng và chồi Keo kéo dài
- Hình 5.** Ra rễ trực tiếp Keo lai bằng thuốc TTG
- Hình 6.** Luống cây Bạch đàn lai và Keo lai nuôi cấy mô trong vườn ươm
- Hình 7.** Chồi Ba kích sơ cấp tái sinh từ lát cắt đốt thân 4 tuần trên môi trường MS + 0,5 mg/l Kin.
- Hình 8.** Cụm chồi Ba kích tái sinh từ đốt thân (hàng trên) và từ ngọn chồi (hàng dưới) 60 ngày trong môi trường MS + 3,0 mg/l BAP
- Hình 9.** Cụm chồi Ba kích tái sinh từ ngọn chồi, đốt thân và phần gốc trong môi trường MS + 3,0 mg/l BAP (60 ngày sau khi cấy)
- Hình 10.** Tạo rễ in vitro chồi Ba kích nuôi cấy trong 1/4MS không bổ sung auxin
- Hình 11.** Cây Ba kích ra rễ in vitro và sinh trưởng trong bầu (sau 90 ngày)
- Hình 12.** Một số giống Địa lan hiện đang lưu giữ
- Hình 13.** Tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường có bổ sung NAA và cây giống Địa lan cấy mô đạt tiêu chuẩn (> 1 g)
- Hình 14.** Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng của Địa lan cấy mô sau 8 tuần
- Hình 15.** Địa lan cấy mô ngoài vườn ươm tại Sapa
- Hình 16.** Địa lan cấy mô ngoài vườn sản xuất (vườn ươm cấp II)
- Hình 17.** Nhân nhanh in vitro hai dòng lúa bất dục
- Hình 18.** Hạt điều làm nguyên liệu nuôi cấy và cây mầm
- Hình 19.** Chồi tạo ra từ nuôi cấy lớp mỏng đốt thân, tạo rễ hoàn chỉnh
- Hình 20.** Cây in vitro giống BO1 ngày thứ 60, cây ra bầu đất ngày thứ 7
- Hình 21.** (A) Mô sẹo giống Tám xoan sau 3 tuần trên môi trường C₁; (B) Mô sẹo giống Dục thơm bị chết sau 30 ngày chiếu xạ ở liều 13 Krad; (C) Cây tái sinh sau 60 ngày chiếu xạ ở liều 9 Krad trên môi trường R; (D) Cây mạ nuôi trên môi trường tạo rễ; (E) Tám xoan đối chứng cao 142 cm (trái) và Tám xoan đột biến cao 1,05 cm (phải) ở thế hệ MR₀ (liều chiếu xạ 9 Krad)
- Hình 22.** B: Dòng lúa TXL7-01-01 không cảm quang; A: Tám Xoan đối chứng - không trở bông
- Hình 23.** Hình dạng và màu sắc hạt lúa và gạo của dòng TXL7-01-01
- Hình 24.** Hàm lượng amylose của F2 và BC2F2 của tổ hợp lai IR64/Jasmine 85
- Hình 25.** Khai thác biến dị soma của các giống lúa đặc sản và cây lúa chuyển sang môi trường tái sinh
- Hình 26.** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng tạo mô sẹo từ hạt phấn
- Hình 27.** Mô sẹo hình thành trên môi trường Cal và Call
- Hình 28.** Tỷ lệ tái sinh của một số tổ hợp lai
- Hình 29.** Cây tái sinh từ mô sẹo
- Hình 30.** Giống Nàng thơm Chợ Đào -5 trồng tại Sóc Trăng và hạt giống OM 5797
- Hình 31.** Mô sẹo tạo từ hạt phấn cặp lai Moroberekan và WAB56-125 trên môi trường thạch và cây lúa tái sinh từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Moroberekan và WAB56-125
- Hình 32.** Cây lúa đơn bội kép HPMD4 nhận được từ nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Moroberekan và WAB56-12
- Hình 33.** Dòng lúa đơn bội kép HPKW1 nhận được từ tổ hợp lai KDML105 và WAB56-125
- Hình 34.** Dòng lúa F6 BW12 trồng vụ xuân 2004 (trái) và dòng lúa KW1 từ cặp lai KDML105 và WAB56-125 trồng vụ xuân 2004
- Hình 35.** Tái sinh cây ngô đơn bội kép
- Hình 36.** Cây tái sinh từ nguồn vật liệu được truyền tính cảm ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây (C164xC172)
- Hình 37.** Cây ngô đơn bội kép được ra ngôi trên nền đất
- Hình 38.** Nguồn dòng C177 kháng khô vằn
- Hình 39.** Nguồn dòng C305 kháng khô vằn
- Hình 40.** Nguồn đối chứng nhiễm bệnh khô vằn
- Hình 41.** Cây ngư tất in vitro nhân từ đốt thân sau 20 ngày nuôi cấy và cây ngư tất in vitro ngoài vườn ươm 75 ngày tuổi

- Hình 42.** Mô sẹo ngang cắt từ hypocotyl trong môi trường MS + 1 mg/l IBA sau 20 ngày nuôi cấy
- Hình 43.** Kết quả điện di sản phẩm RAPD của 36 giống lúa có mức độ kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn với mỗi RA36
- Hình 44.** Sơ đồ hình cây của 36 giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn theo hệ số di truyền giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA
- Hình 45.** Phân tích theo tọa độ chính (PCA) của tập đoàn 36 giống lúa với tổng số của hệ số sai khác di truyền là 60,2 %
- Hình 46.** Đánh giá bệnh rỉ sắt bằng phương pháp lá tách
- Hình 47.** Chọn lọc dòng kháng bệnh rỉ sắt
- Hình 48.** Đánh giá bệnh héo xanh bằng phương pháp nhiễm hạt
- Hình 49.** Điện di kiểm tra sản phẩm PCR-RAPD với các hàm lượng ADN khác nhau.
- Hình 50.** Điện di sản phẩm PCR với cặp mồi L45 và L50 trên gel polyacrylamide 0,6%
- Hình 51.** Sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ giữa 35 giống lạc tập đoàn kháng bệnh héo xanh
- Hình 52.** Kết quả điện di sản phẩm PCR-RAPD của 33 giống lạc với mồi RA40
- Hình 53.** Hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 33 giống lạc nghiên cứu
- Hình 54.** Điện di sản phẩm PCR của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt với cặp mồi L25 trên gel polyarylamit
- Hình 55.** Biểu đồ đa chiều (MDS) của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt
- Hình 56.** Biểu đồ hình cây của 42 giống lạc kháng/mẫn cảm với bệnh rỉ sắt theo hệ số của Jaccard và phương pháp phân nhóm UPGMA.
- Hình 57.** Kết quả điện di sản phẩm PCR của giống ICG950166 và L12 với một số cặp mồi kiểm soát tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc
- Hình 58.** 13 dòng lạc F3 cặp lai ICG950166 x L12 mang chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt phân tích với mồi L38 và L54
- Hình 59.** Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng các cặp mồi SSR liên quan đến tính đa dạng của các giống đậu tương: 1- Cúc Vàng; 2- ĐT80; 3- ĐT12; 4- V74; 5- VX91; 6- ĐT2000; 7- CM60
- Hình 60.** Sự đa dạng của các giống đậu tương được chọn làm nguyên liệu khởi đầu.
- Hình 61.** Sơ đồ hình cây về độ tương đồng di truyền giữa các giống đậu tương
- Hình 62.** Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng các cặp mồi SSR của các giống đậu tương. Cúc Vàng(1), ĐT2000(8), và các dòng lai F3: 2- ĐC4; 3- ĐC5; 4- ĐC6; 5- ĐC7; 6- ĐC8; 7- ĐC10
- Hình 63.** Khoảng cách di truyền của các dòng đậu tương F3 so với bố mẹ
- Hình 64.** Khoảng cách di truyền của các dòng đậu tương F3 so với bố mẹ.
- Hình 65.** Phổ điện di SSR của các giống đậu tương với khả năng kháng bệnh rỉ sắt khác nhau
- Hình 66.** Đa dạng di truyền của một số giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt
- Hình 67.** Cây lai và bố mẹ ĐT2000 x Cúc vàng và ĐT2000 x ĐT12
- Hình 68.** Dòng ĐT213.4.347 (ĐT26) vụ đông 2003 và Dòng ĐT213.4.347 vụ đông 2003
- Hình 69.** Điện di sản phẩm PCR của ADN một số dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Moroberekan và WAB56 - 125 với cặp mồi RG64
- Hình 70.** Điện di sản phẩm PCR của ADN một số cây lúa lai với mồi RG28.
- Hình 71 :** Đánh giá đa hình với chỉ thị Wx với 15 giống lúa mùa và 9 giống lúa cao sản.
- Hình 72.** Kết quả phân tích với chỉ thị RG28 với một số dòng BCF2 của cặp lai IR 64 x DS 20
- Hình 73.** Phả hệ của 80 dòng ngô thuần phân tích với chỉ thị SSR
- Hình 74.** Phân tích tính kháng bệnh khô vằn của thế hệ S4 với chỉ thị phi065

DANH SÁNH CÁC CƠ QUAN PHỐI HỢP NGHIÊN CỨU VÀ NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

1. Một số thông tin chính về đề tài

Tên đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống cây trồng

Mã số: KC.04.08

Thuộc chương trình: Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học

Thời gian thực hiện: 10/2001 – 10/2004

Kinh phí thực hiện: 3 000 000 000 đồng (ba tỉ đồng)

Cơ quan chủ trì: Viện Công nghệ sinh học

Cơ quan chủ quản: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2. Hoạt động của các cơ quan phối hợp tham gia thực hiện đề tài

TT	Tên tổ chức	Địa chỉ	Nội dung và nhiệm vụ	Người chủ trì	Phân bổ kinh phí (triệu đ)
1	Phòng CNTBT, Viện Công nghệ Sinh học	Cầu Giấy, Hà Nội	- Xây dựng đề tài và tổng kết đề tài. - Cải tạo giống lúa đặc sản bằng công nghệ sinh học hiện đại (chọn dòng soma, nuôi cấy bao phấn, chỉ thị phân tử,...). - Sơu tập, khai thác các chỉ thị phân tử đối với đậu tương và lạc. - Đánh giá đa dạng ADN tập đoàn đậu tương, lạc kháng bệnh rỉ sắt, chịu hạn. - Phối hợp chọn dòng đậu tương và lạc bằng chỉ thị phân tử. - Xây dựng quy trình nhân nhanh hai dòng lúa bất dục Nhị32A và BoA. - Triển khai mở rộng sản xuất dòng DR3 tạo được bằng chọn dòng tế bào trong giai đoạn trước đạt quy mô khu vực hoá.	Lê Thị Muội Lê Trần Bình Đinh Thị Phòng Trần Thị Phương Liên	1810
2	Phòng DTTBT, Viện Công nghệ Sinh học	Cầu Giấy, Hà Nội	Chọn tạo các dòng lúa chất lượng cao kháng đạo ôn bằng lai truyền thống, nuôi cấy bao phấn và chỉ thị phân tử	Nguyễn Đức Thành	150

3	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long	Ô Môn, Cần Thơ	Tạo dòng lúa mới bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn và chọn dòng biến dị soma đối với lúa xuất khẩu và lúa đặc sản.	Nguyễn Thị Lang	170
4	Viện nghiên cứu ngô	Thị trấn Phùng, Đan Phượng, Hà Tây	Tạo dòng thuần bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn và phối hợp kỹ thuật phân tử trong chọn tạo giống chịu bệnh khô vằn và năng suất cao.	Bùi Mạnh Cường	180
5	Trung tâm Nghiên cứu và Thực nghiệm đậu đỗ, Viện KHKTNN	Văn Điển, Hà Nội	Phối hợp sử dụng các chỉ thị phân tử để chọn tạo các giống đậu tương và giống lạc chịu bệnh rỉ sắt, héo xanh virus và chịu hạn.	Nguyễn Văn Thắng Trần Thị Trường	170
6	Trung tâm Nghiên cứu giống cây trồng rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp	Đông Ngạc, Từ Liêm, Hà Nội.	Hoàn thiện công nghệ nhân nhanh giống cây trồng rừng năng suất cao bằng công nghệ nuôi cấy mô thực vật cho một số dòng Keo Lai và Bạch Đàn Lai.	Đoàn Thị Mai	140
7	Viện Dược liệu, Bộ Y tế	3B Quang Trung, Hà Nội	Sử dụng công nghệ tế bào thực vật để phục tráng giống Ngưu Tất (<i>Achyranthe bidentata</i> Blume-Amaranthaceae) và hoàn thiện quy trình nhân nhanh <i>in vitro</i> giống Ba Kích (<i>Morinda officinalis</i> Hoai-Rubiaceae).	Phạm Văn Hiến	120
8	Viện Sinh học nông nghiệp, Trường ĐHNHI-HN.	Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội.	Xây dựng quy trình nhân nhanh một số giống hoa Địa Lan quý (khu vực phía Bắc) bằng công nghệ nuôi cấy mô thực vật.	Nguyễn Quang Thạch	150
9	Viện Sinh học Nhiệt đới	Thủ Đức, Hồ Chí Minh	Nghiên cứu nhân nhanh một số dòng điều (<i>Anacardium occidentale</i> L.) cao sản bằng phương pháp quang tự dưỡng và nuôi cấy lớp mỏng.	Nguyễn Thị Quỳnh	110

3. Các cán bộ tham gia

TT	Họ tên	Đơn vị
1	PGS.TSKH. Lê Thị Muội	Viện Công nghệ Sinh học
2	PGS.TS. Lê Trần Bình	Viện Công nghệ Sinh học
3	TS. Đinh Thị Phòng	Viện Công nghệ Sinh học
4	NCS. Lê Xuân Đắc	Viện Công nghệ Sinh học
5	CN. Bùi Văn Thắng	Viện Công nghệ Sinh học
6	CN. Phan Trọng Hoàng	Viện Công nghệ Sinh học
7	KTV. Nguyễn Thị Nhị	Viện Công nghệ Sinh học
8	CN. Bùi Chi Lăng	Viện Công nghệ Sinh học
9	KTV. Nguyễn Thị Dừa	Viện Công nghệ Sinh học
10	CN. Trương Thu Thủy	Viện Công nghệ Sinh học
11	CN. Nguyễn Minh Hùng	Viện Công nghệ Sinh học
12	CN. Nguyễn Hồng Châu	Viện Công nghệ Sinh học
13	CN. Từ Duy Thắng	Viện Công nghệ Sinh học
14	CN. Nguyễn Thị Yến An	Viện Công nghệ Sinh học
15	TS. Nghiêm Như Vân	Viện Công nghệ Sinh học
16	ThS. Cao Thị Lợi	Viện Công nghệ Sinh học
17	KTV. Lê Xuân Sách	Viện Công nghệ Sinh học
18	CN. Phạm Bích Ngọc	Viện Công nghệ Sinh học
19	KS. Đỗ Xuân Đồng	Viện Công nghệ Sinh học
20	KS. Đỗ Tiến Phát	Viện Công nghệ Sinh học
21	SV. Nguyễn Thị Hải Hà	Viện Công nghệ Sinh học
22	SV. Chu Thị Thu Thủy	Viện Công nghệ Sinh học
23	SV. Nguyễn Thị Hải	Viện Công nghệ Sinh học
24	PGS. TS. Nguyễn Đức Thành	Viện Công nghệ Sinh học
25	TS. Phan Thị Bảy	Viện Công nghệ Sinh học
26	KS. Nguyễn Thuý Hạnh	Viện Công nghệ Sinh học
27	ThS. Quách Thị Liên	Viện Công nghệ Sinh học
28	KTV. Đào Thị Hạnh	Viện Công nghệ Sinh học
29	Ths. Lê Thị Bích Thủy	Viện Công nghệ Sinh học
30	TS. Trần Thị Phương Liên	Viện Công nghệ Sinh học
31	ThS. Huỳnh Thị Thu Huệ	Viện Công nghệ Sinh học
32	CN. Lương Thị Thu Hường	Viện Công nghệ Sinh học
33	TS. Trần Thị Trường	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
34	ThS. Nguyễn Văn Thắng	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
35	VS. TSKH. Trần Đình Long	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ

36	TS. Nguyễn Thị Bình	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
37	KS. Nguyễn Thị Loan	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
38	KS. Nguyễn Thị Mỹ Hạnh	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
39	CN. Nguyễn Văn Dương	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
40	ThS. Nguyễn Thị Yến	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
41	ThS. Phan Quốc Gia	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
42	KS. Nguyễn Xuân Thu	Trung Tâm thực nghiệm và nghiên cứu cây đậu đỗ
43	TS. Bùi Mạnh Cường	Viện nghiên cứu cây Ngô
44	GS. TS. Ngô Hữu Tình	Viện nghiên cứu cây Ngô
45	KS. Ngô Thị Minh Tâm	Viện nghiên cứu cây Ngô
46	KS. Ngụy Hương Lan	Viện nghiên cứu cây Ngô
47	KS. Đinh Công Chính	Viện nghiên cứu cây Ngô
48	KS. Đoàn Thị Bích Thảo	Viện nghiên cứu cây Ngô
49	CN. Nguyễn Văn Trường	Viện nghiên cứu cây Ngô
50	CN. Huỳnh Hữu Đức	Viện sinh học Nhiệt đới
51	TS. Nguyễn Thị Quỳnh	Viện Sinh học Nhiệt đới
52	CN. Nguyễn Đình Sỹ	Viện Sinh học Nhiệt đới
53	TS. Thái Xuân Du	Viện Sinh học Nhiệt đới
54	CN. Nguyễn Minh Tuấn	Viện Sinh học Nhiệt đới
55	TS. Phạm Văn Hiến	Viện Dược liệu
56	CN. Vũ Hoài Sâm	Viện Dược liệu
57	ThS. Nguyễn Trần Hy	Viện Dược liệu
58	CN. Tạ Như Thục Anh	Viện Dược liệu
59	KS. Trần Thị Liên	Viện Dược liệu
60	TS. Nguyễn Thị Lang	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
61	PGS. TS. Bùi Chí Bửu	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
62	CN. Đặng Minh Tâm	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
63	CN. Lê Thị Mui	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
64	GS.TS. Nguyễn Quang Thạch	Viện Sinh học nông nghiệp
65	TS. Nguyễn Lý Anh	Viện Sinh học nông nghiệp
66	CN. Hoàng Thị Nga	Viện Sinh học nông nghiệp
67	CN. Vũ Ngọc Lan	Viện Sinh học nông nghiệp
68	CN. Nguyễn Xuân Trường	Viện Sinh học nông nghiệp
69	ThS. Đoàn Thị Mai	Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng
70	CN. Lê Sơn	Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng
71	CN. Lương Thị Hoan	Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng

4. Các đơn vị khác tham gia

- Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống cây trồng Trung ương
- Sở NN và PT nông thôn tỉnh Tuyên Quang
- Sở NN và PT nông thôn tỉnh Vĩnh Phúc
- Sở NN và PT nông thôn tỉnh Trà Vinh
- Sở NN và PT nông thôn tỉnh Thừa thiên Huế
- Sở NN và PT nông thôn tỉnh Nam Hà
- Sở NN và PT nông thôn tỉnh Hưng Yên
- Sở Khoa học công nghệ môi trường tỉnh Quảng Trị
- Sở khoa học công nghệ môi trường tỉnh Hà Tĩnh
- Trung tâm Giống cây trồng tỉnh Bến Tre
- Trung tâm Giống cây trồng tỉnh Tây Ninh
- Trung tâm Khuyến nông tỉnh Trà Vinh
- Trung tâm Khuyến nông tỉnh Sóc Trăng
- Trung tâm Giống cây trồng tỉnh Sóc Trăng
- Trung tâm Khuyến nông và khuyến lâm Thái Nguyên
- Trung tâm Khuyến nông và khuyến lâm huyện Phù Yên, Sơn La
- Trạm Khuyến nông và khuyến lâm Sóc Sơn, Hà Nội
- Trung tâm Khoa học Sản xuất Lâm nghiệp Đông Nam Bộ
- Trung tâm Giống và kỹ thuật lâm nghiệp Phú Yên
- Trung tâm Giống khu vực I, Sơn La
- Trường Trung học kinh tế kỹ thuật Tuyên Quang
- Trạm chuyển giao giống cây trồng mới Đại Mỗ, Hà Nội
- Huyện Đan Phượng, Hà Tây
- Huyện Mê Linh, Hà Nội.
- Hợp tác xã Phú Diễn, Hà Nội
- Hợp tác xã Hiền Quang, Phú Thọ
- Hợp tác xã Cẩm Yên và Cẩm Giang, Huyện Cẩm Thủy, Thanh Hoá
- Hợp tác xã Hương Sơn, Hà Tĩnh
- Hợp tác xã Đồng Hưu, Tân Sỏi, Bắc Giang
- Hợp tác xã Do Thượng, Vĩnh Phúc
- Hợp tác xã Hợp Thịnh, Vĩnh Phúc
- Hợp tác xã Xuân Quang, Hưng Yên

BÀI TÓM TẮT

Đề tài KC.04.08 do Viện CNSH chủ trì giai đoạn 2001 - 2004 có mục đích là chọn tạo, nhân nhanh giống cây trồng mới có năng suất cao, phẩm chất tốt, chống chịu sâu bệnh và điều kiện bất thuận ở lúa, ngô, đậu tương, lạc và Ngưu tất bằng CNTB và CTPT. Đồng thời với đó là hoàn thiện quy trình công nghệ nhân giống *in vitro* ở quy mô sản xuất đối với một số cây trồng rừng, Ba kích và hoa Địa lan, nhằm chuyển giao cho các cơ sở sản xuất và nghiên cứu quy trình nhân giống quy mô phòng thí nghiệm đối với lúa bất dục, điều cao sản.

Bằng việc nuôi cấy lát mỏng và các mầm chồi từ các cây giống gốc theo phương pháp nuôi quang tự dưỡng (môi trường không có kích thích sinh trưởng và đường) và môi trường MS cải tiến, đã tăng hệ số nhân giống đối với cây thân gỗ. Kết quả là hoàn thiện 04 quy trình công nghệ nhân giống *in vitro* quy mô 10000 cây/năm đối với 03 dòng Keo lai, 03 dòng Bạch đàn lai (đây là các dòng Keo lai và Bạch đàn lai mới chọn tạo được), cây Ba kích và hoa Địa lan (07 giống thương mại và hai giống bản địa). Trong đó, quy trình nhân giống đối với cây Keo Lai và Bạch đàn lai đã được chuyển giao cho nhiều đơn vị nghiên cứu và cơ sở sản xuất trong cả nước. Hoàn thiện quy trình nhân giống quy mô phòng thí nghiệm đối với 02 dòng lúa bất dục (Nhị32A và BoA) và 02 dòng điều cao sản (PN1 và BO1).

Lần đầu tiên ở Việt Nam, đã ứng dụng kỹ thuật SHPT vào việc phân tích đa dạng tập đoàn giống cây nhằm xác định ưu thế bố mẹ của các tổ hợp lai ưu tú để tạo ngô năng suất và kháng bệnh khô vằn, lạc kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh; đậu tương chịu hạn, kháng bệnh rỉ sắt và phân tích các dòng mới tạo được bằng các chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng quan tâm. Đã xác định được 22 chỉ thị phân tử liên quan đến một số tính trạng cụ thể là: 05 chỉ thị liên quan đến chất lượng lúa gạo ở lúa, 02 chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn lúa, 02 chỉ thị liên quan đến bệnh khô vằn ở ngô, 08 chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc, 3 chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn và 2 chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương. Các chỉ thị này đã được sử dụng trong phân tích phát hiện sớm các dòng mới tạo được trong đề tài.

Bằng phương pháp lai tạo truyền thống kết hợp với CNSH hiện đại (nuôi cấy bao phấn, chọn dòng biến dị soma, truyền tính cảm ứng nuôi cấy bao phấn), đã tạo được 414 dòng cây ở bốn loại cây trồng (lúa, ngô, lạc và đậu tương) năng suất, chất lượng khá, chống chịu được một số điều kiện bất thuận của môi trường và kháng sâu bệnh. Trong đó đã đưa đi khảo nghiệm 3 dòng lúa (Nàng thơm chợ Đào đột biến-5 (NTCĐĐB-5), OM 3566 và dòng HPKW1); 3 dòng ngô (CN4, CN5 và F145) và 1 dòng đậu tương - DT213.4.347 (ký hiệu khảo nghiệm là DT26). Nổi bật là đã triển khai sản xuất thử được 3673 ha dòng lúa NTCĐĐB-5 và trên 100 ha dòng ngô F145. Dự kiến sẽ xin công nhận giống tiến bộ cho cả hai dòng này vào đầu năm 2005.

Đã mở rộng sản xuất dòng lúa DR3 (tạo được biến dị soma giai đoạn trước) với diện tích gần 3000 ha tại các chân ruộng bạc màu khó khăn về nước, năng suất luôn vượt các giống đang trồng như Khang Dân, Q5,... từ 10 đến 25%. Giống lúa DR3 được Hội đồng giống của Nhà nước công nhận là giống tạm thời ngày 16/1/2004.

MỞ ĐẦU

Công nghệ tế bào thực vật đã trở thành một trong những công cụ thông dụng trong việc nhân nhanh, duy trì, phục tráng và tạo giống cây trồng mới ở nhiều viện nghiên cứu như Viện Công nghệ Sinh học, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Sinh học Nhiệt đới,... Nhiều quy trình công nghệ nhân nhanh trên một số đối tượng cây trồng như khoai tây, dưa sồi, khoai lang, chuối, mía, cỏ ngọt,... đã được áp dụng triển khai ở hầu hết các sở Khoa học và Công nghệ trong cả nước (Sở Khoa học và Công nghệ Hải Dương, Sở Khoa học và Công nghệ Nam Định, Sở Khoa học và Công nghệ Bắc Giang, Sở Khoa học và Công nghệ Hà Tĩnh...). Đặc biệt, việc tạo giống cây trồng thông qua kỹ thuật nuôi cấy bao phấn, chọn dòng biến dị soma và truyền tính cảm ứng nuôi cấy bao phấn cũng rất thành công ở lúa và ngô tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long và Viện Nghiên cứu cây Ngô.

Gần đây, chọn tạo giống với sự trợ giúp của chỉ thị phân tử đang được ứng dụng rộng rãi ở các Viện nghiên cứu trên thế giới (Mỹ, Trung Quốc, IRRI, Ấn Độ,...). Chỉ thị phân tử liên kết chặt chẽ với các gen sẽ được sử dụng để chọn lọc các cá thể ngay ở giai đoạn sớm mà không phải phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Chọn giống dưới sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử (Marker Assisted Selection = MAS) rất có hiệu quả trong tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá, cà chua chịu bệnh nấm sương, đậu tương kháng được sâu đục quả,... Kỹ thuật chỉ thị phân tử đảm bảo cho các nhà chọn tạo giống nhận diện chính xác các gen liên quan ở giai đoạn sớm mà không bị chi phối bởi điều kiện môi trường và thời gian tạo giống rút ngắn xuống từ 2 - 3 năm.

Xuất phát từ cơ sở trên, đề tài: “**Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào thực vật và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống cây trồng**” giai đoạn 2001 - 2004 do Viện CNSH chủ trì và phối hợp với Viện Lúa ĐBSCL, Viện SHNN, Viện SHND, Viện NCCN, Trung tâm NCCTR, Trung tâm NC và TN cây đậu đỗ và Viện Dược liệu đã thực hiện các nội dung nghiên cứu sau:

- (i) Xây dựng và hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* quy mô phòng thí nghiệm đối với 02 dòng lúa bất dục (Nhị32A và BoA) và 02 giống điều (PN1

- và BO1); quy mô 10000 cây/năm đối với cây lâm nghiệp (các dòng Keo lai và Bạch đàn lai mới tạo được), cây Ba kích và giống hoa Địa lan.
- (ii) Triển khai công nghệ tế bào thực vật (kỹ thuật nuôi cấy bao phấn và chọn dòng biến dị soma) vào việc tạo giống lúa chất lượng, năng suất và kháng bệnh (đạo ôn, bạc lá) phục vụ nhu cầu tiêu dùng trong nước và đáp ứng thị trường xuất khẩu; tạo giống ngô năng suất và kháng bệnh khô vằn; phục tráng cây Ngưu tất có thời gian sinh trưởng dài, củ ít xơ.
 - (iii) Sơ tập, khai thác và thiết kế các chỉ thị phân tử vào việc đánh giá đa dạng ADN tập đoàn giống để xác định bố mẹ các tổ hợp lai ưu tú theo mục đích chọn tạo như lúa kháng bệnh bạc lá vi khuẩn, ngô năng suất, lạc kháng bệnh rỉ sắt, đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt.
 - (iv) Nghiên cứu kỹ thuật tạo giống có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử đối với một số tính trạng như chất lượng của gạo; tính kháng bệnh đạo ôn ở lúa; tính kháng bệnh khô vằn ở ngô; lạc kháng bệnh rỉ sắt; đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt.
 - (v) Chuyển giao quy trình công nghệ nhân giống một số loại cây trồng trên cho các đơn vị nghiên cứu và sản xuất trong nước.
 - (vi) Kết luận được 2 - 3 dòng cây có triển vọng: Khảo nghiệm các dòng ưu tú lúa, ngô, đậu tương và lạc.
 - (vii) Mở rộng sản xuất giống lúa DR3 để xin công nhận giống tạm thời (khu vực hoá).

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.1. Nhân nhanh *in vitro*

Ngay từ năm 1959, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được ứng dụng để cải tạo và nhân nhanh giống cây trồng có giá trị thương mại ở nhiều nước trên thế giới (Bajaj, 1990; Jain và CS, 1998). Công nghệ nhân giống *in vitro* một số loại cây cảnh và cây thân gỗ đã mang lại lợi nhuận cao ở nhiều nước trên thế giới (Phillip và CS, 1995). Ở Hà Lan, Ấn Độ và Thái Lan, công nghệ nhân giống *in vitro* đối với cây ăn quả (xoài, dứa,...) và cây hoa (hoa hồng, phong lan, tulip,...) đã trở thành một ngành công nghiệp mang lại nguồn thu hàng năm tới 4 triệu USD (Jain và Klerk, 1997). Hiện nay, Thái Lan, Malaysia, Nhật Bản là những nước triển khai các công nghệ nhân giống *in vitro* ở quy mô công nghiệp trên nhiều đối tượng cây trồng có giá trị (đu đủ, chuối, mía, măng tây, tre trúc,...).

Ở Việt Nam, kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật đã được nghiên cứu và thử nghiệm trên 30 năm nay. Các quy trình công nghệ nhân nhanh các giống cây trồng có giá trị trên các đối tượng như cây thực phẩm (khoai tây, khoai sọ), cây công nghiệp (cà phê, mía, dứa sọ), cây ăn quả (chuối, mía, dứa cayen), cây hoa (phong lan, đồng tiền kép, cẩm chướng), cây dược liệu (trinh nữ hoàng cung, cà gai, tam thất, sâm Ngọc Linh), cây lâm nghiệp (bạch đàn, keo lai, tre) bằng nuôi cấy *in vitro* cũng rất thành công ở các phòng thí nghiệm của nhiều cơ quan nghiên cứu trong cả nước (Trung tâm nghiên cứu cây trồng rừng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Sinh học nông nghiệp, Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Dược liệu,...). Đặc biệt, các phương pháp như nuôi cấy bao phấn (lúa), nhân đỉnh sinh trưởng (khoai tây, dứa sọ, hoa đồng tiền kép, cẩm chướng,...), nuôi cấy lớp mỏng (cam, chanh, nho,...), tế bào trần (thuốc lá) và chọn dòng biến dị soma (lúa, thuốc lá, cỏ ngọt,...) đã được triển khai ứng dụng lần đầu tiên tại Viện Công nghệ Sinh học (Lê Thị Muội, Lê Trần Bình). Hiện nay, nhiều quy trình công nghệ nhân giống *in vitro* đã được chuyển giao cho các Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô ở các địa phương (trên 40 tỉnh thành), phục vụ cho mục đích nhân giống tại chỗ.

Riêng ở Viện Công nghệ Sinh học, các kỹ thuật cơ bản về nuôi cấy mô tế bào thực vật như: i) Nhân giống sạch bệnh bằng cấy mô, nuôi cấy đơn bội, dung hợp tế bào trần, chọn dòng biến dị soma theo chiều hướng chống chịu với các điều kiện bất thuận của môi

trường đã được ứng dụng thành công trên các đối tượng khoai tây, lúa, khoai lang, thuốc lá, mía, chuối, dưa sồi,... (Lê Thị Muội và Lê Trần Bình, 1980, 1985; Lê Trần Bình và CS, 1998; Đinh Thị Phòng và CS, 1999; Phan Thị Bẩy, 1999). Cho đến nay, một số thành tựu cơ bản đã được đưa vào áp dụng ở nhiều Viện nghiên cứu trong nước.

1.2. Tạo giống bằng công nghệ tế bào thực vật

Các nội dung bao gồm chọn dòng biến dị soma và tạo dòng thuần bằng nuôi cấy bao phấn. Biến dị thu được từ các cây tái sinh từ mô sẹo đã tạo ra nhiều giống mới trên đối tượng cây lúa, hoa tulip, thuốc lá, ngô, khoai tây,... (Jain, 1998; Oono, 1983). Vài năm gần đây, kỹ thuật nuôi cấy mô sẹo kết hợp với việc xử lý tác nhân chọn lọc có định hướng đã cho kết quả khả quan trong việc cải tạo các giống cây trồng có khả năng chống chịu với lạnh, hạn, bệnh,... Mức độ biến dị và tính ổn định di truyền của các giống cây trồng mới từ cây tái sinh cũng đã được chứng minh ở mức độ phân tử (Mezencev và CS, 1997). Đến nay, đã có hàng loạt các công bố thành công trong lĩnh vực này (Adkins và CS, 1995; Bertin và CS, 1997; Stephen và CS, 1998; Jan và CS, 1997; Van Sint Jan, 1992). Bằng cách này, nhiều dòng lúa đã trở thành giống và được sản xuất rộng rãi ở Trung Quốc, Nhật Bản (Sun và CS, 1991).

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn để tạo cây đơn bội và dòng thuần được triển khai ứng dụng trong tạo giống từ năm 1960. Nhiều tác giả đã công bố kết quả tạo dòng thuần ở lúa, lúa mì và ngô chỉ mất thời gian là 6 - 12 tháng, trong khi phương pháp truyền thống mất ít nhất là 4 năm. Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn đã là một trong những phương pháp thông dụng trong chọn tạo giống ở Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, IRRI (Bajaj, 1990). Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn để chọn tạo các dòng thuần ưu tú đã thu được kết quả rất đáng khích lệ ở Viện CNSH và Viện NCLĐBSCL. Viện NCLĐBSCL đã tạo ra được giống lúa Khao 39, Khao 85 có nguồn gốc từ giống lúa Khaodak Mali, Thái Lan. Giống Khao 85 cũng đang được sản xuất ở một số tỉnh phía Bắc (tin của Trung tâm khảo nghiệm giống cây trồng Trung ương cung cấp).

Trong cả hai giai đoạn liên tiếp (1991 - 1995; 1996 - 2000), Viện Công nghệ Sinh học đã liên tiếp thực hiện có kết quả đề tài cấp nhà nước thuộc chương trình KHCN do PGS.TSKH. Lê Thị Muội chủ trì với mục tiêu chính là sử dụng kỹ thuật chọn dòng tế

bào để chọn tạo các giống lúa và thuốc lá chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi môi trường. Cụ thể, nhóm tác giả của phòng Công nghệ tế bào thực vật đã tạo được 03 dòng lúa DR1, DR2 và DR3 có khả năng chịu hạn và chịu lạnh khá, trong đó DR2 đã được công nhận là giống lúa quốc gia 1998 và hiện nay, DR2 không chỉ được gieo trồng ở 12 tỉnh miền núi phía Bắc mà còn cả ở phía Nam (Kon Tum) và Lào với tổng diện tích vụ xuân 2000 là trên 1500 ha. DR3 đã qua ba vụ khảo nghiệm cơ bản và hiện đang được triển khai sản xuất thử ở các vùng sinh thái khó khăn (Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, 1999) và nhiều dòng có triển vọng về chịu mặn và phèn sẽ được thử nghiệm trong những năm tới. Nhóm tác giả của phòng thí nghiệm Di truyền tế bào thực vật của Viện CNSH cũng đã chọn lọc thành công dòng lúa BR12 có khả năng kháng bệnh đạo ôn ở lúa (Phan Thị Bẩy, Lê Thị Muội, Nguyễn Đức Thành, 1999). Tương tự, Bùi Bá Bổng đã chọn được các dòng chịu muối triển vọng từ giống lúa Một bụi (Bùi Bá Bổng, 1997).

1.3. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng mới

Từ năm 1983, kỹ thuật chỉ thị phân tử đã trở thành công cụ đắc lực hỗ trợ phương pháp truyền thống trong việc chọn tạo giống cây trồng mới và phát triển mạnh từ thập kỷ 90 của thế kỷ 20. Chỉ thị phân tử cho phép các nhà tạo giống nhận dạng chính xác các gen quan tâm ở bất cứ bộ phận nào của cây ở giai đoạn sớm mà không bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường và thời gian lại được rút ngắn. Hiện nay, có nhiều giống cây trồng mới đã được tạo bằng phương pháp này (Huang và CS (1997) đã tạo được giống lúa mang 4 gen kháng bệnh bạc lá, Zheng và CS (1995) tạo được giống lúa mang 3 gen kháng bệnh đạo ôn).

Các dòng chọn lọc có tính chịu hạn, lạnh, muối và kháng bệnh bằng công nghệ tế bào thực vật đã được chứng minh sự sai khác di truyền ở mức độ phân tử và đánh giá tính chống chịu theo các phương pháp chuẩn xác (Bùi Bá Bổng, 1997; Đinh Thị Phòng và CS, 2000; Phan Thị Bẩy, 2000). Các kết quả này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu để chọn tạo ra những giống lúa chịu hạn, bệnh đạo ôn dưới sự trợ giúp của chỉ thị phân tử (MAS).

Năm năm trở lại đây, nhờ có hợp tác với các tổ chức nước ngoài (Rockefeller Foundation, IRRI, EU,...), nhiều cán bộ nghiên cứu của các Viện đã được cử sang các phòng thí nghiệm tiên tiến ở Mỹ, Bỉ,... để tham gia vào những nghiên cứu về sinh học

phân tử trên đối tượng cây lúa Việt Nam. Hiện nay, chúng ta đã có thể làm chủ được kỹ thuật đánh giá, chọn tạo các giống lúa có tính chống chịu lạnh, hạn, phèn, bệnh đạo ôn dựa trên các kết quả công bố về các trình tự liên quan đến tính chịu lạnh, QTL (các lo cut tính trạng số lượng), của Lê Trần Bình, chịu phèn ở lúa của Nguyễn Thị Vinh, chỉ thị về tính chịu hạn liên quan đến bộ rễ ở lúa nương của Nguyễn Đức Thành, các chỉ thị phân tử liên quan về các nòi đạo ôn ở lúa Việt Nam của Vũ Đức Quang và chỉ thị về tính bất dục nhiệt độ ở lúa của Nguyễn Văn Đồng. Ngay ở Viện Công nghệ Sinh học, gen liên quan đến tính chịu hạn ở đậu tương đã được phân lập và đăng ký bản quyền tác giả tại ngân hàng gen quốc tế EMBL/Genbank/DDBJ. Bên cạnh đó, thì chúng ta cũng có ngân hàng khá phong phú về bộ giống lúa chịu hạn, chịu phèn, chịu đạo ôn, dòng lúa bất dục để chọn các tổ hợp lai cũng như các nghiên cứu có hệ thống về phương pháp đánh giá tính chống chịu. Đây là những điều kiện tiên đề cho phép sử dụng chỉ thị phân tử để tạo giống lúa chịu lạnh, hạn, phèn, kháng bệnh đạo ôn, tính bất dục nhiệt độ (TGMS) ở lúa và giống đậu tương chịu hạn.

Có thể nói rằng các thành tựu về công nghệ tế bào thực vật trong việc nhân nhanh và cải biến giống cây trồng ở Việt Nam đã đạt được nhiều kết quả đáng khích lệ. Ưu điểm của phương pháp này là quy mô thu nhỏ trong phòng thí nghiệm, thời gian chọn tạo ngắn, hệ số nhân giống cao, sạch bệnh, độ thuần giống cao,... Tuy nhiên, việc triển khai ứng dụng công nghệ tế bào thực vật mới chỉ bước đầu thành công ở lúa, khoai tây sạch bệnh và một số quy trình nhân giống *in vitro* chỉ ở quy mô nhỏ đối với một số loại cây trồng.

CHƯƠNG II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. MỤC TIÊU

Xây dựng và áp dụng có hiệu quả công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử trong chọn tạo, nhân nhanh giống cây trồng mới có năng suất cao, phẩm chất tốt, chống chịu sâu bệnh và một số điều kiện bất thuận; Đồng thời với đó là hoàn thiện các quy trình công nghệ ở quy mô sản xuất nhằm chuyển giao cho các cơ sở nghiên cứu triển khai; Đào tạo cán bộ trình độ cao trên lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật. Các mục tiêu chính như sau:

- **Chọn dòng biến dị soma tập trung vào 3 đối tượng là lúa, ngô và cây Ngưu tất:**
(1) **Đối với lúa:** Cải tạo năng suất, độ thuần, khả năng kháng bệnh đạo ôn bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và chỉ thị phân tử cho một số giống lúa có chất lượng cao để tiêu dùng nội địa (Tám xoan, Dự Hương, Hương thơm 1, Bắc Thơm số 7 (cho phía Bắc) và lúa Một bụi, Nàng thơm chợ Đào, Tài Nguyên (cho phía nam).
(2) **Đối với ngô:** Truyền tính cảm ứng nuôi cấy bao phấn từ 3 dòng có khả năng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây *in vitro* sang 200 nguồn vật liệu ưu tú có giá trị trong tạo giống ngô lai thương mại. Tạo dòng đơn bội kép. Xác định được từ 2 - 3 tổ hợp có năng suất cao để đem khảo nghiệm trong sản xuất. (3) **Đối với cây Ngưu tất:** Sử dụng công nghệ nuôi cấy lát mỏng và chọn dòng tế bào để phục tráng giống Ngưu tất (*Achyranthe bidentata* Blume-Amaranthaceae) có thời gian sinh trưởng dài và củ ít xơ.
- **Sử dụng kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu đa dạng và ứng dụng trong tạo giống:** Sử dụng kỹ thuật phân tử để nghiên cứu khoảng cách di truyền nhằm xác định ưu thế lai về năng suất đối với tập đoàn lúa kháng bệnh bạc lá, ngô năng suất kháng khô vằn, lạc và đậu tương năng suất và chịu bệnh/hạn. Sử dụng chỉ thị phân tử liên quan (STS, SSR,...) vào việc chọn tạo các giống ngô kháng bệnh khô vằn, kháng đạo ôn và chất lượng đối với lúa, đậu tương và lạc có năng suất cao trên 3 tấn/ha kháng được bệnh rỉ sắt, chịu hạn khá (đậu tương).
- **Nhân vô tính *in vitro*:** Nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* trên quy mô sản xuất đối với cây lâm nghiệp, một số giống hoa Địa lan quý,

lúa bất dục, cây được liệu và cây điều đáp ứng nhu cầu cây giống đồng đều cho các cơ sở sản xuất.

- **Kết luận được 2 - 3 dòng cây có triển vọng:** Khảo nghiệm các dòng lúa, ngô, đậu tương và lạc ưu tú.
- Mở rộng sản xuất giống lúa DR3 để xin công nhận giống tạm thời (khu vực hoá).

2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU (như đã đăng ký trong Bản thuyết minh)

2.2.1. Xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ nhân nhanh *in vitro*

- *Cây lâm nghiệp:* Hoàn thiện công nghệ nhân nhanh giống Keo lai và Bạch đàn lai bằng công nghệ nuôi cấy *in vitro*, đáp ứng đủ giống cho các cơ sở sản xuất.
- *Cây dược liệu:* Hoàn thiện quy trình nhân nhanh *in vitro* giống Ba kích (*Morinda officinalis* Hoai-Rubiaceae).
- *Hoa Địa lan:* Xây dựng quy trình nhân nhanh bằng tạo dễ hành (protocorm) trong nuôi cấy lát mỏng một số giống hoa Địa lan quý, thích hợp đối với khu vực phía Bắc bằng công nghệ nuôi cấy mô thực vật ở quy mô công nghiệp 10000 cây/năm.
- *Lúa bất dục:* Xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* 2 dòng lúa bất dục Nhị 32A và BoA phục vụ việc sản xuất hạt lai F1 trong nước.
- *Cây Điều:* Xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* đối với 2 giống Điều cao sản BO1 và PO1 để mở rộng diện tích trồng điều đáp ứng nhu cầu xuất khẩu (đây là nội dung nghiên cứu mở rộng không có trong bản thuyết minh).

2.2.2. Sử dụng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn để tạo giống lúa xuất khẩu, lúa chất lượng cao, kháng bệnh đạo ôn trồng trong nội địa, ngô năng suất kháng bệnh khô vằn và phục tráng giống cây Ngưu tất:

- **Đối với lúa:** Tạo giống lúa thuần từ các tổ hợp lai có đủ tiêu chuẩn gạo xuất khẩu cho phía Nam, lúa chất lượng và kháng đạo ôn cho phía Bắc; Cải tạo giống lúa đặc sản theo hướng hạ thấp chiều cao cây, rút ngắn thời gian sinh trưởng, độ thuần giống cao và có tính chống chịu khá với sâu bệnh và các điều kiện bất thuận; Tiếp

tục mở rộng sản xuất dòng lúa DR3 tạo được bằng chọn dòng tế bào trong giai đoạn trước đạt quy mô khu vực hoá.

- **Đối với cây ngô:** Triển khai kỹ thuật truyền tính cảm ứng nuôi cấy bao phấn để tạo dòng ngô đơn bội kép để chọn tạo giống ngô kháng bệnh khô vằn có năng suất từ 6-8 tấn/ha.
- **Cây Ngưu tất:** Sử dụng công nghệ nuôi cấy lát mỏng và chọn dòng tế bào để phục tráng giống Ngưu tất (*Achyranthe bidentata* Blume-Amaranthaceae) có thời gian sinh trưởng dài, củ ít xơ.

2.2.3. Khai thác, thiết kế, triển khai kỹ thuật chỉ thị phân tử vào đánh giá đa dạng tập đoàn giống nhằm lựa chọn bố mẹ cặp lai và đánh giá sớm các dòng có triển vọng thành giống

- Sử dụng các chỉ thị RAPD, SSR,... để đánh giá đa dạng tập đoàn các giống lúa kháng bệnh bạc lá, ngô năng suất, kháng khô vằn, lạc kháng bệnh héo xanh, rỉ sắt, đậu tương chịu hạn/kháng bệnh rỉ sắt.
- Nghiên cứu triển khai và đề xuất các chỉ thị phân tử (RAPD, SSR,...) vào việc chọn tạo các giống lúa chất lượng và kháng bệnh đạo ôn, ngô năng suất kháng bệnh khô vằn, đậu tương và lạc có năng suất cao trên 3 tấn/ha kháng được bệnh rỉ sắt/chịu hạn khá (đậu tương), kháng được bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn (lạc).

2.2.4. Khảo nghiệm và triển khai sản xuất

- Triển khai mở rộng sản xuất giống lúa DR3 để trình Hội đồng giống xin công nhận giống tạm thời.
- Khảo nghiệm các dòng lúa ưu tú: dòng lúa xuất khẩu NTCĐ5 và OM5366, dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao HPKW1, hai dòng ngô CN4 và F145 năng suất kháng bệnh khô vằn và dòng đậu tương chịu hạn kháng bệnh rỉ sắt ĐT26.

2.2.5. Kết luận được 3 giống mới tạo được: Giống lúa NTCD5 năng suất và chất lượng, dòng ngô F145 năng suất và kháng bệnh khô vằn và dòng đậu tương ĐT213.4.347 (ĐT26) năng suất, chịu hạn và kháng khá bệnh rỉ sắt. Cả ba giống mới sẽ xin đăng ký là giống tiến bộ dự kiến vào đầu năm 2005.

2.3. MỞ RỘNG ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

Cây điều là một trong những cây có giá trị thương mại xuất khẩu của Việt Nam. Song hiện nay, nhiều giống điều đang bị thoái hoá nên dẫn đến năng suất thấp và phẩm chất kém. Để đáp ứng được thị trường xuất khẩu và tiêu dùng nội địa thì cần phải nhân nhanh các giống điều có năng suất cao và chất lượng tốt. Việc nhân nhanh những giống điều quý bằng phương pháp *in vitro* có hiệu quả gấp nhiều lần so với phương pháp truyền thống. Vì vậy, đề tài đã đưa thêm nội dung này vào trong quá trình thực hiện.

2.4. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Vật liệu

Bao gồm tập đoàn gồm 532 giống cây trồng, cụ thể: 65 giống lúa (Tám xoan, Tám ấp bẹ, Dự thơm, Tẻ di hương, Một bụi, Nàng thơm chợ Đào, Tài nguyên, Khao Dawk Mali 105, IR64, OM1490, OMCS2000, Khao 39, Moroberekan, WAB56-125, Nhị 32A, BoA...), 58 giống ngô (ngô lai, giống địa phương và nhập nội), 170 giống và dòng lạc, 220 giống và dòng đậu tương, 6 giống cây lâm nghiệp, 2 loại cây thuốc, 2 giống cây điều và 9 giống cây hoa Địa lan do Trung Tâm tài nguyên di truyền thực vật, Viện Nghiên cứu lúa đồng bằng sông Cửu long, Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế cung cấp, Viện Nghiên cứu Ngô, Trung tâm Nghiên cứu và Thực nghiệm cây đậu đỗ, Viện Nghiên cứu cây trồng màu Quốc tế (ICRSAT), Trung tâm nghiên cứu cây trồng rừng, Viện Dược liệu, Viện Sinh học nông nghiệp, Trung tâm Hưng Lộc (thuộc Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam) tỉnh Đồng Nai cung cấp.

2.4.2. Phương pháp

2.4.2.1. Các phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy *in vitro*

- Thu thập các giống Bạch đàn lai, Keo lai, Địa lan (phía Bắc), giống Ba kích, Ngưu tất và các dòng lúa bất dục sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy.
- Đưa vật liệu vào nuôi cấy *in vitro* bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, nuôi cấy lát mỏng,...
- Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy (tạo chồi, tạo mô sẹo, nhân nhanh, tạo rễ,...).
- Kỹ thuật ra cây, chăm sóc cây ngoài nhà lưới, vườn ươm cấp 1, cấp 2,...
- Đánh giá chất lượng các dòng cây nuôi cấy (thời gian sinh trưởng, ra hoa, chất lượng củ,...).
- Đưa ra được quy trình công nghệ sản xuất cây giống quy mô 10000 cây/năm đối với cây Bạch đàn lai, Keo lai và hoa Địa lan; quy mô phòng thí nghiệm (đối với hai dòng lúa bất dục và hai dòng điều).

2.4.2.2. Tạo dòng thuần ở ngô và lúa bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn

- Lai các dòng cảm ứng nuôi cấy *in vitro* với các nguồn ưu tú; Lai các giống lúa cao sản với giống lúa đặc sản. Lai lúa đặc sản với giống lúa kháng bệnh đạo ôn.
- Phương pháp nuôi cấy bao phấn (tạo mô sẹo, tái sinh cây).
- Phương pháp lưỡng bội hoá cây đơn bội.
- Phương pháp phân tích một số đặc điểm nông học, sinh lý, sinh hoá và chất lượng sản phẩm của các dòng cây chọn lọc theo phương pháp chuẩn và quy phạm của từng ngành.
- Phương pháp trồng trọt, khảo nghiệm giống và sản xuất thử theo quy phạm của Bộ NN và PTNT quy định.

2.4.2.3. Phương pháp chọn dòng biến dị soma

- Phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật (tạo mô sẹo, gây đột biến bằng tia gamma, chọn dòng biến dị soma, tái sinh cây, nhân cây,...).

- Phương pháp phân tích một số đặc điểm nông học, sinh lý, sinh hoá và chất lượng sản phẩm của các dòng cây chọn lọc theo phương pháp chuẩn và quy phạm của từng ngành.
- Phương pháp trồng trọt, khảo nghiệm giống và sản xuất thử theo quy phạm của Bộ NN và PTNT quy định.

2.4.2.4. Phương pháp chung cho việc ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống

- Thu thập tập đoàn giống có tính kháng khác nhau đối với bệnh rỉ sắt và héo xanh (lạc), rỉ sắt và chịu hạn (đậu tương), ngô năng suất và kháng bệnh khô vằn,...
- Đánh giá tính kháng bệnh (bệnh rỉ sắt, bệnh héo xanh vi khuẩn, bệnh bạc lá,...) và tính chịu hạn ở điều kiện tự nhiên và phòng thí nghiệm theo phương pháp chuẩn quốc tế.
- Khai thác các chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn, bạc lá, chất lượng (lúa), khô vằn (ngô), rỉ sắt (đậu tương, lạc), bệnh héo xanh vi khuẩn (lạc), hạn (đậu tương) từ các ngân hàng chỉ thị của IRRI; Corne Uni; RGP Nhật và Hàn Quốc.
- Thiết kế, tổng hợp các chỉ thị (RAPD, SSR, AFLP,...) đã thu thập được.
- Tối ưu phản ứng PCR.
- Kỹ thuật đọc số liệu của sản phẩm PCR trên gel agarose/polyacrylamide.
- Kỹ thuật phân tích số liệu bằng các phần mềm chuyên dụng NTSYSpc 2.0 để lập biểu đồ hình cây và xác định các chỉ thị liên quan đến tính trạng quan tâm bằng chương trình GENSTAT,...
- Xác định ưu thế lai dựa vào khoảng cách di truyền thông qua kết quả phân tích đa dạng ADN tập đoàn giống ngô, lạc, đậu tương,...
- Sàng lọc tính đa hình bố mẹ cặp lai với các chỉ thị liên quan.
- Phân tích các cá thể của các cặp lai với các chỉ thị liên quan.
- Đánh giá một số chỉ tiêu nông học, sinh lý, sinh hoá, tính chống chịu các dòng chọn được bằng các phương pháp chuẩn trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng.
- Khảo nghiệm và sản xuất thử các dòng chọn tạo được.

- Trình diễn sản xuất thử để giới thiệu với nông dân các giống mới tạo được.

2.5. DẠNG SẢN PHẨM, KẾT QUẢ TẠO RA

- Sơ đồ của quy trình công nghệ nhân vô tính *in vitro* chuyển giao cho các cơ sở sản xuất.
- Bảng số liệu trình tự các môi SSR/RAPD liên quan đến tính kháng một số bệnh (đạo ôn ở lúa, bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn ở lạc, chịu hạn và rỉ sắt ở đậu tương).
- Các dòng ưu tú triển vọng làm giống.
- Lựa chọn các giống/dòng (lúa, ngô, đậu, lạc,...) làm bố mẹ cặp lai trong tạo giống ngô năng suất kháng bệnh khô vằn, lúa kháng đạo ôn, lạc kháng bệnh rỉ sắt,...
- Báo cáo phân tích về ứng dụng phương pháp mới vào công tác tạo giống cây trồng.
- Đề xuất phương án tạo giống mới kết hợp phương pháp truyền thống và có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử.
- Đề xuất xây dựng dự án triển khai quy mô sản xuất đối với một số loại cây hoa Địa lan, cây lâm nghiệp,...
- Dự án triển khai sản xuất lúa DR3 cho vùng khó khăn.

2.6. NHU CẦU KINH TẾ - XÃ HỘI, ĐỊA CHỈ ÁP DỤNG

- Chiến lược sản xuất lúa gạo hiện nay là: (i) nâng cao chất lượng gạo đang tiêu thụ nội địa; ii) sản xuất gạo hàng hoá cho xuất khẩu. Vì thế, việc cải tạo các giống lúa hàng hoá có đủ tiêu chuẩn cho xuất khẩu và nâng cao năng suất đối với các giống lúa chất lượng tiêu dùng nội địa là vấn đề cần tập trung giải quyết.
- Tạo giống lúa có đủ tiêu chuẩn xuất khẩu đối với miền Nam bằng nuôi cấy bao phấn (12 tổ hợp lai của 3 giống lúa thơm: Nàng thơm chợ Đào, Khao Dawk Mali 105 và Jasmine 85 lai với 4 giống lúa cao sản IR64, OM1490, OMCS2000 và Khao 39) tạo giống lúa hàng hoá phục vụ xuất khẩu và giống lúa địa phương có năng suất cao và chịu với điều kiện bất lợi của môi trường.

- Nâng cao chất lượng gạo tiêu dùng trong nước cần phải tập trung cải tạo năng suất, độ thuần, kháng bệnh đạo ôn bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và chỉ thị phân tử cho một số giống lúa có chất lượng cao để tiêu dùng nội địa (Tám xoan, Tám áp bẹ, Dự thơm, Tẻ di hương (cho phía Bắc) và lúa Một bụi, Nàng thơm chợ Đào, Tài Nguyên (cho phía Nam).
- Nuôi cấy bao phấn có thể rút ngắn thời gian tạo dòng thuần xuống còn 1 năm đối với cả ngô và lúa. Nhưng đối với cây ngô khả năng tái sinh trong nuôi cấy bao phấn rất hạn chế. Giải pháp hiệu quả là dùng lai hữu tính để truyền tính cảm ứng tạo mô sẹo sang các nguyên liệu ưu tú sau đó tiến hành nuôi cấy bao phấn của con lai để nhanh chóng tạo dòng thuần.
- Cây Ngưu tất đang có nguy cơ bị thoái hoá do quá trình di thực. Công nghệ vi nhân giống và chọn dòng biến dị soma có thể khắc phục được hiện tượng này.
- Cung cấp giống cây con ban đầu đối với một số loại đối tượng cây trồng (cây Keo lai, Bạch đàn lai, cây Ba kích, cây hoa Địa lan,...) đang là nhu cầu thực tiễn sản xuất. Phương pháp nhân giống truyền thống rất hạn chế. Vì vậy, cần có quy trình nhân giống *in vitro* cho các loại cây trồng này.

CHƯƠNG III. CÁC KẾT QUẢ CHÍNH ĐÃ THU ĐƯỢC

3.1. NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THIỆN QUY TRÌNH NHÂN NHANH MỘT SỐ GIỐNG CÂY TRỒNG BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY *IN VITRO*: (i) Hoàn thiện quy trình nhân giống vô tính *in vitro* đạt quy mô bán sản xuất (công suất 10000 cây/năm) đối với cây Keo lai, Bạch đàn lai và hoa Địa lan; (ii) Hoàn thiện quy trình nhân giống ở phòng thí nghiệm đối với cây Ba kích, 2 dòng lúa bất dục (Nhị32A và BoA) và 2 giống cây điều (PN1 và BO1).

3.1.1. Cây Keo lai và Bạch đàn lai

(Trước khi thực hiện đề tài KC.04.08, quy trình nhân giống Keo lai và Bạch đàn lai đã được Trung tâm nghiên cứu cây trồng rừng thực hiện, tuy nhiên hệ số nhân giống còn thấp. Giai đoạn này chủ yếu tập trung vào cải tiến môi trường nhân chồi và điều kiện nuôi cấy để tăng hệ số nhân giống đạt quy mô sản xuất 1 vạn cây/năm).

3.1.1.1. Giới thiệu các dòng cây Keo lai và Bạch đàn lai mới tạo được

Ba dòng Keo lai BV10, BV16, BV32 (lai giữa hai loài Keo tai tượng (*Acacia mangium*) và Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*) và ba dòng U29C3, U29E1, U29U24 Bạch đàn lai (lai giữa loài Bạch đàn Uro (*Eucalyptus urophylla*), Bạch đàn Camal (*E.camaldulnessis*) và Bạch đàn liễu (*E.exserta*)) có thể cho năng suất gấp từ 2 đến 4 lần các loài bố mẹ (Lê Đình Khả và Nguyễn Việt Cường, 1998, 2000). Các giống mới ưu việt hơn các giống cũ về năng suất và chất lượng trong công nghiệp sản xuất bột giấy và bảo vệ môi sinh. Do yêu cầu cung cấp các giống gốc cho các cơ sở sản xuất ngày càng cao nên việc nhân nhanh các giống mới trên quy mô bán công nghiệp là một yêu cầu thiết yếu. Kỹ thuật nhân giống nuôi cấy mô cây Keo lai và Bạch đàn lai đã được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu giống cây lâm nghiệp nhằm hoàn thiện phương pháp nhân giống vô tính *in vitro* để tạo ra số lượng cây lớn trong thời gian ngắn phục vụ cho sản xuất và nghiên cứu.

3.1.1.2. Tóm tắt quy trình nhân giống *in vitro* cây Keo lai và Bạch đàn quy mô bán công nghiệp (10000 cây/năm)

Trong giai đoạn 2001 - 2004, đề tài đã hoàn thiện quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô và giám hom cho 3 dòng Keo lai và 3 dòng Bạch đàn lai mới chọn tạo được để đưa nhanh các tiến bộ kỹ thuật vào sản xuất.

- Quy trình nhân giống Keo lai: Nhân giống bằng nuôi cấy mô bao gồm các công đoạn chính là tạo chồi, lấy mẫu, khử trùng, nhân chồi, cho ra rễ và cấy cây vào bầu. Mỗi dòng vô tính chỉ được dùng nuôi cấy mô trong 10 chu kỳ nhân giống, sau đó phải thay bằng mẫu mới được lấy từ những cây tốt nhất đã qua chọn lọc và đánh giá.

Tạo chồi, lấy mẫu và khử trùng: Tạo chồi để nuôi cấy mô bằng cách cắt cây hom (lấy từ cây giống gốc) ở độ cao 5 cm để tạo chồi vượt. Khi chồi vượt cao 15 - 20 cm thì cắt đoạn chồi dài 10 - 15 cm (bỏ ngọn) để nuôi cấy mô. Mùa cắt chồi là tháng 4 đến tháng 8 (ở các tỉnh miền Bắc) và các tháng mùa mưa ở các tỉnh phía Nam (thời gian cắt chồi là đầu buổi sáng). Đoạn chồi đã cắt (dài 10 - 15 cm) được rửa sạch bằng nước xà phòng dưới vòi nước chảy, sau đó lau bằng bông tẩm cồn 70% rồi rửa lại thật sạch bằng nước cất, cắt thành đoạn ngắn có ít nhất một mắt chồi ngủ. Khử trùng mẫu vật bằng Clorua thủy ngân ($HgCl_2$) 0,1% trong thời gian 10 phút.

Nhân chồi: Môi trường nhân chồi ban đầu là MS (Murashige và Skoog) cải tiến (kí hiệu MS*) có bổ sung thêm Riboflavin 0,1 mg/l, Biotin 0,1 mg/l, đường sucrose 30 g/l, thạch 7 g/l và Polyvinyl pyrrolone (PVP) 1 g/l. Điều chỉnh độ pH = 5,8. Môi trường được hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,4 atm trong thời gian 20 phút. Môi trường đã hấp vô trùng được cho vào bình cấy hình hộp hoặc bình tam giác miệng rộng. Chồi được nuôi trong bình đặt trên giá có độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, nhiệt độ trong phòng 25°C ± 2°C. Trước khi cấy chồi phải khử trùng cho panh gấp bằng cách đốt trên ngọn lửa đèn cồn. Sau khi cấy phải đậy lọ bằng nắp nhựa (bình hình hộp) hoặc nút bông (bình tam giác miệng rộng). Sau 30 - 40 ngày, khi chồi bất định dài 1,5 - 2,0 cm, thì cắt và cấy chuyển sang môi trường nhân chồi MS + 7 g/l thạch + 2,0mg/l BAP. Sau đó, cứ 25 ngày cấy chuyển một lần cho đến lúc đủ lượng chồi cần thiết để ra rễ (Hình 4).

Ra rễ: Ra rễ chồi non Keo lai được thực hiện cả trong môi trường dinh dưỡng lẫn trực tiếp trên cát vàng. Môi trường ra rễ cho Keo lai là 1/2 MS trong 7 g/l thạch + IBA 2 mg/l, đường sucrose 15 g/l và PVP 1 g/l. Cho ra rễ trực tiếp trên cát vàng bằng cách cắt chồi dài 2,5 - 3,0 cm bỏ phần gốc, ngâm trong dung dịch Benlat 0,15% trong 10 phút, rồi chấm thuốc bột TTG1 hoặc các loại thuốc bột khác có tỷ lệ ra rễ cao, dùng que chọc lỗ rồi cấy lên cát ở độ sâu 1,0 - 1,5 cm (Hình 5).

Cấy cây vào bầu: Khi cây đã ra rễ hoàn chỉnh thì cấy vào bầu có thành phần ruột bầu như bầu ươm cây hom và chăm sóc như chăm sóc cây hom. Cây ra rễ trong môi trường dinh dưỡng thì trước khi cấy phải rửa sạch thạch. Sau khi cấy cây vào bầu cần chú ý che nắng và bảo đảm độ ẩm cho cây trong một tuần đầu, sau đó theo chế độ chăm sóc thông thường (Hình 6).

- Quy trình nhân giống Bạch đàn lai

Tạo chồi, lấy mẫu và khử trùng mẫu: Mẫu vật là các đoạn chồi gốc dài 10 - 15cm có mắt ngủ lấy từ cây con 6 tháng đến 1 năm tuổi. Lấy mẫu vào buổi sáng những ngày nắng. Khử trùng bề mặt: Dùng nước tẩy rửa trong 3 phút, sau rửa lại mẫu dưới vòi nước chảy nhằm loại bỏ các tác nhân gây bẩn. Khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% trong 10 phút, dùng nước cất vô trùng rửa lại 5 - 6 lần cho sạch. Dùng panh, kéo cắt từng đoạn mẫu có từ 1 - 2 mắt ngủ cấy vào môi trường MS cơ bản, các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Môi trường nhân chồi: là môi trường MS (cải tiến) có bổ xung BAP (Benzyl amino purine) 1mg/l + NAA (1-Naphthyl acetic acid) 0,4 mg/l + đường 30 g/l + thạch 6g/l, pH = 5,8. Môi trường ra rễ: là môi trường MS + IBA (3-Indol butyric acid) 1mg/l + ABT 0,4 mg/l + đường 15 g/l + thạch 6,5 g/l, pH = 5,8. Hấp khử trùng môi trường ở 121°C, áp suất 1,4 atm trong thời gian 20 phút.

Nhân chồi Bạch đàn: Sau khi các chồi bất định xuất hiện khoảng (30 - 45 ngày) (Hình 1 và 2), đạt chiều cao 1,5 - 2 cm được tách ra và cấy vào môi trường nhân chồi. Sau đó, cứ 12 - 15 ngày cấy chuyển sang môi trường mới, khi cấy loại bỏ những mẫu bị nhiễm khuẩn.

Ra rễ: Khi chồi đạt chiều cao từ 2,5 – 3,0 cm, thẳng, khoẻ mạnh có thể cắt để cấy chuyển sang môi trường hình thành rễ. Mật độ cấy trung bình 40 - 45 chồi/bình (Hình 3).

Huấn luyện cây con trước khi đưa ra bầu đất: Sau khi cây ra rễ chuyển ra nhà huấn luyện trong điều kiện nhiệt độ tự nhiên, ánh sáng 5000 - 10000 lux. Thời gian huấn luyện 6 - 8 ngày để cây quen dần với điều kiện tự nhiên thì tiến hành cấy cây vào bầu đất. Công đoạn tạo bầu và xử lý bầu ươm cây mô giống như trong phương pháp giâm hom.

Cấy cây vào bầu: Chuẩn bị dung dịch hồ rễ: đất tầng B đã xử lý dung dịch thuốc tím 0,1% tỷ lệ 1đất/1nước trước khi hồ rễ 12 tiếng. Khi dùng rửa thuốc tím bằng nước sạch từ 3 - 4 lần và tạo cho đất ở dạng hồ loãng để hồ rễ cây. Lấy cây mầm từ trong lọ, rửa hết thạch bằng nước sạch, nhúng rễ cây vào dung dịch hồ rễ. Dùng que cấy cắm vào giữa bầu một lỗ có độ sâu 2 - 3 cm, dùng ngón tay cái và ngón trỏ giữ cho cây thẳng đứng, đưa nhẹ cây vào lỗ có trên bầu, không được làm cong rễ, lấy que cấy ấn nhẹ xung quanh gốc để rễ cây tiếp xúc với đất, cấy đến đâu dùng ô doa tưới nhẹ đến đó (Hình 6).

- Kỹ thuật chăm sóc cây con cho cả Bạch đàn lai và Keo lai

- Chế độ tưới: Giai đoạn đầu (khoảng 12 ngày) dùng bình phun hay dàn phun sương tưới từ 4 - 5 lần/ ngày, khi cây ổn định số lần tưới giảm dần (tùy từng điều kiện thời tiết mà điều chỉnh chế độ tưới cho phù hợp).

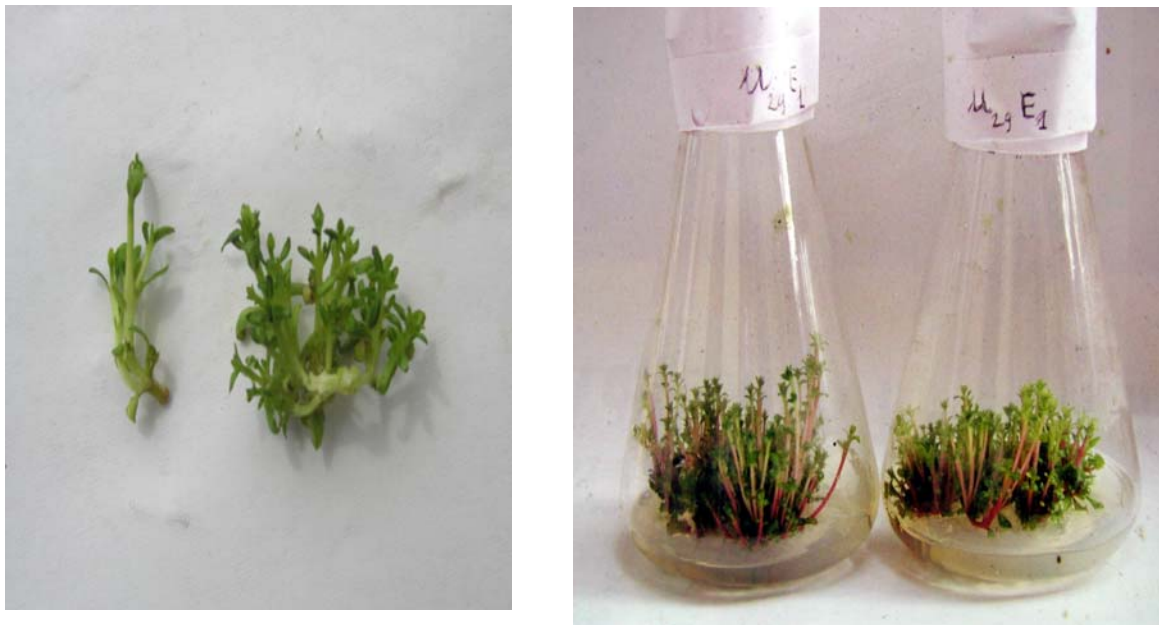
- Chế độ bón phân: Sau khi cấy cây (khoảng 20 ngày) bắt đầu tưới thúc bằng hỗn hợp NPK (5 : 10 : 3), nồng độ 0,5%, liều lượng là 100 lít/20.000 cây (tưới vào lúc trời râm mát), sau đó phải tưới rửa lại bằng nước sạch và cứ 10 ngày tưới thúc 1 lần đến khi chiều cao cây đạt từ 15 - 20 cm thì ngừng tưới.

- Chế độ ánh sáng: Các luống Bạch đàn khi cấy xong dùng vòm có phủ kín bằng nilon trắng, trên là lưới che râm có độ che sáng 90%, che trong 10 ngày đầu sau khi cấy. Sau đó, bỏ nilon, chỉ che lưới có độ che sáng 50 - 70%. Khi cây được 1 tháng có thể bỏ hoàn toàn lưới che.

- Các công đoạn khác cho đến khi cây con xuất vườn giống như phương pháp giâm hom thông thường.



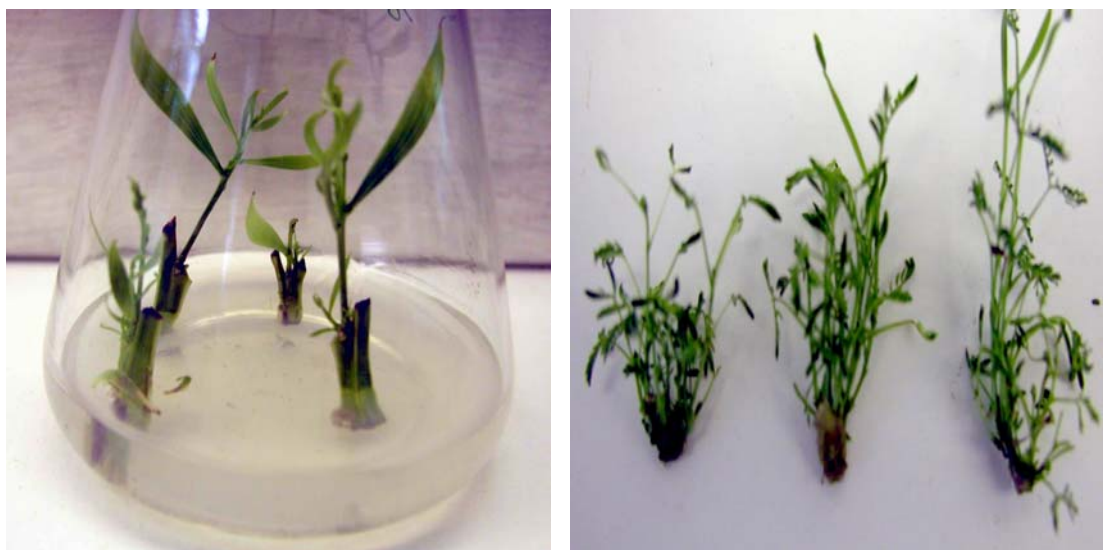
Hình 1. Chối Bạch đàn lai U29E1 (trái) và U29C3 (phải)



Hình 2. Chối bạch đàn cây đứng (chối bên trái), cây nằm (phải)



Hình 3. Chồi bạch đàn lai ra rễ



Hình 4. Chồi bất định Keo lai sau quá trình khử trùng (trái) và chồi Keo kéo dài (phải)



Hình 5. Ra rễ trực tiếp Keo lai bằng thuốc TTG



Hình 6. Luống cây Bạch đàn lai (trái) và Keo lai nuôi cấy mô trong vườn ươm (phải)

3.1.1.3. Các đơn vị đã được chuyển giao công nghệ và giống gốc

Việc chuyển giao giống gốc và kỹ thuật cho các đơn vị nghiên cứu và sản xuất trong nước đã được thực hiện nhằm triển khai các kết quả thí nghiệm vào sản xuất. Trong giai đoạn 2000 - 2003, đề tài đã chuyển giao công nghệ nuôi cấy mô cho một số đơn vị:

- Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ tỉnh Hà Tĩnh
- Trường Trung học kinh tế kỹ thuật và dạy nghề tỉnh Tuyên Quang
- Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường Quảng Trị

Sau khi được chuyển giao kỹ thuật nhân giống, các đơn vị trên đã nắm được các kỹ thuật nhân giống bằng nuôi cấy mô cho các dòng Keo lai và Bạch đàn lai từ khâu khử trùng, vào mẫu, pha môi trường, nhân chồi, ra rễ và huấn luyện cây, không những tự cung cấp cây giống cho đơn vị mình mà còn cung cấp cây con chất lượng cao cho khu vực.

3.1.2. Cây Ba kích

3.1.2.1. Giới thiệu cây Ba kích

Theo y học cổ truyền, Ba kích là vị thuốc có tác dụng bổ trí não, trợ dương, ích tinh, mạnh gân cốt, người già mệt mỏi, kém ăn, ít ngủ, chống trầm cảm, ... Trước những năm 1970, nguồn Ba kích chỉ dựa vào việc khai thác tự nhiên từ rừng thuộc một số tỉnh phía Bắc như Tuyên Quang, Yên Bái, Phú Thọ. Do nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng nên Ba kích mọc hoang bị khai thác ngày càng kiệt quệ. Mặt khác, rừng ở vùng phân bố của Ba kích bị tàn phá nghiêm trọng khiến cây lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng và bị liệt vào sách đỏ Việt Nam. Vì vậy, việc nghiên cứu trồng cây Ba kích là con đường duy nhất để duy trì và phát triển nguồn dược liệu quý này. Các phương pháp nhân giống truyền thống như gieo hạt, giâm cành không thể đáp ứng nhu cầu về cây giống để phát triển trồng Ba kích, ít nhất trong vòng 15 - 20 năm tới, chưa kể đến những hạn chế của phương pháp này đối với sự sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của cây trồng. Việc sử dụng công nghệ tế bào thực vật để nhân nhanh Ba kích là yêu cầu rất cấp bách.

3.1.2.2. Quy trình nhân giống *in vitro*

Tái sinh chồi sơ cấp

Đã tiến hành nghiên cứu phương pháp lấy mẫu vật từ cây *in vivo* vào nuôi cấy, nhưng đều không thành công. Phương pháp duy nhất là sử dụng lát cắt đốt thân cây *in vivo* là thành công để tạo chồi sơ cấp *in vitro* trong môi trường MS chứa 0,5 mg/l Kin (Hình 7).



Hình 7. Chồi Ba kích sơ cấp tái sinh từ lát cắt đốt thân 4 tuần trên môi trường MS + 0,5 mg/l Kin.

Nhân nhanh chồi

Ngọn chồi và đốt thân dài khoảng 1 cm lấy từ chồi *in vitro* được cấy vào môi trường dinh dưỡng gồm khoáng, vitamin, đường, thạch theo MS có bổ sung BAP với các nồng độ 0,5; 1; 2; 3 và 5 mg/l. Kết quả theo dõi 75 ngày sau khi cấy đã chọn được công thức môi trường tối ưu để nhân nhanh chồi: MS + 3mg/l BAP, 20 ngày cấy chuyển. Ở môi trường này, tuy hệ số nhân chồi đạt cao nhất nhưng độ biến động giữa các mẫu tương đối lớn, thể hiện ở độ lệch chuẩn cao. Thực tế có những mẫu cho đến 40 chồi, nhưng có mẫu chỉ đạt 5 - 7 chồi. Muốn tăng hệ số nhân, cần tăng độ đồng đều của mẫu (Hình 8 và 9).



Hình 8. Cụm chồi Ba kích tái sinh từ đốt thân (hàng trên) và từ ngọn chồi (hàng dưới) 60 ngày trong môi trường MS + 3,0 mg/l BAP



Hình 9. Cụm chồi Ba kích tái sinh từ ngọn chồi (trái), đốt thân (giữa) và phần gốc (phải) trong môi trường MS + 3,0 mg/l BAP (60 ngày sau khi cấy).

Sau khi thu hoạch tất cả các đốt thân và ngọn chồi, phần gốc còn lại của cụm cũng được cấy truyền ở mỗi lần cấy. Đáng chú ý là khối mô này ngày càng to và cho nhiều chồi hơn. Cụm chồi tái sinh từ các gốc này thường sinh trưởng nhanh, khỏe, lá to hơn so với chồi tái sinh từ đốt thân và ngọn chồi (Hình 8 và 9).

Các chồi đơn (đều không có rễ) dài ít nhất 3 cm, có 3 đôi lá trở lên được tách từ cụm chồi *in vitro* để nghiên cứu tạo rễ.

Tạo rễ in vitro

Các chồi đơn được đặt trong môi trường MS không có auxin. Cây con có rễ trong khoảng 4 tuần nuôi cấy. Các cây hoàn chỉnh được lấy ra khỏi bình nuôi cấy. Sau khi rửa sạch môi trường (Hình 10), cây con *in vitro* được chuyển vào bầu nylon chứa hỗn hợp đất màu, trấu hun và phân mục (6 : 2 : 1) và nuôi trong lồng nylon tự tạo có phun sương với tần suất 15 phút/lần. Trung bình, số cây sống đạt 70 - 80% tùy theo thời điểm ra cây, từ tháng 3 đến tháng 9 trong điều kiện thời tiết ở Hà Nội.



Hình 10. Tạo rễ *in vitro* chồi Ba kích nuôi cấy trong 1/4MS không bổ sung auxin

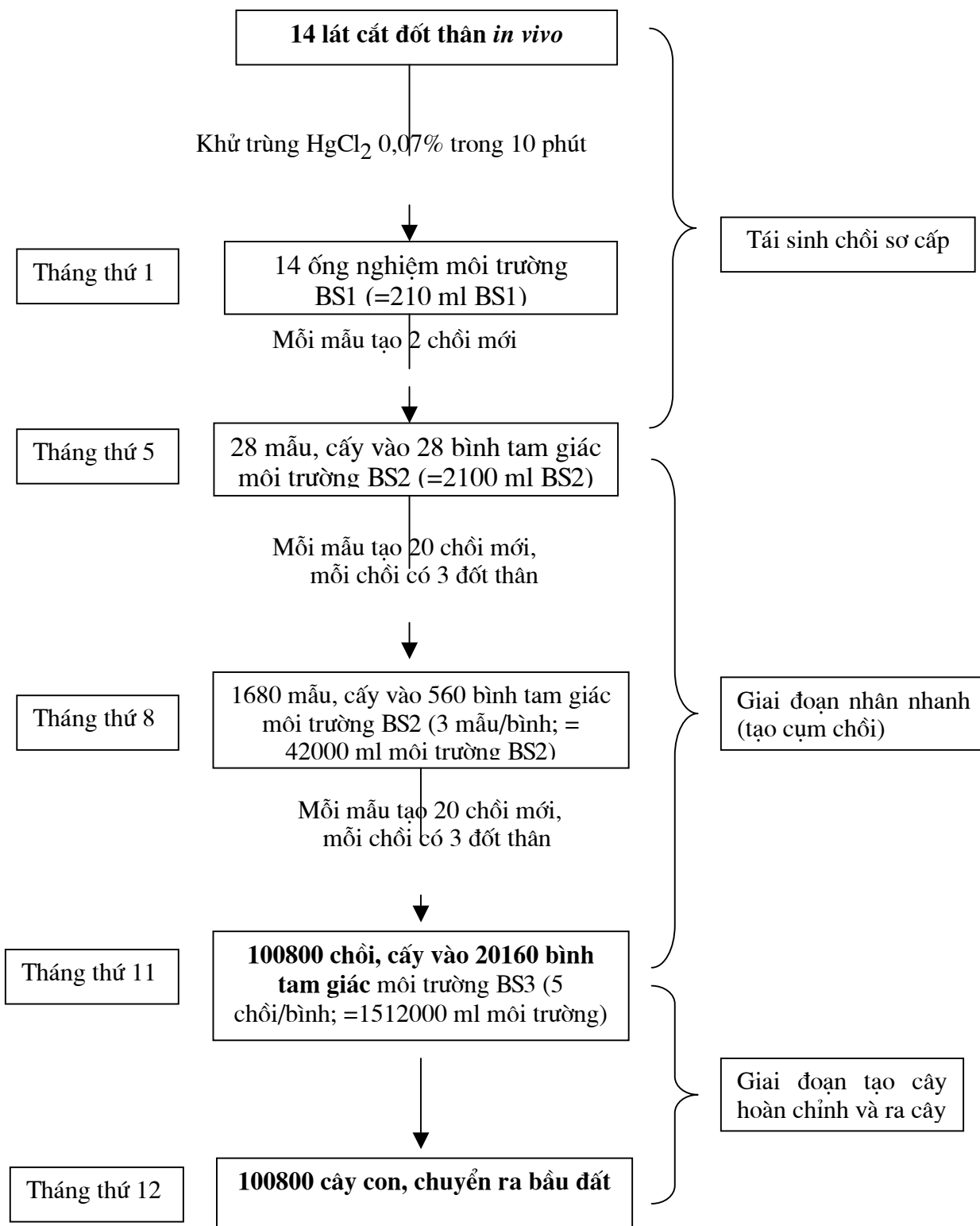
Chồi *in vitro* xử lý với dung dịch 1mg/l IBA bằng phương pháp nhúng nhanh (quick-deep) được cấy vào bầu nylon và nuôi trong điều kiện như trên. Trong thời gian từ

tháng 3 đến tháng 5 ở Hà Nội, 100% số chồi ra rễ chỉ sau 7 - 10 ngày và tiếp tục sinh trưởng, phát triển tốt (Hình 11).



Hình 11. Cây Ba kích ra rễ *in vitro* và sinh trưởng trong bầu (sau 90 ngày).

QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY BA KÍCH



Sơ đồ 1. Quy trình nhân nhanh *in vitro* cây Ba kích

3.1.3. Hoa Địa lan

Nghiên cứu đã tiến hành trên 40 thí nghiệm với 9 giống khác nhau (7 giống thương mại: Xanh Chiếu; Trung Quốc Xanh; Trung Quốc Đỏ; Trung Quốc Vàng; Hồng Bệt; 717; 749 và 02 giống bản địa: Phượng Hoàng Thơm, Mạ nâu lá lớn, hình 12) ở tất các giai đoạn và đã đúc rút ra quy trình nhân Địa lan *in vitro* áp dụng cho các giống thí nghiệm như sau:

Giai đoạn tạo nguồn vật liệu khởi đầu: Tạo mẫu sạch ban đầu: chồi bên cao 3 - 5 cm tách từ cây mẹ được khử trùng kép (7 phút + 1 hoặc 2 phút) bằng HgCl_2 0,1%. Ở nồng độ này, tỷ lệ mẫu sạch đạt 50 - 60%. Thành phần cho một lít môi trường nuôi cấy: MS + 100 ml nước dừa + 10g đường sucrose + 0,34 mg/l BAP + 6,5 g/l thạch, trên môi trường này tỷ lệ mẫu tạo protocorm đạt 75%.

Giai đoạn nhân nhanh: Ở giai đoạn nhân nhanh, chúng tôi đã tiến hành các loại thí nghiệm trên các giống khác nhau để tìm ra những ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng, nồng độ các chất điều tiết sinh trưởng, nồng độ nước dừa, kích thước lát cắt, các thể môi trường để xác định được môi trường nuôi cấy thích hợp. Kết quả đạt được rất khả quan: Độ dày của lát cắt lớp mỏng tế bào đến sự phát sinh hình thái là 0,3 - 0,5 mm. Chất điều tiết sinh trưởng tối ưu đến sự phát sinh hình thái của lát mỏng: MS + 100 ml nước dừa + 10g/l sucrose + 11 mg/l BAP (hoặc 0,21 mg/l Kin.) + 6,5g/l thạch. Trên môi trường này, số protocorm trung bình/ mẫu cấy ban đầu là 27,1 - 29,7.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh: Môi trường tối ưu cho quá trình hình thành rễ là MS + 10g/l sucrose + 0,3 mg/l NAA (hoặc 1 g than hoạt tính) + 6,5 g/l thạch. Trên môi trường này, tỷ lệ cây ra rễ đạt 100% sau 4 tuần cấy chuyển (Hình 13).

Giai đoạn sau *in vitro*

Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm về thời vụ ra cây, tiêu chuẩn cây *in vitro* trước khi đưa ra vườn ươm, giá thể, chế độ tưới, chế độ dinh dưỡng tại hai vùng khác nhau (Hà Nội và Sapa). Trong suốt thời gian từ tháng 12/2002 đến tháng 7/2004, chúng tôi thu được các kết quả như sau:

+ Xác định được tiêu chuẩn cây *in vitro* để đưa ra vườn ươm, cây *in vitro* phải đạt khối lượng >1 g đảm bảo cho cây sinh trưởng phát triển tốt ngoài vườn ươm.

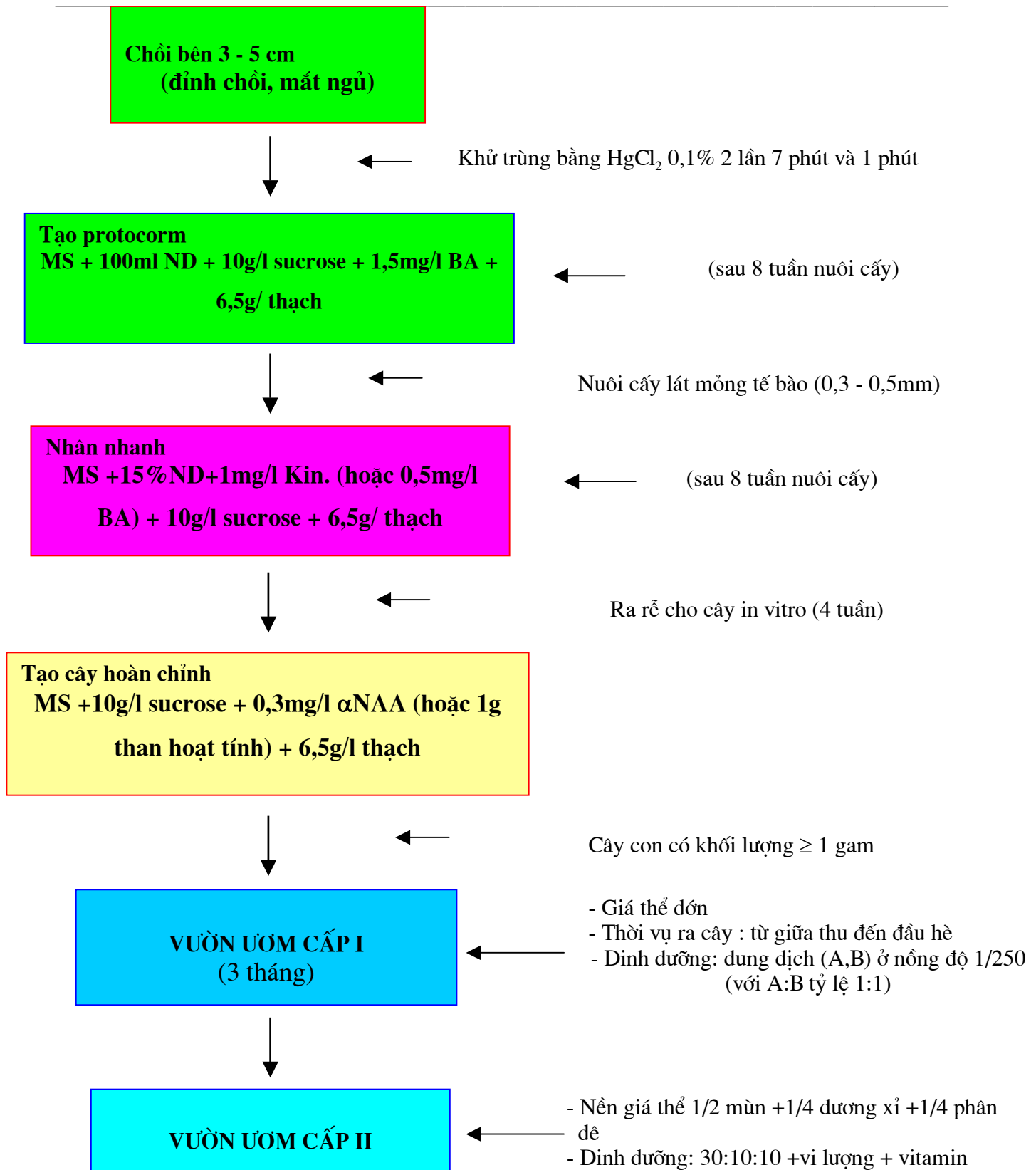
+ Xác định được thời vụ ra cây *in vitro* thích hợp là vụ Đông Xuân (ở Hà Nội); Vụ Xuân (ở Sapa - Lào Cai)

+ Xác định được giá thể ra cây *in vitro* thích hợp là dớn, cho tỷ lệ sống đạt 90% (ở vườn ươm cấp 1); Ở vườn ươm cấp 2, giá thể dương xỉ (điều kiện Hà Nội), giá thể 1/2 mùn địa phương + 1/4 dương xỉ + 1/4 phân dê (điều kiện Sapa - Lào Cai) (Hình 14).

+ Xác định được dinh dưỡng thích hợp cho cây sinh trưởng phát triển ở vườn ươm cấp 1 là phân bón lỏng của Úc (AB) tỷ lệ 1 : 1, nồng độ 1/250, vườn ươm cấp 2 là phân bón tổng hợp NPK tỷ lệ 30 : 10 : 10 kết hợp với vitamin và vi lượng.

Từ các kết quả trên, chúng tôi đưa ra quy trình chung cho các giống Địa lan nghiên cứu như trong sơ đồ 2.

Quy trình này đã được thử nghiệm trên nhiều giống khác nhau và ở hai vùng Sapa và Hà Nội (Hình 15 và 16). Kết quả cho thấy: Có thể áp dụng quy trình này ở cả hai vùng. Tuy nhiên, tại vùng núi Sapa, cây sinh trưởng phát triển thuận lợi hơn (nhất là vào mùa hè) và có thể áp dụng cho nhiều giống khác nhau (Tuy nhiên, đối với giống Mạc nâu, quy trình nhân nhanh *in vitro* rất thuận lợi song giai đoạn sau *in vitro* lại chưa có hiệu quả cao).



Sơ đồ 2. Quy trình nhân giống Địa lan bằng nuôi cấy mô

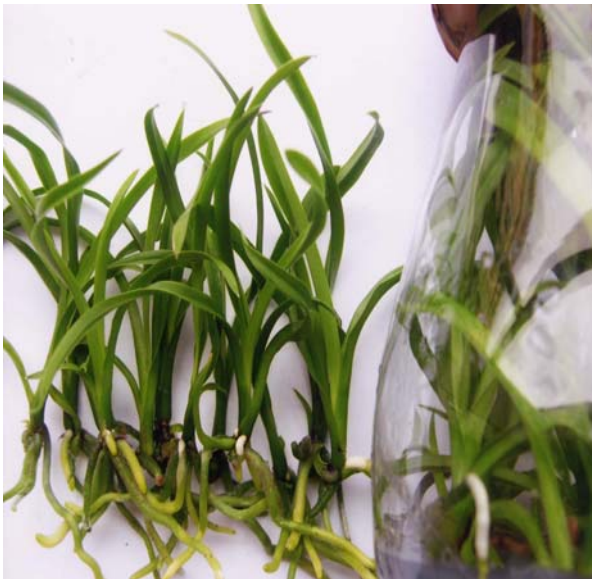


Địa lan Miss Kim



Địa lan Lancelost Misono

Hình 12. Một số giống Địa lan hiện đang lưu giữ



Hình 13. Tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường có bổ sung NAA (trái) và cây giống Địa lan cấy mô đạt tiêu chuẩn (> 1 g).



Hình 14. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng của Địa lan cấy mô sau 8 tuần



Hình 15. Địa lan cấy mô ngoài vườn ươm tại Sapa



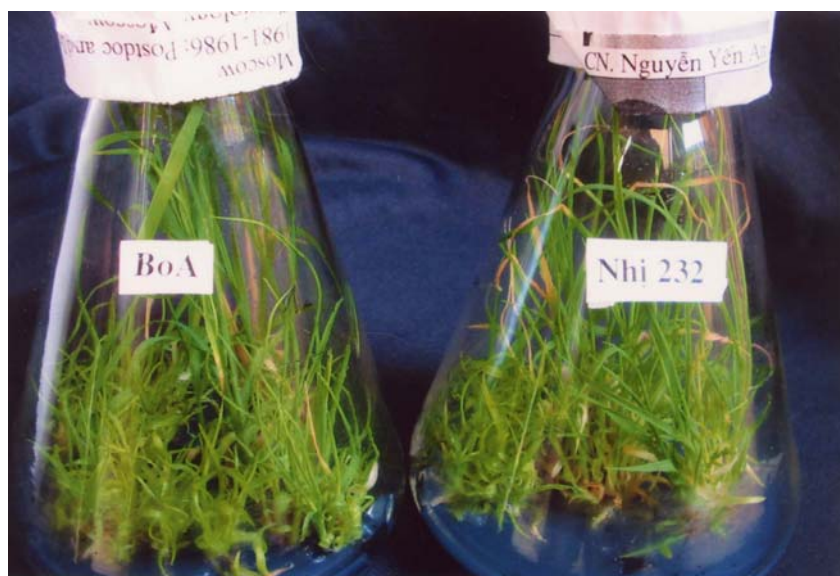
Hình 16. Địa lan cấy mô ngoài vườn sản xuất (vườn ươm cấp II)

3.1.4. Lúa bất dục Nhị 32A và BoA

Hiện nay, các dòng bất dục đực (Nhị32A và BoA) sử dụng trong sản xuất hạt lai trong nước được duy trì chủ yếu là bằng phương pháp giữ gốc rạ và nhất thiết phải dưới điều kiện nhiệt độ nghiêm ngặt (25°C). Phương pháp này rất bị động, tốn kém và không ổn định. Kỹ thuật nhân vô tính *in vitro* với hệ số nhân giống cao (4000 cây/ m^2 diện tích nuôi cấy) có thể giải quyết công việc này ở một quy mô vừa.

- Phương pháp lấy mẫu: Các đốt thân của hai giống lúa hoặc cây con mọc từ gốc rạ.
- Khử trùng mẫu trong dung dịch 0,1% HgCl_2 trong 10 phút.
- Tạo chồi trong môi trường MS cơ bản + 10 g/sucrose + 8 g/l thạch, pH = 5,8.
- Nhân chồi trong môi trường MS cơ bản + 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 1 mg/l Kin + 20 g/l sucrose + 8 g/l thạch, pH = 5,8 (Hình 17).
- Tạo rễ: MS cơ bản + 0,2 mg/l NAA + 20 g/sucrose + 8 g/l thạch, pH = 5,8.
- Điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, độ ẩm phòng $60 \pm 5\%$.

- Ra rễ: 1/10 MS không có vitamin và đường. Khi cây có rễ mới đem trồng ở điều kiện tự nhiên.



Hình 17. Nhân nhanh *in vitro* hai dòng lúa bất dục

3.1.5. Điều cao sản PN1 và BO1

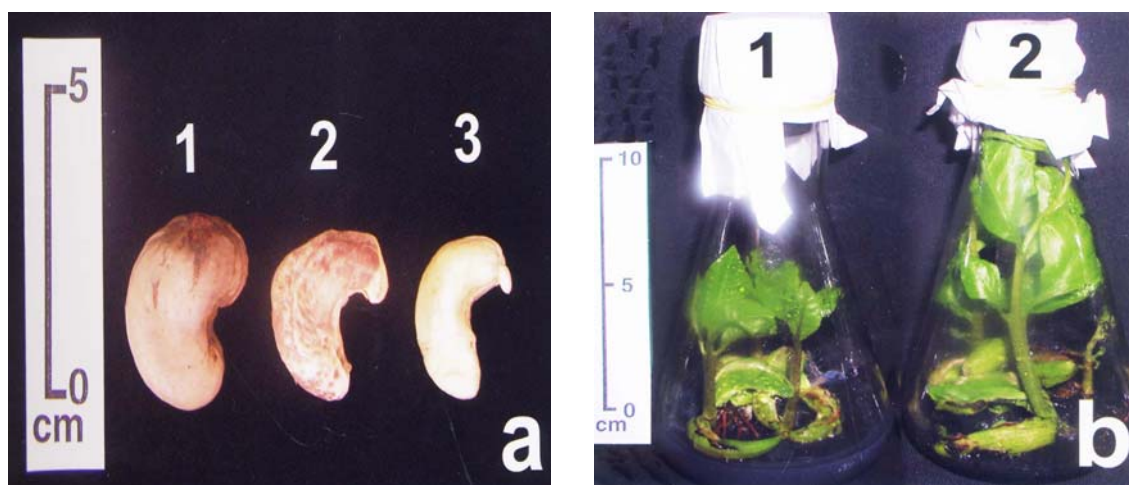
Trong vài năm trở lại đây, Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu nhân hạt điều đứng đầu ở châu Á. Để đạt được diện tích trồng 500000 ha đến năm 2010, cần thêm một lượng giống khoảng 25 triệu cây. Phương pháp nhân giống từ hạt không thể đáp ứng được yêu cầu của sản xuất. Vì vậy, việc nghiên cứu quy trình nhân giống điều cao sản bằng nuôi cấy lớp mỏng tế bào từ thân mầm phát triển từ hạt trưởng thành và từ lông thân của cây trưởng thành đã được nghiên cứu đồng thời với việc nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy quang tự dưỡng trong giai đoạn nhân giống nhằm mục đích tìm ra những phương pháp vi nhân giống hữu hiệu có thể ứng dụng vào việc nhân nhanh các dòng điều cao sản đã được tuyển chọn.

Tóm tắt kết quả quy trình nhân giống cây điều:

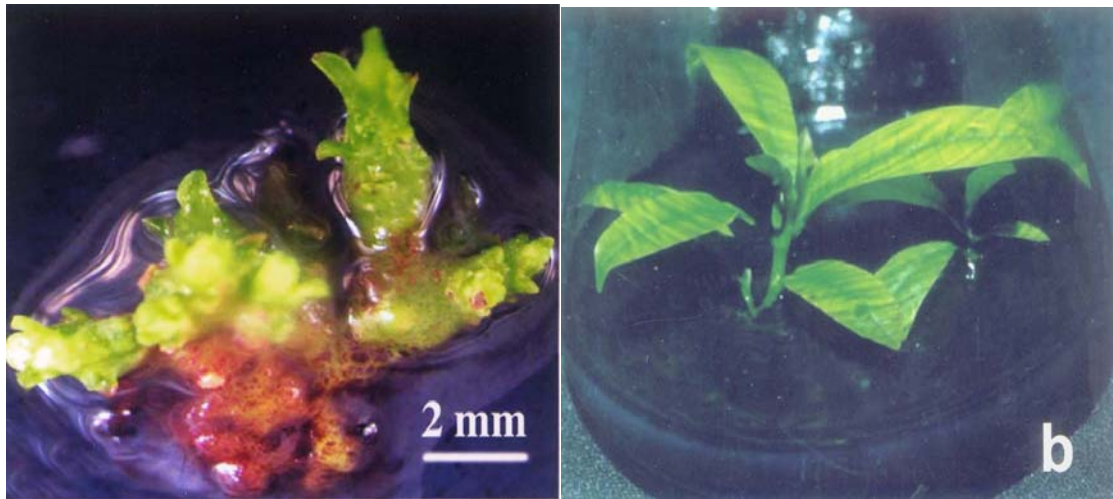
- Bước đầu đã nghiên cứu thành công quy trình nhân giống điều cao sản BO1 và PN1 (Hình 18) bằng phương pháp: Nuôi cấy quang tự dưỡng và lớp mỏng từ cành non và cây mầm.
- Phương pháp khử trùng hạt điều trưởng thành hai lần có hiệu quả nhất với thời gian khử trùng vỏ ngoài là 24 giờ và vỏ trong là 20 phút, nồng độ thích hợp nhất là NaOCl 2% (w/v).
- Lớp mỏng từ cành non khó có thể tạo mô sẹo và hình thành chồi trực tiếp tuy nhiên, mẫu phát triển rất chậm. Lớp mỏng từ thân mầm dòng BO1, PN1 có khả năng hình thành mô sẹo hay các thể chồi trên môi trường có nồng độ chất kích thích tố thực vật khác nhau bao gồm BA, Kin và NAA. Phân dễ dàng tạo chồi trực tiếp là phân gần tử diệt. Nồng độ BA : Kin : NAA theo tỷ lệ 10 : 1 : 0.5 là hiệu quả nhất cho việc tạo chồi trực tiếp. Chồi từ lớp mỏng có thể phát triển thành cây (Hình 19).
- Việc cấy chuyển liên tục làm giảm ảnh hưởng của phenol trên mẫu nuôi cấy, tuy nhiên sẽ làm tăng công lao động trong nhân giống.
- Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào có thể được sử dụng để tạo chồi trực tiếp từ trực thượng diệt của hạt điều nảy mầm. Môi trường nuôi cấy với thành phần khoáng MS có bổ sung 10 mg/l BAP, 1 mg/l Kin và 0,5 mg/l NAA là tốt nhất cho sự tạo chồi từ nuôi cấy lớp mỏng của đốt tử diệt. Đối với đốt thân mầm thì không cần sự hiện diện của Kin. Cũng cần nghiên cứu về sự tạo phôi soma từ nuôi cấy lớp mỏng thân mầm, cành non và lá.
- Tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng thực vật dùng trong nghiên cứu này chưa thích hợp để tạo chồi từ các lớp mỏng của cành non và cần phải nghiên cứu thêm.
- Cây điều *in vitro* đã tăng trưởng tốt trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng (môi trường không đường và vitamin). Cần tìm hiểu thêm về các điều kiện ánh sáng, nồng độ CO₂ và giá thể nuôi cấy tác động lên sự tăng trưởng cũng như tạo rễ của cây cấy mô để hoàn thiện quy trình nhân giống và có thể ứng dụng trong điều kiện sản xuất (Hình 20).

3.1.6. Kết luận về nghiên cứu và hoàn thiện quy trình nhân nhanh một số giống cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

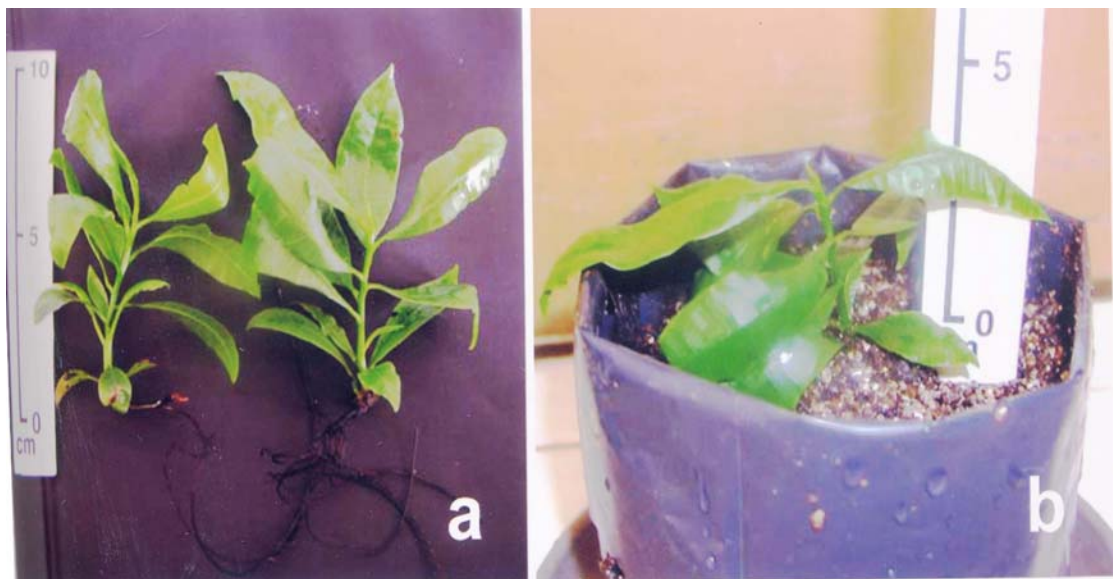
1. Hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* quy mô bán công nghiệp công suất 10000 cây/năm đối với 03 dòng cây Keo lai BV10, BV16, BV32; 03 dòng Bạch đàn lai U29C3, U29E1, U29U24; cây Ba kích và 08 giống cây Địa lan, trong đó có 06 giống thương mại và 02 giống bản địa.
2. Hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* ở quy mô phòng thí nghiệm đối với 02 dòng lúa bất dục (Nhị 32A và BoA).
3. Bước đầu đã nghiên cứu thành công quy trình nhân nhanh *in vitro* hai giống điều cao sản PO1 và BO1 bằng nuôi cấy lát mỏng thân mầm theo phương pháp nuôi cấy thông thường và phương pháp quang tự dưỡng. Các môi trường nuôi cấy đã được tối ưu cho mỗi phương pháp.
4. Đã chuyển giao công nghệ nhân giống *in vitro* và giống gốc đối với cây Keo lai và Bạch đàn lai cho một số cơ sở nghiên cứu và sản xuất trong nước.



Hình 18. Hạt điều làm nguyên liệu nuôi cấy (trái) và cây mầm (phải)



Hình 19. Chồi tạo ra từ nuôi cấy lớp mỏng đốt thân (trái), tạo rễ hoàn chỉnh (phải)



Hình 20. Cây *in vitro* giống BO1 ngày thứ 60 (trái), cây ra bầu đất ngày thứ 7 (phải)

3.2. TẠO GIỐNG MỚI BẰNG KỸ THUẬT CHỌN DÒNG BIẾN DỊ SOMA VÀ NUÔI CẤY BAO PHẦN Ở LÚA, NGÔ VÀ CÂY NGUU TẮT

3.2.1. Lúa chất lượng cao dùng trong nước

3.2.1.1. Kết quả tạo các dòng mô sẹo lúa mang biến dị soma

Khả năng tạo mô sẹo: Nuôi cấy phôi hạt chín của 4 giống lúa địa phương (Tám xoan, Tám ấp bẹ, Dự thơm và Tẻ di hương) trên 2 loại môi trường tạo mô sẹo C_1 và C_2 (Bảng 1), chúng tôi nhận thấy tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường C_1 cao hơn hẳn so với môi trường C_2 . Kết quả đánh giá cũng cho thấy các mô sẹo được tạo ra trên môi trường C_1 phát triển đồng đều, có màu sắc vàng đều và không bị mọng đen như trên môi trường C_2 . Điều này có thể giải thích là do sự kết hợp của các chất kích thích sinh trưởng ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ phân chia và các hoạt động sinh hoá của tế bào. Tuy nhiên, hiệu suất và chất lượng của mô sẹo cũng còn phụ thuộc vào kiểu gen của từng giống.

Bảng 1. Đánh giá khả năng tạo mô sẹo của các giống lúa trên môi trường C_1 và C_2

Tên giống	Số hạt gạo nuôi cấy	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%) sau 3 tuần nuôi cấy	
		C_1	C_2
Tám xoan	200	95,0	40,4
Tám ấp bẹ	200	93,0	49,7
Dự thơm	200	90,0	43,1
Tẻ di hương	200	93,3	48,5

Tỷ lệ sống sót của mô sẹo sau khi chiếu xạ: Kết quả bước đầu cho thấy xử lý chiếu xạ bằng tia gamma ở liều càng cao thì khả năng sống sót của mô sẹo càng giảm, sự miễn cảm của mô sẹo phụ thuộc vào nguồn gốc của giống khác nhau. Cùng liều chiếu, tỷ lệ mô sống sót của các giống Tẻ di hương và Tám ấp bẹ cao hơn so với giống Dự thơm và Tám xoan. Ở liều chiếu 13 Krad, tỷ lệ sống sót của mô sẹo của giống Dự thơm chỉ còn 2,4% trong khi đó các giống khác còn khoảng 20% (Bảng 2).

Bảng 2. Tỷ lệ phần trăm mô sống sau 30 ngày chiếu xạ gamma từ nguồn C_{60}

Tên giống	Số mô chiếu xạ/liều	Liều chiếu xạ tia gamma từ nguồn C_{60}						
		0 Krad	3 Krad	5 Krad	7 Krad	9 Krad	11 Krad	13 Krad
Tám xoan	250	100	45,2	44,4	26,0	23,6	22,0	21,2
Tám Ấp bẹ	250	100	85,6	77,6	74,4	55,3	48,2	19,6
Dự Thơm	250	100	70,0	55,2	32,0	24,4	11,6	2,4
Tẻ Di hương	250	100	94,4	80,0	75,5	72,7	50,0	20,8

Kết quả tái sinh cây từ mô sẹo sống sót sau chiếu xạ: Các mô sống sót được cấy chuyển lên môi trường tái sinh cây, sau 60 ngày tiến hành đánh giá: Kết quả tái sinh cây (Bảng 3) cho thấy khả năng tái sinh cây tỷ lệ nghịch với liều chiếu xạ. Liều chiếu càng cao, tỷ lệ mô tái sinh càng giảm.

Bảng 3. Tỷ lệ (%) mô sẹo tái sinh cây sau 60 ngày chiếu xạ

Liều chiếu	Tẻ Di hương		Dự Thơm		Tám Ấp bẹ		Tám xoan	
	MTS*	SC/ M*	MTS*	SC/ M*	MTS*	SC/ M	MTS*	SC/ M*
0	52,4	2,4	51,7	4,5	48,5	3,2	47,9	2,4
3	38,5	3,1	18,6	2,4	32,1	2,3	40,2	2,6
5	29,3	2,7	10,4	1,5	19,7	1,4	35,8	1,7
7	26,4	2,5	7,1	1,3	17,0	1,0	22,7	1,2
9	15,6	2,2	4,6	2,0	15,8	2,0	18,3	1,9
11	5,3	1,0	0	0	6,8	1,2	0	0
13	3,8	1,0	0	0	0	0	0	0

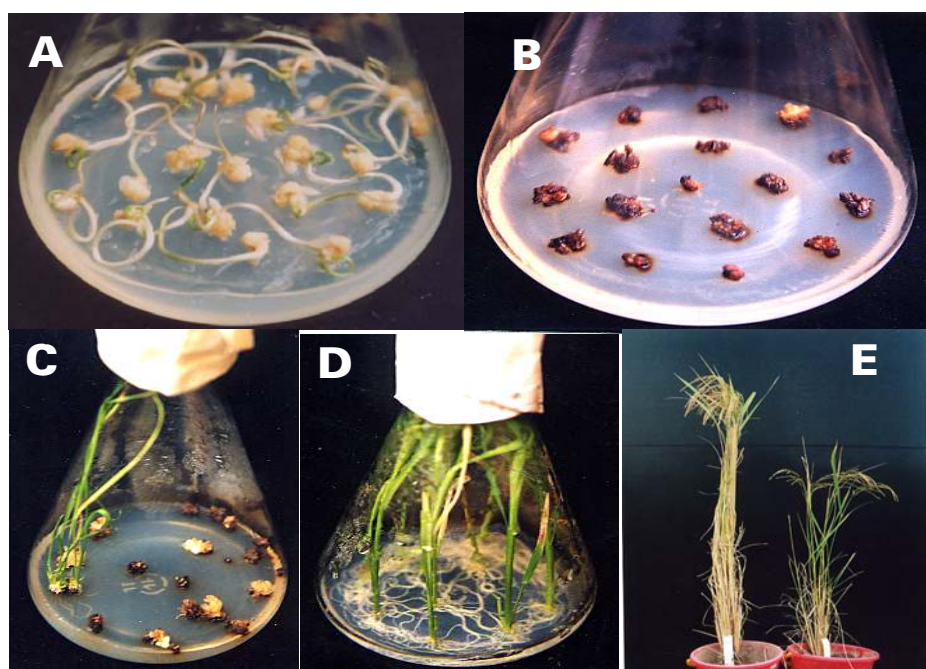
Ghi chú: (*) MTS: mô tái sinh; SC/M: số cây/mô (giá trị trung bình).

Với liều chiếu 11 Krad, mô sẹo các giống Dự thơm và Tám xoan không còn khả năng tái sinh, còn đối với giống Tẻ di hương và Tám ấp bẹ thì tỷ lệ mô tái sinh là 5,3% và 6,8% so với đối chứng là 52,4% và 48,5%. Ở liều chiếu 13 Krad, chỉ có mô sẹo của giống Tẻ di hương còn khả năng tái sinh với tỷ lệ rất thấp là 3,8%.

Từ kết quả đánh giá khả năng sống sót và tái sinh cây của mô sẹo sau xử lý tia gamma, chúng tôi thấy giới hạn trên của các giống là: Tẻ di hương là 13 Krad, Tám áp bẹ là 11 Krad, Dự thơm và Tám xoan là 9 Krad. Nếu vượt qua liều chiếu này, đa số mô sẹo chết, các mô còn sống sót có khả năng tái sinh rất thấp. Dựa trên kết quả thu được, chúng tôi xác định liều chiếu xạ thích hợp cho mô sẹo của 4 giống lúa nghiên cứu từ 7 Krad đến 9 Krad.

Bảng 4. Số cây tái sinh thu được

Tên giống	Số cây tái sinh ở từng liều chiếu xạ						
	0 Krad	3 Krad	5 Krad	7 Krad	9 Krad	11 Krad	13 Krad
Tám xoan	287	120	68	18	21	0	0
Tám áp bẹ	388	158	54	32	42	10	0
Dự thơm	582	78	22	8	6	0	0
Tẻ di hương	316	281	158	124	62	7	2
Tổng	1573	637	302	182	131	17	2



Hình 21. (A) Mô sẹo giống Tám xoan sau 3 tuần trên môi trường C_1 ; (B) Mô sẹo giống Dự thơm bị chết sau 30 ngày chiếu xạ ở liều 13 Krad; (C) Cây tái sinh sau 60 ngày chiếu xạ ở liều 9 Krad trên mô trường R; (D) Cây mạ nuôi trên môi trường tạo rễ; (E) Tám xoan đối chứng cao 142 cm (trái) và Tám xoan đột biến cao 1,05 cm (phải) ở thế hệ MR_0 (liều chiếu xạ 9 Krad)

Thống kê kết quả bảng 4 cho thấy khả năng tái sinh cây chịu sự ảnh hưởng của tia gamma và kiểu gen của từng giống. Số cây tái sinh giảm tỷ lệ nghịch với liều chiếu ở mỗi giống. Mẫu đối chứng tổng số cây tái sinh được 1573 cây trong khi đó mẫu chiếu xạ 3 Krad tái sinh được 637 cây và ở liều chiếu 13 Krad chỉ tái sinh được 2 cây (Tẻ di hương). Quan sát cây tái sinh ở liều chiếu 11 Krad và 13 Krad, đa số cây bị bạch tạng hoặc bị biến dạng (thân cong, lá xoắn, không thoát ngọn).

Các dòng lúa tạo ra được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh (SR) và được trồng ra nhà lưới để tiếp tục nghiên cứu các đặc điểm nông sinh học làm cơ sở để chọn lọc các dòng có những đặc điểm mong muốn như (thấp cây, ngắn ngày, mất cảm quang) phục vụ cho công tác chọn tạo giống mới. Kết quả ở thế hệ MR0 một số dòng đã biểu hiện về chiều cao rất rõ (Hình 21). Các dòng này tiếp tục được theo dõi ở các thế hệ tiếp theo.

3.2.1.2. Phân tích một số đặc điểm nông học trên dòng ruộng thế hệ RM0

Hiện tượng bất dục thế hệ RM0: Các dòng cây xanh được trồng trên đồng ruộng thế hệ MR0, kết quả cho thấy tỷ lệ bất dục hoàn toàn khá cao đối với tất cả các giống, giống Tám ấp bẹ có tỷ lệ các dòng bất dục cao nhất (44,60%), đây là đặc điểm khá phổ biến đối với cây tái sinh từ mô sẹo và đặc biệt đối với cây trồng khi xử lý đột biến (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả gieo trồng các dòng tái sinh từ mô sẹo xử lý tia gamma thế hệ RM0

TT	Tên giống	Số dòng cấy	Số dòng thu được hạt	Tỷ lệ bất dục (%)
1	Dự thơm	201	118	41,29
2	Tẻ di hương	100	63	37,00
3	Tám ấp bẹ	139	77	44,60
4	Tám xoan	137	105	23,36
	Tổng cộng	577	363	37,09

Sự biến động một số đặc điểm nông học ở thế hệ RM0: Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển các dòng lúa thế hệ RM0 cho thấy mức độ biến dị của tất cả các đặc điểm nông học

là rất lớn. Kết quả thu được ở bảng 6 cho thấy các dòng tái sinh từ mô sẹo xử lý tia gamma có những biến đổi rất lớn về đặc tính sinh lý, di truyền dẫn đến sự biến động các tính trạng hình thái. Đây là nguồn nguyên liệu rất phong phú cho những chọn lọc tiếp theo.

Nhận xét: Nhìn chung các đặc điểm nông sinh học của các dòng tái sinh từ mô sẹo xử lý tia gamma thế hệ RM0 của các giống có những đặc điểm sau:

- Chiều cao cây: thấp hơn đối chứng, có hệ số biến động lớn hơn đối chứng rất nhiều.
- Số bông/khóm cũng biến động lớn đối với từng giống và từng liều chiếu khác nhau.
- Chiều dài bông: đây là chỉ tiêu tương đối ổn định, có hệ số biến động không chênh lệch nhiều so với giống đối chứng.
- Số hạt chắc/bông: đây là chỉ số có hệ số biến động rất lớn, nhìn chung các dòng cây từ nuôi cấy mô thông qua xử lý khi trồng trên đồng ruộng có tỷ lệ hạt chắc tương đối thấp, tỷ lệ các dòng bất dục hoàn toàn tương đối cao.
- Đã thu được một số dòng có chiều cao cây thấp, chín sớm, tỷ lệ hạt chắc cao.

Bảng 6. Một số đặc điểm nông học của các dòng tái sinh từ mô sẹo xử lý tia gamma thế hệ RM0 của các giống lúa nghiên cứu

Liều chiếu	Chiều cao cây		Số bông/khóm		Chiều dài bông (cm)		Số hạt chắc/bông	
	X	Cv(%)	X	Cv(%)	X	Cv(%)	X	Cv(%)
Giống Dự thơm								
L0 (ĐC)	132,10	6,52	8,90	3,88	25,78	3,39	135,54	29,61
L7	110,74	12,15	6,74	3,74	24,68	3,25	63,14	58,61
L9	114,27	13,96	7,40	4,34	25,85	1,76	50,32	46,20
Tẻ Di hương								
L0	123,07	5,76	14,07	3,99	22,12	2,64	76,00	17,65
L5	109,53	12,97	7,00	4,03	21,85	2,35	32,74	34,60
L7	120,58	7,45	7,08	4,29	23,83	3,83	46,83	45,89
L9	115,61	8,32	12,26	6,45	23,84	2,71	12,94	18,41
L11	117,39	6,88	9,86	5,42	25,35	2,39	64,90	42,57

Tám áp bẹ								
L0	142,14	6,92	9,04	2,73	27,48	2,24	188,25	34,90
L5	122,42	10,76	10,29	4,28	25,79	2,08	21,78	23,35
L7	117,32	17,89	10,66	5,13	24,49	2,12	35,07	39,62
L9	108,20	19,67	10,73	5,76	25,57	2,38	36,09	43,40
L11	122,67	6,90	17,40	7,23	24,18	2,05	47,18	47,97
Tám xoan								
L0	143,27	6,99	9,00	2,61	28,16	2,70	177,73	21,93
L7	129,05	13,44	7,47	5,17	24,82	2,73	54,63	63,97
L9	120,02	27,91	5,76	3,36	26,03	2,65	27,61	65,24

Ghi chú: X: giá trị trung bình của 1 chỉ tiêu, Cv%: hệ số biến động của 1 chỉ tiêu.

3.2.1.3. Sự phân ly một số đặc điểm nông học ở thế hệ RM1

Các dòng thu được hạt ở thế hệ MR0 tiếp tục được gieo cấy vụ tiếp theo để đánh giá sự phân ly các tính trạng và chọn lọc các dòng mong muốn. Quan sát quần thể MR1 của các dòng cho thấy có nhiều tính trạng thay đổi khác hẳn so với đối chứng như chiều cao cây, dạng cây, dạng lá đòng,... Đặc biệt, các dòng có nguồn gốc từ giống lúa Tám xoan và Tám áp bẹ có sự biến dị rất rõ về màu sắc, hình dạng và kích thước hạt, phân ly về màu sắc hạt có dòng hạt màu vàng sáng, nâu sáng, nâu đen,... phân ly về dạng hạt có dạng hạt bầu, dạng hạt tròn, hạt có râu,...

Kết quả bảng 7 thu được một số dòng quan tâm RM1 của giống Tám xoan và Tám áp bẹ cho thấy hầu hết các dòng này dạng khóm gọn, lá đòng vừa phải, góc lá đòng đứng, thấp cây, chín sớm hơn so với đối chứng 5 - 15 ngày. Tuy nhiên, đặc điểm về số bông/khóm, số hạt chắc/bông của các dòng này thay đổi rất nhiều so với đối chứng.

Bảng 7. Một số đặc điểm nông học các dòng lúa Tám xoan và Tám ấp Bẹ quan tâm thu vụ mùa 2003 - thế hệ RM1

TT	Tên dòng	C.Cao cây (cm)	Số bông/ khóm	Dài bông (cm)	Số hạt/ bông	Tỷ lệ lếp (%)	Dài hạt (mm)	Rộng hạt (mm)	Thời gian ST (ngày)	TL 1000 hạt (g)
0	TX ĐC	140,70	4,67	24,87	120,30	6,03	7,91	2,61	140	22
1	TXL7-01-1	130,50	6,40	22,60	140,30	21,45	7,23	3,12	120	23
2	TXL7-01-2	127,30	7,80	24,70	116,30	26,87	7,11	2,89	120	22
3	TXL7-01-3	125,00	7,50	26,50	134,50	22,18	7,41	2,90	130	23
4	TXL7-01-4	130,40	8,30	24,60	145,60	19,23	7,21	3,08	130	23
5	TXL7-27-2	127,50	4,60	27,21	206,00	32,57	7,26	2,26	125	20
6	TXL7-27-4	125,80	7,20	27,21	206,00	17,57	7,26	2,57	125	21
7	TXL7-30-2	141,50	6,50	22,65	103,20	31,70	7,43	2,58	125	22
8	TXL7-34-2	127,30	11,0	23,89	129,90	23,70	7,54	2,60	125	21
9	TXL9-41-3	139,20	8,00	24,40	156,00	14,87	7,23	2,38	130	21
10	TXL7-46-1	130,10	10,2	23,38	147,20	19,60	7,56	2,46	130	22
11	TXL7-47-13	141,20	11,0	21,77	90,10	18,70	7,71	2,53	125	21
12	TXL7-48-1	145,50	5,80	25,13	146,25	25,60	7,57	2,32	140	22
13	TXL7-52-7	124,80	5,80	24,50	139,60	29,70	7,69	2,64	120	21
14	TXL9-8-18	125,20	8,00	23,54	132,60	16,50	7,32	2,24	125	21
15	TXL9-10-13	127,90	5,70	27,77	124,30	25,10	7,7	25,5	130	22
16	TXL9-29-1	124,30	6,70	22,32	126,40	26,70	7,87	2,59	125	22
17	TXL9-47-2	120,00	9,10	28,96	161,50	26,80	7,71	2,50	125	21
18	TAB ĐC	135,20	4,59	25,84	143,90	13,99	7,72	2,67	143	22
19	TABL9-10-6	110,40	6,80	22,45	75,40	15,50	7,57	2,76	135	21
20	TABL7-32-1	130,20	12,30	25,30	97,60	24,40	7,84	2,85	125	21
21	TABL7-34-29	132,00	6,60	25,50	118,90	102,00	7,35	2,52	125	22
22	TABL7-53-2	143,30	8,40	26,10	190,80	29,70	7,54	2,42	125	21
23	TABL7-53-3	138,50	10,60	25,70	154,40	19,80	7,61	2,54	120	23

Một số dòng không cảm quang - trở được vụ Xuân: Trong số các dòng thu được ở thế hệ RM1 được gieo cấy vào vụ Xuân (gieo cấy trái vụ), kết quả thu được một số dòng không có tính cảm quang với ánh sáng ngày dài - trở được vụ Xuân (Bảng 8). Đáng chú ý là dòng lúa Tám xoan TXL7-01-1 (Hình 22 và 23) có độ thuần khá cao, trở bông đồng đều, chiều cao cây 100,5 cm, thời gian sinh trưởng là 116 ngày, màu sắc hạt nâu sáng như giống gốc, hình dạng hạt hơi bầu. Kết quả cũng thu được một số dòng lúa Tám xoan TXL9-29-3(1-15) cũng không cảm quang, tuy nhiên các dòng này có sự phân ly về hình thái rất mạnh, trong số này có các dòng TXL9-29-3-1, TXL9-29-3-2 và TXL9-29-3-3 vẫn giữ được màu sắc và hình dạng hạt so với giống gốc. Theo đánh giá cảm quan ban đầu thì các giống này vẫn giữ được mùi thơm của giống gốc.

Hai dòng lúa có nguồn gốc từ giống Dự thơm (DTL7-01-08) và Tẻ di hương (TDHL9-8-5) cũng không cảm quang. Dòng DTL7-01-08 có thời gian sinh trưởng dài, cây cao, hạt có râu, tỷ lệ lép cao. Dòng TDHL9-8-5 cũng phân ly mạnh về các đặc điểm hình thái, một số khóm không trở bông, tỷ lệ lép cao.

Đồng thời với nghiên cứu này, chúng tôi cũng tiến hành chọn lọc một số dòng lúa Tám đột biến do Viện Kỹ thuật hạt nhân thành phố Hồ Chí Minh cung cấp, kết quả thu được dòng lúa tám hạt nhỏ trở được cả 2 vụ, có độ thuần cao, thấp cây, chín sớm, hạt gạo thon dài và trong.

Bảng 8. Đặc điểm nông học của các dòng không cảm quang trở vụ Xuân 2004 – thế hệ RM2

TT	Tên dòng	C.Cao cây (cm)	Số bông/ khóm	Dài bông (cm)	Số hạt/bông	Tỷ lệ lếp (%)	Dài hạt (mm)	Rộng hạt (mm)	Màu sắc, dạng hạt	Thời gian ST (ngày)	TL. 1000 hạt
1	TXL7-01-1	100,5	9,2	21,95	93,90	12,14	7,48	3,03	Nâu sáng Bầu tròn	116	23,8
2	TXL7-01-2	124,8	8,6	22,35	107,7	8,54	7,26	3,06	Nâu sáng Vàng sáng Bầu tròn	120	23,6
3	TXL7-01-3	112,1	7,2	22,30	89,60	17,07	7,50	3,36	Nâu sáng Vàng sáng Bầu tròn, râu	120	23,0

4	TXL9-29-3-1	130,3	7,4	23,53	118,21	34,52	7,92	2,62	Nâu sáng Nhỏ thon	115	22,2
5	TXL9-29-3-2	127,5	7,1	22,96	105,65	36,45	7,87	2,61	Nâu sáng Nhỏ thon	115	22,1
6	TXL9-29-3-3	124,2	7,0	20,27	86,80	47,60	7,68	2,59	Nâu sáng Nhỏ thon	124	21,8
7	TXL9-29-3-4	122,7	9,3	19,31	80,23	94,30	7,72	2,64	Nâu sáng Nhỏ thon	124	20,5
8	TXL9-29-3-5	115,4	6,8	18,60	96,75	24,82	8,31	2,97	Vàng sáng, râu rất dài, hạt to dài	124	23,5
9	TXL9-29-3-6	150,3	7,5	22,71	76,12	10,52	8,42	3,54	Vàng sáng Hạt rất to	124	27,6
10	TXL9-29-3-7	130,6	5,6	22,56	75,51	31,86	7,25	2,46	Vàng sáng, nhỏ	124	19,6
11	TXL9-29-3-8	115,9	3,9	19,63	86,72	26,34	7,49	2,73	Vàng sáng, nhỏ	124	20,2
12	TXL9-29-3-9	130,2	6,4	21,12	90,74	25,60	8,15	2,89	Vàng sáng Dài	124	21,1
13	TXL9-29-3-10	135,4	4,5	22,24	81,15	30,23	8,27	3,32	Vàng sáng Dài-to	124	23,4
14	TXL9-29-3-11	117,5	5,7	21,15	76,88	26,78	8,21	3,29	Vàng sáng Dài-to	124	22,7
15	TXL9-29-3-12	142,0	3,6	19,27	84,86	22,71	7,41	2,56	Vàng sáng nhỏ	124	20,3
16	TXL9-29-3-13	150,4	2,6	18,38	83,45	24,51	7,71	2,64	Vàng sáng nhỏ	124	19,8
17	TXL9-29-3-14	120,4	6,4		87,42	28,56	7,78	2,68	Vàng sáng nhỏ	124	19,4
18	TXL9-29-3-15	118,5	8,4	19,54	75,65	100,00	-	-	Nâu - lép	-	-
19	DTL7-01-8	145,6	6,2	16,70	67,50	72,30	7,43	2,62	Vàng sáng	140	20,5
20	TDHL9-8-5	130,3	7,4	18,50	72,70	60,70	7,50	2,91	Vàng sáng	130	21,8
21	Tám Hạt nhỏ	96,3	9,0	23,80	149,10	8,11	8,66	2,48	Vàng, Nhỏ thon	110	19,2

3.2.1.4. Tóm tắt kết quả tạo các dòng lúa đặc sản dùng trong nước

1. Các giống lúa Dự thơm, Tẻ di hương, Tám xoan và Tám áp bẹ đều có khả năng tạo mô sẹo tốt trên môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l NAA + 0,2 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D với tỷ lệ tạo mô sẹo tương ứng là: 90%; 93,3%; 93% và 95%.
2. Xác định liều chiếu xạ thích hợp cho mô sẹo của 4 giống lúa nghiên cứu từ 7 Krad đến 9 Krad.
3. Đã trồng được 577 dòng cây trên đồng ruộng thế hệ RM0 và thu được 363 dòng có hạt.
4. Bước đầu đã chọn lọc được 38 dòng của 4 giống cần quan tâm theo dõi ở thế hệ tiếp theo (Tám xoan 17 dòng, Tám áp bẹ 5 dòng, Dự thơm 9 dòng, Tẻ di hương 8 dòng).
5. Đã thu được 20 dòng không cảm quang với ánh sáng ngày dài (trở được cả 2 vụ), trong đó có dòng Tám xoan TXL7-01-01 có độ thuần cao, thấp cây và chín sớm.



Hình 22. B: Dòng lúa TXL7-01-01 không cảm quang
A: Tám Xoan đối chứng - không trổ bông



Hình 23. Hình dạng và màu sắc hạt lúa và gạo của dòng TXL7-01-01
(hạt Tám Xoan đối chứng, trái; Hạt của dòng TXL7-01-01 (phải))

3.2.2. Lúa xuất khẩu

Chiến lược hiện nay đối với việc sản xuất lúa gạo ở miền Nam là tạo giống lúa có đủ tiêu chuẩn xuất khẩu. Để đạt được mục đích này, đề tài đã xác định được các tổ hợp lai ưu tú giữa giống lúa cao sản với giống lúa chất lượng như trong bảng 9. Tuy nhiên, con đường tạo giống nhanh và có hiệu quả cao là kết hợp giữa phương pháp tạo giống truyền

thống và công nghệ sinh học hiện đại (công nghệ tế bào thực vật bao gồm chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn kết hợp với chỉ thị phân tử).

Bảng 9. Một số đặc điểm các giống trong tổ hợp lai để cấy túi phấn và tế bào soma

TT	Tên giống	Đặc điểm
1	IR 64	Năng suất cao, ngon cơm, thời gian sinh trưởng ngắn
2	OM 1490	Thấp cây, năng suất cao, ngắn ngày
3	OMCS 2000	Ngắn ngày, ít bạc bụng, năng suất cao
4	Khao dawk Mali 105	Thơm, ngon cơm, cao cây, phẩm chất tốt
5	DS 20	Năng suất cao, ngắn ngày, thơm , ngon cơm
6	Jamine 85	Năng suất cao, ngắn ngày, thơm , ngon cơm
7	OM 3536	Năng suất, ngắn ngày, thơm , ngon cơm, protein cao
8	OM 4392	Giàu vitamine, năng suất cao (do chuyển gen IR 64)
9	Tequing	Japonica, nguồn gốc Trung Quốc và năng suất cao
10	Nàng thơm chợ Đào	Ngon cơm, thơm dẻo, dài ngày

3.2.2.1. Kết quả khai thác vật liệu di truyền để nuôi cấy tế bào soma và túi phấn

Quan sát một số tổ hợp trên quần thể F2 với hai thông số hệ số di truyền (H) và phương sai kiểu gen (sg^2) trên hàm lượng amylose, tỷ lệ protein, độ bền thể gel (GC) và độ hoá hồ (GT). Kết quả nhận được ở bảng 10 cho thấy hàm lượng amylose của các tổ hợp tương đối cao. Chứng tỏ rằng amylose được kiểm soát chủ yếu do di truyền bên trong. Giá trị H thấp trên các tính trạng độ bền gel, độ hoá hồ. Một vài tổ hợp ghi nhận trên tỷ lệ protein có H thấp. Điều này cho thấy các chỉ tiêu trên có sự tương tác kiểu gen và môi trường (GxE). Qua kết quả giúp chúng ta chọn vật liệu ban đầu để khai thác các tính trạng mong muốn thông qua nuôi cấy bao phấn.

Bảng 10. Hệ số di truyền (H) và phương sai (sg^2) của quần thể F2 của một số tổ hợp lai

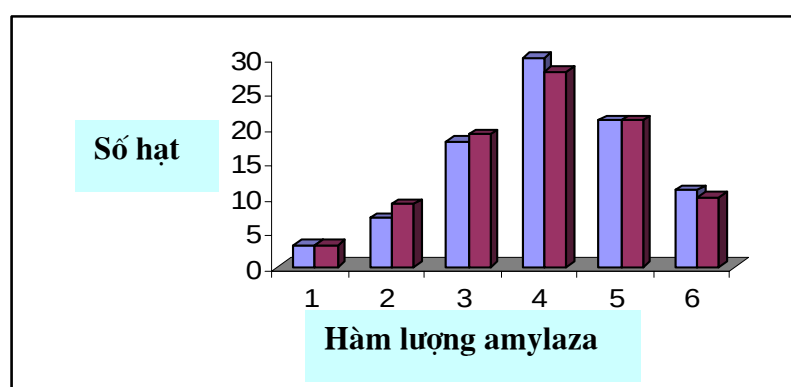
Cặp lai	Amylose		GC		GT		Protein	
	sg^2	H	sg^2	H	sg^2	H	sg^2	H
1	1,20**	0,76	0,01	0,10	0,01	0,12	0,06	0,23
2	1,23*	0,84	0,05	0,20	0,01	0,40	0,04	0,13
3	0,8**	0,75	0,07	0,28	0,02	0,45	0,12*	0,36
4	1,2*	0,83	0,12*	0,32	0,30*	0,62	0,10*	0,32

Ghi chú: 1: IR 64/Jamine; 2: IR 64/ KhaoDawMali105; 3: OM 1490/ Nàng thơm chợ đào; 4: OMCS 2000/ KhaoDawMali 105; * và **: ý nghĩa mức 0,05 và 0,01.

Kiểu gen AC: Trên hai quần thể F2 và BC2F2 được chuyển AC từ bố mẹ vào con lai với quần thể F2 và BC2F2, sự phân ly của F2 và BC2F2 đều theo tỷ lệ 3 : 1. Sự phân ly của AC được kiểm soát theo định luật Mendel với quần thể allele có AC cho gen trội. Sự phân ly và chuyển vị của các allele khác nhau trên hai quần thể F2 và BC2F2 trên hình 24.

Kiểu gen của GC: Độ bền gel trên quần thể chia ra cứng và mềm rõ nét trên quần thể BC2 avf F2 theo tỷ lệ 1: 2 : 1 trên (Bảng 11).

Kiểu gen GT: Đối với GT khi phân tích quần thể F2 sẽ cho tỷ lệ phân ly theo tỷ lệ 1: 3, tuy nhiên khi phân tích quần thể BC2F2 thì tỷ lệ phân ly theo tỷ lệ 1 : 1. Điều này cũng phù hợp với nhiều tác giả trước đây.



Hình 24. Hàm lượng amylose của F2 và BC2F2 của tổ hợp lai IR64/Jasmine 85

Kết luận ba tính trạng AC, GC và GT xem như là tính trạng rất quan trọng trong chất lượng của gạo. Kết quả của báo cáo này phân tích rõ khi xem xét trên IR64/Jasmine 85.

Bảng 11. Các thông số di truyền trên các tính trạng AC, GC và GT trên tổ hợp IR 64/ Jasmine 85

Tính trạng	Quần thể	Số cây	Số cây	Số cây	Tỷ lệ	X ²
AC	F ₂	62(>21%)	28(<21%)		3:1	0,54
	BC ₂ F ₂	60(>21%)	30(<21%)		3:1	0,50
GC	F ₂	25(>60mm)	50(>50mm)	26(<40mm)	1:2:1	0,64
	BC ₂ F ₂	21(>60mm)	44(>50mm)	26(<40mm)	1:2:1	0,60
GT	F ₂	25(>6)	70(<3mm)		1:3	0,46
	BC ₂ F ₂	42(>6)	49(<3mm)		1:1	0,14

Phân tích sự tương quan: Phân tích hệ tương quan cả hai quần thể F₂ và BC₂F₂ trên các tính trạng: AC, GC, GT cho thấy giữa AC và GT cả hai có tương quan rất chặt cả F₂ và BC₂F₂ (Bảng 12). Đối với quần thể F₂ tương quan của hai chỉ tiêu rất lý thú nếu kết hợp hai tính trạng trên sẽ cho con lai vừa ngon cơm, vừa dẻo. Tuy nhiên, trong BC₂F₂ tương quan có chiều ngược lại bất lợi khi sử dụng các giống trong quần thể con lai đối với các hạt gạo ngon cơm nhưng lại cứng cơm.

Bảng 12. Hệ số tương quan của các tính trạng với AC với GC và GT trên hai quần thể F₂ và BC₂F₂ của IR 64/ Jasmine 85

Tính trạng	AC
GT: F ₂ : BC ₂ F ₂	-0,7488** 0,7739**
GC : F ₂ : BC ₂ F ₂	-0.171 -0,149

Tuy nhiên, khi phân tích hệ số tương quan kiểu gen (r_g), kiểu hình (r_p) và môi trường (r_e) trên các quần thể F₃ của IR 64/ Jasmine 85 cho các thông số như trong bảng 13: AC tương quan r_g , r_p và r_e rất chặt với GC và có ý nghĩa thống kê mức 0,05 và 0,01 theo thứ tự. Tuy nhiên, độ bền gel và protein thì chỉ có ý nghĩa với môi trường r_e . Tương quan giữa GT và

GC cũng chỉ ghi nhận tương quan âm ở môi trường. Điều này cũng khẳng định rằng hai tính trạng AC và CT có tương quan rất chặt với kiểu gen, kiểu hình và môi trường.

Bảng 13. Hệ số tương quan kiểu gen (r_g), kiểu hình (r_p) và môi trường (r_e) trên quần thể F3 của IR 64 /Jasmine 85

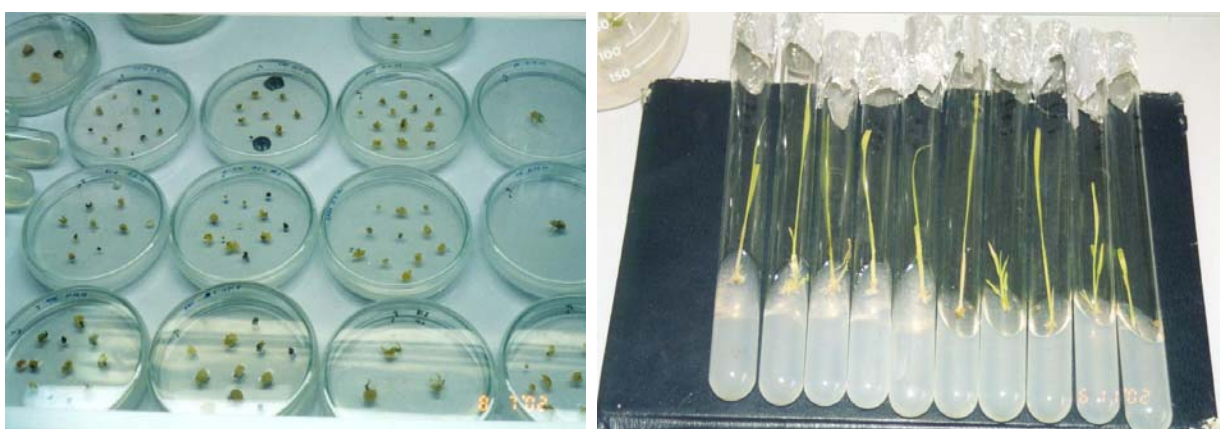
Tính trạng	Hệ tương quan	GC	GT	Protein
AC	r_g	0,331*	0,151	0,120
	r_p	0,472**	-0,212	0,232
	r_e	0,510**	-0,380*	0,415*
GC	r_g		0,118	0,235
	r_p		-0,256	0,317
	r_e		-0,342*	0,461*
GT	r_g			-0,037
	r_p			0,158
	r_e			0,269

3.2.2.2. Chọn tạo các dòng lúa bằng kỹ thuật chọn dòng tế bào soma

12 giống lúa được ứng dụng và khai thác tế bào soma, tuy nhiên theo dõi các giống cho tỷ lệ tái sinh tốt có 4 giống (Bảng 14 và hình 25). Hầu hết các giống phát triển mô sẹo khoẻ mạnh trong 3 tuần nuôi cấy. Các giống khác nhau thì cho tỷ lệ tạo mô sẹo cũng khác nhau, đồng thời khả năng phát triển của các mô sẹo cũng khác nhau. Tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất là Nàng thơm chợ Đào (86,67%), kế đến là Jasmine (70,42%), OM 1490 (63,33%), mô sẹo cũng phát triển tốt có thể dùng làm Tổ hợp lai nuôi cấy mô tế bào để tạo biến dị di truyền. Các giống cho dòng cao là Nàng thơm chợ Đào, kế đến là Jasmine. Tuy nhiên, số dòng được chọn để đưa qua so sánh năng suất và phẩm chất thì tỷ lệ giống Nàng thơm chợ Đào và OM 3536 cho kết quả tốt nhất (Bảng 14).

Bảng 14. Kết quả tạo tế bào soma trên một số giống

Giống	Số hạt	% mô sẹo	% cây tái sinh	Số dòng tái sinh	Số dòng chọn được
OM1490	125	63,33	50,20	71	12
OM 3536	142	55,33	45,10	51	40
Nàng thơm chợ Đào	127	86,67	70,00	210	51
Jamine	125	70,42	100,00	100	20



Hình 25. Khai thác biến dị soma của các giống lúa đặc sản (trái) và cây lúa chuyển sang môi trường tái sinh (phải)

3.2.2.3. Chọn lọc dòng lúa phẩm chất thông qua nuôi cấy túi phấn

Nuôi cấy túi phấn trong thế hệ F2 và F3 của cây lúa để tạo quần thể tế bào đơn bội và đơn bội kép kiểm soát bởi các yếu tố tham gia như môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy...

Bảng 15. Ảnh hưởng chuyển túi phấn từ môi trường mô sẹo sang môi trường tái sinh

STT	Tổ hợp lai	Số bao phấn cấy	Tỷ lệ tạo mô sẹo
1	IR64 / OMCS4	720	0,27
2	IR64 / OM CS96	360	0,56
3	IR64 / DS20	240	0,42
4	IR64 / Jamine 85	240	0,42

5	OM 1490 / IR64	1320	0,3
6	IR64/ OM 2536	240	0,42
7	OM 1490 / KhawDawMali 105	600	0,33
9	OM 1490 / Jamine 85	240	0,83
10	JASMINE / KHAODawMali 105	120	0,83
11	OM 1490 / Nàng thơm chợ Đào	360	0,56
12	CS2000 / KHAO DAW Mali 105	360	1,11
13	OMCS 2000/ Jamine 85	240	0,42
14	Tequing/KhaodawMali 105	480	1,67
15	Tequing/Nàng thơm chợ Đào	360	1,39
16	Tequing/Jamine 85	240	1,25
17	Tequing/ OM 3536	360	1,39

Việc nuôi cấy bao phấn thành tùy thuộc vào cặp lai của từng tổ hợp. Tùy theo từng giống có thể từ sau 4 đến 8 tuần thì mô sẹo xuất hiện. Phần trăm mô sẹo xuất hiện được đánh giá phụ thuộc vào phần trăm của túi phấn sản xuất mô sẹo. Khi mô sẹo dài 2 mm, sẽ được chuyển sang môi trường tái sinh. Để đảm bảo phần trăm tái sinh, đếm số mô sẹo từ túi phấn tạo ra cây xanh và cả cây bạch tạng trên 100 túi phấn được phân lập. Nhân cây tái sinh từ một mô sẹo tạo ra trồng ra ngoài đất và cho cây phát triển. Tổng số 1000 tới 7000 túi phấn được được lập lại và đánh giá qua 4 lần lập lại trên môi trường N6 (Hình 26). Ảnh hưởng của số túi phấn trên các tổ hợp lai được đánh giá trên môi trường tạo mô sẹo. Tỷ lệ rất thấp trên các giống indica/indica so với trên các giống lai từ japonica/ indica cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo có khá hơn từ 1,39 đến 1,67% (Bảng 15).

Từ mô sẹo chuyển sang môi trường tái sinh cho tỷ lệ cao tới 64,52% cặp lai OMCS2000/KhaoDawMali 105 (Bảng 16). Tuy nhiên, cũng có nhiều cặp lai không cho thấy tỷ lệ tái sinh như IR64/OMCS96 hoặc Jasmine/OMCS2000,... Cây tái sinh từ môi trường nuôi cấy túi phấn cho thấy tỷ lệ cây xanh là 6,1% trên cặp lai OMCS2000/KhaodawMali 105 và DS20/ Nàng thơm chợ Đào (5,0%).

Bảng 16. Tỷ lệ cây tái sinh trên vại tổ hợp lai

TT	Tổ hợp lai	Số mô cấy	Tỷ lệ mô tái sinh cây xanh (%)	Tỷ lệ mô hình thành cây bạch tạng (%)	Số cây xanh đưa ra chậu vại	Tỷ lệ cây xanh so với số bao phần cấy (%)
1	IR64 / OM CS96	2	0	16,67	0	0
2	IR64 / OM 1490	2	0	50	0	0
3	DS20 / Nàng thơm chợ Đào	2	50	0	18	5
4	OM 1490/Jamine	8	12,50	0	24	5
5	OMCS2000/ KĐML 105	5	20	0	22	6,1
6	OMCS2000/ NTCĐ Đào	3	0	66,67	0	0
7	IR 64/ NTCĐ	3	33,33	16,70	10	2,08
8	Jamine/ OMCS2000	2	0	0	0	0
9	OMCS 2000/ KĐML 105	31	64,52	0	28	1,94

Một số thông tin khi phân tích các tổ hợp lai để khai thác hàm lượng giàu vitamine như sau: Tổ hợp khai thác từ giống OM 4393 có tỷ lệ tạo mô sẹo rất cao. Có điều đáng chú ý là tỷ lệ túi phần cho cây rất cao ở tổ hợp OM 4392/ OM 3536 (Bảng 17).

Bảng 17. Đánh giá tỷ lệ tạo mô sẹo và phát triển cây tái sinh trên tổ hợp giống giàu vitamine

Cặp lai	Số túi phần	Phần trăm mô sẹo (%)	Số mô sẹo /đĩa	% cây xanh	% cây sản xuất ra nhà lưới	Phần trăm cây bạch tạng (%)	Tỷ lệ túi phần / cây (%)
OM4392/ OM1490	480	92,00	64	3,12	17,81	48,43	9,09
OM4392/ OM3536	678	86,70	192	18,23	43,75	75,0	39,15
OM4392/ OM2031	491	47,49	113	1,50	0,98	53,58	1,50
OM4392/ Jasmin 85	500	54	53	0,75	0,5	85,0	1,25

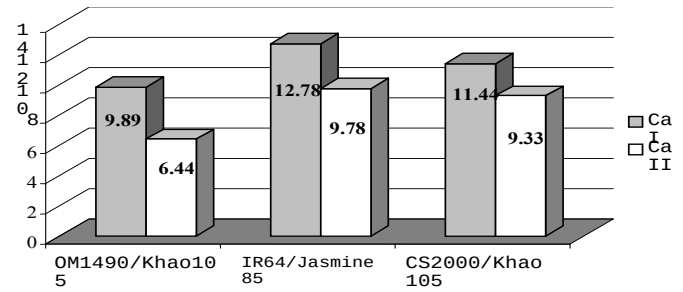


Hình 26. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng tạo mô sẹo từ hạt phấn

Khả năng tạo mô sẹo trên một số môi trường: Việc thành công hay thất bại trong việc nuôi cấy mô còn phụ thuộc vào môi trường, do vậy khi quan sát sự tạo mô sẹo của các tổ hợp lai trên các môi trường CaI (tạo mô sẹo 1) và CaII (tạo mô sẹo 2). Kết quả ở bảng 18 cho thấy hầu hết các tổ hợp lai đều có khả năng tạo mô sẹo trên cả hai môi trường khi nuôi cấy túi phấn. Tuy nhiên, khả năng tạo mô sẹo giữa các tổ hợp lai trên cùng môi trường có sự khác biệt, tổ hợp lai IR64/Jasmine85 có tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất 12,78% so với các tổ hợp khác. Mặt khác, trên hai môi trường khảo sát, môi trường CaI ($N_6 + 2 \text{ mg/l } 2,4 \text{ D} + 1 \text{ mg/l NAA}$) có tỷ lệ tạo mô sẹo trung bình 11,37%, cao hơn môi trường CaII ($N_6 + 2 \text{ mg/l } 2,4 \text{ D}$) có tỷ lệ 8,52% (Hình 27).

Bảng 18. Tỷ lệ tạo mô sẹo trên các môi trường

Tổ hợp	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	
	Ca I	Ca II
OM1490/Khao105	9,89c	6,44c
IR64/Jasmine85	12,78a	9,78a
CS2000/Khao 105	11,44b	9,33b
TB	11,37	8,52
CV%	11,88	20,86
LSD _{0,05}	1,32	1,37



Hình 27. Mô sẹo hình thành trên môi trường CaI và CaII

Đánh giá sự tái sinh và các loại môi trường nuôi cấy: Khi mô phôi sinh đầu tiên được thiết lập và đưa vào môi trường lỏng, tế bào non sẽ xuất hiện. Quan sát thấy một vài tế bào sẽ sản xuất ra các polysaccharide, tế bào không thành phôi cũng xuất hiện sẽ tạo ra một dung dịch huyền phù. Tiếp tục cấy chuyển sang môi trường mới, phôi và phôi sinh nếu hiện diện sẽ xuất hiện màu vàng và nâu nhạt dưới kính hiển vi. Sau đó trở nên đen sau vài ngày. Phôi sinh sẽ khởi hành đời sống ban đầu và phát triển sẽ xuất hiện màu vàng tới tím nhạt. Một số phôi khởi đầu xuất hiện ngay trong môi trường lỏng. Nếu quan sát dưới kính hiển vi một số có màu đen thì các mô sẽ không phát triển. Cây con có thể tạo trực tiếp từ phôi đơn tính đực mà không cấy chuyển. Trường hợp các phôi cần phải cấy chuyển sang môi trường mới gọi là môi trường tái sinh. Mỗi loại cây sẽ có môi trường tái sinh khác nhau, Thí dụ cây lúa môi trường tái sinh cần lượng đường thấp 20 - 30 g/l và 2,4-D được thay bằng NAA, hoặc IBA. Môi trường cơ bản vẫn là MS với 4 mg/l K_{in} và 0,5 mg/l IAA. Trong kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng mô sẹo sau khi hình thành trên môi trường 5 tuần được chuyển sang 4 loại môi trường tái sinh GeI (tái sinh 1), GeII (tái sinh 2), GeIII (tái sinh 3) và GeIV (tái sinh 4). Khi khảo sát sự tái sinh cây xanh trên bốn loại môi trường, hầu hết các tế bào có khả năng tái sinh nhưng sự tạo mô sẹo từ túi phấn có sự khác biệt giữa các tổ hợp lai. Tất cả các tổ hợp có sự thích nghi trên hai loại môi trường GeI và

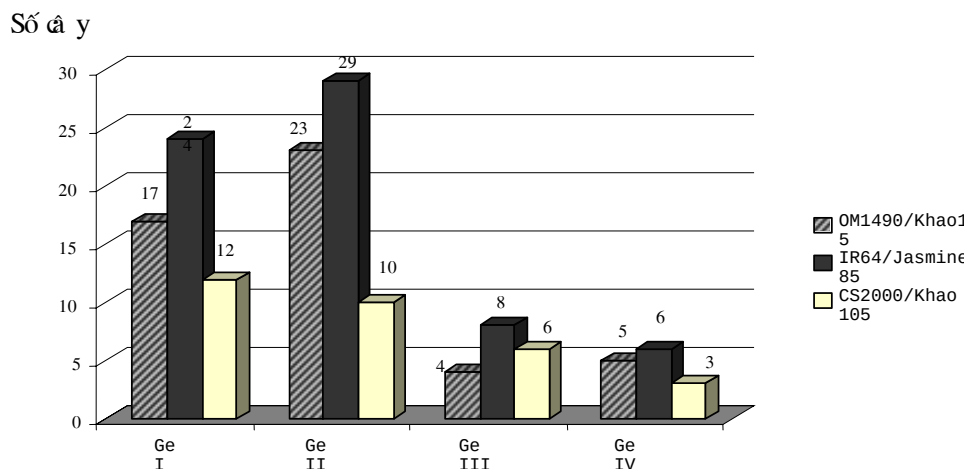
GeII. Tuy nhiên, khi so sánh trong cùng một nhóm môi trường và trên cùng tổ hợp lai, kết quả bảng 3 cho thấy tổ hợp IR64/Jasmine85 có khả năng tái sinh cao nhất trên môi trường GeII (MS + 1 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA + 2 mg/l BA), các tổ hợp lai khác cũng có khả năng tái sinh song tỷ lệ thấp hơn (Bảng 19).

Bảng 19. Khả năng tái sinh cây xanh trên các môi trường

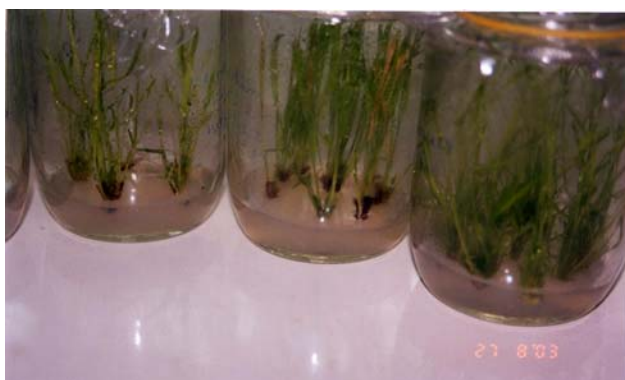
Tổ hợp	Số cây xanh tái sinh							
	Ge I	Ge II	Ge III	Ge IV	CV%	LSD _{0,05}	Tổng	TB
OM1490/Khao105	17 A a	23 AB a	4 A b	5 A b	89,48	1,173	49,00	12,25
IR64/Jasmine85	24 A ab	29 A a	8 A bc	6 A c	108,34	1,942	67,00	16,75
CS2000/Khao 105	12 A a	10 B a	6 A a	3 A a	122,08	1,119	31,00	7,75
CV%	119,16	104,81	106,6	122,08				
LSD _{0,05}	2,19	2,05	0,69	0,62				
Tổng	53,00	62,00	18,00	14,00				
TB	17,67	20,67	6,00	4,67				

Ghi chú: A: so sánh các tổ hợp lai trên cùng một môi trường; a: so sánh các môi trường trên cùng tổ hợp lai.

Ngoài ra, khi cây xanh đạt kích thước khoảng 1,5 – 2,0 cm có thể tách ra cho nhân chồi trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BAP hay chuyển sang môi trường tạo rễ (MS + 0,5 mg/l NAA), khi rễ có chiều dài 2 - 3 cm các cây được chuyển sang môi trường dinh dưỡng Yoshida, để chuẩn bị cho ra nhà lưới. Hầu hết các chồi được tách ra và nhân trên môi trường nhân chồi đều tạo chồi tốt, nhưng các chồi được tạo ra có thân lá hoàn chỉnh, có thể chuyển sang môi trường tạo rễ sau 20 - 30 ngày (Hình 28).



Hình 28. Tỷ lệ tái sinh của một số tổ hợp lai



Hình 29. Cây tái sinh từ mô sẹo

Trong quá trình tái sinh cây từ túi phấn, hiện tượng cây tái sinh không tổng hợp được diệp lục tố nên cây có màu trắng còn gọi là cây bạch tạng, điều này khác với quá trình tạo đột biến bằng tế bào soma. Trên tổ hợp nuôi cấy túi phấn cây bạch tạng đạt tỷ lệ cao nhất trên tổ hợp lai OM1490/Khao105 (60,98%), thấp nhất trên tổ hợp CS2000/Khao105 (42,42%) và khác biệt ở mức có ý nghĩa 0,05. Tuy nhiên, khi đánh giá chung số lượng cây tái sinh giữa các tổ hợp, tổ hợp IR64/Jasmine85 có số lượng cây tái sinh cao (67 cây, bảng 18) trên môi trường GeII (MS + 1 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA + 2 mg/l BA). Túi phấn từ các tổ hợp lai dòng trong thí nghiệm có khả năng phát triển mô sẹo trên môi trường khảo sát. Trong đó tổ hợp lai IR64/Jasmine85 tạo mô sẹo tốt trên môi

trường N₆+ 2 mg/l 2,4D+ 1 mg/l NAA, các mô sẹo có khả năng tái sinh khác biệt trên các tổ hợp lai. Hai tổ hợp lai IR64/Jasmine85 và OM1490/Khao105 tái sinh cây tốt trên môi trường MS + 0,5 mg/l NAA+ 2 mg/l⁻¹ BA và MS + 1 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA + 2 mg/l BA. Các cây xanh nhân chồi hoàn chỉnh tốt trên môi trường MS + 2 mg/l BA và tạo rễ trên môi trường 0,5 mg/l NAA. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu biến di của cây trong quá trình khai thác tế bào haploid, trồng và theo dõi khả năng kháng sâu bệnh cây cấy mô ngoài nhà lưới và ngoài đồng ruộng, cần đánh giá tiếp chất lượng của các dòng trên.

3.2.2.4. Đánh giá năng suất phẩm chất của các dòng có triển vọng

Tiến hành so sánh và quan sát ngoài ruộng với 532 dòng, chọn so sánh sơ khởi là 25 dòng. Từ 25 dòng đó đã chọn được 5 dòng từ 5 giống lúa (Bảng 20) để so sánh khi đưa ra khảo nghiệm. Kết quả phân tích ANOVA các dòng tế bào soma cho thấy phẩm chất của các giống đạt hàm lượng amylose trung bình, độ bạc bụng cấp 0. Ngoại trừ giống Nàng thơm chợ Đào.

Bảng 20. So sánh kết quả một số dòng từ nuôi cấy túi phấn vụ Hè thu năm 2003

Tên giống	Cây cao	Số chồi	Dài bông	Hạt lép/bông	Hạt chắc/bông	% lép	TL10 00	NS (gram)
OM 1490	111,50	7,25	29,00	50,75	162,75	23,19	22,65	27,47
OM 3536	117,25	13,25	29,50	71,50	129,50	31,39	23,15	33,48
Jamine 85	113,50	11,75	29,50	79,00	172,25	31, 50	22,95	38,91
Nàng thơm chợ Đào	113,75	12,00	28,87	69,00	142,75	32,55	23,20	31,71
Khao Daw Mali 105	113,75	8,25	28,87	78,25	119,00	38,99	23,70	26,03
Trung bình	113,95	10,50	29,15	69,70	145,25	31,52	23,13	31,52
EMS	35,35	5,93	4,09	792,03	1984,75	92,16	3,62	44,67
cv %	5,218	23,20	6,94	40,38	30,67	30,45	8,22	21,21

F-value	0,49ns	4,55*	0,10ns	0,66ns	0,99ns	1,37ns	0,16ns	2,35ns
LSD 0,05	8,96	3,67	3,04	42,41	67,13	14,47	2,87	10,07
0,01	12,39	5,08	4,22	58,65	92,836	20,005	3,964	13,927

Đánh giá năng suất và phẩm chất các dòng nuôi cấy túi phấn: Đánh giá năng suất và thành phần năng suất của các tổ hợp giàu vitamine A kết quả cho thấy bốn tổ hợp lai cho thời gian ngắn từ 81 - 88 ngày đây là điều thú vị cho các giống luân canh ba vụ trong năm Đông xuân 2003 (Bảng 21; 22; 23 và 24). So sánh sơ khởi của các dòng giàu vitamine: Kết quả với 4 tổ hợp được chọn trên 145 dòng và chọn ra 4 dòng từ 4 cặp lai để quan sát và đánh giá kết quả.

Bảng 21. Phân tích phẩm chất của một số giống

Stt	Giống	Protein	Chiều dài hạt (mm)	Bạc bụng (cấp)	Độ bền gel	Amylose (%)	Độ trở hồ (cấp)
1	OM 1490	8,58	7,31	0	43	24,1	3
2	OM 3536	8,9	7,71	0	44	24,2	3
3	Jamine 85	8,75	7,42	0	58	22,5	3
4	Nàng thơm chợ Đào	8,23	7,10	0-7	50	23,5	7
5	KhaoDaw Mali 105	8,64	7,23	0	48	23,1	3

Bảng 22. Các đặc tính hình thái của các dòng nuôi cấy túi phấn từ tổ hợp lai F1

Stt	Cặp lai	TGST (ngày)	Cao cây (cm)	Dài bông (cm)
1	OM 4392/ OM 1490	84	68,6	21,03 b
2	OM 4392/ OM 3536	81	74	20,96 b
3	OM 4392/ OM 2031	87	79,4	20,27 b
4	OM 4392/ Jasmin 85	88	80	23,28 a
				CV=5,23% $\alpha = 0,01$

Tiếp tục nghiên cứu năng suất của 4 giống thì thấy đều đạt được năng suất từ 5 tấn/ha. Tuy nhiên, trọng lượng 1000 hạt rất thấp vì hạt rất nhỏ và ngắn (Bảng 23).

Bảng 23. Các thành phần năng suất của các dòng nuôi cấy túi phấn từ tổ hợp lai F1

TT	Nguồn gốc	Số bông/m ²	Số hạt chắc/bông	Tỷ lệ lép	TL1000 hạt	Năng suất (T/ ha)
1	OM 4392/ OM 1490	381 a	70 b	15,66	20,58 a	4,97 b
2	OM 4392/ OM 3536	368 a	73,46 b	44,62	20,38 a	5,94 a
3	OM 4392/ OM 2031	348 ab	70,24 b	18,28	20,67 a	5,233 b
4	OM 4392/Jasmin 85	315 b	95,16 a	25,46	20,38 a	5,843 a
	Cv (%)	24,72% $\alpha = 0,1$	18,40% $\alpha = 0,05$		2,45% $\alpha = 0,01$	15,85% $\alpha = 0,1$

Phân tích phẩm chất của 4 dòng trên cho thấy hàm lượng amylose từ cặp lai OM 4392/OM 3536 cho hàm lượng amylose trung bình và độ bền gel trung bình (Bảng 24).

Trên bảng 25 và 26 cho thấy khai thác tế bào soma một vài giống chọn có năng suất cao hơn bình thường như Nàng thơm chợ đào và OM 3536, nhưng ngược lại có nhiều giống lại thấp hơn bình thường như OM1490. Phẩm chất mùi thơm nhiều giống lại mất đi như Nàng thơm chợ Đào và Khao DawMali 105.

Khảo nghiệm các dòng nuôi cấy tế bào soma và nuôi cấy túi phấn có hai dòng: Nàng thơm chợ Đào đột biến - 5 nuôi cấy biến dị soma năng suất cao nhưng cứng cơm. Một dòng đột biến tế bào Soma từ Jasmine 85. Năng suất và địa điểm của các giống đưa đi khảo nghiệm như trong bảng 27 và hình 30.

Bảng 24. Phân tích phẩm chất của 4 dòng trên được ghi nhận trên bảng 24

Tổ hợp lai	Protein	Vitamine A (%)	Chiều dài hạt (mm)	Bạc bụng (cấp)	Độ bền gel	Amylose (%)	Độ trở hồ (cấp)
OM4392/OM1490	8,50	3,97	5,31	0	32	26,3	3
OM4392/OM3536	8,12	2,05	5,71	0	50	22,3	6
OM4392/OM2031	7,54	4,09	6,28	0	55	25,5	6
OM4392/Jasmin 85	8,23	2,15	5,81	1 - 5	37	24,1	6

Bảng 25. Năng suất và thành phần năng suất của các giống/dòng lúa từ túi phấn và tế bào soma
Đông xuân 2003

TT	Tên giống/dòng	HC/ Bông	% hạt lép	TL 1000hạt	NS Tấn / ha
1	OM 1490 (bình thường)	163	12,2	28,1	5,50**
2	OM 3536 (Soma)	148	13,7	28,3	5,40**
3	OM 1490/ KhawD 105	153	12,2	27,2	5,20**
4	Nàng thơm chợ Đào đột biến (soma)	119	24,1	27,3	5,0**
5	JASMINE 85 (Bình thường)	128	29,7	27,5	4,50**
6	Jamine (tế bào soma)	104	32,7	25,4	4,50**
7	IR 64	135	17,7	27,2	4,40**
8	Khao DawMali 105 (bình thường)	103	19,3	23,9	4,10*
9	IR 64/ Nàng thơm chợ Đào	82	40,8	30,2	3,60 ^{ns}
10	Nàng thơm chợ Đào (bình thường)	128	33,5	21,8	3,40
	CV%	7,73	19,43	1,58	10,30
	LSD 0,5	16,07	8,20	0,73	0,76
	0,1	21,77	11,11	0,98	1,03

Bảng 26. Phẩm chất gạo của các giống/dòng lúa từ soma và túi phấn

TT	Tên giống/dòng	Dài hạt (mm)	Mùi thơm	Bạc bụng (cấp)	Độ bền gel	Hàm lượng Amylose (%)	Độ trở hồ (cấp)
1	OM 1490	7,02	0	0	51	24,1	3
2	OM 3536 (soma)	7,80	1	0	54	24,7	5
3	OM 1490/ Khao 105	7,53	0	0	60	21,4	5
4	Nàng thơm Chợ Đào đột biến (soma)	6,87	0	0-1	43	26,7	5
5	JASMINE 85	7,22	1	0	40	23,4	3
6	Jamine (tế bào soma)	7,35	1	0	50	22,0	3
7	IR 64	7,25	0	0	41	24,1	3
8	KhaoDawMali105	7,11	2	0	50	21,7	6
9	IR 64/ Nàng thơm chợ Đào	6,90	0	98	100	5,3	5
10	Nàng thơm chợ Đào	6,22	1	90	100	6,6	5

Bảng 27. Năng suất và địa điểm của các dòng lúa đưa đi khảo nghiệm

TT	Tên dòng	Nguồn gốc	Năng suất	Địa điểm khảo nghiệm
1	NTCDDB-5*	Nàng thơm chợ Đào	6 - 7 tấn / ha	Trồng tại Viện lúa và tỉnh Sóc Trăng
2	OM 5797	Nuôi cấy túi phấn IR64/Jasmine 85	5 tấn	Đang trồng tại Viện

*: Nàng Thơm Chợ Đào đột biến 5



Hình 30. Đồng lúa NTCĐĐB -5 trồng tại Sóc Trăng (trái) và hạt giống OM 5797 (phải)

3.2.2.5. Tóm tắt kết quả chọn dòng lúa xuất khẩu bằng công nghệ tế bào thực vật

- 1) Đã thiết lập và tiến hành phép lai cho 17 tổ hợp lai để nuôi cấy bao phấn và 12 giống lúa phục vụ chọn dòng biến dị soma. Túi phấn từ các tổ hợp lai dùng trong thí nghiệm có khả năng phát triển thành mô sẹo trên môi trường khảo sát. Trong đó tổ hợp lai IR64/Jasmine85 tạo mô sẹo tốt trên môi trường N6 + 2 mg/l 2,4D + 1 mg/l NAA. Các mô sẹo có khả năng tái sinh khác biệt trên các tổ hợp lai. Hai tổ hợp lai IR64/Jasmine85 và OM1490/Khao105 tái sinh cây xanh tốt trên môi trường MS + 0,5 mg/l NAA + 2 mg/l BA và MS + 1 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA + 2 mg/l BA. Các cây xanh nhân chồi hoàn chỉnh tốt trên môi trường MS + 2 mg/l BA và tạo rễ trên môi trường MS + 0,5 mg/l NAA.
- 2) Môi trường cấy phải thay đổi phù hợp yếu tố di truyền theo từng lứa tuổi của túi phấn để cho cây phát triển. Môi trường đầy đủ các thành phần vô cơ và dinh dưỡng theo yêu cầu sinh lý của cây. Thêm vào các nguyên nhân cơ bản như muối và vitamine, hormone thúc đẩy việc tạo thành phôi và mô sẹo. Cytokinin là tối cần thiết để tạo mô sẹo từ hạt phấn trên nhiều cây ngoại trừ thuốc lá. Auxin 2,4-D gia tăng phôi trên các loài ngũ cốc. Đối với cây tái sinh, cytokinin và nồng độ auxin thấp là yêu cầu cần thiết.
- 3) Đánh giá năng suất của các giống trong vụ Hè Thu 2003 cho thấy các giống đều có năng suất cao nhưng lại phẩm chất không tốt. Còn các dòng có năng suất thấp lại có phẩm chất tốt. Một số dòng có gạo thơm nhưng dài ngày và nhiễm sâu bệnh, cao

cây, dễ đổ. Để khắc phục trường hợp này, chúng tôi tiếp tục cho lai tạo tiếp để tạo các dòng đạt cả 3 yếu tố năng suất cao, phẩm chất và chịu khá với điều kiện bất lợi môi trường.

- 4) Đã tạo được 50 dòng ưu tú, trong đó nổi bật là dòng OM3566 năng suất cao tạo được bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn; NTCĐDB-5 cho năng suất cao, gạo ngon, nhưng mất mùi thơm.

3.2.3. Lúa kháng bệnh đạo ôn

Đạo ôn là một trong các loại bệnh gây thiệt hại rất nghiêm trọng đến năng suất lúa. Hiện chưa có thuốc đặc trị cho bệnh này. Tạo giống lúa kháng đạo ôn là giải pháp hữu hiệu nhất. Mục đích trong nghiên cứu là tạo các giống lúa kháng đạo ôn và có chất lượng khá bằng nuôi cấy bao phấn từ các tổ hợp lai giữa giống chất lượng với giống kháng đạo ôn như trong Bảng 28.

Bảng 28. Các tổ hợp lai nghiên cứu chọn tạo giống lúa chất lượng kháng đạo ôn

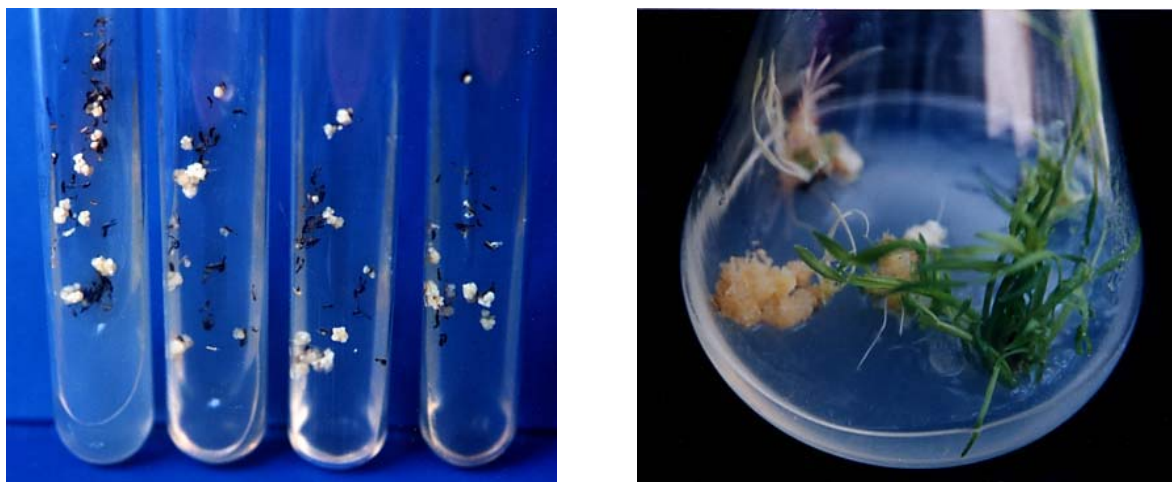
TT	Cặp lai	Mục tiêu chọn dòng
1	Moroberekan/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
2	Moroberekan/WAB56-125	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
3	C101A51/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
4	C71/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
5	Tẻ tếp/Q5	Lúa kháng đạo ôn năng suất cao
6	Q5/KDML105	Lúa năng suất cao, chất lượng tốt
7	KDML105/WAB56-125	Lúa chất lượng cao
8	WAB56-125/Tẻ tếp	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
9	Khang dân/Moroberekan	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá
10	Khang dân/Tẻ tếp	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá
11	BR12/WAB56-125	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá
12	BR12/Tám thơm	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng tốt
13	BR12/KDML105	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng tốt
14	C71/WAB56-125	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng tốt

3.2.3.1. Kết quả nuôi cấy bao phấn

Nhận được 1079 dòng mô sẹo và 387 dòng cây tái sinh (trong đó có 93 dòng cây xanh) từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn của các tổ hợp lai (Bảng 29 và hình 31).

Bảng 29. Kết quả tạo mô sẹo và tái sinh cây từ nuôi cấy bao phấn

Cặp lai	Số bao phấn nuôi cấy	Số mô sẹo hình thành và cấy chuyển		Tái sinh cây					
				Số mô tái sinh cây		Số mô tạo cây xanh		Số mô tạo cây bạch tạng	
		Số mô	%	Số mô	%	Số mô	%	Số mô	%
Moroberekan/KDM L 105	750	38	5,1	12	31,5	2	16,6	10	83,4
Moroberekan/WAB56 125	720	130	18	94	72,3	32	34	62	66
BR12/ WAB56-125	870	285	32,7	44	15,4	15	34	29	66
C71/ KDML105	1050	140	13,3	16	14,4	2	12,5	14	87,5
Khangdân/Moroberekan	1870	131	7	59	45	3	5	56	95
WAB56-125/Tẻ tép	2160	248	11	111	44	29	20	82	74
WAB56125/KDML105	735	51	7	22	43	2	9	20	81
Q5/KDML105	660	26	4	20	76,9	6	30	14	70
C101A51/KDML105	300	12	4	3	25	0	0	3	100
Tẻ tép	930	28	3	6	21,4	2	33	4	67
Tổng		1079		387		93			



Hình 31. Mô sẹo tạo từ hạt phấn cặp lai Moroberekan và WAB56-125 trên môi trường thạch (trái) và cây lúa tái sinh từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Moroberekan và WAB56-125 (trái).

3.2.3.2. Kết quả theo dõi đặc điểm nông sinh học một số dòng lúa chọn lọc

Chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm đồng ruộng để kiểm tra một số chỉ tiêu nông sinh học ở một số dòng lúa nhận được từ nuôi cấy bao phấn. Kết quả cho thấy, nhìn chung các chỉ tiêu nông học ở 5 dòng lúa nhận được từ nuôi cấy bao phấn có hệ số biến đổi di truyền không đáng kể, đặc biệt các cây trong cùng một dòng là tương đối đồng đều (Bảng 30).

Bảng 30. Mức độ biến động một số chỉ tiêu hình thái ở các dòng lúa nuôi cấy bao phấn

Chỉ tiêu Tên dòng	Cao cây		Dài bông		Số hạt chắc/bông		Dài hạt		Rộng hạt	
	X	Cv %	X	Cv %	X	Cv %	X	Cv %	X	Cv %
HPMD4	95,8±1,9	3,2	28,7±1,7	6,0	164,5±26,6	14	7,58±0,3 1	2,5	2,7±0,07	2,0
HPMD6	102,2±2,2	4,0	22,7±2,2	7,0	185,7±27,4	14	6,7±0,10	2,5	2,38±0,1	2,5
HPMD9	100,3±2,8	3,5	27,3±2,1	7,2	273,3±24,6	17	6,92±0,1 8	1,5	2,5±0,07	2,0

HPMD13	90,5±3,3	4,0	20,1±1,9	7,0	144,4±22,6	15	7,2±0,13	1,5	2,54±0,07	2,0
HPMD20	96,7±3,5	3,8	22,5±1,8	6,8	145,4±21,2	13	6,8±0,2	2,0	2,8±0,08	2,0
Moroberekan	97,3±3,0	3,2	23,9±1,6	6,5	151,5±22,2	14	6,86±0,21	2,0	2,84±0,05	2,0
WAB56-125	98,3±4,5	3,5	20,4±2,0	8,5	142,9±16,3	11	7,25±0,23	2,0	2,82±0,08	2,0

Chú thích: X là giá trị trung bình mẫu và Cv là hệ số biến đổi di truyền

3.2.3.3. Kết quả phân tích sinh hoá một số dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn

Bốn dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn có triển vọng đã được lấy mẫu hạt phân tích các chỉ tiêu sinh hoá liên quan đến chất lượng nấu nướng và ăn uống của gạo như: hàm lượng protein, hàm lượng amylose, nhiệt độ hoá hồ và độ bền thể gel. Kết quả cho thấy (Bảng 31) các dòng lúa chọn lọc từ nuôi cấy bao phấn cây lai F1 tổ hợp lai (Morobekan/WAB 56-125) là những dòng lúa có chất lượng tốt. Đặc biệt có dòng lúa HPMD9 có hàm lượng amylose 21,5, nhiệt độ hoá hồ trung bình và cơm gạo từ dòng này sẽ rất mềm dẻo, không bị cứng khi để nguội và dòng HPMD4 có độ dài gel loại TB, hàm lượng amylose thấp và nhiệt độ hoá hồ trung bình nên cũng cho cơm mềm dẻo.

Bảng 31. Kết quả phân tích sinh hoá một số dòng/giống lúa thí nghiệm

Tên dòng/giống lúa	Protein	Amylose		Nhiệt độ hoá hồ		Độ bền Gel C (mm)		
	% CK	% CK	Phân loại	Nhiệt độ hoá hồ (0°C)	Phân loại	Sau 30'	Sau 60'	Phân loại
WAB56-125	11,93	15,25	Thấp	70 - 74	TB	69	71	Mềm
Moroberekan	10,18	20,52	TB	<70	Thấp	54	58	TB
HPMD4	11,98	18,54	Thấp	70 - 74	TB	40	42	TB
HPMD6	8,69	20,07	TB	70 - 74	TB	42	45	TB C
HPMD9	9,33	21,65	TB	70 - 74	TB	75	78	Mềm
HPMD13	10,12	20,60	TB	74 - 75	TBC	39	43	TB C

3.2.3.4. Một số dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao tạo được

Dựa vào các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã định hướng chọn một số dòng lúa ưu tú từ các tổ hợp lai để phát triển thành giống.

Bảng 32. Một số dòng lai và dòng đơn bội kép chọn lọc cho các nghiên cứu khảo nghiệm

TT	Cặp lai	Số dòng chọn đến 2003		Mục tiêu chọn dòng	Chú thích
		Dòng ĐBK	Dòng cây lai		
1	Moroberekan/ KDML105	1 dòng (HPMK1)	2 cá thể F3 (MK1,MK2)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	
2	Moroberekan/ WAB56-125 Và ngược lại	2dòng HPMD4,HPMD 9	2 cá thể (MWC1, MWC10)	Lúa kháng đạo ôn,chất lượng cao	
3	C101A51/KD ML105	0	1 cá thể F2	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	Cây kém không phát triển
4	C71/KDML10 5	0	1 cá thể F5 (CK1)	Lúa kháng đạo ôn , chất lượng cao	
5	Tẻ tép/Q5 và ngược lại	0	1 cá thể F2	Lúa kháng đạo ôn năng suất cao	Kém không phát triển
6	Q5/KDML105	0	1 cá thể F2	Lúa năng suất cao, chất lượng tốt	Kém không phát triển
7	KDML105/W AB56-125 Và ngược lại	1 dòng (HPKW1)	2 cá thể F5 (KW1, KW2)	Lúa chất lượng cao	
TT	Cặp lai	Số dòng chọn đến 2003	Mục tiêu chọn dòng	Chú thích	
8	WAB56-125/ Tẻ tép	2 dòng (HPWT1, HPWT2)	1 cá thể F3 (WT1)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	
9	Khangdân/ Moroberekan	1 dòng (HPKDM1)	2 cá thể F3 (KDM1, KDM2)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá	
10	Khangdân/Tẻ tép	2 dòng	1 cá thể F3 (KT1)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá	

11	BR12/ WAB56-125	1 dòng Kém phát triển	1 cá thể F5 (BW12)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá	
12	BR12/Tám thơm	2 dòng	1 cá thể	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	Kém không phát triển
13	BR12/KDML1 05	1 dòng	1 cá thể		Kém không phát triển
14	C71/WAB56- 125	2 dòng	1 cá thể		Kém không phát triển

Dự kiến: Cuối năm 2005 đưa khảo nghiệm 2 dòng HPMK1, KDM1, các dòng còn lại sẽ đưa khảo nghiệm vào các năm tiếp theo.



Hình 32. Cây lúa đơn bội kép HPMD4 nhận được từ nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Morroberekan và WAB56-12



Hình 33. Dòng lúa đơn bội kép HPKW1 nhận được từ tổ hợp lai KDML105 và WAB56-125



Hình 34. Dòng lúa F6 BW12 trồng vụ xuân 2004 (trái) và dòng lúa KW1 từ cặp lai KDML105 và WAB56-125 trồng vụ xuân 2004 (phải).

3.2.3.5. Tóm tắt kết quả chọn dòng lúa kháng đạo ôn

- 1) Đã tạo được 14 cặp lai giữa các giống kháng đạo ôn và chất lượng cao.
- 2) Các dòng cây F1 từ các cặp lai khác nhau ở lúa cho khả năng tái sinh tạo mô sẹo và tái sinh cây khác nhau: tỷ lệ tạo mô sẹo dao động từ 5,1 - 32,7%, tỷ lệ tái sinh cây 14,4 - 723%, tỷ lệ tạo cây xanh trong quần thể cây tái sinh từ 5 - 34%. Các cây xanh tái sinh từ mô sẹo nuôi cấy bao phần cây lai F1 trồng ra ruộng thí nghiệm có 47% cây đơn bội và 53% cây nhị bội. Nhận được 93 dòng cây từ bao phần của 10 cặp lai.
- 3) Qua theo dõi đánh giá một số đặc điểm nông học của 71 dòng thế hệ con lai và 61 dòng cây từ bao phần và tính kháng bệnh kháng đạo ôn và đánh giá chất lượng gạo (mùi thơm, độ mềm cơm) bằng cảm quan mùi thơm đã chọn được 2 dòng cây F3, F5 và 2 dòng cây đơn bội kép từ nuôi cấy bao phần của một số tổ hợp lai (Hình 32).
- 4) Đã trồng kiểm tra dòng HPKW1 chất lượng cao ở vụ Mùa 2003 trước khi gửi đi khảo nghiệm giống (Hình 33) và một số dòng ưu tú chọn lọc đã được trồng kiểm tra ở vụ Xuân năm 2004 (Hình 34).

3.2.4. Ngô năng suất kháng khô vằn

Bao gồm các vật liệu ưu tú có giá trị trong tạo giống thương mại lai với các dòng có tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây cao. *Các thí nghiệm cơ bản (xác định môi trường và điều kiện nuôi cấy in vitro tạo dòng đơn bội kép tham gia các tổ hợp lai đơn của đề tài là kết quả nghiên cứu của giai đoạn 1996 – 2000. Giai đoạn 2001-2004, tiến hành các thí nghiệm truyền tính cảm ứng nuôi cấy, tạo và đánh giá một số đặc điểm nông học của các dòng đơn bội kép, khả năng chịu bệnh khô vằn, xác định các chỉ thị liên quan tính kháng bệnh khô vằn, xác định ưu thế lai, đánh giá các dòng triển vọng...*

Tập đoàn nguyên liệu được gieo trồng tại Viện Nghiên cứu ngô từ tháng 2 đến tháng 8 hàng năm. Bao phần dùng để nuôi cấy chứa bào tử phát triển ở giai đoạn từ một nhân sớm đến hai nhân muộn. Sau khi xử lý lạnh ở 10°C từ 10 - 14 ngày được cấy trên môi trường tạo phôi. Quá trình tạo phôi diễn ra trong điều kiện 27°C không có ánh sáng, tỷ lệ tạo phôi được theo dõi từ ngày thứ 21 sau khi cấy. Các cấu trúc phôi đạt kích thước từ 1 - 2 mm được cấy chuyển sang hệ thống môi trường tái sinh trong điều kiện 27°C, chiếu sáng

16 h/ngày để tái sinh cây (Hình 35). Cây tái sinh từ các cấu trúc phôi có đầy đủ các bộ phận thân lá được cấy chuyển sang hệ thống môi trường ra rễ và ra ngôi. Đánh giá độ thuần di truyền, khả năng sinh trưởng - phát triển từ thế hệ S_2 theo phương pháp đánh giá dòng của CIMMYT. Lai thử theo phương pháp lai đỉnh (top cross). Số liệu thí nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học.

3.2.4.1. Tạo dòng thuần bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn

Truyền tính cảm ứng sang 250 nguồn. Đến vụ Xuân năm 2003, đã xác định được 19 Tổ hợp lai có tỷ lệ tạo cấu trúc phôi trung bình là 9,5%, tái sinh cây là 10,4% ổn định qua các vụ (Bảng 34). Trong số 19 Tổ hợp lai đó có 7 Tổ hợp lai có tỷ lệ tạo cấu trúc phôi dưới 10%, 2 tổ hợp lai có tỷ lệ tạo cấu trúc phôi trên 20%. Vụ Thu 2003 đã nuôi bao phấn của 64 tổ hợp lai và xác định được 25 nguồn có khả năng tạo phôi và tái sinh cây (Bảng 33).

Bảng 33. Kết quả cải tạo nâng cao tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây

TT	Tổ hợp lai	Tỷ lệ tạo phôi (%)		Tỷ lệ tái sinh cây (%)	
		Vụ Xuân	Vụ Thu	Vụ Xuân	Vụ Thu
1	C2 x C172	2,1	3,4	4,2	6,6
2	C135 x C172	8,4	11,3	6,7	8,4
3	AC7931 x 172	3,1	5,6	6,1	7,2
4	C154 x C172	2,1	8,4	3,7	4,2
5	C164 x C172	24,6	30,6	14,6	13,7
6	C2 x C172	4,2	10,4	6,6	8,4
7	LVN32	6,4	7,3	2,1	3,4
8	C77 x C172	12,2	14,6	12,5	11,4
9	T3 x C 172	14,9	22,0	15,2	16,1
10	T5 x C172	4,1	6,3	9,0	8,3
11	C25 x C172	3,4	2,5	10,6	10,0
12	C103 x C172	6,1	8,4	8,2	10,4
13	C104 x C172	2,4	3,15	2,15	4,0
14	C193 x C172	16,8	16,4	22,2	19,0

15	T6 x C164	13,8	14,0	15,0	13,7
16	T2 x C164	4,8	6,3	4,05	4,5
17	HBC (Đ/C)	28,9	32,0	28,4	22,6
18	C155 x C172	12,5	14,0	25,4	28,8
19	C129 x C172	11,3	10,0	2,6	3,1
<i>Trung bình</i>		<i>9,5</i>	<i>11,9</i>	<i>10,4</i>	<i>10,7</i>



Hình 35. Tái sinh cây ngô đơn bội kép

Bảng 34. Tỷ lệ tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây của một số tổ hợp lai được chuyển tính cảm ứng
(vụ Thu 2003)

STT	Tổ hợp lai	Tỷ lệ tạo phôi (%)	Tỷ lệ tái sinh cây (%)
1	C104 x C81	2,30	-
2	C174 x C81	5,30	-
3	T3 x C82	10,30	9,68
4	C96 x C82	3,30	10,00
5	C180 x C82	4,67	7,14
6	C183 x C82	7,67	4,35
7	B14-BC	5,00	20,00
8	C69 x C280	4,00	16,67
9	C86 x C280	7,30	18,18
10	C117 x C280	6,30	36,84
11	C118 x C280	5,67	29,41
12	C71 x C286	5,67	-
13	C85 x C286	3,30	10,00
14	C87 x C286	5,67	29,41
15	C105 x C286	6,67	10,00
16	C117 x C286	8,00	37,50
17	C68 x C287	2,67	25,00
18	C70 x C287	10,67	6,25
19	C72 x C287	2,30	-
20	C114 x C287	10,0	16,67
21	C88 x C296	3,30	10,00
22	C111 x C296	3,67	-
23	C117 x C296	7,00	4,76
24	C71 x C301	6,00	-
25	C159 x C301	10,30	16,13
Trung bình		5,85	12,69

Đã thành lập được tập đoàn vật liệu phục vụ nuôi cấy bao phấn bao gồm 43 nguồn với tỷ lệ tạo phôi trung bình là 9,08%, tái sinh cây 11,26%. Vụ Xuân 2004 đã nuôi cấy 51

nguồn vật liệu, xác định được 18 nguồn tạo phôi (35,29%) với tỷ lệ phản ứng tạo phôi trung bình là 9,67% và 13 nguồn tái sinh (25,49%) với tỷ lệ tái sinh cây trung bình là 14,53% (Bảng 35).

Bảng 35. Kết quả thí nghiệm nuôi cấy bao phấn (Vụ Xuân 2004)

STT	Tổ hợp lai	Tỷ lệ tạo phôi (%)	Tỷ lệ tái sinh cây (%)
1	HBC (Đối chứng)	33,3	12,6
2	AC24xDòngK4	3,3	16,0
3	AC29x7	3,3	0,0
4	AC30x52	3,8	0,0
5	AC35x38	18,3	37,5
6	AC35x57	6,6	4,0
7	BioseedxAC24	1,6	0,0
8	G49xHBC	3,0	0,0
9	G49xAC24	3,3	50,0
10	SC7114xAC24	8,0	0,0
11	SC18161xHBC	13,3	10,0
12	SC18161xAC24	8,0	33,3
13	SC1614xAC24	10,0	19,0
14	SC7114xHBC	25,0	28,5
15	SX2007xAC24	8,3	0,0
16	SX2010xHBC	6,0	6,6
17	SX2010xAC24	11,2	33,3
18	F145 (C56N x VN38)	6,0	8,6
19	F174 (C107xC286)	11,4	16,6
<i>Trung bình</i>		<i>9,67</i>	<i>14,53</i>

So sánh kết quả nuôi cấy bao phấn của các năm 2002, 2003 và 2004 thấy rằng: Tỷ lệ tạo phôi trung bình của các Tổ hợp lai trong vụ Xuân 2004 ổn định ở mức tương đối cao (9,67%), đặc biệt là tỷ lệ tái sinh cây trong nuôi cấy bao phấn đã được nâng lên một cách đáng kể: từ 10,7 - 11,9% (2002) đến 12,69% (2003) và vụ Xuân 2004 là 14,53%. Đồng thời với việc nâng cao được tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi của các tổ hợp lai

thì tỷ lệ tái sinh cây cũng được cải thiện. Như vậy, nhược điểm của kỹ thuật nuôi cấy bao phấn là tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây thấp đã được khắc phục (Hình 36).



Hình 36. Cây tái sinh từ tổ hợp lai được truyền tính cảm ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây (C164xC172)

3.2.4.2. Tạo cây ngô đơn bội kép

Tính đến hết vụ Thu 2003, đã tạo mới được 105 dòng đơn bội kép, bao gồm 80 dòng ở thế hệ S_2 , 19 dòng ở thế hệ S_3 và 6 dòng ở thế hệ S_1 đang được đánh giá trên đồng ruộng. Trong vụ Xuân 2004 tạo được thêm 9 dòng mới nâng tổng số dòng tạo được lên 114 dòng. Đánh giá khả năng kết hợp của 5 dòng S_6 (kết quả 1997 - 2000) đã xác định được 2 tổ hợp lai đơn có khả năng cho năng suất cao, chống chịu tốt, có nhiều triển vọng ứng dụng trong sản xuất đó là dòng F145 và F154.



Hình 37. Cây ngô đơn bội kép được ra ngôi trên nền đất



Hình 38. Dòng C177 kháng khô vằn



Hình 39. Dòng C305 kháng khô vằn



Hình 40. Nguồn đối chứng nhiễm bệnh khô vằn

3.2.4.3. Đánh giá và khảo nghiệm tác giả các dòng lai triển vọng

Xác định tổ hợp lai có triển vọng: Trên cơ sở tập đoàn dòng đơn bội kép và kết quả phân tích đa dạng di truyền, đã tiến hành lai tạo 300 tổ hợp lai, đánh giá trên đồng ruộng qua các vụ Xuân, Thu 2002 và vụ Xuân, Thu 2003. Kết quả đã xác định được một số dòng ngô triển vọng (Bảng 36).

Bảng 36. Đặc điểm của một số dòng ngô triển vọng

TT	Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)		Khả năng chống chịu			Năng suất (tạ/ha)
		Xuân	Thu Đông	Đổ	Hạn	Khô vằn	
1	363	115	108		Khá	Khá	108,0
2	331(F154)	110	105		Khá	Khá	101,9
3	277	110	105	Khá	Khá	Khá	103,3
4	74	110	105	Khá	Khá	Khá	99,5
5	52	108	100	Khá	Khá	Khá	98,1
6	13	108	100	Khá	Khá	Khá	97,3
7	F145	105	95	Khá	Khá	Tốt	95,4
8	CN4	110	105	Kém	Khá	TB	96,1
9	CN5	110	105	Khá	TB	Khá	94,7
10	LVN99 (ĐC1)	105	100	Tốt	Khá	Tốt	93,7
11	LVN4 (ĐC 2)	115	110	Khá	Khá	Khá	90,1
12	G49 (ĐC 3)	115	105	Tốt	Tốt	Tốt	80,2
13	DK 999 (ĐC4)	110	105	Khá	TB	Khá	73,4

Kết quả khảo nghiệm tác giả và thử nghiệm một số tổ hợp lai: Từ vụ Xuân 2003, tiến hành khảo nghiệm một số tổ hợp lai có triển vọng ở các vùng sinh thái (kết quả từ nuôi cấy bao phấn và phân tích đa dạng di truyền).

Bảng 37. Kết quả khảo nghiệm tác giả một số dòng trong sản xuất (Thu Đông 2003)

TT	Tên dòng	TGST (ngày)	Năng suất (tạ/ha) tại một số địa phương				Trung bình
			Tam Dương	Mê Linh	Đan Phượng	Kim Bảng	
1	CN4 (11x7)*	105	61,4	57,7	96,1	-	71,7
2	CN5 (8x7)*	105	65,6	62,4	94,7	67,0	72,4
3	F145 (C56NxVN38)*	97	71,8	-	95,4	69,8	79,0
4	CN2 (VN38xTU373)*	95	72,4	64,0	79,5	69,0	71,2
5	LVN4 (ĐC)	110	64,9	61,8	90,1	-	72,3

Ghi chú: *: Tên của tổ hợp lai đơn

Từ các kết quả thí nghiệm cho thấy: Dòng CN2 là giống ngắn ngày, chịu được bệnh khô vằn, năng suất cao được đưa vào thử nghiệm trong vụ Thu Đông 2003; Các dòng ngô CN4 và F145 là những dòng có năng suất cao, ổn định, có khả năng chống chịu tốt, được thử nghiệm trong mạng lưới khảo nghiệm Quốc gia trong vụ Xuân 2004. Kết quả ở bảng 36 và bảng 37 cho thấy các dòng F145, CN4, CN2 đều cho năng suất tương đương hoặc cao hơn đối chứng. Dòng CN4 có năng suất tương đương với đối chứng, có khả năng thích ứng với nhiều vùng sinh thái, nhưng khả năng chịu bệnh khô vằn yếu và nhất là chống đổ kém, do đó không nên đưa vào sản xuất. Dòng CN2 chín sớm, chịu bệnh khô vằn, năng suất từ 60 - 80 tạ/ha, tuy nhiên giống này còn 2 điểm yếu cần khắc phục là hình thái bắp và màu sắc hạt nên cần phải tiếp tục nghiên cứu cải tiến. Dòng F145 là giống có năng suất cao, ổn định, có khả năng chống chịu tốt, nhất là chịu được hạn và bệnh khô vằn, thích hợp với nhiều vùng sinh thái, đây là giống có nhiều triển vọng. Chính vì thế, trong thời gian tới cần đẩy mạnh việc đưa dòng F145 vào thử nghiệm rộng hơn nữa trong sản xuất, tiến tới khu vực hoá giống vào năm 2005.

Khảo nghiệm Quốc gia hai dòng ngô CN4 và F145 trong vụ Xuân 2004 và được đánh giá là những giống có năng suất cao, vượt đối chứng (LVN4) từ 5 - 10% và khả năng chống chịu tốt với hạn, bệnh khô vằn. Hai dòng được kết luận là giống có triển vọng.

4.2.4.4. Kết quả tạo dòng ngô mới năng suất kháng khô vằn

- 1) Nghiên cứu thành công việc truyền tính cảm ứng nuôi cấy *in vitro* sang 250 nguồn. Thành lập được tập đoàn vật liệu phục vụ nuôi cấy bao phấn bao gồm 51 Tổ hợp lai, xác định được 18 nguồn tạo phôi (35,29%) với tỷ lệ phản ứng tạo phôi trung bình là 9,67% và 13 nguồn tái sinh (25,49%) với tỷ lệ tái sinh cây trung bình là 14,53%.
- 2) Kết hợp với Viện bảo vệ thực vật phân lập, giám định được 5 chủng *Rhizoctonia*. Đánh giá trực tiếp các vật liệu trên đồng ruộng và gây nhiễm nhân tạo. Xác định được 2 nguồn dòng kháng được bệnh khô vằn trong tổng số 11 nguồn dòng ở thế hệ S4. Thông qua phương pháp chọn lọc truyền thống và gây nhiễm nhân tạo trên đồng ruộng ở ngô đã xác định được 02 nguồn dòng là C177 và C305 (Hình 38; 39 và 40) và 01 tổ hợp lai (tạo ra dòng CN2) chịu được bệnh khô vằn.
- 3) Đã tạo được 114 dòng đơn bội kép. Đánh giá khả năng kết hợp của 5 dòng S₆ xác định được 2 tổ hợp có khả năng cho năng suất cao, chống chịu tốt, có triển vọng phát triển thành giống đó là dòng F145 và F154.

3.2.5. Phục tráng cây Ngưu tất

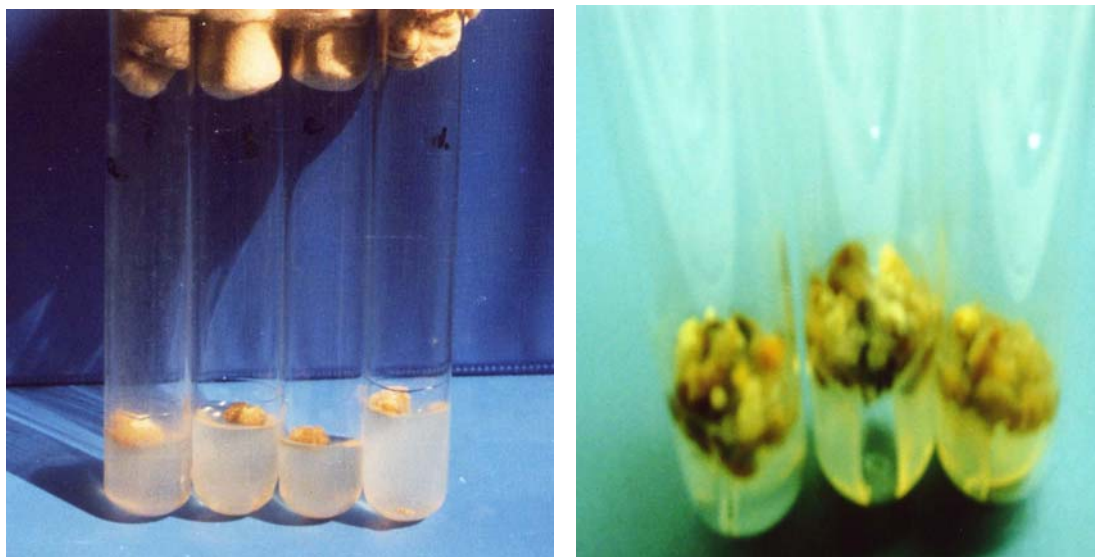
Ngưu tất là cây có nhiều hạt và nhân giống khá dễ dàng bằng hạt. Mục tiêu là thiết lập quy trình nhân nhanh *in vitro* không phải để trồng lấy dược liệu mà để phục vụ cho việc nhân nhanh các cá thể đầu dòng được chọn tạo sau này. Các cá thể này sẽ được trồng để thu hạt giống, sau đó dùng hạt giống để trồng lấy dược liệu theo cách làm thông thường.

- Môi trường tạo chồi *in vitro* sơ cấp tốt nhất là MS + 0,1 mg/l IBA
- Môi trường tốt nhất để nhân nhanh và tạo rễ từ lát cắt đốt thân (Hình 41) và ngọn chồi là MS không có chất điều tiết sinh trưởng, ở môi trường này, tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 90% nhưng cây khỏe, không kèm theo mô sẹo và đạt tỷ lệ sống 100% khi chuyển ra vườn ươm.
- Có thể tạo mô sẹo từ gian đốt thân trong môi trường MS + 1 mg/l NAA + 0,2 mg/l BAP và từ hypocotyl trong môi trường MS + 1 mg/l IBA (Hình 42).

- Mô sẹo Ngưu tất từ cả hai nguồn nguyên liệu đều bị hoá nâu trong quá trình cấy chuyền.
- Đang tiếp tục nghiên cứu khắc phục hiện tượng hoá nâu của mô sẹo trong nuôi cấy để tiến hành chọn dòng Ngưu tất có thời gian sinh trưởng dài, củ ít xơ, chất lượng tốt.



Hình 41. Cây ngưu tất *in vitro* nhân từ đốt thân sau 20 ngày nuôi cấy (trái) và cây ngưu tất *in vitro* ngoài vườn ươm 75 ngày tuổi (phải)



Hình 42. Mô sẹo ngưu tất từ hypocotyl trong môi trường MS + 1 mg/l IBA sau 20 ngày nuôi cấy.

3.3. NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ VÀO VIỆC ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN TẬP ĐOÀN MỘT SỐ GIỐNG CÂY TRỒNG NHẪM LỰA CHỌN BỐ MẸ CẶP LAI VÀ ĐÁNH GIÁ SỚM CÁC DÒNG CÓ TRIỂN VỌNG THÀNH GIỐNG

Ngay từ thập kỷ 90 của thế kỷ 20, kỹ thuật sinh học phân tử đã trở thành công cụ rất có hiệu quả trong phân tích đa dạng, bảo tồn và tiến hoá giống loài ở sinh vật. Các phép phân tích đa dạng giúp các nhà nghiên cứu xác định việc chọn bố mẹ cặp lai theo mục đích nghiên cứu. Đặc biệt, các kết quả phân tích phân tử kết hợp với phân tích kiểu hình đã cho phép các nhà nghiên cứu nhận dạng chính xác chỉ thị liên quan đến một số đặc điểm nông học quan trọng ở một số loại cây trồng như lúa, lúa mì, cao lương, ngô,... Mục đích đặt ra trong nghiên cứu là: (i) *Sưu tập, khai thác các chỉ thị phân tử để đánh giá đa dạng tập đoàn giống lúa kháng bệnh bạc lá, lác kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh, đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt,...* (ii) *Sử dụng các chỉ thị liên quan đến chất lượng và tính kháng bệnh đạo ôn (lúa), khô vằn (ngô), bệnh rỉ sắt và tính chịu hạn (lạc và đậu tương) để đánh giá các dòng mới tạo được trong đề tài.*

3.3.1. Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn (*Xanthomonas oryza*)

Kết quả phân tích đa dạng ADN:

Kết quả phân tích đa hình ADN của 36 giống lúa có nguồn gốc và tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn (do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam cung cấp như trình bày trong bảng 38, điểm đánh giá tính kháng/nhiễm của các giống lúa mới chỉ với một nòi vi khuẩn phổ biến ở vùng Đồng bằng sông Hồng) với 21 mẫu ngẫu nhiên (mỗi mẫu có chiều dài 10 nucleotide được thiết kế theo công bố của hãng Operon có ký hiệu: RA31, RA32, RA36, RA40, RA45, RA46, RA50, RA142, RA143, RA159, OPA13, OPP19, UBC39, V8, Q14, GN38, C19, O10, O13, O18, I13), đã thu được tổng số có 392 phân đoạn ADN được nhân bản. Số lượng các phân đoạn ADN nhân bản với các mẫu xê dịch từ 9 (RA45) đến 28 (O-18), kích thước nhân bản từ 0,23 kb đến 3 kb. Tính đa hình của các mẫu RAPD được đánh giá thông qua giá trị PIC. Giá trị PIC càng lớn thì tính đa hình của mẫu đó càng cao và ngược lại. Kết quả cho thấy giá trị PIC dao động từ 0,25

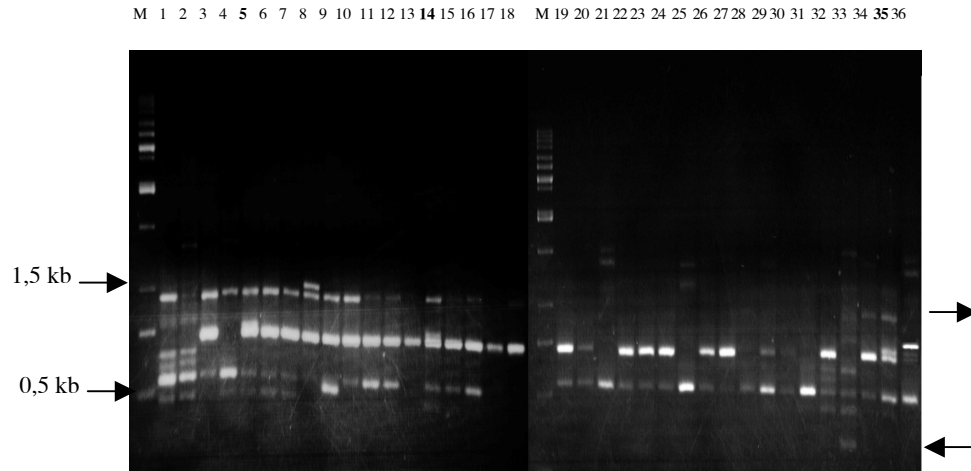
Bảng 38. Danh sách tập đoàn giống lúa sử dụng trong nghiên cứu

STT(1)	Tên giống	Nguồn gốc	Điểm	STT (2)	Tên giống	Nguồn gốc	Điểm
1	OM3499-5	Việt Nam	4,0	19	IRRI346	IRRI	7,7
2	OM3242-50	Việt Nam	5,0	20	MILYANG23	Hàn Quốc	7,0
3	OM3496-9	Việt Nam	5,0	21	MILYANG42	Hàn Quốc	3,0
4	NTCD1-12	Việt Nam	5,0	22	SUWION290	Hàn Quốc	9,0
5	NTCD1-16	Việt Nam	5,0	23	BJ1	Ấn Độ	7,7
6	Tám tiêu	Việt Nam	5,5	24	Tẻ tép	Việt Nam	7,7
7	Tám xuân bắc	Việt Nam	5,5	25	BL89	Việt Nam	3,0
8	Nếp đen	Việt Nam	3,3	26	BL28	Việt Nam	3,0
9	Nếp cái hoa	Việt Nam	5,5	27	BL31-97	Ấn Độ	1,0
10	Nếp sớm	Việt Nam	3,3	28	BBL72-99	Ấn Độ	3,0
11	HT1	Trung Quốc	7,7	29	KBL75-99	Ấn Độ	3,0
12	N87	Đài Loan	7,7	30	KBL53-99	Ấn Độ	5,0
13	DV85	IRRI	1,0	31	Khang dân	Trung Quốc	5,0
14	IRRI1545	IRRI	3,0	32	Chiêm hương	Trung Quốc	9,0
15	IRRI20	IRRI	5,0	33	Q5	Trung Quốc	7,7
16	IRRI8	IRRI	5,0	34	DÔ115	Việt Nam	5,0
17	KUNTLAN	Đài Loan	5,0	35	KB1	Việt Nam	7,7
18	ZENITH	Đài Loan	5,0	36	TN1	Việt Nam	7,7

Ghi chú: 1: Kháng cao 3: Kháng 5: Kháng vừa 7: Nhiễm vừa 9: Nhiễm nặng

(mỗi RA143 và mỗi OPA13) đến 0,58 (mỗi RA36). Trong đó, 3/21 mỗi RAPD (RA36, RA45, O-18) cho tính đa hình cao với giá trị PIC $\geq 0,5$. Tuy nhiên trong kết quả nhận được, tính đa hình thể hiện ở giá trị PIC không tỷ lệ thuận với số lượng các phân đoạn nhân bản. Chẳng hạn với mỗi RA36, mặc dù chỉ có 9 phân đoạn ADN được nhân bản nhưng đã cho tính đa hình rõ nhất với giá trị PIC là 0,58. Trong khi đó, mỗi RA31 có tới 27 phân đoạn ADN được nhân bản nhưng giá trị PIC chỉ là 0,31. Tính đa hình cũng chỉ ra rất rõ khi so sánh giữa các giống với mỗi RA36 (hình 43). Ví dụ, tại vị trí 0,3 kb và 0,5 kb chỉ có giống Q5 và giống Nếp cái hoa vàng xuất hiện phân đoạn ADN (mũi tên), hoặc tại vị trí 0,75 kb chỉ có giống NTCD1-16, IRRI1545 và giống KB1 là xuất hiện phân đoạn

ADN (mũi tên). Trong khi đó giống DV85, KUNTLAN và ZENITH phân đoạn ADN đã không được nhân bản ở vị trí 0,55 kb.



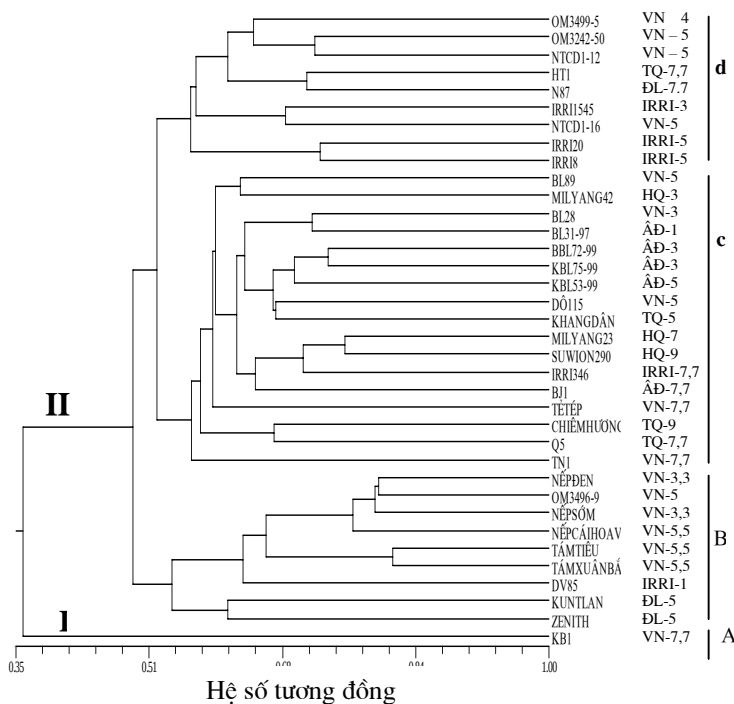
Hình 43. Kết quả điện di sản phẩm RAPD của 36 giống lúa có mức độ kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn với môi RA36 (Thứ tự tên các giống như trong bảng 39), M: Thang ADN chuẩn 1 kb.
← xuất hiện phân đoạn ADN; → không xuất hiện phân đoạn ADN

Mối quan hệ di truyền giữa các giống lúa nghiên cứu: Sơ đồ hình cây theo hệ số di truyền giống nhau của Jaccard với kiểu phân nhóm UPGMA (hình 44) đã chỉ ra mức độ sai khác di truyền giữa 36 giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn. Mức độ khác nhau được biểu hiện bằng hệ số sai khác giữa các giống. Các giống có hệ số di truyền giống nhau sẽ được xếp vào một nhóm, giữa các nhóm lại có sự liên hệ với nhau. Kết quả phân nhóm theo tọa độ chính (hình 45) là bằng chứng của cách phân nhóm theo sơ đồ hình cây (hình 44) như sau:

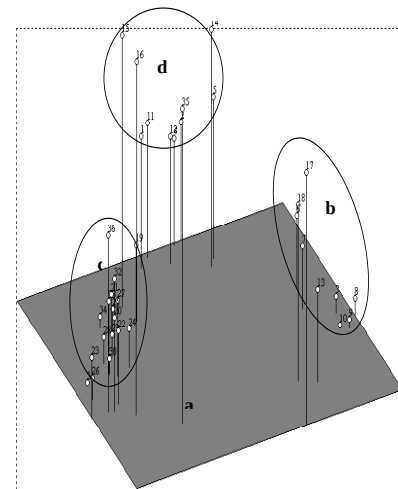
Nhóm I (a) chỉ có một giống KB1 có nguồn gốc Việt Nam và nhiễm với bệnh bạc lá vi khuẩn (điểm bệnh 7,7), có hệ số sai khác so với các giống khoảng 64% (1- 0,36). Đây là giống có sự sai khác nhiều nhất so với các giống còn lại.

Nhóm II gồm 35 giống còn lại và được chia làm ba nhánh phụ: Nhóm phụ 1 (b) gồm 9 giống: ZENITH, KUNTLAN, DV85, Tám xuân bắc, Tám tiêu, Nếp cái hoa vàng, Nếp sớm, OM3496-9, Nếp đen. Nhóm này chủ yếu là các giống lúa địa phương, có nguồn gốc ở Việt Nam và có mức độ kháng bệnh trung bình (điểm bệnh từ 1 đến 5,5), trừ giống DV85 có khả năng kháng bệnh cao (điểm kháng bệnh 1). Hệ số di truyền sai khác giữa

các giống trong nhóm từ 18% đến 46%, Nhóm phụ 2 (c) gồm 17 giống và được chia làm 6 nhóm nhỏ; Nhóm phụ 3 (d) gồm 9 giống, trong đó có 4 giống của Việt Nam (NTCD1-16, NTCD1-12, OM3242-50, OM3499-5) đều là giống lúa chất lượng, năng suất và có điểm kháng bệnh từ 3,0 đến 5,0. Đặc biệt, hai giống là N87, HT1 có nguồn gốc ở Trung Quốc, Đài Loan đều nhiễm nặng với bạc lá vi khuẩn (điểm bệnh 7,7) thì hình thành một nhóm phụ và có hệ số di truyền khác với các giống khác trong nhóm khoảng 31% (1- 0,69).



Hình 44. Sơ đồ hình cây của 36 giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn theo hệ số di truyền giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA (VN: Việt Nam, TQ: Trung Quốc, DL: Đài Loan, HQ: Hàn Quốc, ẤĐ: Ấn Độ, IRRI: Viện NC lúa Quốc tế. Các chữ số chỉ điểm kháng bệnh).



Hình 45. Phân tích theo tọa độ chính (PCA) của tập đoàn 36 giống lúa với tổng số của hệ số sai khác di truyền là 60,2 % (trục x: 13,2%; trục y: 20,4%, trục Z: 26, 6%; số thứ tự tên các giống như bảng 39).

Kết quả nhận được trong nghiên cứu cho thấy 36 giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn khi phân tích với 21 mỗi RAPD rõ ràng có sự sai khác ở mức độ phân tử. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử vào việc xác định mối quan hệ di truyền tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn phổ biến ở đồng bằng sông Hồng. Dựa vào một số tính trạng đã biết như tiềm năng năng suất, chất lượng của mỗi giống và

hệ số sai khác di truyền sẽ cho phép các nhà tạo giống lựa chọn bố mẹ cặp lai theo mục đích. Chẳng hạn, có thể lai giữa giống kháng bệnh cao như giống DV85 (điểm bệnh là 1) với các giống lúa nhiễm bệnh nặng như SUWION290 hoặc Chiêm hương (cả hai giống điểm bệnh là 9) để tạo quần thể dùng trong lập bản đồ tính kháng bệnh (hệ số di truyền khác nhau là 50% và 55%, tương ứng); Các giống lúa chất lượng như OM3242-50, OM3496-9, NTCD1-12, NTCD1-16 có thể lai với giống có tính kháng bệnh cao như DV85 (hệ số di truyền khác nhau là 51%, 64%, 51% và 52%, tương ứng) để tạo ra giống lúa kháng bệnh, năng suất và chất lượng.

Kết quả phân tích đa dạng tập đoàn giống lúa kháng bệnh bạc lá

- Phân tích 21 mẫu ngẫu nhiên với 36 giống lúa thu được tổng số có 392 phân đoạn ADN được nhân bản. Tất cả 21 mẫu RAPD đều cho tính đa hình với giá trị PIC từ 0,25 (RA143, OPA13) đến 0,58 (RA36). Trong đó, 3/21 (RA36, RA45, O18) mẫu cho đa hình phong phú nhất với giá trị PIC $\geq 0,5$.

- Sơ đồ hình cây thu được chia làm hai nhóm chính: nhóm I chỉ có một giống KB1 và nhóm II gồm 3 nhóm phụ, có sự sai khác về hệ số tương đồng di truyền khoảng từ 22% đến 64%. Nhóm phụ 1(b) gồm 9 giống, hầu hết các giống có nguồn gốc ở Việt Nam và đều có khả năng kháng bệnh (điểm bệnh từ 1 (DV85) đến 5,5). Nhóm phụ 2(c) gồm 19 giống có nguồn gốc ở nhiều nước khác nhau. Trong đó các giống nhiễm bệnh nằm cùng một nhóm. Nhóm phụ 3 (d) gồm 9 giống, chủ yếu có nguồn gốc Việt Nam và là những giống có năng suất, chất lượng cao và kháng bệnh khá. Hai giống có nguồn gốc Trung Quốc và Đài Loan đều nhiễm với bệnh bạc lá (điểm 7,7) tạo thành một nhóm phụ và có hệ số di truyền sai khác với các giống trong nhóm khoảng 31%.

- 36 giống lúa có tính kháng bệnh bạc lá khác nhau có thể được sử dụng như là những nguyên liệu để xác định gen kháng của từng giống lúa làm cơ sở trong nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá vi khuẩn, năng suất và chất lượng.

3.3.2. Cây lạc

Rỉ sắt và héo xanh là hai bệnh lá thường xuyên xuất hiện từ khi cây lạc có 2 tuần tuổi. Bệnh làm giảm năng suất và thậm chí không cho thu hoạch. Phương pháp phòng trừ

chủ yếu vẫn là sử dụng thuốc hoá học, nhưng hiệu quả không cao. Vì vậy tạo giống lạc kháng bệnh là giải pháp tối ưu nhất. Để có cơ sở cho việc chọn lựa và đánh giá tập đoàn các giống lạc kháng bệnh rỉ sắt/héo xanh vi khuẩn phục vụ chọn tạo giống mới, nghiên cứu đã tiến hành đánh giá tính đa hình ADN một số giống lạc trong tập đoàn giống kháng bệnh rỉ sắt bằng các chỉ thị RAPD/SSR và sử dụng nhận biết các chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt.

3.3.2.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn lạc kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn

Đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh là một trong những nhiệm vụ quan trọng nhằm tìm ra nguồn gen kháng đồng thời phục vụ cho việc phân tích đa dạng di truyền tập đoàn giống có tính kháng bệnh khác nhau. Vì vậy, đề tài đã tiến hành thu thập được 170 mẫu giống lạc có tính kháng khác nhau đối với hai bệnh quan tâm ở cả trong nội địa và nước ngoài. Hoàn thiện phương pháp đánh giá một đặc điểm nông học, trong đó chú trọng đến đánh giá tính kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh.

3.3.2.2. Kết quả đánh giá phản ứng kháng bệnh của các giống thu thập

Đã đánh giá phản ứng của 50 mẫu giống lạc đối với bệnh rỉ sắt, 120 mẫu giống với bệnh héo xanh theo phương pháp hàng nhiễm (infector row) để đánh giá/ sàng lọc khối lượng lớn nguồn vật liệu ngoài đồng và phương pháp lá tách (detached leaf technique) (Hình 46). Kết quả đã tìm ra:

- 10 giống kháng cao (điểm từ 1 đến 3) với bệnh rỉ sắt là: ICG 11325, ICGX 950084, ICGV 99003, ICGX 950166, ICGV 99019, ICGV 86699, ICG 11312, ICGV 99051, ICGV 99052, ICGV 99005, 12 giống kháng trung bình và số còn lại là nhiễm bệnh nặng.
- Đã xác định 01 giống kháng cao với bệnh héo xanh – Gié Nho Quan; 6 giống kháng trung bình: MD7, ICGV11505, L14, L02, LVT; 3 giống nhiễm: V79, ICG 3704, L05.
- Đánh giá 17 đặc tính hình thái và nông sinh học của 22 mẫu giống lạc kháng rỉ sắt cho thấy có sự đa dạng/ biến động về các đặc tính nghiên cứu.
- Các mẫu giống đã được đánh giá tính kháng bệnh để lựa chọn cho việc phân tích phân tử phục vụ chọn tạo giống lạc mới năng suất, chất lượng và kháng khá với bệnh rỉ sắt, héo xanh.



Hình 46. Đánh giá bệnh rỉ sắt bằng phương pháp lá tách



Hình 47. Chọn lọc dòng kháng bệnh rỉ sắt

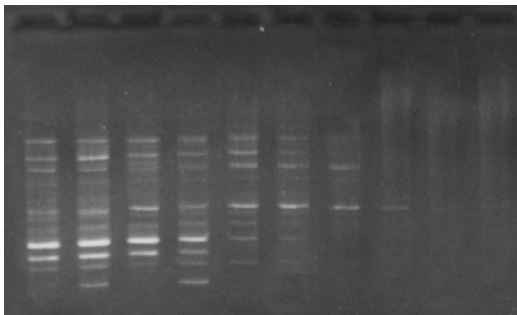


Hình 48. Đánh giá bệnh héo xanh bằng phương pháp nhiễm hạt

3.3.2.3. Tối ưu phản ứng PCR

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến kết quả của phản ứng RAPD như là nồng độ *Taq* polymerase $MgCl_2$, hàm lượng ADN khuôn, nhiệt độ bắt mỗi nhưng trong phản ứng RAPD đối với ADN genom lạc, chúng tôi thấy việc tối ưu được hàm lượng ADN khuôn cho một phản ứng có tính chất quyết định đến sự thành công. Với kết quả thu được như hình 55 khi thực hiện phản ứng RAPD với các hàm lượng ADN khuôn khác nhau (5 ng, 25ng, 50 ng, 100ng và 150ng), chúng tôi nhận thấy ở hàm lượng ADN khuôn từ 5ng – 25 ng xuất hiện từ 8 - 9 phân đoạn ADN, ở hàm lượng 50 ng xuất hiện 7 phân đoạn ADN, ở hàm lượng 100 ng xuất hiện chỉ còn 1 - 2 phân đoạn ADN và hàm lượng 150 ng không có phân đoạn ADN xuất hiện. Độ nét của các băng cũng giảm dần theo chiều tăng hàm lượng ADN khuôn (Hình 49).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Hình 49. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR-RAPD với các hàm lượng ADN khác nhau.

Giếng 1,2 là 5ng; giếng 3,4 là 25ng; giếng 5,6 là 50 ng; giếng 7,8 là 100 ng và giếng 9,10 là 150 ng.
1,3,5,7 và 9 là cùng một mẫu = ICG950166;
2,4,6,8 và 10 là cùng một mẫu = ICG87165 .

Từ các kết quả nghiên cứu, nồng độ ADN đối với cây lạc trong các phản ứng PCR-RAPD hoặc PCR-SSR là 5 ng đến 20 ng trong 25 μ l thể tích của dung dịch PCR.

3.3.2.4. Phân tích đa dạng tập đoàn lạc kháng bệnh héo xanh với các chỉ thị SSRs

Kết quả phân tích đa dạng ADN: Tập đoàn 35 giống lạc có mức độ kháng khác nhau với bệnh héo xanh vi khuẩn (Bảng 39) đã được phân tích với 20 cặp mỗi SSR (trình tự các nucleotide như trong bảng 45). Đánh giá tính đa hình của mỗi cặp mỗi SSR thông

qua giá trị PIC (Polymorphism Information Content - hàm lượng thông tin tính đa hình). Giá trị PIC càng lớn thì tính đa hình của cặp mỗi đó càng cao.

Bảng 39. Danh sách 35 giống lạc có phản ứng khác nhau với bệnh héo xanh vi khuẩn

Thứ tự	Tên giống	Nguồn gốc	Điểm bệnh	Thứ tự	Tên giống	Nguồn gốc	Điểm bệnh
1	ICG13971	TBN	N	19	MD7	TQ	KTB
2	ICG12720	TBN	N	20	QĐ3-1	TQ	N
3	ICGV3704	TBN	N	21	QHQN	TQ	N
4	MDRF5-176	TBN	N	22	SĐ1	TQ	N
5	MDRF5-223	TBN	N	23	CG10	TQ	N
6	FDRF5-177	TBN	N	24	GCH3	TQ	N
7	ICGV93260	TBN	N	25	CL14	VN	N
8	ICGV93261	TBN	N	26	93144	VN	N
9	ICGV980127	TBN	N	27	9205-H1	VN	N
10	ICGV92118	TBN	N	28	L12	VN	N
11	ICGV92120	TBN	N	29	GNQ	VN	KC
12	CF11-3	AĐ	N	30	MD9	VN	KTB
13	CF6-67	AĐ	N	31	L05	VN	N
14	ICG11505	TBN	KTB	32	L08	VN	N
15	FDRF5-175	AĐ	N	33	V79	VN	N
16	KPS13	TQ	N	34	BW1	VN	KC
17	L02	TQ	N	35	BW9	VN	KC
18	L14	TQ	KTB				

Ghi chú: TBN: Tây Ban Nha TQ: Trung Quốc VN: Việt Nam AĐ: Ấn Độ

KC: Kháng cao N: Nhiễm KTB: Kháng trung bình

Kết quả phân tích điện di sản phẩm SSR của 20 cặp mỗi thì 19 cặp mỗi SSR cho đa hình (trừ cặp mỗi L26) với giá trị PIC từ 0,284 (L29) đến 0,615 (L36). Trong đó, 8/19 cặp mỗi cho tính đa hình cao với giá trị PIC $\geq 0,5$ (42%). Trong kết quả nghiên cứu của chúng

tôi sở dĩ các cặp môi cho đa hình cao vì đây chính là các cặp môi được thiết kế trên cơ sở genom của cây lạc. Số lượng các phân đoạn ADN được nhân bản với mỗi cặp môi xê dịch từ 1 đến 17 trong phạm vi quan sát (bảng 40). Kích thước của các phân đoạn ADN nhân

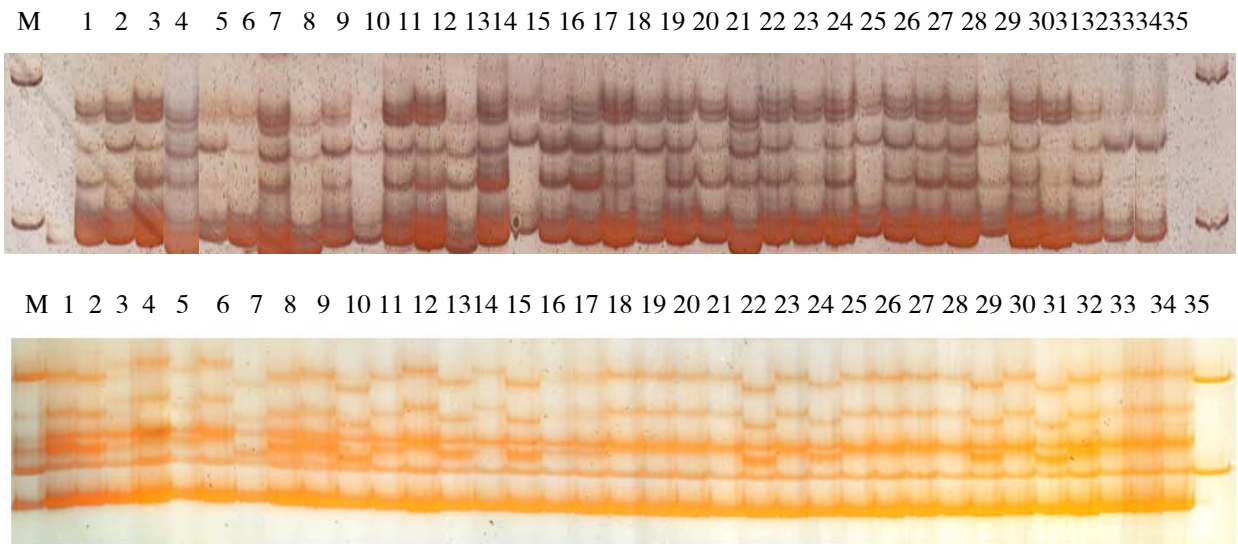
Bảng 40. Giá trị PIC của tập đoàn 35 giống lạc kháng bệnh héo xanh vi khuẩn

Tên môi	Kích thước lý thuyết (bp)	Kích thước quan sát (bp)	Số ale n	Giá trị PIC	Tên môi	Kích thước lý thuyết (bp)	Kích thước quan sát (bp)	Số ale n	Giá trị PIC
L23	290	260-300	5	0,575	L38	282	250-307	17	0,472
L24	299	299-310	9	0,440	L39	252	250-261	6	0,402
L26	152	160	1	0	L40	259	270-275	4	0,560
L28	298	330-334	3	0,421	L41	264	275-294	4	0,352
L29	198	195-213	7	0,284	L43	262	265-274	6	0,579
L31	203	205-207	2	0,297	L44	238	235-275	8	0,582
L32	281	305-326	9	0,495	L45	152	155-170	6	0,607
L33	225	220-240	6	0,505	L47	292	290-345	9	0,354
L36	285	260-340	10	0,615	L50	269	250-275	9	0,443
L37	265	290-360	13	0,530	L51	274	250-285	6	0,300

bản từ 155 bp đến 360 bp. Trong phạm vi quan sát thì 140 phân đoạn ADN đã được nhân bản, trung bình số phân đoạn ADN là 7/locút. Chẳng hạn với cặp môi L45 đã cho thấy mỗi giống trung bình có 1 phân đoạn ADN của genom lạc được nhân bản trong phạm vi quan sát (155 bp - 170 bp). Đây là cặp môi cho tính đa hình cao với PIC = 0,607. Cặp môi này chỉ ra tính đa hình tương đối rõ ràng khi so sánh các giống về nguồn gốc sinh thái. Chẳng hạn tại vị trí 155 bp có 9 giống mà phân đoạn ADN được nhân bản (bảng 40), các giống này có nguồn gốc sinh thái ở Việt Nam và Trung Quốc.

Kết quả điện di sản phẩm SSR của 35 giống lạc với 20 môi SSR đã thu được tổng số 1664 phân đoạn ADN. Bình quân mỗi giống xuất hiện 47,5 phân đoạn ADN, trong đó

giống ICGV3704 có số phân đoạn ADN được nhân bản nhiều nhất (54 phân đoạn) và giống MDRF5-176 có số phân đoạn ADN được nhân bản ít nhất (42 phân đoạn). Như vậy việc sử dụng 20 môi SSR đã cho thấy có sự khác nhau giữa 35 giống lạc ở mức độ phân tử. Hình 50 là kết quả điện di sản phẩm PCR của 35 giống lạc với cặp môi L45 và L50.



Hình 50. Điện di sản phẩm PCR với cặp môi L45 và L50 trên gel polyacrylamide 6% (Các giếng mẫu số 1, số 2... tương ứng với tên các giống như trong bảng 41)

Mối quan hệ di truyền giữa các giống lạc dựa trên phân tích SSR: Để kiểm tra phương pháp phân nhóm, chúng tôi đã tiến hành xác định giá trị tương quan kiểu hình theo ba phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau (phương pháp của Jaccard, của Nei & Li, của Sokal) với bốn kiểu phân nhóm (WPGMA, UPGMA, liên kết hoàn toàn và liên kết đơn lẻ) (bảng 41). Biểu đồ hình cây được thiết lập dựa trên giá trị tương quan cao nhất với các giá trị khi $r \geq 0,9$: tương quan rất chặt, $r = 0,8 - 0,9$: tương quan chặt, $r = 0,7 - 0,8$: tương quan tương đối chặt, $r \leq 0,7$: tương quan không chặt.

Hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm ở khoảng từ 0,37 đến 0,88, Trong đó hệ số tương đồng di truyền thấp nhất là 0,37 khi so sánh giữa giống ICGV980127 với giống SD1, cao nhất là giữa hai giống BW1 và BW9 với hệ số tương đồng di truyền là 0,88. Sơ

đồ hình cây chỉ ra sự sai khác giữa các giống lạc về mặt di truyền. Mức độ khác nhau được biểu hiện bằng hệ số sai khác giữa các giống, Các giống có hệ số tương đồng di truyền cao được xếp vào một nhóm. Giữa các nhóm lại có sự liên hệ về mức độ giống nhau của hệ số tương đồng di truyền.

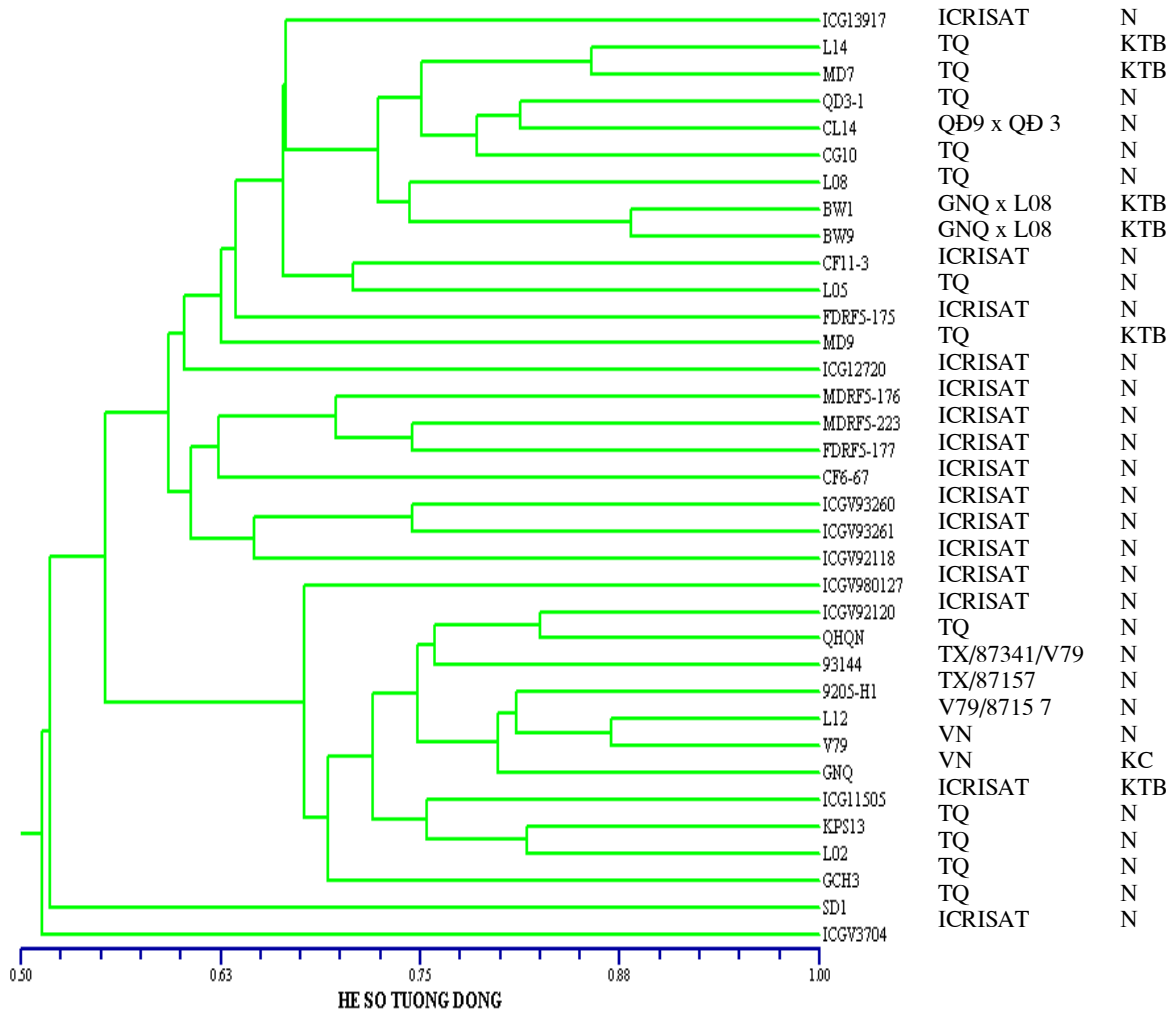
Bảng 41. Giá trị tương quan kiểu hình theo 3 phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau với 4 kiểu phân nhóm

	UPGMA	WPGMA	Liên kết hoàn toàn	Liên kết đơn lẻ
SM	0,78722	0,75322	0,54421	0,67773
DICE	0,77990	0,74044	0,68642	0,68197
Jaccard	0,80514	0,76520	0,71087	0,71461

Kết quả trong phân tích đã chỉ ra hệ số tương quan theo phương pháp tính hệ số giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA là cao nhất ($r = 0,805$) so với các phương pháp khác. Tuy nhiên đối với chỉ thị SSR là chỉ thị đồng trội thì hệ số giống nhau DICE (phương pháp tính của Nei & Li) là tốt nhất bởi vì công thức tính hệ số DICE ưu tiên cho chỉ thị đồng trội. Kết quả phân nhóm đối với 35 giống lạc có phản ứng với bệnh héo xanh được thiết lập theo hệ số giống nhau DICE với kiểu phân nhóm UPGMA đã được biểu diễn theo sơ đồ hình cây ở hình 51 và được kiểm tra trên biểu đồ phân tích theo trục tọa độ chính đều phân ra làm hai nhóm tập trung các giống và hai giống nằm riêng biệt.

Phân tích sự sai khác về hệ số di truyền của 35 giống lạc được chia thành 2 nhánh cây chính:

- Nhánh 1 chỉ có một giống ICGV3704 (Tây Ban Nha) có hệ số sai khác so với các giống khác là 49% ($1 - 0,51$). Đây là giống có hệ số di truyền sai khác nhiều nhất so với 34 giống còn lại.
- Nhánh 2 gồm 34 giống lạc được chia thành hai nhánh phụ:
 - + Nhánh phụ 1 chỉ có giống SĐ1 (Trung Quốc) có hệ số di truyền sai khác so với giống khác trong nhánh là 47% ($1 - 0,53$)
 - + Nhánh phụ 2 lại được phân làm hai nhóm:
 - Nhóm 1 gồm 12 giống trong đó giống ICGV980127 khác xa so với các giống trong nhóm, Mười một giống còn lại trong nhóm có nguồn gốc từ Trung Quốc,



Hình 51. Sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ giữa 35 giống lạc tập đoàn kháng bệnh héo xanh

Việt Nam, Tây Ban Nha nhưng chúng vẫn thể hiện được mối quan hệ về mặt di truyền. Nhóm này có 2 giống L12 và V79 có hệ số di truyền sai khác 14% (1- 0,86), là hai giống có nhiều đặc điểm chung nhất trong nhóm. Trong đó giống L12 có nguồn gốc từ giống V79 (giống L12 là con lai từ tổ hợp lai V79 x 87155).

➤ Nhóm 2 lại được chia thành 2 nhóm phụ:

* Nhóm phụ một gồm 7 giống mà đa số có nguồn gốc từ Tây Ban Nha và đều bị nhiễm vi khuẩn héo xanh.

* Nhóm phụ hai gồm 14 giống chủ yếu có nguồn gốc từ Trung Quốc, Việt Nam và Tây Ban Nha. Trong đó, 2 giống có nguồn gốc từ Tây Ban Nha có hệ số tương đồng khác xa với các giống khác trong nhóm.

Trong nhóm này có 2 giống là MD7 và L14 có hệ số tương đồng giống khá cao. Đây là hai giống có nguồn gốc từ Trung Quốc và đều kháng bệnh héo xanh trung bình.

Đặc biệt, có hai giống BW1 và BW9 có hệ số di truyền sai khác là ít nhất chỉ là 12% (1- 0,88) trong 35 giống lạc nghiên cứu. Cả hai giống này đều của Việt Nam và kháng cao với bệnh héo xanh vi khuẩn.

Như vậy kết quả phân tích tính đa hình 35 giống lạc bằng kỹ thuật SSR với 20 môi SSR đã cho ta thấy sự khác nhau giữa chúng rất rõ ràng ở mức độ phân tử. Điều đáng lưu ý là các giống có cùng nguồn gốc hoặc cùng mức độ kháng bệnh lập thành một nhóm nhỏ.

Kết luận về phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc kháng bệnh héo xanh vi khuẩn:

- Khi phân tích 20 cặp môi SSR với tập đoàn 35 giống lạc có phản ứng khác nhau đối với bệnh héo xanh vi khuẩn thì 19 cặp môi cho tính đa hình trừ cặp môi L26. Giá trị PIC dao động từ 0,284 (L29) đến 0,615 (L36). Trong đó 8/19 cặp môi cho tính đa hình phong phú nhất với giá trị $PIC \geq 0,5$.
- Trong phạm vi vùng phân tích có 140 phân đoạn ADN được nhân bản, số lượng phân đoạn dao động từ 1 đến 17 đối với mỗi cặp môi.
- Kết quả phân tích trên sơ đồ hình cây cho thấy: các giống chủ yếu tập trung vào 2 nhóm chính. Hai giống là ICGV3704 và SĐ1 nằm riêng biệt. Hệ số di truyền sai khác giữa 35 giống dao động từ 12% đến 49%.

Điều đáng lưu ý là các giống có cùng nguồn gốc hoặc cùng mức độ kháng bệnh đều lập thành một nhóm nhỏ. Đặc biệt BW1 và BW9 là hai giống lạc của Việt Nam có khả năng kháng bệnh héo xanh cao thì cũng cùng nằm trong một nhóm phụ.

3.3.2.5. Phân tích đa dạng tập đoàn 33 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt bằng các chỉ thị RAPD

33 giống lạc (do Viện KHKT VN cung cấp, nguồn gốc, mức độ nhiễm bệnh rỉ sắt của các giống lạc được trình bày trong bảng 42) đã được phân tích với 80 đoạn môi ngẫu nhiên với chiều dài 10 nucleotit để sàng lọc môi đa hình. Kết quả chỉ có 11 môi là cho tính đa hình, trình tự các nucleotide như trong bảng 43.

Trong số 109 phân đoạn xuất hiện với 11 đoạn mỗi thì có 66 phân đoạn đa hình chiếm 60,6%, chứng tỏ giữa 33 giống lạc nghiên cứu có sự khác nhau trong hệ gen. Đặc biệt mỗi RA40 cho thấy sự biểu hiện tính đa hình giữa các giống rất rõ rệt (hình 52). Trong 33 giống lạc nghiên cứu, có 30 giống xuất hiện phân đoạn ADN tại vị trí 1,50 Kb so với thang ADN chuẩn, trừ 3 giống (ICG99001, ICG99004 và ICG99051) là không xuất

Bảng 42. Nguồn gốc và mức độ kháng bệnh rỉ sắt của 33 giống lạc

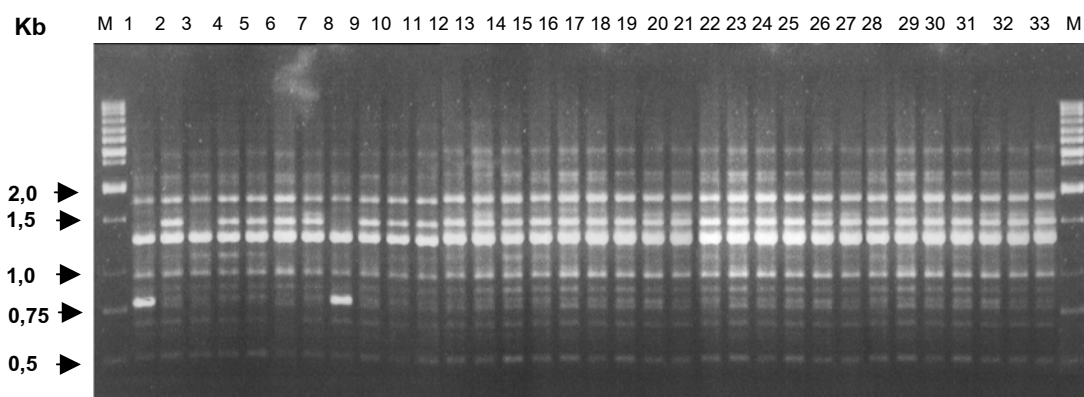
TT(1)	Giống	Nguồn gốc	ĐKBGS	TT(2)	Giống	Nguồn gốc	ĐKBGS
1	ICG 99001	ICRISAT	5,0	18	LO8	Việt Nam	5,0
2	ICG 99003	ICRISAT	3,0	19	CL6	Việt Nam	5,0
3	ICG 99004	ICRISAT	6,0	20	CL5	Việt Nam	2,0
4	ICG 99005	ICRISAT	2,0	21	ICG960036	ICRISAT	5,0
5	ICG 86699	ICRISAT	2,0	22	VAG15	Việt Nam	3,0
6	ICG 87165	ICRISAT	7,0	23	CL9	Việt Nam	2,0
7	ICG 87157	ICRISAT	5,0	24	TAINAN9	Đài Loan	3,0
8	ICG99051	ICRISAT	2,0	25	TRAMDAU2	Trung Quốc	4,0
9	ICG 99019	ICRISAT	3,0	26	KIMCHUNG	Việt Nam	4,0
10	ICG950084	ICRISAT	2,0	27	SD5	Trung Quốc	4,0
11	ICG 950166	ICRISAT	2,0	28	SD6	Trung Quốc	4,0
12	ICG 10931	ICRISAT	5,0	29	SD3	Trung Quốc	6,0
13	ICG 11312	ICRISAT	2,0	30	VAG50	Việt Nam	4,0
14	ICG 11325	ICRISAT	2,0	31	GCH3	Trung Quốc	5,0
15	ICG 11331	ICRISAT	4,0	32	V79	Trạmxuyên/IC G87157	6,0
16	ICG 99052	ICRISAT	2,0	33	GNQ	Việt Nam	5,0
17	TMV2	ICRISAT	7,0				

Ghi chú: ĐKBGS = Điểm kháng bệnh rỉ sắt; STT = Số thứ tự; * ICRISAT: Viện nghiên cứu cây trồng quốc tế cho các vùng nhiệt đới bán khô hạn. Điểm 1-3 kháng, điểm 4-6 kháng trung bình và 7- 9 nhiễm nặng.

hiện. Còn ở vị trí 0,76 Kb chỉ có 2 giống (ICG99001 và ICG99051) xuất hiện phân đoạn ADN. Tương tự như vậy tại các vị trí khác một số giống xuất hiện phân đoạn, một số giống khác lại không xuất hiện. Từ kết quả phân tích cho phép nhận xét giữa các giống lạc nghiên cứu đã có sự sai khác về mặt di truyền.

Bảng 43. Trình tự các nucleotide sử dụng trong nghiên cứu

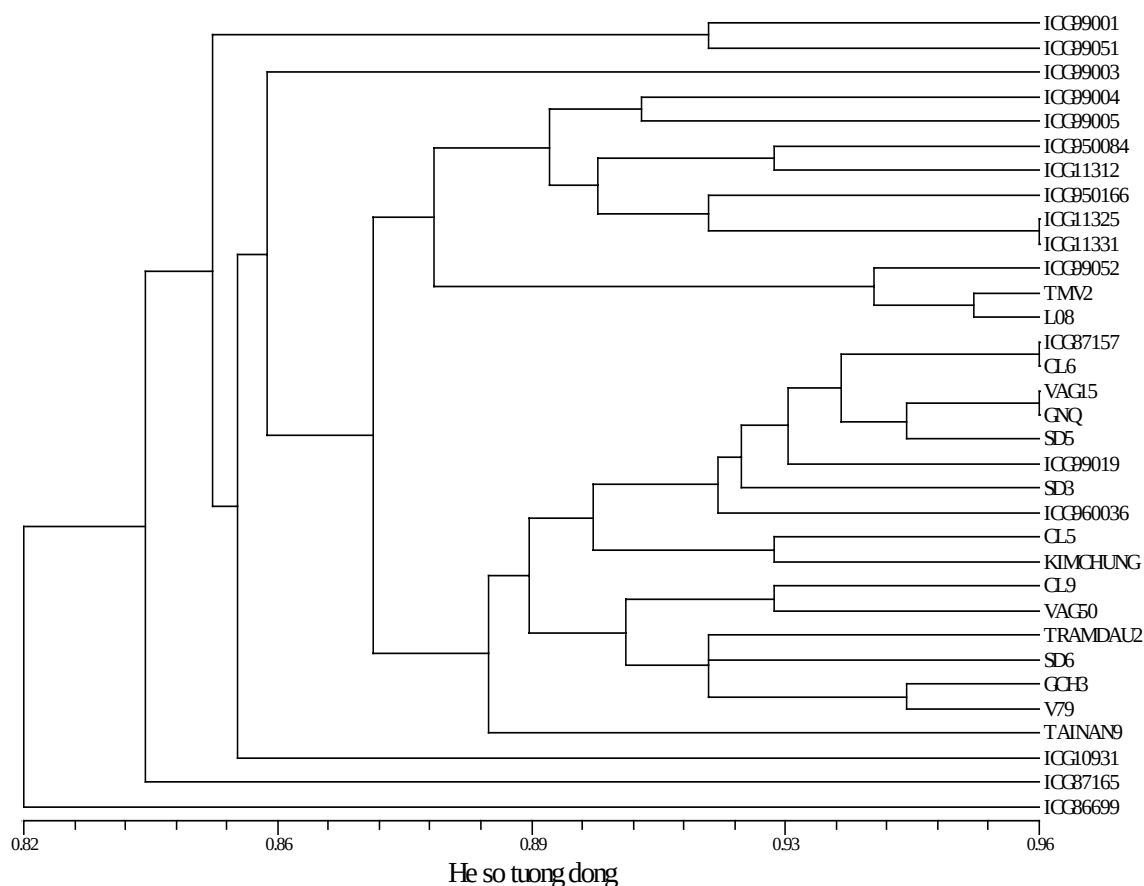
Tên môi	Trình tự nucleotide	Tên môi	Trình tự nucleotide
RA31	5'AACCGACGGG 3'	RA159	5' GTCCACACGG 3'
RA36	5'TACCACCCCG 3'	UBC3	5' CTATGCCGAC 3'
RA40	5'GGCGGACTGT 3'	UBC776	5' CCTGCTCATC 3'
RA45	5'TACCACCCCG 3'	OPL3	5' CTGTTGCTAC 3'
RA142	5'CAATCGCCGT 3'	OPH08	5' CCTCCAGTGT 3'
RA143	5'TCGGCGATAG 3'		



Hình 52. Kết quả điện di sản phẩm PCR-RAPD của 33 giống lạc với môi RA40
Thứ tự các cột tương ứng với các giống như bảng 44; M: thang ADN chuẩn 1 Kb.

So sánh hệ số tương đồng giữa 33 giống lạc nghiên cứu: Sau khi mã hoá các phân đoạn ADN được nhân bản với 11 đoạn môi ngẫu nhiên và xử lý số liệu trong chương trình NTSYSpc version 2,0, chúng tôi đã nhận được sơ đồ hình cây (hình 53). Qua sơ đồ hình cây cho thấy, giữa các giống có hệ số đồng dạng di truyền khá cao nằm trong khoảng từ 0,82 đến 0,96.

Sơ đồ hình cây chia làm 2 nhánh chính, ở nhánh chính 1 đa số giống ở nhánh này có đặc tính kháng bệnh rỉ sắt, chúng đều thuộc tập đoàn giống của ICRISAT, trừ giống L08 là của Việt Nam. Trong đó, giống TMV2 là giống nhiễm bệnh và giống L08 kháng trung bình nằm trong một nhánh phụ thuộc nhánh chính 1 có hệ số sai khác di truyền với các giống từ 4,7%-11,6%; Ngược lại, ở nhánh chính 2 đa số các giống kháng bệnh rỉ sắt trung bình, thuộc tập đoàn giống của Việt Nam, Trung Quốc và Đài Loan. Còn 5 giống (ICG99001, ICG99003, ICG10931, ICG87165 và ICG86699) không thuộc 2 nhánh trên là do chúng có sự sai khác lớn về hệ số tương đồng di truyền với các giống ở 2 nhánh, đồng thời chúng cũng có những đặc điểm thực vật khác biệt so với các giống trong 2 nhánh, chẳng hạn như giống ICG86699 có kích thước hạt lớn hơn (rộng hạt 1,05 cm).



Hình 53. Hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 33 giống lạc nghiên cứu

Kết luận về phân tích đa dạng tập đoàn 33 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt với các môi ngẫu nhiên:

- 1) Phân tích hệ gen của 33 giống lạc với 11 đoạn môi ngẫu nhiên, nhận được 109 phân đoạn ADN. Trong đó có 66 phân đoạn đa hình chiếm 60,6%. Điều này cho thấy giữa 33 giống lạc nghiên cứu khác nhau về mặt di truyền, mức sai khác từ 4% (1 - 0,96) đến 18% (1 - 0,82).
- 2) Kết quả phân tích tính đa hình ADN cho thấy các giống lạc ở cùng một vùng địa lý, sinh thái được tập trung thành từng nhóm.
- 3) Giữa các giống chống chịu bệnh rỉ sắt của tập đoàn giống ICRISAT và các giống năng suất trong nước không nằm trong cùng một nhánh. Vì thế có thể lựa chọn các cặp bố mẹ mong muốn để phục vụ cho công tác chọn tạo giống mới.

3.3.2.6. Xác định các chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

Trong các loại chỉ thị phân tử thì chỉ thị SSR (Simple Sequence Repeat) đang được xem như có hiệu quả hơn chỉ thị RFLP, AFLP hoặc RAPD bởi trình tự đơn giản (2-6 bazơ) lặp lại đặc trưng cho từng loài. Trình tự lặp lại có tính đa hình rất cao thậm chí khi so sánh phân tích giữa các cá thể ngay trong cùng một giống. Hiện nay có khoảng trăm chỉ thị SSR đã được công bố là có tính đa hình cao ở lạc nuôi trồng. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các chỉ thị SSR đã được thiết kế trên cơ sở genome của lạc để nghiên cứu đa hình tập đoàn 42 giống lạc có mức độ kháng khác nhau với bệnh rỉ sắt và tìm kiếm mối liên quan giữa kiểu gen (chỉ thị SSR) với tính kháng bệnh rỉ sắt (điểm kháng bệnh).

Kết quả phân tích tính đa hình ADN trong tập đoàn 42 giống lạc: Hai mươi ba cặp môi SSR (trình tự 23 cặp môi SSR được thiết kế như trong bảng 45) được sử dụng cho phân tích đa dạng tập đoàn 42 giống lạc (Bảng 44) có mức độ kháng khác nhau với bệnh rỉ sắt. Kết quả tất cả 23 cặp môi SSR đều cho tính đa hình với giá trị PIC từ 0,239 (L47) đến 0,616 (L42), 12/23 cặp môi SSR cho tính đa hình cao với giá trị $PIC \geq 0,5$ (52%) (Bảng 46). Số lượng các phân đoạn ADN được nhân bản với mỗi cặp môi xê dịch từ 2 đến 10 trong phạm vi quan sát (bảng 46 và hình 54). Kích thước của các phân đoạn ADN nhân bản từ 152 bp đến 420 bp. Tổng số thu được 139 allen đã được nhân bản, trung bình số allen là 6,04/ locút.

Bảng 44. Nguồn gốc sinh thái và điểm kháng bệnh của 42 giống lạc

TT	Giống	Nguồn gốc sinh thái	Điểm bệnh rỉ sắt	TT	Giống	Nguồn gốc sinh thái	Điểm bệnh rỉ sắt
1	ICGV99001	Tây Ban Nha	2	22	TMV2	Tây Ban Nha	5,7
2	ICGV99003	Virginia	1	23	L08	Việt Nam	5
3	ICGV99004	Tây Ban Nha	2,3	24	MDRF5-176	Ấn Độ	2,7
4	ICGV99005	Virginia	1	25	CL6	Việt Nam	3
5	ICGV86699	Virginia	1,3	26	CL5	Việt Nam	4
6	ICGV87165	Tây Ban Nha	4,3	27	ICG93261	Tây Ban Nha	nd
7	ICGV87157	Valencia	2,3	28	ICG960036	Tây Ban Nha	nd
8	ICGV99051	Virginia	1	29	VAG15	Việt Nam	3
9	ICGV99019	Tây Ban Nha	1	30	CF6-67	Ấn Độ	2
10	ICGx950084	Tây Ban Nha	1	31	CL9	Việt Nam	4
11	ICGx950166	Tây Ban Nha	1	32	TAINNAN9	Đài Loan	3
12	ICG 10931	Tây Ban Nha	2,7	33	TRAMDAU2	Trung Quốc	3
13	ICG 10975	Tây Ban Nha	2,6	34	9205-H1	Ấn Độ	nd
14	ICG 11185	Tây Ban Nha	1,7	35	ICG11505	Tây Ban Nha	nd
15	ICG 11312	Tây Ban Nha	1	36	KIMCHUNG	Việt Nam	4
16	ICG 11325	Tây Ban Nha	1,3	37	SD5	Trung Quốc	3
17	ICG 11331	Tây Ban Nha	2	38	SD6	Trung Quốc	3
18	ICG 11485	Tây Ban Nha	2,3	39	L12	Trung Quốc	5
19	ICG 12720	Tây Ban Nha	2,3	40	FDRF5-175	Ấn Độ	4
20	ICG 13917	Tây Ban Nha	2,3	41	VAG50	Việt Nam	4
21	ICG 99052	Virginia	1	42	GCH3	Trung Quốc	5

Ghi chú: Mức độ phản ứng khác nhau của các giống đối với bệnh rỉ sắt đánh giá vụ đông năm 2001 tại Trung tâm Nghiên cứu và Thực nghiệm đậu đỗ. Điểm từ 1= mức độ nhiễm bệnh <10% và 9= mức độ nhiễm bệnh từ 81 đến 100%, nd: chưa đánh giá).

Bảng 45. Trình tự 23 cặp môi SSR thiết kế

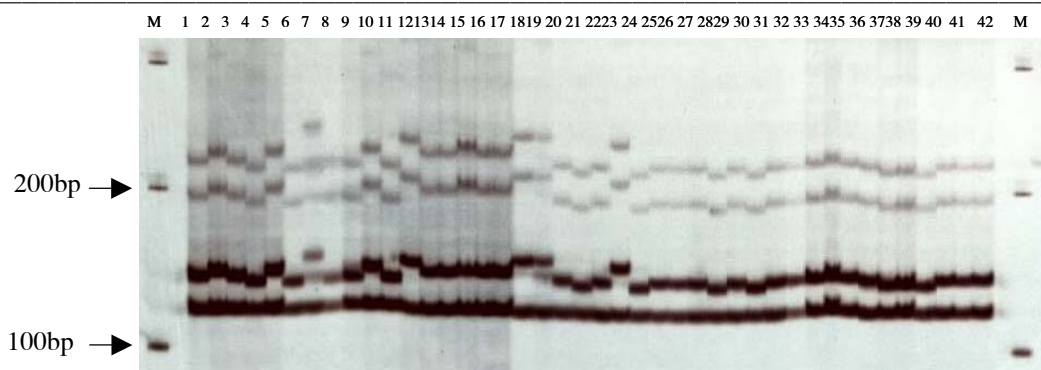
TT	Ký hiệu	Trình tự	Kích thước allen lý thuyết (bp)
1	L45	5' ATA CGT GAC TTG GGC CAG AC 5' AGT GAA AAA TAC ACC CAA CGA A	152
2	L29	5' TCT GTT GAG AAC CAC CAG CA 5' GTG CTA GTT GCT TGA CGC AC	198
3	L36	5' GCA ACT AGG GTG TAG GCC GT 5' CAA CCC TAT ACA CCG AGG GA	285
4	L49	5' TCA ACT TTG GCT GCT TCC TT 5' TCA ACC GTT TTT CAC TTC CA	285
5	L26	5' CGT CGG ATT TAT CTG CCA GT 5' AGT AGG GGC AAG GGT TGA TG	152
6	L37	5' AAT CCG ACG CAA TGA TAA AAA5' TCC CCT TAT TGT TCC AGC AG	265
7	L27	5' AAC TCG CTT GAT CCG GCT AA 5' AGG AAT AAT AAC AAT ACC AAC AGC	264
8	L28	5' CTT TCG CGC TTG TTT GAA AT 5' AAG CTG CGT GTA AAA GGG TC	298
9	L50	5' ATC ACC ATC AGA ACG ATC CC 5' TTT GTA GCC TTC TGG CGA GT	269
10	L42	5' AAG CTG AAC GAA CTC AAG GC 5' TGC AAT GGG TAC AAT GCT AGA	265
11	L32	5' GGA CAG CCG GAT GCT ATT TA 5' ACA TGA GTC CCT TTT CCC TT	281
12	L40	5' AAT GCA TGA GCT TCC ATC AA 5' AAC CCC ATC TTA AAA TCT TAC CAA	259
13	L43	5' TGA CCA AAG TGA TGA AGG GA 5' AAG TTG TTT GTA CAT CTG TCA TCG	262
14	L23	5' TGT CGT TGT AAG ACC TCG GA 5' TTG GTT TCC TTA AGG CTT CG	290
15	L25	5' TGA GTT TCC CCA AAA GGA GA 5' CAA CAA CAA TAC GGC CAA CA	132
16	L44	5' ATC ATT GTG CTG AGG GAA GG 5' CAC CAT TTT TCT TTT TCA CCG	238
17	L35	5' ATT CCC ATG TCG TCA AGA CC 5' GCG ACG GTA TTG GCT TTT AG	203
18	L47	5' TTC ACC CGT ACA AAC CAG TG 5' CCT CGG CAG ATC TGG AGT AA	292
19	L33	5' ACT CCC GAT GCA CTT GAA AT 5' AAC CTC TGT GCA CTG TCC CT	225

20	L34	5' TTG CTA CTA AGC CGA AAA TGA A 5' CTT GAA ATT AAC ACA TAT GCA CAC A	230
21	L31	5' ATC CCT GAT TAG TGC AAC CC 5' CGT AGG TGG TTT TAG GAG GG	203
22	L30	5' CTC AAA AAG CGC TTA GCC AC 5' CTG CCT ACT GCC TAC TGC CT	194
23	L38	5' CGT TCT TTG CCG TTG ATT CT 5' AGC ACG CTC GTT CTC TCA TT	282

Kết quả phân nhóm: Kết quả phân tích tính đa hình ADN (sự xuất hiện hay biến mất phân đoạn ADN) của 23 cặp môi SSR với 42 giống lạc trong nghiên cứu được phân tích trong phần mềm chuyên dụng NTYSIS 2.1 để tìm ra sự sai khác giữa các giống lạc thông

Bảng 46. Số phân đoạn ADN nhân bản và giá trị PIC của tập đoàn 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt

Tên môi	Cỡ allen lý thuyết (bp)	Cỡ allen quan sát (bp)	Số allen	Giá trị PIC	Tên môi	Cỡ allen lý thuyết (bp)	Cỡ allen quan sát (bp)	Số allen	Giá trị PIC
L45	152	152-200	6	0,588	L43	262	270-300	4	0,510
L29	198	200-230	2	0,310	L23	290	230-270	5	0,602
L36	285	280-380	10	0,580	L25	132	120-170	6	0,501
L49	285	300-420	6	0,372	L44	238	250-300	6	0,443
L26	152	120-300	9	0,438	L35	203	220-300	7	0,559
L37	265	280-350	2	0,394	L47	292	290-300	6	0,239
L27	264	270-350	5	0,479	L33	225	220-280	4	0,522
L28	298	300-380	3	0,464	L34	230	250-300	4	0,392
L50	269	250-350	7	0,302	L31	203	200-300	8	0,511
L42	265	300-390	9	0,616	L30	194	230-290	7	0,569
L32	281	270-320	7	0,513	L38	282	260-340	8	0,399
L40	259	260-310	4	0,500					



Hình 54. Điện di sản phẩm PCR của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt với cặp mồi L25 trên gel polyarylamít (M: Thang phân tử, 1-42: thứ tự giống như trong bảng 46.

qua biểu đồ hình cây. Để khẳng định kết quả phân nhóm, chúng tôi đã tiến hành xác định giá trị tương quan kiểu hình theo ba phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau (phương pháp của Jaccard, của Dice và phương pháp của Sokal) với bốn kiểu phân nhóm (WPGMA, UPGMA, liên kết hoàn toàn và liên kết đơn lẻ). Biểu đồ hình cây được thiết lập dựa trên giá trị tương quan cao nhất với các giá trị khi $r > 0,9$: tương quan rất chặt; $r = 0,9 - 0,8$: tương quan chặt; $r < 0,8$ tương quan không chặt. Kết quả trong phân tích đã chỉ ra hệ số tương quan theo phương pháp tính hệ số giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA là cao nhất ($r = 0,877$) so với các phương pháp khác.

Kết quả phân nhóm của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt thiết lập theo hệ số giống nhau của Jaccard với kiểu phân nhóm UPGMA đã được kiểm tra trên biểu đồ đa chiều ở hình 55 và biểu diễn theo sơ đồ hình cây ở hình 56 đều phân ra làm ba nhóm chính (các giống lạc trong các nhóm chính đều giống nhau) và có mức độ khác nhau về mặt di truyền giữa các giống là 70% (1-0,3).

Nhóm a: Bao gồm 3 giống ICGV99001, ICGV13917 và ICGV99004 có hệ số di truyền khác nhau là 75% (1-0,43). Cả ba giống đều của Spanish và có mức độ kháng khá bệnh rỉ sắt (điểm kháng bệnh từ 2 đến 2,3).

Nhóm b: Bao gồm 19 giống thuộc ba kiểu sinh thái Spanish, Valencia và Virginia có hệ số di truyền khác nhau là 60% (1-0,4). Trong nhóm này phân làm 02 nhóm phụ: nhóm 1 bao gồm 10 giống, và đều kháng với bệnh rỉ sắt (điểm kháng bệnh từ 1 đến 1,3); nhóm phụ 2 gồm 9 giống, trong đó 5/9 giống kháng khá với bệnh rỉ sắt (điểm kháng bệnh

từ 1 đến 2,3), Giống TMV (giống mẫn cảm với bệnh rỉ sắt, điểm kháng bệnh là 5,7) cũng nằm trong nhóm này nhưng có mức độ khác nhau về di truyền với các thành viên trong nhóm là 57% (1-0,43),

Nhóm c: Bao gồm 20 giống, hầu hết các giống đều của Việt Nam, Trung Quốc, Đài Loan và Ấn Độ có mức độ khác nhau là 67% (1-0,33). Trừ giống MDRF5-176 (điểm kháng bệnh là 2) còn lại các giống là nhiễm với bệnh rỉ sắt (từ 3 đến 5 điểm).

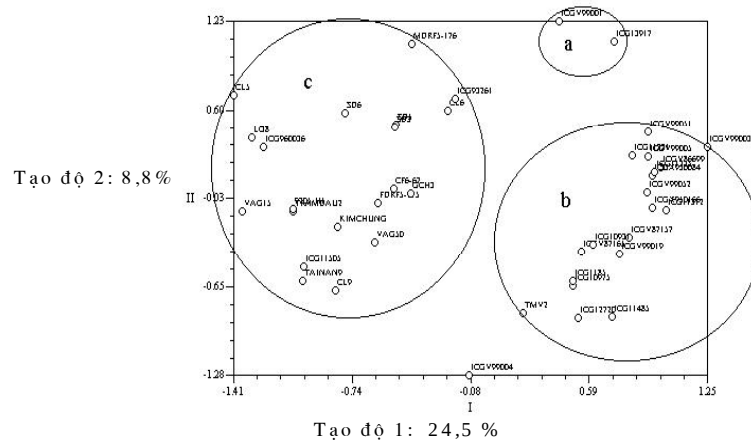
Mối liên quan giữa kiểu gen(chỉ thị SSR) và kiểu hình (điểm kháng bệnh rỉ sắt):

Để tìm ra các chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt, các số liệu phân tích SSR (sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn ADN của 23 cặp mỗi SSR với 42 giống lạc) với tính kháng bệnh rỉ sắt của từng giống (điểm đánh giá tính kháng bệnh của từng giống) đã được phân tích trong chương trình phần mềm Genstat. Những chỉ thị được xem như là có liên quan đến tính kháng bệnh khi có giá trị $P < 0,05$. Kết quả phân tích nhận được ở bảng 47 đã chỉ ra 8 chỉ thị L26, L50, L40, L43, L44, L31 và L38 được xem như là có liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc. Trong các chỉ thị nhận biết ở đây có hai chỉ thị L43 và L38 cũng đã được nhận biết vị trí nhờ định vị (QTLs) trong kết quả lập bản đồ tính kháng bệnh rỉ sắt trên quần thể F7 lai giữa giống kháng và giống nhiễm (số liệu chưa công bố). Tuy nhiên để xác định sự liên kết thực sự giữa kiểu gen (SSR) và kiểu hình (bệnh rỉ sắt) cần phải có thêm các nghiên cứu ở mức độ chính xác hơn như lập bản đồ liên kết phân tử và kiểm tra thực tiễn tính kháng bệnh của các dòng trên đồng ruộng.

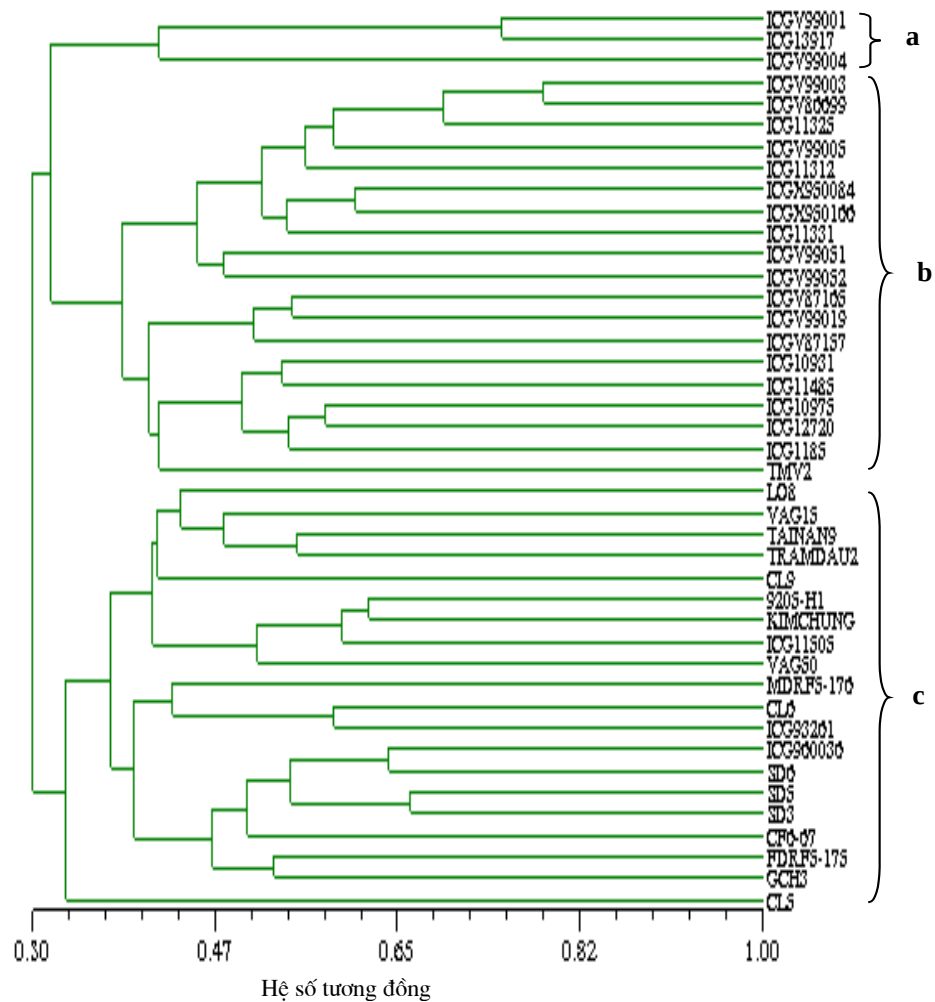
Từ các kết quả nhận được trong nghiên cứu này có thể triển khai áp dụng để nhận biết chỉ thị liên quan đến một số tính trạng nông học quan trọng ở các loại cây trồng khác.

Bảng 47. Các allen có liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

Số vị trí của allen	Mỗi	Allele (bp)	Giá trị P
25	L26	120	0,013
27	L26	160	0,044
48	L50	250	0,014
70	L40	280	0,053
73	L43	280	0,004
75	L43	290	0,005
91	L44	150	0,001
123	L31	300	0,044
132	L38	280	0,032



Hình 55. Biểu đồ đa chiều (MDS) của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt



Hình 56. Biểu đồ hình cây của 42 giống lạc kháng/mẫn cảm với bệnh rỉ sắt theo hệ số của Jaccard và phương pháp phân nhóm UPGMA.

3.3.2.7. Lai hữu tính, tạo quần thể và chọn lọc giống lạc kháng bệnh rỉ sắt

Từ các kết quả nghiên cứu về sinh học phân tử, đề tài đã tiến hành lai hữu tính giữa các giống kháng và nhiễm theo hướng kháng bệnh rỉ sắt và bệnh héo xanh. Cụ thể là:

- Đối với bệnh rỉ sắt: đã tạo được 67 cá thể F_2 của tổ hợp lai ICGV950166♀ x L12♂ và 206 dòng của tổ hợp lai L08♀ x ICGV95051♂;

- Đối với bệnh héo xanh tạo được 194 cá thể F_2 của tổ hợp lai Gié Nho Quan♀ x L08♂.

Các cá thể lạc F_3 của hai tổ hợp lai tạo giống lạc kháng bệnh rỉ sắt đã được sử dụng để nghiên cứu phân tích với các chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt.

- Tất cả bố mẹ và các cá thể lạc lai F_3 đã được đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo trong phòng thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm do Bộ môn miễn dịch học, Viện kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

3.3.2.8. Nghiên cứu sàng lọc sớm các cá thể lạc F_3 của cặp lai ICG950166 x L12 với các chỉ thị SSR đã được xác định liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt

51 cá thể cây F_3 (có ký hiệu là B1, B2, B3...) cặp lai ICG950166 x L12 (ICG950166 dùng làm mẹ và kháng với bệnh rỉ sắt và giống L12 dùng làm bố, năng suất, không kháng bệnh rỉ sắt) và 96 cá thể cây F_3 (có ký hiệu là A1, A2, A3...) cặp lai L08 x ICG99051 (L08: năng suất và kháng bệnh rỉ sắt trung bình, giống ICG99051 kháng bệnh rỉ sắt) do Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm cây đậu đỗ cung cấp; Trình tự các nucleotide của 8 chỉ thị SSR (L26, L28, L32, L36, L38, L43, L52 và L58) liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt như trong bảng 48.

- *Sàng lọc tính đa hình của bố mẹ cặp lai:* ADN tách từ lá của giống ICG950166 và L12 được dùng để sàng lọc tính đa hình của bố mẹ hai cặp lai với tám cặp mỗi SSR. Tính đa hình của giống ICG950166 và giống L12 được thể hiện ở sự khác nhau về kích thước phân đoạn ADN khi phân tích sản phẩm PCR trên gel 6% polyacrylamide.

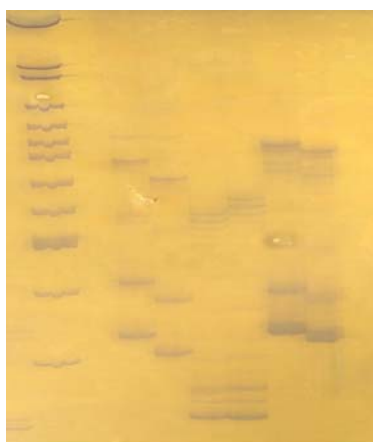
- *Sàng lọc các cá thể cây F_3 có các chỉ thị SSR kiểm soát tính kháng bệnh rỉ sắt:* ADN tách từ lá của 51 **cá thể cây** lạc tự thụ F_3 cặp lai ICG950166 x L12 sẽ được phân tích với các cặp mỗi SSR chỉ ra tính đa hình giữa bố và mẹ. Phân tích sản phẩm PCR theo qui ước A: Xuất hiện phân đoạn ADN có kích thước như giống dùng làm mẹ (ICG950166) trong cặp lai; B: Xuất hiện phân đoạn ADN có kích thước như giống dùng làm bố (L12) trong cặp lai; H: Con lai xuất hiện cả phân đoạn ADN có kích thước như cả của mẹ và bố (dị hợp tử); U: Con lai xuất hiện phân đoạn ADN có kích thước không giống cả mẹ và bố.

Bảng 48. Trình tự nucleotide của các cặp môi SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt

STT	Tên cặp môi	Trình tự các nucleotide	Kích thước allele (bp)
1	L26	5' CGT CGG ATT TAT CTG CCA GT 3' 5' AGT AGG GGC AAG GGT TGA TG 3'	152
2	L28	5' CTT TCG CGC TTG TTT GAA AT 3' 5' AAG CTG CGT GTA AAA GGG TC 3'	298
3	L32	5' GGA CAG CCG GAT GCT ATT TA 3' 5' ACA TGA GTC CCT TTT CCC TT 3'	281
4	L36	5' GCA ACT AGG GTG TAG GCC GT 3' 5' CAA CCC TAT ACA CCG AGG GA 3'	285
5	L38	5' CGT TCT TTG CCG TTG ATT CT 3' 5' AGC ACG CTC GTT CTC TCA TT 3'	282
6	L43	5' TGA CCA AAG TGA TGA AGG GA 3' 5' AAG TTG TTT GTA CAT CTG TCA TCG 3'	262
7	L52	5' ATT CGT CTC CTT CTT TTG GC 3' 5' TTT TGC TTC CAA ATG GCT TC 3'	350
8	L54	5' CAT GCC ATC ATC ACA ACA CA 3' 5' GGA GGA AGC AAT GGT TTC AG 3'	310

Kết quả sàng lọc tính đa hình giữa bố mẹ hai cặp lai: Kết quả sàng lọc tính đa hình giữa bố và mẹ hai cặp lai chỉ ra: Hai cặp môi L38 và L54 là chỉ ra tính đa hình giữa giống bố và mẹ của cặp lai ICG950166 x L12; và 05 cặp môi L37, L38, L43, L52 và L54 chỉ ra tính đa hình giữa giống bố mẹ cặp lai L08 x ICG99051) có kích thước bằng đúng với lý thuyết. Đây là các cặp môi sẽ được sử dụng cho phân tích với các dòng lạc F3 của hai cặp lai này (Hình 57).

M A B A B A B



Hình 57. Kết quả điện di sản phẩm PCR của giống ICG950166 và L12 với một số cặp môi kiểm soát tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc (M: marker 100 bp, A: giống ICG950166, B: giống L12).

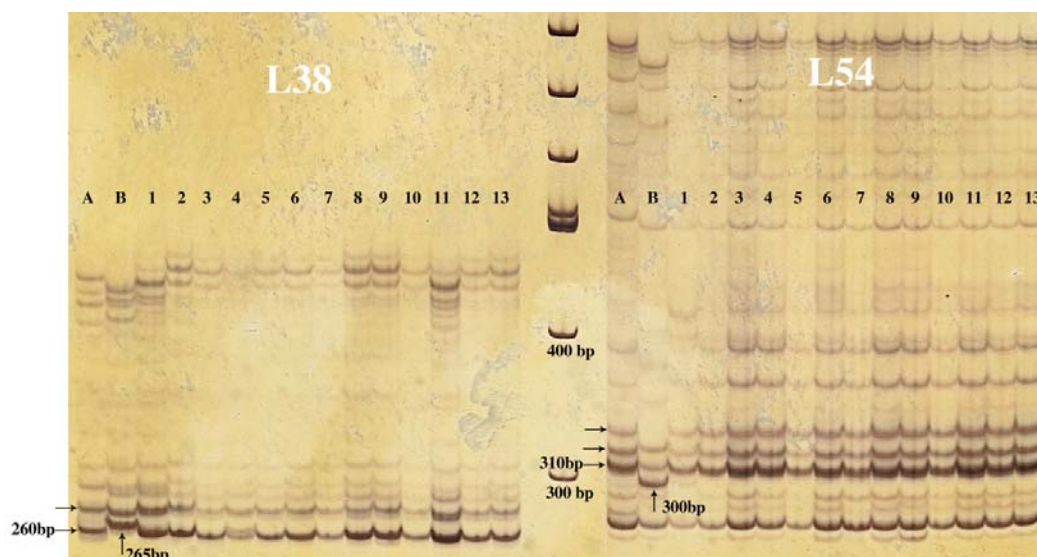
Kết quả phân tích kiểu gen kháng bệnh rỉ sắt với 51 dòng lạc tự phối F3

Để đánh giá kiểu gen tính kháng bệnh rỉ sắt, hai cặp môi SSR L38 và L54 đã được sử dụng để phân tích với 51 cá thể lạc tự phối F3 (ICG910166 x L12). Chỉ thị SSR là chỉ thị đồng trội, vì vậy thông qua kết quả phân tích hình ảnh trên gel polyacrylamide sẽ phát hiện chính xác các dòng lạc mang chỉ thị giống mẹ (ICG950166) kháng bệnh rỉ sắt. Các dòng lạc chỉ mang chỉ thị của bố (L12) sẽ không kháng bệnh rỉ sắt.

Các dòng lạc cùng mang cả chỉ thị của bố và mẹ (dị hợp tử) thì tính kháng bệnh cũng sẽ tốt hơn so với giống bố và các dòng không mang chỉ thị của cả bố và mẹ thì sẽ có phản ứng khác nhau với bệnh rỉ sắt. Xác định sự có mặt của các chỉ thị liên quan bằng việc phân tích sản phẩm PCR trên gel 0,6% polyacrylamide. Kết quả nhận được như sau:

Cặp môi L38: Có 24 cá thể cây lạc (B24, B37, B40, B41, B46, B48, B60, B63, B72, B102, B108, B3, B4, B6, B7, B8, B12, B20, B21, B43, B45, B58, B110 và B35) nhân bản được phân đoạn ADN đúng bằng với giống dùng làm mẹ (ICG950166) và có kích thước là 265 bp. 17 cá thể (B38, B47, B53, B67, B13, B17, B23, B27, B52, B55, B61, B103, B105, B107, B11, B34, B44) nhân bản được phân đoạn ADN đúng bằng với giống dùng làm bố (L12) có kích thước là 270 bp. Mười dòng (B47, B54, B59, B65, B71, B100, B22, B32, B106 và B111) nhân bản được phân đoạn ADN của cả bố và mẹ.

Cặp môi L54: 20 cá thể cây (B24, B37, B38, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B17, B21, B61, B110, B34, B44, B106 và B111) nhân bản được phân đoạn ADN đúng bằng với giống dùng làm mẹ (ICG950166) và có kích thước là 310 bp. 22 cá thể cây (B40, B53, B54, B59, B67, B71, B100, B4, B13, B22, B23, B27, B32, B45, B52, B55, B58, B105, B107, B11, B32, B35) mang chỉ thị của bố (L12) với kích thước phân đoạn ADN là 305 bp. Tám cá thể: B47, B48, B63, B65, B72, B8, B20, B43 mang chỉ thị của cả bố và mẹ và một cá thể cây (B103) không mang chỉ thị nào của cả bố và mẹ.



Hình 58. 13 cá thể cây lạc F3 cặp lai ICG950166 x L12 mang chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt phân tích với mỗi L38 và L54 (M: thang phân tử 100 bp; A: giống ICG950166; B: giống L12; 1-13 tương ứng với các cá thể B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110; dấu mũi tên chỉ tại các phân đoạn ADN quan tâm.

Kết quả đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh rỉ sắt: Để có cơ sở cho nghiên cứu áp dụng kỹ thuật MAS trong tạo giống lạc kháng bệnh rỉ sắt chúng tôi đã tiến hành đánh giá tính kháng bệnh rỉ sắt đối với 51 cá thể cây lạc bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo. Kết quả nhận được là 08 cá thể cây lạc (B24, B37, B46, B60, B102, B108, B12 và B110) đều kháng với bệnh rỉ sắt, chẳng hạn điểm kháng bệnh là 1 (kháng cao) như dòng B102 đến điểm 3 (kháng tốt) như cá thể B108 và dòng B24 (bảng 49). So sánh với kết quả phân tích kiểu gen thì tất cả tám dòng lạc này cũng đều mang chỉ thị của mẹ (ICG950166) khi phân tích với cả hai cặp mỗi L38 và L54. Các cá thể cây lạc mang chỉ thị của mẹ hoặc của cả bố và mẹ (dị hợp tử) cũng có tính kháng tốt với bệnh rỉ sắt. Chẳng hạn cá thể cây B47 đều là dị hợp tử với cả hai môi L38 và L54 và có điểm kháng bệnh là 2 (kháng cao), hoặc cá thể cây B8 và B20 mang chỉ thị giống mẹ (A) khi phân tích với mỗi L38 và là dị hợp tử (H) với cặp mỗi L54 và có

Bảng 49. Tổng hợp kết quả sàng lọc phân tử của các cá thể cây lạc F3 với bốn cặp môi kiểm soát tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc.

TT	Tên cá thể	Tên cặp môi SSR và điểm kháng bệnh			TT	Tên dòng	Tên cặp môi SSR và điểm kháng bệnh			TT	Tên cá thể	Tên cặp môi SSR và điểm kháng bệnh		
		L38	L54	Điểm bệnh			L38	L54	Điểm bệnh			L38	L54	Điểm bệnh
1	B24	A	A	3,0	18	B100	H	B	-	35	B43	A	H	2,0
2	B37	A	A	2,0	19	B102	A	A	1,0	36	B45	A	B	-
3	B38	B	A	-	20	B108	A	A	3,0	37	B52	B	B	5,0
4	B40	A	B	-	21	B3	A	A	-	38	B55	B	B	6,0
5	B41	A	A	-	22	B4	A	B	-	39	B58	A	H	3,0
6	B46	A	A	2,5	23	B6	A	A	-	40	B61	B	A	3,5
7	B47	H	H	2,0	24	B7	A	A	-	41	B103	B	U	6,0
8	B48	A	H	2,0	25	B8	A	H	3,0	42	B105	B	B	-
9	B53	B	B	5,0	26	B12	A	A	2,0	43	B107	B	B	-
10	B54	H	B	-	27	B13	B	B	-	44	B110	A	A	2,0
11	B59	H	B	-	28	B17	B	A	5,5	45	B11	B	B	6,0
12	B60	A	A	2,0	29	B20	A	H	2,0	46	B32	H	-	2,5
13	B63	A	H	3,0	30	B21	A	A	-	47	B34	B	A	4,5
14	B65	H	H	-	31	B22	H	B	-	48	B35	A	B	3,5
15	B67	B	B	5,0	32	B23	B	B	5,5	49	B44	B	A	5,0
16	B71	H	B	3,0	33	B27	B	A	3,0	50	B106	H	A	1,0
17	B72	A	B	2,0	34	B32	H	-	2,5	51	B111	H	A	2,0

Ghi chú: A: mang chỉ thị của mẹ (giống ICG950166); B: mang chỉ thị của bố (giống L12); H: dị hợp tử; U: không mang chỉ thị của cả mẹ và bố; (-) không có số liệu; 1: kháng cao; 3: kháng tốt; 5: Nhiễm trung bình; 6-9: Nhiễm nặng.

điểm kháng bệnh là 3 và 2 (tương ứng). Hầu hết các dòng đều mang chỉ thị của bố (B) khi phân tích với cả hai chỉ thị L38 và L54 đều có tính kháng bệnh kém điểm từ 5,5 đến 6, ví dụ như cá thể B67, B23, B55, B11. Từ kết quả nhận được khi phân tích kiểu gen và kiểu hình cho phép nhận thấy hai cặp môi L38 và L54 có thể triển khai áp dụng trong chọn dòng lạc kháng bệnh rỉ sắt ở lạc. Những kết quả nhận được trong nghiên cứu của chúng tôi sẽ là cơ sở cho việc áp dụng kỹ thuật chọn giống nhờ sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử (MAS) trong chọn tạo giống lạc năng suất chất lượng và kháng bệnh rỉ sắt. Tuy nhiên để khẳng định chắc chắn kết quả trong nghiên cứu này cần phải tiến hành đánh giá lại kiểu hình một lần nữa.

Kết quả phân tích kiểu gen kháng bệnh rỉ sắt với 96 dòng lạc tự phối F3 cặp lai L08 x ICG99051: Tất cả 96 cá thể F3 cặp lai (L08 x ICG99051) khi phân tích với cả 5 cặp môi L37, L38, L43, L52 và L54 đều chỉ mang chỉ thị của giống L08. Kết quả này cho phép kết luận cả 96 dòng F3 (L08 x ICG99051) đã được phát triển từ các cây F1 không phải là con lai mà chỉ là dòng tự thụ mà thôi (kết quả này cũng đã được thảo luận với Trung tâm NC và Thực nghiệm cây đậu đỗ và đã được công nhận kiểu hình các dòng ngoài đồng ruộng).

Kết luận về nghiên cứu sàng lọc các dòng lạc lai với các chỉ thị liên quan

- Trong số các cặp môi SSR đã tìm thấy 4 cặp môi L32, L38, L52 và L54 cho tính đa hình giữa giống lạc dùng làm mẹ và giống lạc dùng làm bố của cặp lai ICG950166 và L12. Hai cặp môi L38 và L54 là có kích thước của các chỉ thị tìm thấy đúng bằng với kích thước của lý thuyết.

- Trong số 51 cá thể F3 cặp lai ICG950166 x L12 đã sàng lọc được 13 cá thể B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110 có sự xuất hiện chỉ thị đặc trưng liên kết với tính kháng bệnh rỉ sắt ở cả hai cặp môi L38 với kích thước phân đoạn ADN là 265 bp và 310 bp đối với cặp môi L54. Kết quả phân tích kiểu hình tính kháng bệnh cũng chỉ ra đây là các dòng có tính kháng cao với bệnh rỉ sắt.

- Tất cả 96 cá thể F3 cặp lai (L08 x ICG99051) khi phân tích với cả 5 cặp môi L37, L38, L43, L52 và L54 đều chỉ mang chỉ thị của giống L08. Kết quả này cho phép kết luận

cả 98 cá thể F3 (L08 x ICG99051) đã được phát triển từ các cây F1 không phải là con lai mà chỉ là dòng tự thụ mà thôi.

3.3.2.9. Kết luận chung về tạo giống lạc có sự hỗ trợ của sinh học phân tử

- 1) Đã thu thập và lưu giữ được tập đoàn lạc 170 mẫu giống trong đó có 10 giống kháng cao với bệnh rỉ sắt, 01 giống kháng cao với bệnh héo xanh (Gié Nho quan) và 6 giống kháng khá với bệnh rỉ sắt.
- 2) Hoàn thiện phương pháp đánh giá chính xác bệnh rỉ sắt và héo xanh dùng trong nghiên cứu chỉ thị phân tử. Đó là phương pháp hàng nhiễm (infectior row) để đánh giá sàng lọc khối lượng lớn nguồn vật liệu ngoài đồng và phương pháp lá tách (detached leaf technique); Phương pháp nhiễm hạt nảy mầm hoặc sát thương rễ cho hiệu quả cao đối với bệnh héo xanh.
- 3) Hoàn thành việc phân tích đa dạng ADN tập đoàn 35 giống lạc có mức độ kháng khác nhau với bệnh héo xanh vi khuẩn; Tập đoàn 33 các giống lạc kháng bệnh rỉ sắt; Thông qua các phép phân tích sự phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình bước đầu đã tìm ra được 7 chỉ thị SSR là L26, L50, L40, L43, L44, L31 và L38 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt lạc.
- 4) Dựa vào kết quả phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc đã xác định được các tổ hợp lai ưu tú. Kết quả tạo đối với bệnh rỉ sắt tạo được 68 **cá thể cây** F₂ của tổ hợp lai ICGV950166 X L12 và 206 dòng của tổ hợp lai L08 X ICGV95051; Đối với bệnh héo xanh tạo được 194 **cá thể cây** F₂ của tổ hợp lai Gié Nho Quan X L08.
- 5) Trong số 51 dòng lạc F3 cặp lai ICG950166 x L12 đã sàng lọc được 13 **cá thể cây** B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110 có sự xuất hiện chỉ thị đặc trưng liên kết với tính kháng bệnh rỉ sắt ở cả hai cặp môi L38 với kích thước phân đoạn ADN là 265 bp và 310 bp đối với cặp môi L54. Tất cả các dòng này đều có tính kháng cao (điểm 1-2) đối với bệnh rỉ sắt khi thực hiện việc lây nhiễm bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm.
- 6) Cả 96 **cá thể** F3 cặp lai (L08 x ICG99051) khi phân tích với cả 5 cặp môi L37, L38, L43, L52 và L54 đều chỉ mang chỉ thị của giống L08 (giống làm mẹ trong cặp

lai). Kết quả này cho phép kết luận cả 96 cá thể F3 (L08 x ICG99051) đã được phát triển từ các cây F1 không phải là con lai mà chỉ là dòng tự thụ mà thôi.

- 7) Các **cá thể cây** lạc lai F3 đã được đánh giá phân tử đang được tiếp tục theo dõi để phát triển thành giống.

3.3.3. Cây đậu tương

3.3.3.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn thí nghiệm đánh giá tính kháng bệnh rỉ sắt

- Đã tiến hành thu thập được 262 mẫu giống đậu tương có tính kháng khác nhau đối với bệnh rỉ sắt và tính chịu hạn quan tâm ở cả trong nội địa và nước ngoài. Tóm tắt phương pháp đánh giá tính kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn như sau:

- Thí nghiệm đánh giá khả năng kháng bệnh rỉ sắt (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) của 200 mẫu giống ở điều kiện ngoài ruộng: Thí nghiệm được gieo tuần tự, 3 hàng/giống, 10 mẫu giống có 1 đối chứng nhiễm (V74) và kháng (ĐT2000). Chăm sóc thí nghiệm theo quy trình hướng dẫn của trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm đậu đỗ. Đánh giá mức độ kháng bệnh theo hướng dẫn của trung tâm rau màu Châu Á (AVRDC).

- Kết quả của thí nghiệm đã phân các mẫu giống thành nhóm chịu hạn, nhiễm bệnh rỉ sắt khác nhau làm cơ sở cho phân tích tính đa dạng ADN: Các giống chịu hạn khá giỏi: ĐT80, Cúc vàng, CM60, 95389, Đỗ lạng; Các giống chịu hạn khá: M103, D140; Các giống chịu hạn trung bình: ĐT12, VX92, Đơn ca chi lăng, JS4; Các giống chịu hạn yếu: VX-93, ĐT2000.

3.3.3.2. Nghiên cứu chọn một số chỉ thị RADP và SSR thích hợp cho nghiên cứu

Đối với các môi RAPD: Một số nghiên cứu trên đậu tương cho thấy sử dụng một số môi RAPD có thể phát hiện được sự đa dạng giữa các giống đậu tương khi bị tác động của môi trường (Shatter at al, 1995). Trên cơ sở đó chúng tôi chọn 10 môi 10 nucleotide và 2 cặp môi 20 nucleotide. Nghiên cứu với 10 cặp môi RAPD cho thấy khả năng sử dụng không cao, khả năng lặp lại yếu, lượng mẫu hạt của các dòng lai lại thường rất ít không đủ cho những thí nghiệm này.

Đối với các cặp môi SSR: Việc quan trọng đầu tiên là tìm được các cặp môi SSR thích hợp trong số trên 600 chỉ thị SSR để nghiên cứu sự đa dạng của những giống đậu tương sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu với mục đích chọn dòng chịu hạn và chọn dòng kháng bệnh rỉ sắt. Tính chịu hạn là tính trạng được nghiên cứu rất sâu để chọn giống đậu tương có khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường. Đây là tính trạng do nhiều gen quyết định theo các hướng như tránh hạn, tránh mất nước và chịu mất nước. Specht và cộng sự (2001) đã phân tích QTL của tính chịu hạn ở đậu tương trên cơ sở thí nghiệm về

Bảng 50. Chỉ thị SSR liên quan đến tính chịu hạn ở đậu tương

Stt	SSR	Trình tự môi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Kích thước allele
1	Satt557	F- GCGGGATCCACCATGTAATATGTG R- GCGCACTAACCCTTTATTGAA	C2	207 bp
2	Satt 489	F-CGTGTGCTTGCTTCTCTTAGACTGACT R-GCGTACTACTTACCCTGTTTGTCTAAAA	C2	261 bp
3	Satt373	F- TCCGCAGATAATTCGTAAAAT R-GGCCAGATACCCAAGTTGTACTTGT	L	248 bp
4	Satt567	F-GGCTAACCCGCTCTATGT R- GGGCCATGCACCTGCTACT	M	113 bp
5	Satt150	F-AAGCTTGAGGTTATTCGAAAATGAC R-TGCCATCAGGTTGTGTAAGTGT	M	201 bp

chế độ tưới nước khác nhau, kiểm tra sự chuyển hoá carbon và cuối cùng là đánh giá năng suất, khối lượng và phẩm chất hạt khi sử dụng 665 chỉ thị phân tử (RFLP, SSR) nghiên cứu tổ hợp lai gồm có 265 dòng lai trên 20 nhóm liên kết. Các tác giả đã tìm thấy các chỉ thị phân tử SSR và RFLP có QTL biểu thị rõ nhất đối với tính chịu hạn ở các nhóm liên

kết: C2, L, M. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã chọn ra 5 cặp mỗi SSR trong vùng mạnh nhất của các nhóm liên kết kể trên đối với tính chịu hạn, trình tự của chúng được liệt kê trên bảng 50. Kích thước allele được tính là kích thước đoạn SSR của giống đậu tương Williams (Mỹ). Ký hiệu Satt dùng để chỉ SSR có đoạn nucleotit lặp lại là (ATT)_n.

Bảng 51. Chỉ thị SSR dùng để đánh giá đa dạng tập đoàn giống đậu tương

Stt	SSR	Trình tự mỗi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Kích thước allele
1	Satt 042	F- GACTTAATTGCTTGCTAT R- GTGGTGCACACTCACTT	AI	172 bp
2	Satt 005	F- TATCCTAGAGAAGAACTAAAAA R- GTCGATTAGGCTTGAAATA	D1b	141 bp
3	Satt146	F-AAGGGATCCCTCAACTGACTG R-GTGGTGGTGGTGAAAACCTATTAGAA	F	287 bp
4	Satt175	F-GACCTCGCTCTCTGTTTCTCA R- GGTGACCACCCCTATTCCTTAT	M	163 bp
5	Satt173	F-TGCGCCATTTATTCTTCA R-AAGCGAAATCACCTCCTCT	O	198 bp
6	Satt009	F- CCA ACT TGA AAT TAC TAG AGA AA R- CTT ACT AGC GTA TTA ACC CTT	N	158 bp (Att) ₁₄
7	Satt 431	F- GCG TGG CAC CCT TGA TAA ATA A R- GCG CAC GAA AGT TTT TCT GTA A	J	230 bp (Att) ₂₁

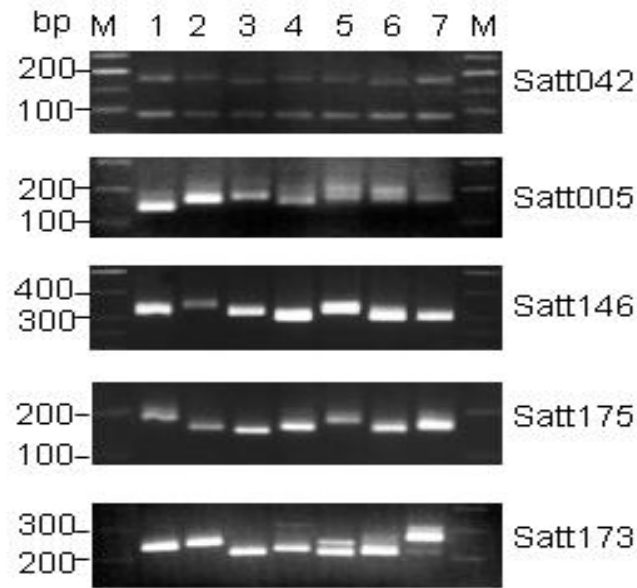
Vì chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt chưa được nghiên cứu nên chúng tôi tìm hiểu các chỉ thị phân tử liên quan đến tính đa dạng để kết hợp bổ sung chọn nguyên liệu khởi đầu cho hướng này. SSR sử dụng để nghiên cứu đa dạng sinh học ở các tập đoàn đậu tương tại Mỹ, Nhật Bản, Trung Quốc...Narvel và cộng sự (2000) phát hiện

thấy 397 allele khi nghiên cứu 79 giống đậu tương ở Mỹ trên 74 locus SSR. Như vậy, mỗi locus SSR có từ 2 đến 11 allele khác nhau. Trong khi đó, sử dụng chỉ thị phân tử khác hoặc chỉ thị isozyme cho sự đa dạng ít hơn hẳn (ví dụ: RFLP chỉ cho 2 allele cho mỗi locus). Abe và cộng sự (2003), đã chỉ ra sự đa dạng khi nghiên cứu 131 giống từ 14 nước châu Á bằng 20 chỉ thị SSR. Trung bình mỗi locus SSR cho 11,9 allele với hệ số đa dạng gen là 0,772 và cho thấy rằng các tập đoàn giống đậu tương Trung Quốc và Nhật Bản có nguồn gốc khác nhau. Dựa vào những phân tích trên, 7 cặp mỗi SSR cho tính đa dạng trên các nhóm liên kết và có trình tự trên bảng 51 đã được chọn để thiết kế.

Đây là những chỉ thị SSR có hệ số đa dạng di truyền cao. Như vậy, việc phát hiện ra khả năng di truyền các tính trạng liên kết cùng các chỉ thị này dễ dàng hơn.

Sự đa dạng di truyền của nguyên liệu khởi đầu: Bảy giống đậu tương: Cúc Vàng, ĐT12, ĐT80, ĐT2000, VX91, V74, CM60 được chọn làm nguyên liệu khởi đầu để tạo giống chịu hạn, kháng bệnh rỉ sắt đồng thời có năng suất cao. Trong đó, các giống vụ hè: giống địa phương Cúc Vàng (còn gọi là Cúc Lục Ngạn, Cúc Hà Bắc); ĐT80 (giống lai giữa Vàng Mộc Châu và V70); ĐT12 (còn gọi là TN12- giống nhập nội từ Trung Quốc, chống chịu sâu bệnh khá). Giống kháng bệnh rỉ sắt: ĐT2000 (giống nhập nội từ AVDC) và VX91. Giống năng suất cao: CM60 và ĐT2000. Giống miễn cảm với bệnh rỉ sắt: V74.

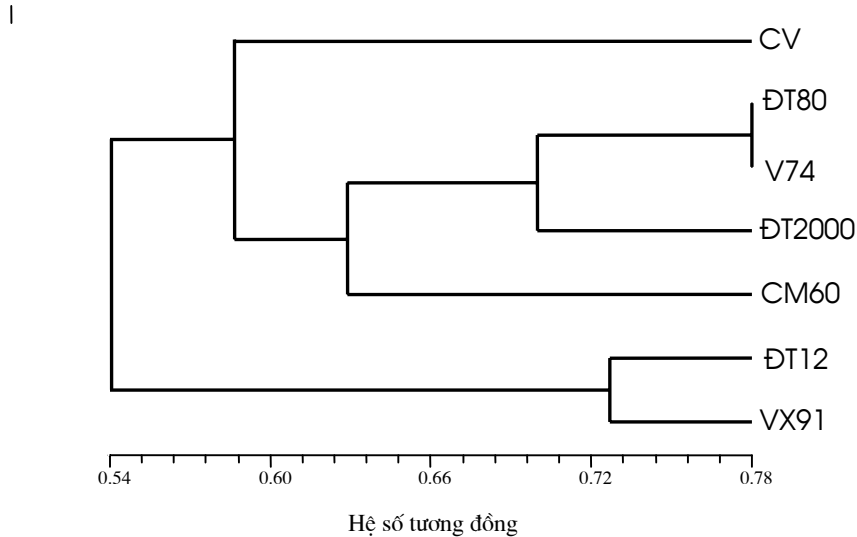
Đã phát hiện được 38 allele trong số các kiểu gen được nghiên cứu. Tất cả các cặp mỗi đều cho sự đa hình giữa các giống đậu tương kể trên. Như vậy, trung bình 3,7 allele cho mỗi locus và hệ số đa dạng di truyền trung bình là 0,6326. Phần mềm NTSYS 2.0 được sử dụng để nghiên cứu khoảng cách di truyền giữa các giống. Kết quả cho thấy bảy giống đậu tương trên chia thành 3 nhóm: Cúc Vàng tách riêng một nhóm, hai giống đậu tương ĐT12 và VX91 cũng tách thành nhóm riêng so với 4 giống còn lại- ĐT2000, V74, ĐT80, CM60. Như vậy, với mục đích chọn giống để lai với giống đậu tương ĐT2000 (giống có năng suất cao, có khả năng kháng bệnh rỉ sắt) theo hướng chịu nóng, hạn cho vụ hè, chúng tôi nhận thấy hai giống đậu tương vụ hè – Cúc Vàng và ĐT12 - có khoảng cách di truyền xa ĐT2000 so với các giống khác và có thể chọn để lai tạo giống như mong muốn (hình 59, hình 60). Như vậy, có thể chọn 2 cặp lai là ĐT2000 X Cúc vàng và ĐT2000 X ĐT12 (hay còn ký hiệu là TN12).



Hình 59. Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng các cặp mồi SSR liên quan đến tính đa dạng của các giống đậu tương: 1- Cúc Vàng; 2- ĐT80; 3- ĐT12; 4- V74; 5- VX91; 6- ĐT2000; 7- CM60

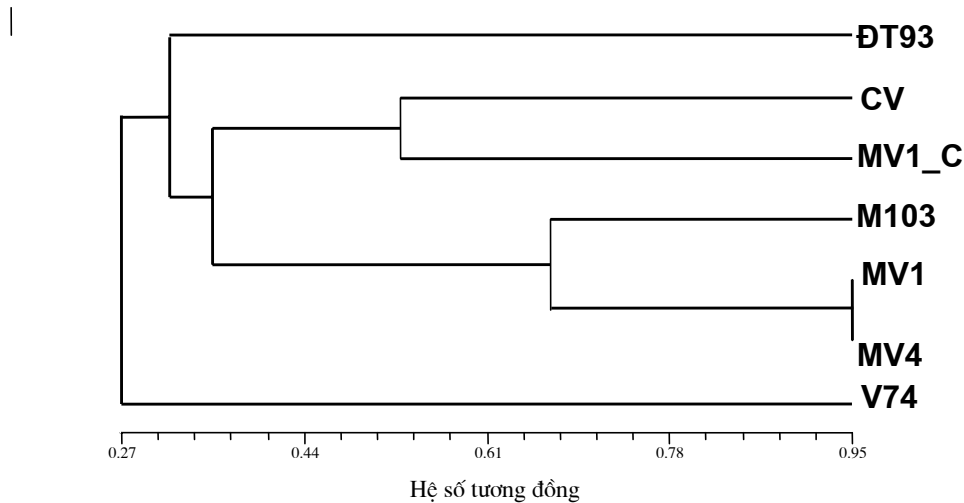
Bảng 52. Kết quả phân tích sự đa dạng một số giống đậu tương với các chỉ thị SSR

Stt	SSR	Dạng SSR	Số allele	Hệ số đa dạng (H)
1	Satt 042	(Att) ₂₇	3	0,6531
2	Satt 005	(Att) ₁₉	3	0,5715
3	Satt146	(Att) ₁₇	4	0,6939
4	Satt175	(Att) ₁₆	5	0,7347
5	Satt173	(Att) ₁₈	4	0,7348
6	Satt 557	(Att) ₁₇ GAT	2	0,4897
7	Satt 489	(Att) ₂₃ GTT	4	0,6938
8	Satt373	(Att) ₂₁	5	0,7756
9	Satt567	(Att) ₁₃	2	0,245
10	Satt150	(Att) ₂₀	5	0,7347



Hình 60. Sự đa dạng của các giống đậu tương được chọn làm nguyên liệu khởi đầu.

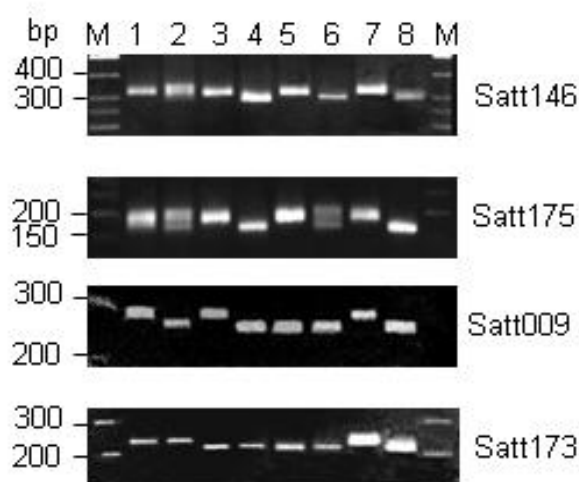
Nghiên cứu các giống lai đã được thuần hóa và khu vực hóa: Qua phân tích thăm dò ba giống bố mẹ là Cúc vàng, M103, V74 bằng SSR cho thấy chúng có sự đa dạng, vì vậy chúng tôi đã nghiên cứu 7 giống trong các tổ hợp lai của chúng: M103, V74, MV1, MV4, MV1-C; Cúc Vàng, DT93. Trong đó, tổ hợp lai M103♀ X V74♂ và 2 giống lai MV1, MV4; tổ hợp MV1 X Cúc Vàng và giống lai MV1-C; giống DT93 là giống lai giữa giống 821 có hệ gen Cúc vàng và giống 134 của Nhật Bản. Việc nghiên cứu bản chất di truyền và sự ổn định các tính trạng quý được di truyền từ bố mẹ ở các giống lai sau nhiều năm thuần hóa và khu vực hóa là điều rất cần thiết. Kết quả cho thấy trong 12 cặp mỗi SSR, có 9 cặp còn lại cho đa hình rõ rệt. Phát hiện tổng số 25 allele trên 9 cặp mỗi này (trung bình là 2,7 allele/locus). DT93 mang nhiều ưu điểm của Cúc Vàng, MV1 và MV4 mang đặc điểm của M103- giống đột biến chịu nóng, hạt to, năng suất cao. MV1-C trung gian, có đồng thời đặc điểm của bố và mẹ. Đây là giống có thể sử dụng gieo trồng tất cả các vụ trong năm (hình 61).



Hình 61. Sơ đồ hình cây về độ tương đồng di truyền giữa các giống đậu tương

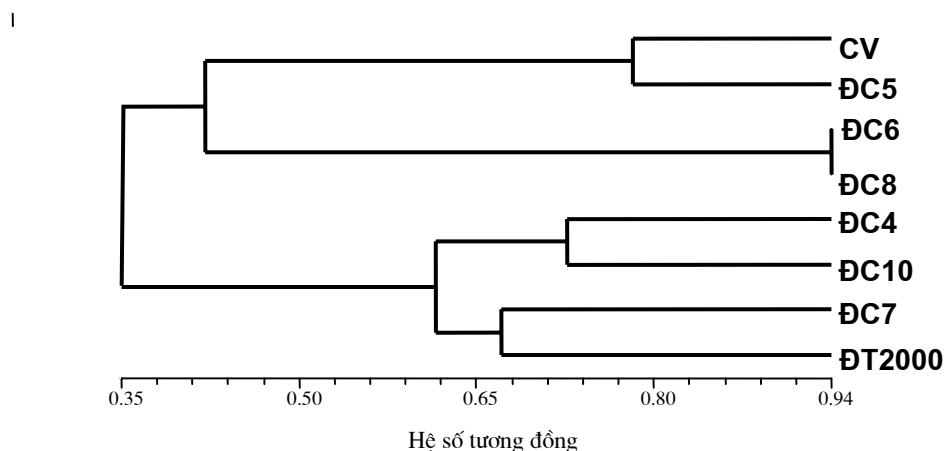
Sự phân ly các chỉ thị SSR trong các tổ hợp lai DT2000 x Cúc Vàng và tổ hợp DT2000 X DT12: Khảo sát các dòng F3 trong tổ hợp lai DT2000 X Cúc Vàng bằng 12 cặp mỗi SSR cho thấy chín cặp mỗi cho sự đa dạng giữa các dòng F3, các dòng đều mang tính trạng của bố và mẹ ở các mức độ khác nhau. Các dòng lai mang các chỉ thị di truyền của Cúc Vàng và DT2000 có thể chia thành hai nhóm: Cúc Vàng và các dòng lai ĐC5, ĐC6, ĐC8 thuộc nhóm 1; DT2000 và các dòng lai ĐC4, ĐC7, ĐC10 thuộc nhóm 2. Khảo sát một số locus SSR liên quan đến QTL (quantitative trait loci - locus tính trạng số lượng) về tính chịu hạn cho thấy các dòng lai ĐC4, ĐC7, ĐC10 mang các allele SSR này của DT2000. Nghiên cứu các SSR liên quan đến tính đa dạng còn cho thấy các dòng ĐC4, ĐC5, ĐC7, ĐC10 mang tính di truyền của cả Cúc Vàng. Như vậy, các dòng ĐC4, ĐC5, ĐC7, ĐC10 có thể được chọn để theo dõi tiếp về sự ổn định di truyền trong các thế hệ sau (hình 62, hình 63).

Trong tổ hợp lai DT2000- DT12, các dòng đều mang tính di truyền của cả giống bố mẹ. Kết quả phân tích bằng chương trình NTSYS cho thấy chúng chia thành 2 nhóm: nhóm 1 gồm có DT12 và các dòng lai DT2, DT6 và DT8; nhóm 2 gồm có DT2000 và các dòng còn lại: DT1, DT3, DT4, DT5, DT7, DT9, DT10. Trong nhóm 2, DT10 có tính di truyền gần với DT2000 nhất, sau đó đến DT3, DT9; còn bốn dòng DT1,4,5,7 tách thành nhóm riêng, có khoảng cách xa hơn. Các dòng DT1, DT4, DT5, DT7 đều cần lưu ý để nghiên cứu tiếp.

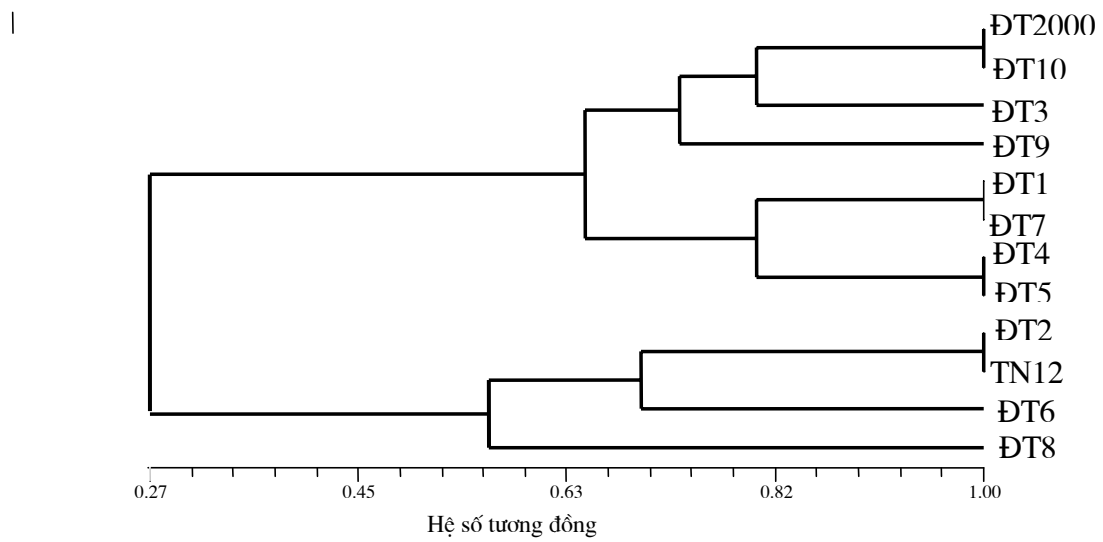


Hình 62. Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng các cặp môi SSR của các giống đậu tương. Cúc Vàng(1), ĐT2000(8), và các dòng lai F3: 2- ĐC4; 3-ĐC5; 4-ĐC6; 5-ĐC7; 6-ĐC8; 7-ĐC10.

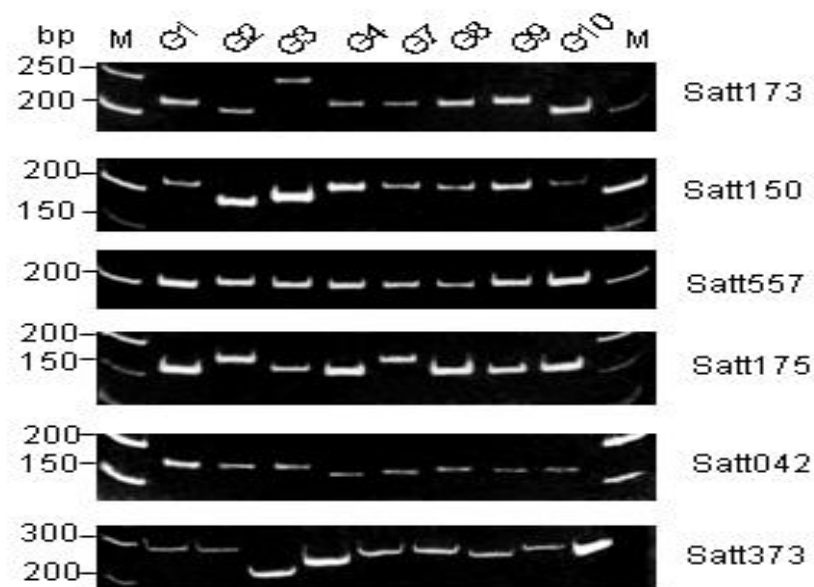
Nghiên cứu đa dạng di truyền giữa một số giống đậu tương có khả năng kháng bệnh rỉ sắt khác nhau: G1,G2,G3 là các giống mẫn cảm với bệnh rỉ sắt; G4,G7 – kháng bệnh ở mức trung bình; G8,G9,G10 – kháng bệnh rỉ sắt tốt. Sử dụng 12 chỉ thị SSR để khảo sát sự khác nhau giữa các giống này đã cho kết quả bước đầu: tám giống nghiên cứu có thể chia thành 2 nhóm: nhóm 1: gồm các giống đậu tương G1, G2, G3; nhóm 2: G4, G7, G8, G9, G10 và ĐT2000. Trong nhóm 2 lại có thể chia thành 2 nhóm: G8, G9 tách riêng so với 4 giống đậu tương còn lại. Gen kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương chưa được nghiên cứu kỹ, chưa định vị trên genom. Vì vậy những kết quả này bước đầu góp phần tìm kiếm các chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng này (hình 64, hình 65).



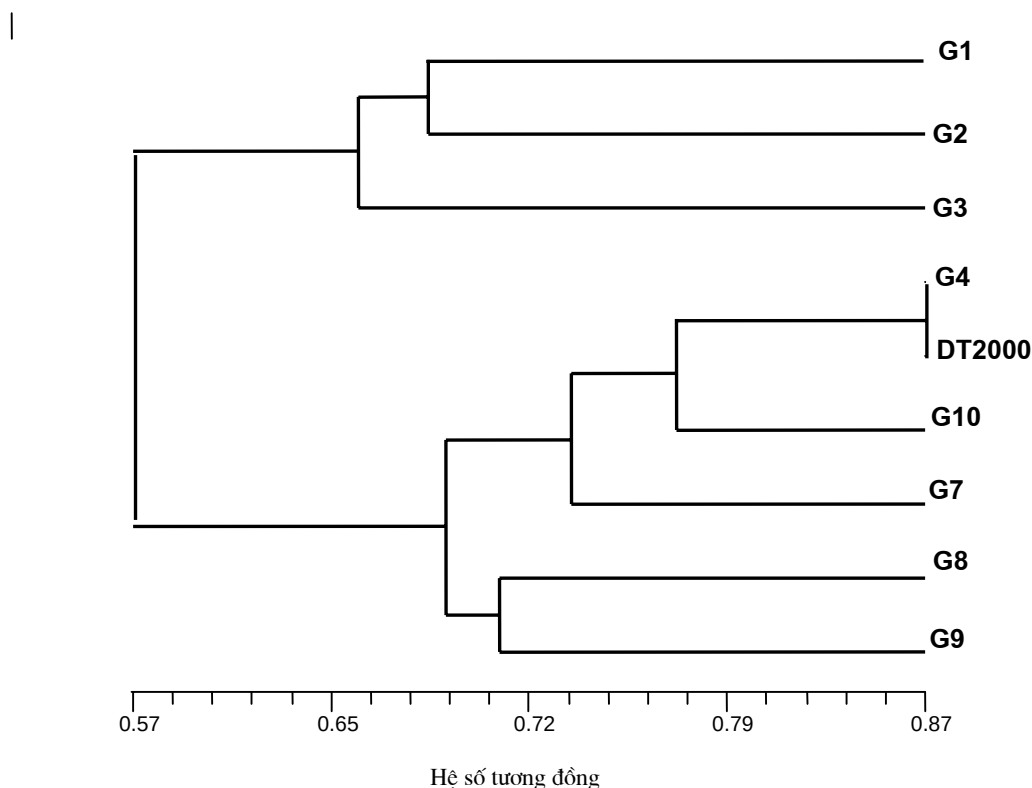
Hình 63. Khoảng cách di truyền của các dòng đậu tương F3 so với bố mẹ.



Hình 64. Khoảng cách di truyền của các dòng đậu tương F3 so với bố mẹ.



Hình 65. Phổ điện di SSR của các giống đậu tương với khả năng kháng bệnh rỉ sắt khác nhau.



Hình 66. Đa dạng di truyền một số giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt.

3.3.3.3. Kết quả tạo giống đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt có sự phối hợp của chỉ thị phân tử

Từ kết quả nghiên cứu đa dạng, đề tài đã tiến hành tổ hợp lai ĐT2000 x Cúc, Đ2000 x ĐT12 để chọn tạo giống đậu tương năng suất, kháng được bệnh rỉ sắt và có khả năng chịu hạn khá. Các dòng triển vọng F6 đã được thử nghiệm ở một số vùng sinh thái khác nhau. Sau đây là kết quả thử nghiệm đại diện vụ **xuân 2004 tại vùng nước trời Thanh Hà, Hoà Bình.**

Bộ khảo nghiệm gồm 9 dòng, giống trong đó có 3 dòng thuộc tổ hợp ĐC, 6 dòng thuộc tổ hợp ĐT và các dòng bố mẹ ĐT2000, Cúc vàng, ĐT12, đối chứng là DT84 đã được chúng tôi đưa vào thử nghiệm tại vùng nước trời tỉnh Hoà Bình. Kết quả thử nghiệm đã cho thấy:

Về thời gian sinh trưởng và khả năng phân cành, đốt của các dòng thử nghiệm

Phần lớn các dòng thử nghiệm đều tập trung vào 95-96 ngày. Duy nhất có dòng ĐC98.1.120 có TGST tương đối ngắn (87 ngày), chín sớm hơn DT84 - 2 ngày và muộn hơn cúc vàng 5 ngày. Đây là dòng lai của tổ hợp đối chứng nên TGST của dòng này

Bảng 53. Thời gian sinh trưởng của các dòng thử nghiệm, vụ xuân 2004 tại Thanh Hà, Hoà Bình

STT	Tên dòng	TGST (ngày)	Cao cây (cm)	Số cành/cây	Số đốt/thân chính
1	ĐC51.1.58	95	66.6	3.0	15.0
2	ĐC72.1.20	98	50.6	2.0	10.0
3	ĐC98.1.120	87	53.5	3.0	13.0
4	ĐT 213.5.250	94	44.0	3.0	11.0
5	ĐT320.2.176	99	47.2	2.0	12.0
6	ĐT320.3.21	96	61.6	3.0	13.0
7	ĐT 213.4.347 (ĐT26)	98	70.4	2.0	14.0
8	ĐT356.1.372	105	82.4	2.0	15.0
9	ĐT147.3.386	106	53.5	3.0	14.0
10	Cúc vàng	80	43.5	3.0	12.0
11	ĐT12	81	40.5	3.0	12.0
12	ĐT 2000	115	73.8	2.0	15.0
13	DT 84 (đ/c)	89	41.5	2.0	10.0

ngiên về cúc vàng. Hai dòng ĐT356.1.372 và ĐT147.3.386 có TGST dài hơn các dòng triển vọng khác khoảng 10-12 ngày và ngắn hơn ĐT2000 10 ngày. Cúc vàng và DT84 có TGST 80-89 ngày (bảng 53).

Về chiều cao cây, khả năng phân cành, đốt của các dòng thử nghiệm ở mức trung bình khá. Cao cây dao động từ 41,5 đến 82,4 cm trong đó cúc vàng và DT 84 có chiều cao cây thấp nhất (41-43 cm) và dòng ĐT356.1.372 cao cây nhất (82,4 cm).

Tổng số cành/cây của các dòng thử nghiệm đều ngang bằng và vượt bố mẹ và đối chứng DT84, đạt từ 2-3 cành. Hai dòng ĐC51.1.58 và ĐC72.1.20 có tổng số đốt/thân chính cao (15 đốt) bằng với DT2000. Các dòng ĐC98.1.120, DT320.3.321, DT213.4.347 và DT147.3.386 là những dòng có tổng số đốt/thân chính tương đối cao (13-14 đốt) và đều cao hơn cục vàng và DT84.

Tỷ lệ quả chắc quả và tổng số quả/cây

Trong điều kiện khô hạn, không có điều kiện tưới thì dòng ĐC98.1.120 và DT213.5.250 là những dòng có khả năng chịu hạn hơn cả, chúng có tỷ lệ quả chắc cao, tổng số quả/cây cũng khá 32-34 quả và số quả 3 hạt/cây đều vượt trội hơn so với các dòng khác. Kém nhất là DT2000, dòng DT356.1.372 và DT320.2176.

Năng suất đạt cao nhất là dòng DT213.5.250 (2437 kg/ha) tiếp theo là ĐC98.1.120 và DT213.4.347. Sự vượt trội về năng suất cả 3 dòng này là có ý nghĩa so với đối chứng DT84 ở mức tin cậy 95%. Nếu so sánh 3 dòng này với bố mẹ chúng là cục vàng, DT12 và DT2000 thì đều vượt về năng suất ở mức có ý nghĩa 95%. Một số dòng như ĐC.72.1.20, ĐC51.1.58 và DT320.3.321 cũng có năng suất thực thu cao hơn đ/c nhưng sự sai khác này không có ý nghĩa.

Các dòng còn lại DT320.2.176, DT356.1.372, DT147.3.386 và DT2000 là những dòng có năng suất rất thấp, tỷ lệ quả lép/cây quá nhiều và không thích hợp cho vùng nước trời tỉnh Hoà Bình.

Nhận xét:

- Trong vụ xuân năm 2004 chúng tôi đã khảo nghiệm 8 mẫu dòng tại Thanh trì -Hà Nội và Nông trường Thanh Hà -Hoà Bình, kết quả cho thấy:

- Mẫu dòng DT213.4.347, DT320.2.176 đạt năng suất 3,0–3,1 tấn/ha, vượt so với DT84 16% và tăng so với DT12 từ 30-40% ở Hà Nội. Mẫu giống DT213.5.250 có khả năng sinh trưởng, phát triển tương đối tốt và đạt năng suất cao nhất (**2437kg/ha**), sau đến ĐC98.1.120 (2156kg/ha) tại Hoà Bình (Bảng 54).

- Các mẫu dòng trên đều cứng cây chống đổ khá tốt, nhiễm bệnh ở mức nhẹ đến trung bình đặc biệt cải tiến được một số tính trạng (màu vỏ hạt, rốn hạt, độ rạn nứt vỏ hạt) so với mẫu giống bố mẹ DT2000.

Bảng 54. Năng suất và các yếu tố tạo thành năng suất của các dòng thử nghiệm, vụ xuân 2004 tại Thanh Hà, Hoà Bình.

STT	Tên dòng, giống	TS.quả chắc/cây	Quả 3 hạt/cây	TS quả lếp/cây	KL.100 hạt (g)	NS (kg/ha)
1	ĐC51.1.58	14	2	14	9.6	1250
2	ĐC72.1.20	15	2	11	9.8	1310
3	ĐC98.1.120	34	5	8	10.4	2156
4	ĐT 213.5.250	32	6	3	16.0	2437
5	ĐT320.2.176	8	0	26	14.2	798
6	ĐT320.3.21	23	5	5	16.4	2115
7	ĐT 213.4.347	24	8	3	16.6	2241
8	ĐT356.1.372	5	2	21	15.8	713
9	ĐT147.3.86	13	2	17	16.0	826
10	Cúc vàng	28	3	3	9.5	1486
11	ĐT12	16	5	4	19.0	1738
12	ĐT2000	4	0	17	15.7	745
13	DT 84(đ/c)	11	2	3	17.0	1632
	CV%					17.2
	LSD _{0.05}					519.69
	LSD _{0.01}					704.29

- Thông qua các vụ thử nghiệm ở các vùng sinh thái khác nhau và kết hợp với phân tích các chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn đã chọn được 3 dòng triển vọng **ĐT213.4.347 (ĐT4)**, **ĐT320.2.176 (ĐT7)**, **ĐT213.5.250 (ĐT5)**. Phản ứng với mùa vụ của các dòng:
Vụ xuân: mẫu dòng **ĐT213.4.347 (ĐT4)**, **ĐT320.2.176 (ĐT7)** có thời gian sinh trưởng 96-98 ngày trong vụ xuân, năng suất đạt 3106–3166kg/ha, vượt so với DT84 16% và tăng so với ĐT12 từ 30-40%. Mẫu dòng **ĐT213.5.250 (ĐT5)** sinh trưởng, phát triển tốt nhất tại vùng nước Hoà Bình có thời gian sinh trưởng 87- 94 ngày ở vụ xuân,

năng suất đạt (2156-2437kg/ha). Vụ đông: mẫu dòng ĐT320.2.176 (ĐT7), ĐT213.4.347 (ĐT4) và ĐT213.5.250 (ĐT5).

Các mẫu dòng chọn lọc đều cứng cây chống đổ khá tốt, nhiễm sâu, bệnh ở mức nhẹ đến trung bình.

- Dòng ĐT213.4.347 (ĐT4) (*ký hiệu dòng gửi đi khảo nghiệm là ĐT26*) đã được gửi sang Trung tâm khảo kiểm nghiệm giống cây trồng TƯ để tham gia khảo nghiệm ở vụ Đông 2004 (vụ thứ nhất).

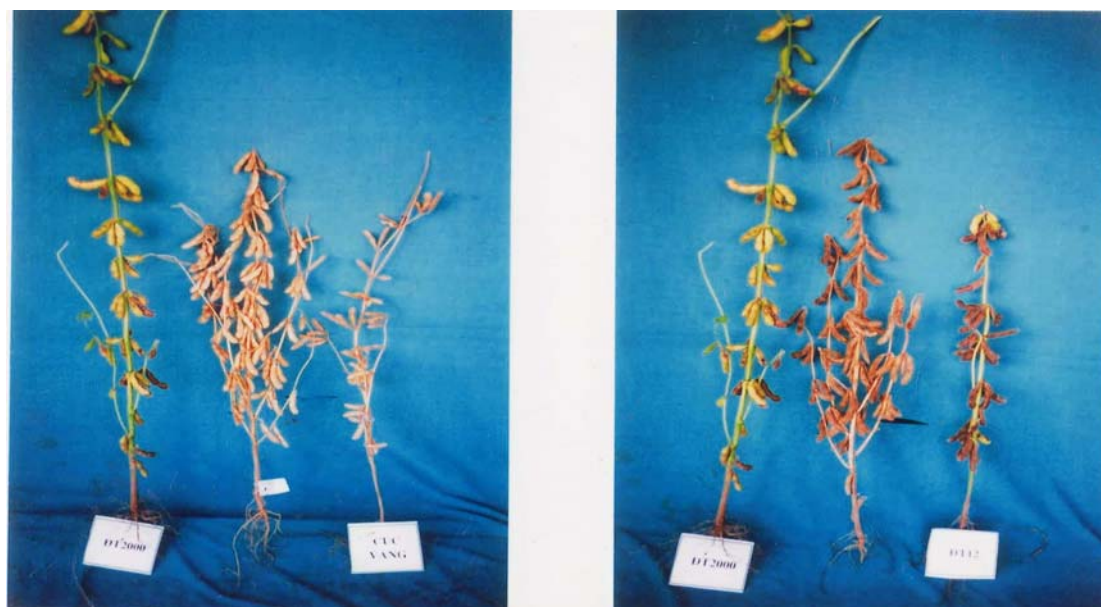
3.3.3.4. Kết luận về tạo giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử

- 1) Chọn được các chỉ thị phân tử SSR để nghiên cứu tính đa dạng và liên quan đến tính chịu hạn: Satt005, Satt042, Satt146, Satt175, Satt173, Satt 009; Satt431, Satt150; Satt373; Satt489, Satt557, Satt567.
- 2) Các chỉ thị phân tử: Satt489, Satt373, Satt150 có thể sử dụng để chọn dòng có khả năng chịu hạn.
- 3) Các chỉ thị Satt042, Satt173 có thể có liên quan đến gen kháng bệnh rỉ sắt và có thể chọn để nghiên cứu định vị gen này trong bộ gen.
- 4) Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của 7 nguyên liệu khởi đầu đã tìm ra các giống có khoảng cách di truyền xa hơn các giống khác để sử dụng trong lai tạo: tổ hợp ĐT2000 và Cúc vàng; tổ hợp ĐT2000 và ĐT12 (Hình 67).
- 5) Nghiên cứu sự phân ly và di truyền các chỉ thị SSR của một số dòng F3 tổ hợp lai ĐT2000 và Cúc Vàng có thể dự đoán các dòng ĐC4, ĐC5, ĐC7 ĐC10 có triển vọng để nghiên cứu theo dõi tiếp; còn tổ hợp lai ĐT2000 và ĐT12 có thể lưu ý đến các dòng ĐT1, ĐT4, ĐT5, ĐT7.
- 6) Thông qua các vụ thử nghiệm ở các vùng sinh thái khác nhau và kết hợp với phân tích các chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn đã chọn được 3 dòng triển vọng **ĐT213.4.347 (ĐT4), ĐT320.2.176 (ĐT7), ĐT213.5.250 (ĐT5)**. Phản ứng với mùa vụ của các dòng như sau:
 - a. Vụ xuân: mẫu dòng **ĐT213.4.347 (ĐT4), ĐT320.2.176 (ĐT7)** có thời gian sinh trưởng 96-98 ngày trong vụ xuân, năng suất đạt 3106–3166kg/ha, vượt

so với DT84 16% và tăng so với DT12 từ 30-40%. Mẫu dòng **DT213.5.250 (DT5)** sinh trưởng, phát triển tốt nhất tại vùng nước Hoà Bình có thời gian sinh trưởng 87- 94 ngày ở vụ xuân, năng suất đạt (2156-2437kg /ha)

b. Vụ đông: mẫu dòng DT320.2.176 (DT7), DT213.4.347 (DT4) (Hình 68) và DT213.5.250 (DT5).

- 7) Các tính trạng của các con lai phần lớn đều thể hiện trung gian của bố mẹ, đặc biệt con lai cải tiến được một số nhược điểm của giống bố mẹ DT2000 như rốn đen, vỏ hạt vàng xám, rạn và tính trạng này ổn định qua các thế hệ. Các mẫu dòng chọn lọc đều cứng cây chống đổ khá tốt, nhiễm sâu, bệnh ở mức nhẹ đến trung bình.
- 8) Dòng DT213.4.347 (DT4) (*ký hiệu dòng gửi đi khảo nghiệm là DT26*) đã được gửi sang Trung tâm khảo kiểm nghiệm giống cây trồng TƯ để tham gia khảo nghiệm ở vụ Đông 2004 (vụ thứ nhất).



Hình 67. Cây lai và bố mẹ DT2000 x Cúc vàng và DT2000 x DT12



Hình 68. Dòng DT213.4.347 (DT26) vụ đông 2003 (trái) và Dòng DT213.4.347 vụ đông 2003 (phải)

3.3.4. Đánh giá sớm các dòng lúa và ngô chọn lọc được bằng các chỉ thị phân tử liên quan

3.3.4.1. Đánh giá sớm các dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao với các chỉ thị STS

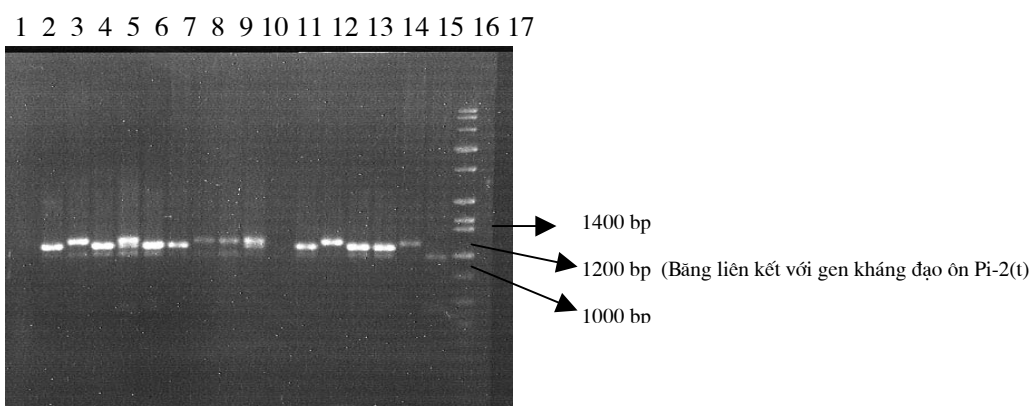
Trình tự các chỉ thị STS liên kết với các gen kháng bệnh đạo ôn và chất lượng lúa gạo như trong bảng 55.

Phản ứng PCR với cặp môi RG64 và các môi liên quan đến chất lượng gạo (Wxa, RZ284, RG28, G243A) đã bước đầu chọn được 5 dòng lúa đơn bội kép (HPMD4, HPMD6 và HPMD9, HPMD13, HPMD20) mang đoạn ADN liên kết với gen kháng bệnh đạo ôn Pi-2(t) và 2 dòng cây F3 (F3C1 và F3C10) vừa có tính kháng bệnh đạo ôn vừa có các đặc điểm chất lượng gạo tốt từ tổ hợp lai Moroberekan và WAB56-125 (Hình 69 và Hình 70).

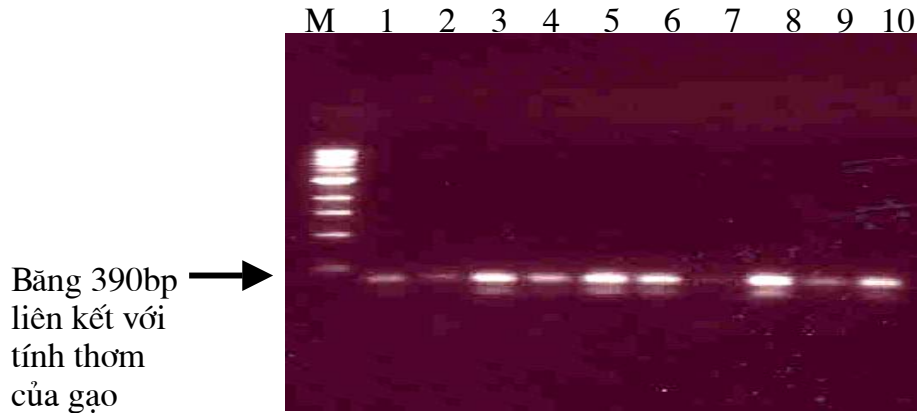
Bảng 55. Trình tự các chỉ thị STS liên quan đến tính kháng đạo ôn và chất lượng lúa gạo:

TT	Tên môi	Trình tự môi	Kích cỡ đoạn ADN (bp)
1	RG64	5-GTTGTTTGTAGCTCTCCAATGCCTGTTC-3 5-CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG-3	1155
2	RZ536-	5-ATAGGAGGAGGAGGGCAA-3 5-ACTTGTCATGCCCAGCTA-3	213
3	Wxa	5-GTATACAGCAATAAACCCATGAGCT-3 5-TAGCTGTTGCTGTGGAAGATC-3	2487
4	RG171	5-TGACAGGTTTGCTGTCTCC-3 5-TTTCCCCCTTTTGGGTT-3	557
5	RZ284	GGAACAGTTCTCAGTTTGC-3 5-GCACTTGAAGGATCAGCT-3	343
6	RG28	5-GATGGGGTAGACTAGACCA-3 5-TACCCAATCTACCCAATCAG-3	390
7	G243A	5-CCAACCTTAGGAATGCAT-3 5-TTGCAAGTAAGAGAAGC-3	143

Ghi chú: RG64 - môi liên kết với gen kháng bệnh đạo ôn Pi-2(t)
 RZ536 - môi liên kết với gen kháng đạo ôn Pi-1(t)
 Wxa - môi liên kết với hàm lượng Amyloza cao
 RG171 và G243 - các môi liên kết với độ bền gel
 RZ284 - môi liên kết với độ dài hạt
 RG28 - môi liên kết với tính thơm của gạo



Hình 69. Điện di sản phẩm PCR của ADN một số dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Moroberekan và WAB56-125 với cặp môi RG64



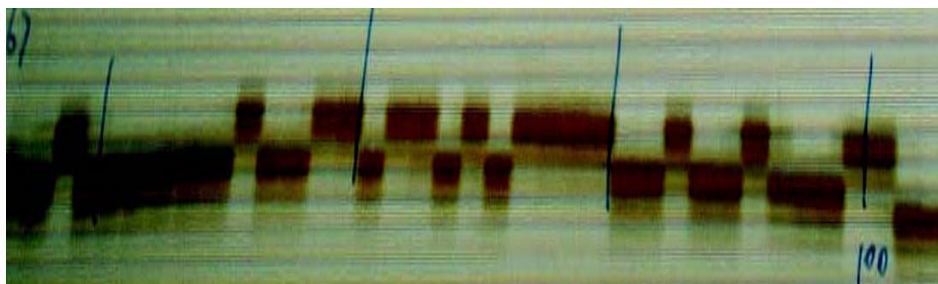
Hình 70. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN một số cây lúa lai với môi RG28. 1: WAB56125; 2: KDMKL105(cây lúa thơm đã được xác định); 3: Tế tếp; 4-10: Các cây lai F5 của cặp lai WAB56,125 và KDML105(WK).

Sử dụng các chỉ thị RG64, RG28, RG171, Wx1, Wxa, Wxb, G243, RZ323, RZ284 để đánh giá tính kháng đạo ôn và chất lượng (hàm lượng amylose, độ bền gen, mùi thơm, độ dài hạt ...) ở 5 dòng cây từ nuôi cấy bao phấn và 2 dòng cây F3. Kết quả nhận được là với môi RG64 (liên kết với tính kháng đạo ôn) có thể phân biệt được các dòng kháng đạo ôn, môi G243, RZ284, RZ323... có thể dùng đánh giá chất lượng gạo.

3.3.4.2. Đánh giá sớm các dòng lúa xuất khẩu với các chỉ thị phân tử liên quan

Đánh giá hàm lượng amylose với chỉ thị STS liên quan: Để có cơ sở cho nghiên cứu, chúng tôi đã sử dụng các chỉ thị Wxa liên quan đến hàm lượng amylose để phân tích tập đoàn các giống lúa trong nghiên cứu. Kết quả đã chỉ ra tính đa hình ở các giống lúa mùa có hai phân đoạn ADN với kích thước khác nhau. Tính đa hình được phân biệt giữa hàm lượng amylose cao và thấp trên các quần thể lúa mùa (Hình 71).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

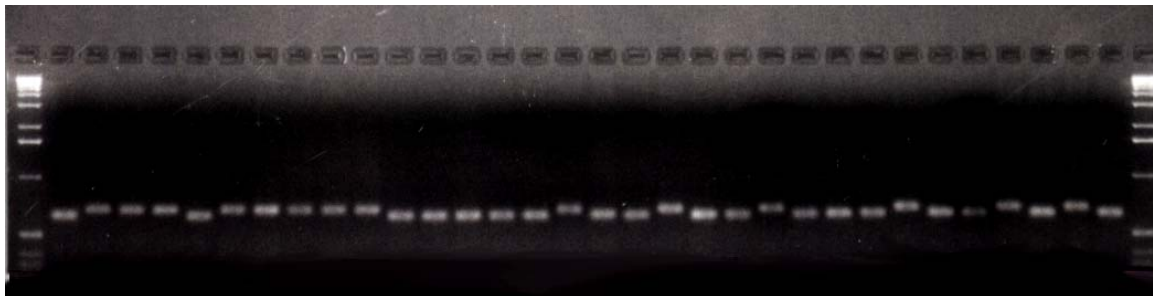


Hình 71 : Đánh giá đa hình với chỉ thị Wx với 15 giống lúa mùa và 9 giống lúa cao sản.

Đánh giá mùi thơm thông qua kiểu gen: Phân tích các dòng cây lai BC1F2 của một số tổ hợp lai với chỉ thị RG28 (chỉ thị liên quan đến mùi thơm ở gạo) đã chỉ ra kết quả đáng lưu ý. Chẳng hạn kết quả phân tích của quần thể BC1F2 cặp lai IR64 (không thơm) x DS20 (thơm) với chỉ thị RG28 ở hình 72 cho thấy sự khác nhau rõ rệt giữa các cá thể con lai so với bố mẹ. Những cá thể mang phân đoạn ADN có kích thước là 800 bp (như giống lúa DS20) là các dòng lúa mang chỉ thị liên quan đến mùi thơm, còn các dòng mang phân đoạn ADN kích thước 750 bp (giống như giống lúa IR64) sẽ không có mùi thơm.

Nghiên cứu sự phân ly của các locut liên quan đến mùi thơm khi phân tích trên quần thể F1 và BC1F1 với các chỉ thị RG28 đã không chỉ ra tính đa hình. Nhưng đối với quần thể F2 cho tỷ lệ 12% đa hình, đối với các dòng BC1F2 có tỷ lệ là 9,5%. Điều này, cho thấy sự phân ly theo cách phân tích các tổ hợp có kết quả tương tự.

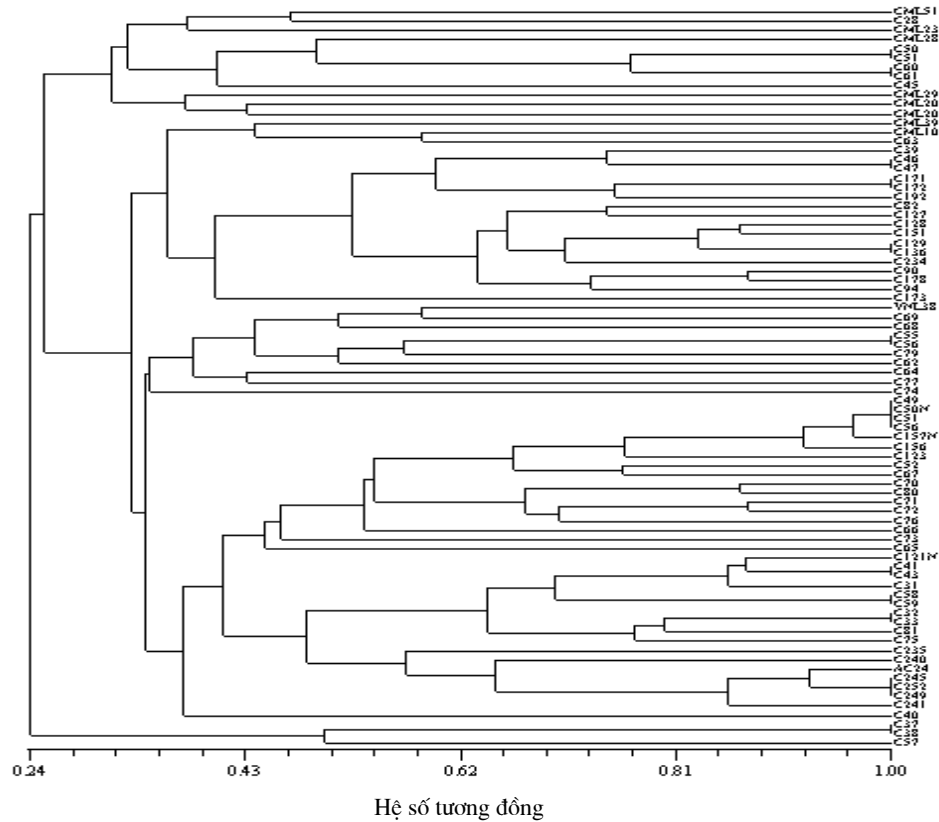
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 M



Hình 72. Kết quả phân tích marker phân tử với marker RG28 tách quần thể BC 1F2 trên cặp lai IR 64/ DS 20, M: là marker chuẩn 1Kb; Cột 1: là IR 64; 2: DS20; Từ 3 tới 32 là cá thể từ BC1F2.

3.3.4.3. Chọn tạo các dòng ngô mới có sự trợ giúp của chỉ thị phân tử

Xác định ưu thế lai thông qua kết quả phân tích đa dạng di truyền tập đoàn giống ngô bằng chỉ thị RAPD và SSR: Phân tích đa dạng di truyền bằng 60 chỉ thị RAPD với tập đoàn 29 dòng ngô thuần có nguồn gốc khác nhau. Đánh giá tính đa hình và xác định được 2 nhóm ưu thế lai của tập đoàn gồm 29 dòng ngô thuần thông qua chỉ thị RAPD. Khoảng cách di truyền (GD) tương quan thuận với năng suất hạt của các tổ hợp lai F1. Xác định 3 tổ hợp lai có thời gian sinh trưởng trung bình, năng suất cao hơn đối chứng từ 9 – 14%, màu hạt đẹp, chống đổ tốt. Rút ra được 2 tổ hợp lai tốt là CN4 và CN5. Phân tích đa dạng di truyền tập đoàn 80 dòng thuần bằng chỉ thị SSR (Hình 73). Xác định được một số tổ hợp lai ưu tú và đã tiến hành lai thử nghiệm vụ Thu 2003, các dòng đang được đánh giá một số chỉ tiêu nông học ở vụ đông xuân 2004 – 2005.



Hình 73: Phả hệ của 80 dòng ngô thuần phân tích với chỉ thị SSR

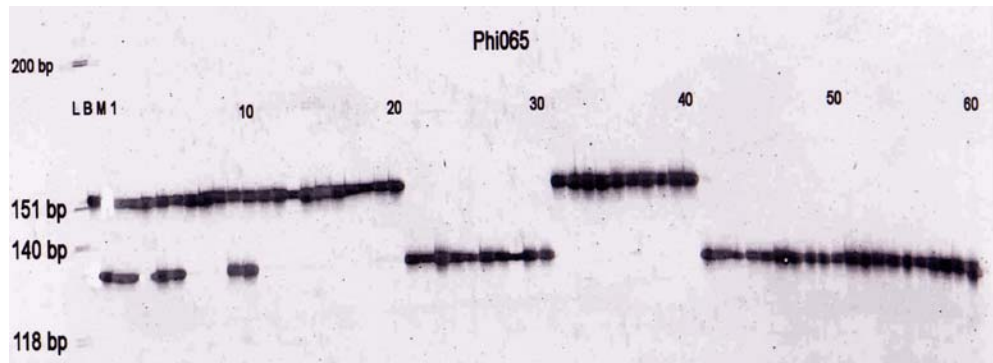
Chọn lọc sớm các dòng ngô kháng bệnh khô vằn bằng các chỉ thị phân tử liên quan:

Hiện nay có một số chỉ thị SSR đã được công bố là liên quan đến tính kháng bệnh khô vằn ở ngô. Để đánh giá các dòng ngô chọn tạo được, chúng tôi đã tiến hành phân tích các dòng ngô tạo được với các chỉ thị SSR liên quan. Kết quả bước đầu đã xác định được hai chỉ thị Phi065 và Phi123, trình tự các nucleotide như trình bày trong bảng 56.

Bảng 56. Trình tự các nucleotide của hai chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh khô vằn ở ngô

TT	Tên mỗi	Trình tự mỗi xuôi (F) ngược (R) (Từ đầu 5' đến 3')	Phân đoạn ADN (bp)
1	phi065	5' AGGGACAAATACGTGGAGACACAG 3' 5' CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC 3'	131-151
2	phi123	5' GGAGACGAGGTGCTACTTCTTCAA 3' 5' TGTGGCTGAGGCTAGGAATCTC 3'	146-160

Hình 74 là kết quả phân tích 60 dòng ngô thế hệ S4 với chỉ thị Phi63 và đã phát hiện ra 30 dòng ngô mang phân đoạn ADN liên quan có kích thước khoảng 151 bp. Kết quả phân tích phân tử cũng phù hợp với kiểu hình tính kháng. Tuy nhiên để khẳng định kết quả cần phải có các nghiên cứu tiếp.



Hình 74. Phân tích tính kháng bệnh khô vằn của thế hệ S4 với chỉ thị Phi065

Tóm tắt một số kết quả chọn tạo giống ngô năng suất và kháng bệnh khô vằn

- Thông qua phép phân tích phân tử với tập đoàn 29 dòng ngô bằng các chỉ thị RAPD và 80 dòng thuần bằng chỉ thị SSR đã xác định được 300 tổ hợp lai theo hướng tạo ngô năng suất, chất lượng và chịu khô vằn. Xác định 10 tổ hợp lai có triển vọng tốt.
- Bước đầu đã xác định được 02 chỉ thị SSR đó là Phi123 và Phi065 liên quan tới tính kháng bệnh khô vằn ở ngô.
- Thông qua phương pháp gây nhiễm nhân tạo trên đồng ruộng và phân tích với chỉ thị phân tử liên quan khô vằn ở ngô đã xác định được 02 nguồn dòng là C177 và C305 và 01 tổ hợp lai (dòng CN2) chịu được bệnh khô vằn.
- Các dòng ngô CN4, CN5 và dòng F145 đã tham gia khảo nghiệm quốc gia vụ Xuân 2004. Trong đó F145 được đánh giá là giống triển vọng. Đang tiến hành thử nghiệm rộng để xin công nhận giống vào năm 2005.

3.4. KẾT QUẢ KHẢO NGHIỆM VÀ TRIỂN KHAI SẢN XUẤT THỬ CÁC DÒNG LÚA ,NGÔ VÀ ĐẬU TƯƠNG

Từ các kết quả phân tích một số đặc điểm nông học, sinh lý, sinh học phân tử, chất lượng lúa gạo... Đề tài đã chọn được tổng số 7 dòng cây trồng ưu tú, trong đó có 03 dòng lúa (NTCĐDB-5, OM3566 và HPKW1), 03 dòng ngô (CN4, CN5 và F145) và 01 dòng đậu tương (Bảng 57). Số vụ khảo nghiệm và diện tích sản xuất thử của các dòng như sau:

Bảng 57 . Số vụ khảo nghiệm và diện tích sản xuất thử của các dòng cây trồng tạo được

TT	Tên dòng	Số vụ khảo nghiệm cơ bản	Diện tích sản xuất thử (ha)	Ghi chú
Lúa				
1	NTCĐDB-5	3	3673	Hạt gạo dài, năng suất đạt trên 5 tấn/ha, chất lượng gạo khá. Dự kiến xin công nhận giống tiến bộ vào năm 2005
2	OM3566	1	1	Hạt gạo dài, năng suất đạt 5,6 tấn/ha, kháng đạo ôn khá.
3	HPKW1	1 (vụ Mùa 2004)	0,2	Chất lượng gạo khá, kháng đạo ôn
Ngô				
4	CN4	1 (vụ Xuân 2004)	50	Năng suất đạt 66,55 tạ/ha, chịu khá bệnh khô vằn
5	CN5	1	50	Năng suất, chịu khá bệnh khô vằn
6	F145	1 (vụ Đông 2004)	50	Năng suất đạt 75 tạ/ha, chịu khô vằn khá. Sẽ xin công nhận giống tiến bộ vào năm 2005
Đậu tương				

7	ĐT26	1 (vụ Đông 2004)	5	Năng suất đạt trên 3 tấn/ha, chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt khá.
---	------	------------------------	---	---

Kết quả đánh giá khảo nghiệm một số chỉ tiêu của các dòng được trình bày trong bảng 58 và 59. Sau đây là trích lược một số kết quả chính của khảo nghiệm cơ bản một số dòng cây trồng (*Dòng lúa HPKW1, dòng ngô F145 và dòng đậu tương ĐT26 chưa có kết quả báo cáo của khảo nghiệm cơ bản*).

Bảng 58 . Thống kê một số đặc điểm nông học của các dòng lúa khảo nghiệm

Loại cây	Tên dòng	TGST (ngày)	Cao cây	Dài hạt (mm)	Rộng hạt (mm)	D/R	Chất lượng gạo	Điểm bệnh đạo ôn	Năng suất (tấn/ha)
Lúa	NTCĐĐB-5	97-100	100-110	7,6	2,3	3,3	Tốt, mất mùi thơm	5	4,92
	OM3566	95-100	95-105	7,21	2,2	3,2	Tốt, hạt gạo trong không bạc bụng	3	4,98
	HPKW1	-	-	-			-	-	

Ghi chú: (-) chưa có kết quả của khảo nghiệm

Bảng 59. Thống kê một số đặc điểm nông học của các dòng ngô khảo nghiệm

TT	Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Điểm độ đồng đều cây	Điểm bệnh khô vằn	Dạng và màu sắc hạt	Năng suất	
							Tấn/ha	Vượt đ/c (%)
1	CN4	100	206,6	2,0	Tốt	Bầu rỗ ngứa, vàng cam	6,7	+11,9
2	CN5	117	186	2,0	Trung bình	Rỗ ngứa, vàng sáng	6,6	+11,1
3	F145	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (điểm bệnh khô vằn: 1- không nhiễm, 2 - nhiễm nhẹ, 3- nhiễm trung bình; 4- nặng; 5- rất nặng); (-): chưa có kết quả của khảo nghiệm.

Song song với khảo nghiệm cơ bản các dòng cây tạo được, chúng tôi cũng đã tiến hành sản xuất thử, trong đó đáng chú ý nhất là dòng lúa NTCĐĐB-5 đã sản xuất thử với diện tích 3673 ha và dòng ngô F145 (là tổ hợp lai tạo ra từ nuôi cấy bao phấn) với diện tích 100 ha. Đây là hai dòng cây có nhiều ưu việt so với các giống đang được gieo trồng về năng suất, chất lượng và tính chống chịu.

Nhận xét của các địa phương gieo trồng hai dòng cây mới:

- Dòng lúa NTCĐĐB-5: thích ứng rộng, năng suất đạt 5 tấn/ha, cơm mềm và ngon cơm, nhưng mất mùi thơm, chịu khá với các loại sâu bệnh.
- Dòng ngô 145: đều cây, chống đổ tốt, chịu hạn và khô vằn, năng suất đạt trên 7 tấn/ha, có nơi như Nam Hà và Sơn La đạt đến 8 tấn/ha.

3.5. MỞ RỘNG SẢN XUẤT GIỐNG LÚA MỚI DR3

Giống lúa DR3 đã triển khai sản xuất ở 12 tỉnh và thành phố với tổng diện tích sản xuất qui mô đạt gần 3000 ha, giống lúa DR3 đã được Hội đồng giống, Bộ NN và PTNT phê duyệt công nhận là Giống Tạm thời ngày 7/12/2003. Sau đây là tóm tắt nhận xét của các địa phương tham gia sản xuất lúa DR3

- Giống lúa DR3 đã được triển khai sản xuất thử chủ yếu trên chân đất bạc màu và thiếu nước cục bộ. Trải qua mười vụ sản xuất thử, năm vụ Đông Xuân (1998-1999; 1999-2000, 2000-2001, 2001- 2002 và 2002-2003) và năm vụ Mùa 1999, 2000, 2001, 2002 và 2003 tại 12 tỉnh Sơn La, Hà Tây, Hà Nội, Bắc Giang... với tổng diện tích là 2958 ha (Bảng 60). Diện tích sản xuất thử ít nhất là 0,2 ha và nhiều nhất là 10 ha.
- Năm 1999, giống lúa DR3 cũng được TTKKNGCTTU và Văn phòng chuyển giao giống cây trồng mới Đại Mỗ đưa sang trồng thử nghiệm tại Senegan và Lào cũng có nhận xét là giống lúa DR3 có khả năng chịu hạn, chịu nóng và năng suất khá hơn các giống địa phương. Hiện nay DR3 vẫn được duy trì sản xuất ở một số diện tích tại Lào.
- Theo yêu cầu của một số địa phương về mở rộng sản xuất thử giống lúa DR3, vụ Mùa năm 2003 chúng tôi đã triển khai sản xuất thử lúa DR3 tại vùng đất khó khăn ở tỉnh Vĩnh Phúc, KonTum và Hà Tĩnh. Theo báo cáo thực tế của các địa phương cho thấy giống lúa DR3 phát triển khá hơn cả giống Khang Dân và Q5 đang sản xuất tại địa phương.

- Hội nghị đầu bờ lần thứ nhất tổ chức ngày 06/9/2002 có 50 đại biểu của cơ quan Trung ương và các địa phương tham dự. Hội nghị đã kết luận: Giống lúa DR3 có độ thuần khá,

Bảng 60. Thống kê diện tích sản xuất giống lúa DR3 trong 10 vụ sản xuất thử (ĐX 1998-1999, vụ Mùa 1999, ĐX 1999-2000, vụ Mùa 2000, ĐX 2000-2001, Mùa 2001, ĐX 2001-2002 và vụ Mùa 2002, vụ ĐX2002 và Mùa 2003)

TT	Địa điểm sản xuất	Diện tích (ha)	Năng suất (tạ/ha)
1	Hiền Quang-Phú Thọ	99	44-53
2	Sóc Sơn, Hà Nội	254	46-60
3	Phú Diễn-Hà Nội	50	45-59
4	Phù yên-Sơn La	343	44-61
5	Hiệp Hoà-Bắc Giang	160	47-61
6	Yên Thế-Bắc Giang	184	40-63
7	Bảo Đài- Bắc Giang	161	41-56
8	Xuân Hương-Bắc Giang	138	42-57
9	Tuyên Quang	297	41-60
10	Cao Bằng	290	41-56
11	Trạch Mĩ Lộc-Hà Tây	194	40-62
12	Cần Kiệm – Hà Tây	87	40-60
13	Cẩm Yên-Thanh Hoá	124	40-51
14	Cẩm Giang- Thanh Hoá	140	42-60
15	Thái nguyên	255	38-47
16	Phi Mô, Lạng Sơn	170	40-54
17	Do Thượng-Vĩnh Phúc	10	42-52
18	Hương Sơn-Hà Tĩnh	2	42-57
	Tổng	2958 ha	

sinh trưởng khoẻ, trổ tập trung, khả năng thích ứng rộng, đặc biệt cho vùng đất thiếu nước cục bộ, nghèo dinh dưỡng và năng suất đạt cao hơn rất nhiều so với giống Khang Dân hoặc Q5. Giống lúa DR3 ưu thế hơn giống lúa Khang dân ở vụ Mùa. Nhiều địa phương như Thái Nguyên, Phú Thọ, Bắc Giang... đề nghị cho triển khai rộng giống lúa DR3 vào vụ Mùa năm 2003.

- Theo thông báo ngày 20/8/2003 Ban chủ nhiệm HTX Sơn Tân, Huyện Hương Sơn, Hà Tĩnh đã tổ chức hội nghị đầu bờ để thăm quan sản xuất lúa DR3. Hội nghị có 80 đại biểu tham dự, Tất cả các thành viên đều đánh giá lúa DR3 phát triển tốt, sạch sâu bệnh, chịu nóng, chịu hạn, trổ tập trung, rất thuần và có ưu thế hơn hẳn giống Khang dân đang sản xuất đại trà tại địa phương, đặc biệt tại các chân ruộng khó khăn về nước, ước tính năng suất đạt 55 tạ/ha. Hiện nay bà con nông dân HTX trong huyện đã đăng ký hết giống DR3 sản xuất vụ Mùa năm 2003 (khoảng 11 tấn) cho vụ Đông xuân 2004.

Tóm tắt chung nhận xét của các địa phương tham gia sản xuất lúa DR3: Độ thuần giống khá, trổ tập trung, đẻ khỏe, dạng hình đẹp, cứng cây, chịu nóng và chịu hạn khá, tương đối sạch sâu bệnh. Năng suất đạt khoảng 60 tạ/ha. Thời gian sinh trưởng ngắn hơn CR203 là 5 ngày. Dạng hạt thon dài, chất lượng gạo khá hơn DR2. Có ưu thế rõ trong vụ Mùa.

CHƯƠNG IV. TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC

4.1. KẾT QUẢ NỔI BẬT

- 1) Chuyển giao quy trình công nghệ nhân giống quy mô sản xuất cây Keo lai và Bạch đàn lai cho 03 đơn vị nghiên cứu và sản xuất trong nước, đó là:
 - Trung tâm Phát triển Khoa học Công nghệ Hà Tĩnh
 - Trường trung học kinh tế – kỹ thuật và dạy nghề tỉnh Tuyên Quang
 - Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Quảng Trị
- 2) Nghiên cứu thành công phương pháp truyền tính cảm ứng nuôi cấy để tạo dòng thuần ở ngô và hoàn thiện kỹ thuật chọn dòng biến dị soma kết hợp xử lý chiếu xạ mô sẹo các giống lúa đặc sản (Tám xoan, Tám áp bẹ, Dẻ thơm, Tẻ di hương).
- 3) Lần đầu tiên ở Việt Nam đã triển khai kỹ thuật sinh học phân tử vào việc đánh giá đa dạng tập đoàn giống phục vụ lựa chọn bố mẹ cặp lai để tạo dòng lạc kháng bệnh rỉ sắt, đậu tương chịu hạn, ngô kháng bệnh khô vằn.
- 4) Phát hiện được 02 chỉ thị liên quan đến bệnh khô vằn ở ngô, 08 chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc, 03 chỉ thị SSR liên quan đến tính chịu hạn và 02 chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương. Các chỉ thị đã được sử dụng để sàng lọc nhanh các dòng ưu tú giai đoạn sớm. Từng bước đưa kỹ thuật chọn giống cây trồng có sự giúp đỡ của chỉ thị phân tử vào việc tạo các giống lúa kháng đạo ôn, ngô năng suất kháng khô vằn, lạc và đậu tương năng suất kháng rỉ sắt/chịu hạn.
- 5) Khảo nghiệm cơ bản 03 dòng lúa (NTCĐĐB-5, OM3536 và HPKW1), 03 dòng ngô (CN4, CN5 và F145) và 01 dòng đậu tương (ĐT26).
- 6) Sản xuất thử được trên 3673 ha lúa NTCĐĐB-5 và trên 200 ha dòng ngô CN4, CN5 và F145. Trong đó dòng lúa NTCĐĐB-5 và dòng ngô F145 được các địa phương đánh giá là những dòng triển vọng. Dự kiến vào năm 2005 sẽ xin công nhận giống khu vực đối với dòng lúa NTCĐĐB-5 và dòng ngô F145.
- 7) Giống lúa DR3 đã được Hội đồng giống, Bộ NN và PTNT phê duyệt công nhận là Giống Tạm thời ngày 16/1/2004.

4.2. TRÌNH ĐỘ CÔNG NGHỆ

- Lần đầu tiên ở Việt Nam đã triển khai thành công kỹ thuật sinh học phân tử vào việc tạo các giống cây trồng năng suất, chất lượng và chịu khá với sâu bệnh và điều kiện bất lợi của môi trường ở lúa, ngô lạc và đậu.
- Các kết quả nghiên cứu thu được đã khẳng định trình độ của các cán bộ khoa học nước ta trên lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại ngang tầm với các nước trong khu vực và thế giới. Các kết quả thu được vừa có ý nghĩa khoa học và vừa có ý nghĩa thực tiễn cao trong việc cải tiến giống cây trồng và nhân giống *in vitro*.
- Đặc biệt đề tài đã tiếp cận tạo giống cây trồng có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử đạt trình độ quốc tế.
- Các bước đánh giá một số đặc điểm nông học, chất lượng của các dòng/giống tạo được tuân thủ theo qui định hiện hành của Bộ NN và PTNT.

4.3. KHẢ NĂNG ÁP DỤNG

TT	Tên tiến bộ kỹ thuật	Cơ quan tạo ra	Nơi được chuyển giao	Hiệu quả kinh tế	Pháp lý cho việc áp dụng
1	Công nghệ nhân giống <i>in vitro</i> cây Keo lai, cây Bạch Đàn lai	Trung tâm nghiên cứu cây trồng rừng	- TTKHSX Lâm nghiệp Đông Nam Bộ. - Sở KH-CNMT Hà Tĩnh, Quảng Trị - TT Giống và KT lâm nghiệp Phú Yên. - Trường TH kinh tế kỹ thuật Tuyên Quang.	Giải quyết nhu cầu cây con đồng đều phục vụ quy mô trồng rừng	Sẽ đăng ký quyền tác giả
2	Công nghệ nhân giống <i>in vitro</i> Ba Kích	Viện dược liệu	- Các Sở KH-CNMT các tỉnh - Các vùng miền núi của các tỉnh như Thanh Hoá, Quảng Ninh, Phú Thọ...	Duy trì nguồn dược liệu và cung cấp đủ cây giống để sản xuất quy mô lớn	Sẽ đăng ký quyền tác giả

3	Công nghệ nhân giống <i>in vitro</i> hoa Địa lan	Viện Sinh học nông nghiệp	- Các Sở KHCNMT các tỉnh - Các vùng trồng hoa ven đô. - Các công ty trồng hoa xuất khẩu	Cung cấp cây giống đồng loạt để đáp ứng được nhu cầu thị hiếu người tiêu dùng	Sẽ đăng ký quyền tác giả
4	Công nghệ nhân giống <i>in vitro</i> hai giống điều	Viện Sinh học Nhiệt đới	- Các sở KHCNMT các tỉnh Phía Nam - Các vùng trồng điều ở phía Nam	Mở rộng diện tích trồng điều đáp ứng tiêu chuẩn xuất khẩu	Sẽ đăng ký quyền tác giả
5	Cây Ngưu tất	Viện Dược liệu	Các địa phương trồng cây thuốc	Tạo được giống phù hợp với đặc thù khí hậu Việt Nam	Sẽ đăng ký quyền tác giả
6	Các giống ngô kháng bệnh, năng suất	Viện nghiên cứu cây ngô	- Cơ quan tạo giống - Các địa phương sản xuất hạt ngô lai F1	Tăng năng suất vì giảm thiệt hại do bệnh khô vằn	Sẽ đăng ký quyền tác giả
7	Các dòng lúa chất lượng khá và kháng đạo ôn	Viện Công nghệ Sinh học	- Các cơ quan tạo giống - Các địa phương	Giảm thiệt hại bệnh và cải thiện năng suất, chất lượng giống	Sẽ đăng ký quyền tác giả
8	Các dòng lúa đủ tiêu chuẩn xuất khẩu	Viện NC lúa Ô Môn	- Các địa phương trồng lúa xuất khẩu	Đáp ứng thị trường gạo xuất khẩu	Sẽ đăng ký quyền tác giả
9	Các dòng lúa đặc sản	Viện Công nghệ Sinh học	Các địa phương	Tăng vụ và cải tạo năng suất	Sẽ đăng ký quyền tác giả
10	Các dòng lạc, đậu tương	Viện Công nghệ Sinh học	Các địa phương	Tăng năng suất do giảm thiệt hại về bệnh, hạn	Sẽ đăng ký quyền tác giả
11	Giống lúa	Viện	Các địa phương	Cải thiện	Đã đăng ký

	DR3	Công nghệ Sinh học		năng suất ở vùng đất bạc màu thiếu nước	quyền tác giả
12	Phương pháp xác định chỉ thị SSR liên quan đến bệnh khô vằn (ngô), rỉ sắt và chịu hạn (đậu tương), rỉ sắt (lạc), đạo ôn (lúa).	Viện Công nghệ Sinh học	Các viện Nghiên cứu	Rút ngắn thời gian tạo giống	Đào tạo và sẽ đăng ký quyền tác giả

4.4. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI

1. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã nghiên cứu thành công phương pháp truyền tính cảm ứng nuôi cấy *in vitro* để tạo dòng thuần ở ngô.
2. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã triển khai kỹ thuật sinh học phân tử vào việc đánh giá đa dạng tập đoàn giống phục vụ lựa chọn bố mẹ cặp lai để tạo dòng lạc kháng bệnh rỉ sắt, đậu tương chịu hạn, ngô kháng bệnh khô vằn.
3. Nghiên cứu triển khai kỹ thuật ứng dụng chỉ thị phân tử vào việc chọn tạo các giống lúa kháng đạo ôn và có chất lượng gạo khá, ngô năng suất kháng khô vằn, lạc và đậu tương năng suất kháng rỉ sắt/chịu hạn.

4.5. ĐÀO TẠO

TT	Họ Tên	Năm	Tên luận án	Bậc đào tạo
1	Lê Xuân Đắc	2001 - 2005	Nghiên cứu biện pháp công nghệ sinh học thực vật nhằm giảm chiều cao cây và tăng khả năng chống đổ của các giống lúa chất lượng cao	Tiến sĩ
2	Hoàng Thị Nga	2004-2008	Nghiên cứu các giải pháp kỹ thuật nuôi trồng và điều khiển sự ra hoa ở hoa Địa Lan nuôi cấy <i>in vitro</i>	Tiến sĩ

2	Nguyễn Thị Hải Hà	2004	Đánh giá đa dạng tập đoàn giống lúa kháng/nhiễm bệnh bạc lá vi khuẩn (<i>xanthomonas oryzae</i>) bằng kỹ thuật RAPD	Cử nhân
3	Chu Thị Thu Thủy	2004	Sàng lọc sớm các dòng lạc F3 có tính kháng bệnh rỉ sắt (<i>Puccinia arachidis</i>) bằng các chỉ thị SSR	Cử nhân
4	Nguyễn Thị Hải	2004	Phân tích sự đa dạng tập đoàn giống lạc có phản ứng khác nhau với bệnh héo xanh vi khuẩn bằng kỹ thuật SSR	Cử nhân
5	Lương Thị Thu Hương	2003	Nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử SSR để chọn dòng chịu nóng, chịu hạn ở đậu tương	Cử nhân
6	Lê Thạc Tiến	2003	Khảo sát tập đoàn giống đậu tương chịu hạn	Cử nhân
7	Nguyễn Thị Loan	2004 - 2005	Nghiên cứu vật liệu chọn tạo giống đậu tương chịu hạn cho vùng nước trời ở một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt nam	Thạc sĩ
8	Nguyễn Thị Hiếu	2004	Khảo sát một số dòng đậu tương vụ hè 2004 tại Thanh Trì Hà Nội	Kỹ sư
9	Trương Thị Duyên	2002	Nghiên cứu nhân <i>in vitro</i> cây Ngưu tất	Kỹ sư
10	Vũ Hoài Sâm	2004 - 2005	Nghiên cứu quy trình nhân nhanh <i>in vitro</i> cây Ba kích	Thạc sĩ
11	Tăng Bá Dương	2002	Nghiên cứu tạo cụm chồi <i>in vitro</i> cây Ba kích	Kỹ sư
12	Phạm Việt Hùng	2003	Sử dụng chỉ thị STS liên quan đến tính kháng đạo ôn và chất lượng gạo để đánh giá một số dòng lúa lai giữa các giống lúa kháng đạo ôn và chất lượng.	Cử nhân
13	Đào Thị Hải Lý	2003	Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả nuôi cấy bao phấn lúa ở con lai F1 của một số cặp lai	Cử nhân
14	Trần Thị Thiêm	2002	Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật cắt lớp mỏng tế bào <i>in vitro</i> giống Địa lan thương mại (Miss Kim)	Cử nhân
15	Nguyễn Mai Lan	2002	Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật cắt lớp mỏng tế bào nhân nhanh <i>in vitro</i> giống Địa lan thương mại (Miss Kim)	Cử nhân
16	Đỗ Thị Diễm	2003	Nghiên cứu nhân nhanh một số giống Địa lan bản địa bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào	Cử nhân

17	Đinh Thị Lan	2004	Góp phần nghiên cứu tối ưu hóa quá trình nhân <i>in vitro</i> ở một số giống Địa lan quý	Cử nhân
18	Đỗ Đức Thịnh	2003	Xây dựng một số khâu kỹ thuật chính ở giai đoạn sau nuôi cấy mô trên giống Địa lan thương mại <i>Cymbidium Miss Kim</i>	Cử nhân
19	Phan Bá Lợi	2003	Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật cho phong lan (Hồ điệp và Vanda) và địa lan (<i>Cymbidium Miss Kim</i>) nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm và giai đoạn trưởng thành	Cử nhân
20	Trần Đình Giỏi	2002-2003	Nuôi cấy túi phấn các tổ hợp lai giữa giống lúa IR64 với các giống lúa dạng hình mới	Thạc sĩ
21	Nguyễn Xuân Trường	2004-2005	Nghiên cứu quy trình kỹ thuật nuôi trồng và điều khiển ra hoa Lan Hồ điệp <i>in vitro</i>	Thạc sĩ
22	Vũ Thị Hoài	2004-2005	Nghiên cứu các chế độ dinh dưỡng cho cây hoa Địa Lan sau nuôi cấy <i>in vitro</i>	Thạc sĩ
23	Trần Văn Dương	2004-2005	Phân tích bản đồ di truyền và nhận biết QTLs tính kháng bệnh vi khuẩn héo xanh ở lạc (<i>Puccinia arachidis</i>)	Thạc sĩ
24	Đỗ Thị Thư	2004-2005	Nghiên cứu sự phân ly kiểu gen kháng bệnh rỉ sắt trong thế hệ F4 của tổ hợp lai giữa hai giống lạc ICG950166 và L12	Thạc sĩ

4.6. SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI

4.6.1. Sản phẩm công nghệ của đề tài

- Quy trình công nghệ nhân giống *in vitro* quy mô bán sản xuất (10000 cây/năm): 04 (Keo lai, Bạch đàn lai, Ba kích, Địa lan).
- Quy trình nhân giống *in vitro* quy mô phòng thí nghiệm: Lúa bất dục và cây Điều: 02
- Hợp đồng chuyển giao công nghệ (Keo lai và Bạch đàn lai): 03
- Tập đoàn giống lúa, ngô, đậu tương, lạc, Keo lai...: 532 giống
- Phương pháp tạo giống lúa, ngô, lạc và đậu tương: 06
- Tạo được dòng cây nguyên liệu mới: 414 dòng (lúa, ngô, lạc, đậu tương)
- Khảo nghiệm cơ bản: 03 dòng lúa, 03 dòng ngô và 01 dòng đậu tương

- Mỗi phân tử liên quan đến kháng đạo ôn và chất lượng gạo: 22 chỉ thị (trong đó 2 chỉ thị đánh giá tính kháng đạo ôn và 05 chỉ thị đánh giá chất lượng ở lúa gạo; 02 chỉ thị liên quan tới tính kháng bệnh khô vằn ở ngô; 8 chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt lác; 03 chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn và 02 chỉ thị Satt042, Satt173 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương).
- Bảng số liệu về đặc điểm và trình tự chỉ thị liên quan đến việc đánh giá đa dạng di truyền và phân tích một số tính trạng quan tâm đối với lúa, ngô, lác và đậu đỗ làm cơ sở cho việc lai tạo giống: 6 bảng.
- Đào tạo: 02 nghiên cứu sinh; 07 cao học; 13 cử nhân và 03 kỹ sư.
- Đào tạo nâng cao: 50 cán bộ.
- Công bố 26 bài báo và 01 bài báo đang chuẩn bị gửi đăng tạp Euphytica
- Báo cáo khoa học: 7 báo cáo.
- Cử 02 cán bộ sang trao đổi hợp tác và học tập ở Ấn Độ

4.6.2. Sản phẩm giao nộp của đề tài đã ký trong Hợp đồng nghiên cứu với Chương trình KC.04

TT	Tên sản phẩm	Số lượng đăng ký	Chỉ tiêu KT - KT đăng ký	Kết quả đạt được		Đánh giá (so với Hợp đồng)
				Số lượng sản phẩm	Chất lượng sản phẩm	
1	Quy trình công nghệ nuôi cấy mô.	03 quy trình	Quy mô bán sản xuất (1 vạn cây/năm)	04 (Cây Keo lai, Bạch đàn lai, Ba Kích và Địa lan)	Quy mô 1 vạn cây/năm	Vượt mức (01 QT cây Ba kích)
2	Xác định chỉ thị phân tử liên quan đến bệnh đạo ôn (lúa), khô vằn (ngô), rỉ sắt, héo xanh và chịu hạn ở lác và đậu đỗ.	04 loại	Áp dụng rộng rãi trong tạo giống	6 loại chỉ thị: - 07 chỉ thị SSR liên quan kháng bệnh rỉ sắt ở lác. - 03 chỉ thị SSR liên quan tính chịu hạn ở đậu tương. - 02 chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương - 02 chỉ thị STS liên quan tính kháng bệnh đạo ôn. - 06 chỉ thị STS liên quan đến chất lượng ở lúa gạo.	Áp dụng rộng rãi trong tạo giống lác kháng bệnh rỉ sắt, đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt; lúa chất lượng và kháng đạo ôn; Ngô năng suất kháng khô vằn	Vượt mức 01 loại (chỉ thị liên quan đến chất lượng lúa gạo)

				- 02 chỉ thị SSR liên quan kháng bệnh khô vằn ở ngô		
3	Tạo dòng mới có triển vọng đối với: - Lúa chất lượng, năng suất, kháng bệnh đạo ôn	3 dòng	- Năng suất 5 - 6 tấn/ha, chất lượng tốt, đạt tiêu chuẩn xuất khẩu	- Hoàn thành khảo nghiệm cơ bản với 3 dòng: Dòng lúa NTCĐDB-5 (3 vụ), dòng, OM3566 và HPKW1 (vụ thứ nhất). <u>Thử nghiệm trồng 3673 ha dòng NTCĐDB-5.</u>	Hạt gạo dài đủ tiêu chuẩn xuất khẩu, cơm ngon dẻo, NS đạt trên 5 tấn/ha, kháng đạo ôn.	Vượt mức
	- Khu vực hoá giống lúa chịu hạn DR3	01 giống	- Trồng vùng đất khó khăn về nước, NS: đạt tới 5 tấn/ha.	- 1 giống: DR3 đã được công nhận giống Tạm thời 16/12004 (khu vực hoá)	- Trồng trên ruộng khó khăn về nước NS đạt 5 tấn/ha.	Hoàn thành
	- Ngô kháng bệnh khô vằn và năng suất	2 dòng	- Năng suất 6-8 tấn/ha, kháng khô vằn	- 3 dòng: Hoàn thành cơ bản vụ thứ nhất đối với dòng CN4, CN5 và F145. <u>Triển khai sản xuất thử 200 ha các dòng CN4, CN5 và F145.</u>	- NS đạt 6,6-7,5 tấn/ha, chịu khá bệnh khô vằn, hạt vàng đều, bắp dài 23 cm.	Vượt mức
	- Lạc và đậu tương kháng bệnh rỉ sắt/héo xanh/chịu hạn	1 dòng	Năng suất đạt 3-4 tấn/ha	- 1 dòng: Gửi khảo nghiệm vụ thứ nhất (vụ đông 2004) dòng đậu tương ĐT213.4.347 (ĐT26). <u>Triển khai sản xuất thử 5 ha.</u>	- NS đạt trên 3 tấn/ha, chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt.	Hoàn thành
	- Ngưu Tát có chất lượng tốt	1 dòng	Chất lượng như giống gốc	- Các dòng mô sẹo đang được tiếp tục nghiên cứu	- Chưa đánh giá được	Đang tiến hành

4.7. TỒN TẠI CỦA ĐỀ TÀI

Cần tối ưu các điều kiện nuôi cấy để khắc phục hiện trạng hoá nâu trong khi nuôi cấy mô sẹo và tăng hệ số nhân đối với cây Ngưu tất.

4.8. HỢP TÁC QUỐC TẾ

- Viện nghiên cứu cây trồng màu Quốc tế (ICRISAT), Ấn Độ.
- Trường Đại học tổng hợp Tuskegee, Mỹ.
- Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI).
- Công ty hoa, Thái Lan.
- Trung tâm công nghệ gen và công nghệ sinh học Quốc tế (ICGEB).

4.9. TÌNH HÌNH SỬ DỤNG KINH PHÍ

- Kinh phí SNKH: 3.000.000.000 đồng
- Tổng kinh phí đã quyết toán: 2.909.165.590 đồng

Các khoản mục đã chi như sau:

TT	Mục chi	Kinh phí (đồng)	Ghi chú
1	114+101: Thuê khoán chuyên môn	1.161.500.000	
2	119+109: Nguyên vật liệu + năng lượng	1.278.000.000	
3	117: Sửa chữa nhỏ	78.000.000	
4	145: Thiết bị máy móc	210.000.000	
5	134: Chi khác	181.665.590	Còn 90.834.410 chưa chi hết của mục 115: Đoàn ra
	Tổng	2.909.165.590	

CHƯƠNG V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. KẾT LUẬN CHÍNH

- 1) Nghiên cứu hoàn thiện 04 quy trình công nghệ nhân giống *in vitro* quy mô bán sản xuất (công suất 10000 cây/năm) đối với cây Keo lai và Bạch đàn lai (ba dòng Keo lai: BV10, BV16, BV32 và ba dòng Bạch đàn lai: U29C3, U29E1, U29U24; đây là các dòng cây mới chọn tạo được), hoa Địa Lan (7 giống thương mại và 2 giống bản địa) và cây Ba kích. Hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* quy mô phòng thí nghiệm đối với hai giống lúa bất dục đực (Nhị 32A và BoA) và hai giống điều cao sản (PN1 và BO1).
- 2) Đã chuyển giao công nghệ nhân giống *in vitro* và giống gốc đối với cây Keo lai và Bạch đàn lai cho ba cơ sở nghiên cứu và sản xuất đó là:
 - Trung tâm Phát triển Khoa học Công nghệ Hà Tĩnh
 - Trường trung học kinh tế – kỹ thuật và dạy nghề tỉnh Tuyên Quang
 - Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Quảng Trị
- 3) Lần đầu tiên ở Việt Nam đã kết hợp giữa phương pháp tạo giống truyền thống với phương pháp hiện đại trong chọn tạo các giống chất lượng, năng suất và chịu khá với điều kiện bất lợi (sâu bệnh, hạn...) ở lúa, ngô, lạc và đậu tương.
- 4) Thông qua việc đánh giá đa dạng tập đoàn giống lúa (kháng bệnh bạc lá vi khuẩn), ngô (năng suất, chất lượng và kháng bệnh khô vằn), lạc (kháng bệnh héo xanh vi khuẩn và rỉ sắt) và đậu tương (chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt) đã xác định bố mẹ các tổ hợp lai ưu tú theo mục đích chọn tạo như:
 - Tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá: lai các giống OM3242-50, OM3496-9, NTCD1-12, NTCD1-16 có thể lai với giống có tính kháng bệnh cao như DV85.
 - Tạo giống ngô năng suất, chất lượng, kháng khô vằn: dòng 11 x dòng 7 (tạo được dòng ngô CN4), dòng 8 x dòng 7 (tạo được dòng CN5), dòng 10 x dòng 7 (tạo được dòng ngô F145).

- Tạo giống lạc năng suất kháng bệnh rỉ sắt: ICG950166 x L12, ICG99501 x L08, L12 x ICG11312; Tạo giống lạc kháng bệnh héo xanh vi khuẩn: Gié Nho Quan x L08, Gié Nho Quan x L05, BW40 x V79,...
 - Đậu tương năng suất và chịu hạn: ĐT2000 x Cúc vàng ĐT2000 x ĐT12...
- 5) Đã xác định và sử dụng 22 chỉ thị phân tử để chọn nhanh ra các dòng có triển vọng làm giống ở giai đoạn sớm, cụ thể: 02 chỉ thị RG64, RZ536 liên kết gen kháng bệnh đạo ôn và 05 chỉ thị Wxa, RG171, G243, RZ284 và RG28 liên quan đến chất lượng ở lúa gạo (hàm lượng amylose, độ bền gen, mùi thơm, độ dài hạt...); 02 chỉ thị Phi123 và Phi065 liên quan tới tính kháng bệnh khô vằn ở ngô; 8 chỉ thị L26, L50, L40, L43, L44, L31, L54 và L38 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc; 03 chỉ thị Satt489, Satt373, Satt150 liên quan tính chịu hạn và 02 chỉ thị Satt042, Satt173 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương.
- 6) Đề tài đã tạo được gần 3000 dòng cây làm vật liệu đầu dòng cho nghiên cứu chọn lọc tiếp theo. Đến nay đã thu 414 dòng ưu tú ở thế hệ thứ 3, cụ thể: 200 dòng lúa, 114 dòng ngô và 100 dòng đậu tương, lạc.
- 7) Đã tiến hành khảo nghiệm cơ bản các dòng mới tạo được: Hoàn tất việc khảo nghiệm cơ bản 3 vụ dòng lúa NTCĐĐB-5, vụ thứ nhất đối với dòng lúa OM3566 (lúa xuất khẩu) và hai dòng ngô CN4, CN5. Đang tiến hành khảo nghiệm vụ thứ nhất dòng lúa HPKW1 (lúa chất lượng kháng đạo ôn), dòng ngô F145 và dòng đậu tương ĐT213.4.347 (ĐT26).
- 8) Triển khai sản xuất thử dòng NTCĐĐB-5 với diện tích 3673 ha ở nhiều tỉnh phía Nam và 100 ha dòng ngô F145. Dự kiến đăng ký xin công nhận giống Tiến bộ vào năm 2005 cho cả hai giống này.
- 9) Mở rộng sản xuất giống lúa mới DR3 với tổng diện tích sản xuất quy mô đạt gần 3000 ha. Năng suất luôn vượt các giống đang trồng như Khang dân và Q5 từ 10-20 % trên các chân ruộng bạc màu thiếu nước. Giống lúa mới DR3 đã được bộ NN &PTNT công nhận là giống khu vực hoá ngày 16/1/2004.
- 10) Đã công bố 26 bài báo, 01 bài sẽ đăng tạp chí Euphytica; đào tạo 02 NCS, 07 Thạc sĩ, 13 Cử nhân và 03 Kỹ sư, đào tạo 50 lượt cán bộ nâng cao cho các đơn vị phối hợp, 7 báo cáo khoa học. Cử 02 cán bộ sang trao đổi hợp tác và học tập ở Ấn Độ.

5.2. KIẾN NGHỊ

Cho kéo dài đề tài thêm 02 năm nữa để tiếp tục đánh giá tính ổn định di truyền một số tính trạng chọn lọc (chống chịu sâu bệnh, năng suất và chất lượng) các dòng triển vọng làm giống ở lúa, ngô và đậu, lạc để phát triển thành giống và hoàn tất nội dung nghiên cứu tạo dòng chịu nóng đối với cây Ngưng tất.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

1. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn, Lương Thị Hoan, Lê Trần Bình, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội (2003). Nhân giống một số loài cây trồng rừng có năng suất, chất lượng cao bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 910-914.
2. Bùi Mạnh Cường, Đoàn Thị Bích Thảo, Ngô Thị Minh Tâm, Ngụy Hương Lan, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Đinh Thị Phòng (2003). Sử dụng chỉ thị RAPDs trong nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn giống và ứng dụng để chọn lọc tổ hợp ngô lai năng suất cao phục vụ sản xuất. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 745-749.
3. Bùi Văn Thắng, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Nguyễn Văn Thắng, Trần Văn Dương (2003). Đánh giá tính đa dạng của một số giống lạc trong tập đoàn giống chống chịu bệnh gỉ sắt bằng kỹ thuật RAPD. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 805-809.
4. Dinh Thi Phong, Emma Mace, Jonathan H. Crouch (2003). Application of SSR markers in diversity analysis of groundnut genotypes resistant to early leaf spot. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (3): 333-346.
5. Lê Thị Bích Thủy, Nguyễn Đức Thành (2003). Kiểm tra tính chịu hạn ở một số dòng lúa lai được chọn lọc dựa vào chỉ thị phân tử STS liên quan đến tính chịu hạn ở lúa. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (2): 227-236.
6. Lê Xuân Đắc, Bùi Văn Thắng, Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Lê Duy Thành (2003). Nghiên cứu ảnh hưởng của tia gamma (Co^{60}) đến khả năng

- sống sót và tái sinh cây từ mô sẹo ở một số giống lúa địa phương. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 750-753.
7. Lê Xuân Đắc, Bùi Văn Thắng, Lê Trần Bình, Lê Duy Thành, Lê Thị Muội (2003). Đánh giá đa dạng di truyền của một số giống lúa Tám ở Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (4): 493-501.
 8. Lê Xuân Thám, Hồ Quang Cua, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Ngọc Ngân, Nguyễn Thị Ngọc Tú, Lê Trần Bình, Lê Xuân Đắc (2003). Các dòng đột biến phóng xạ thuần giống lúa tám thơm (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 962-966.
 9. Ngô Hữu Tình, Bùi Mạnh Cường, Ngô Thị Minh Tâm, Ngụy Hương Lan, Đinh Công Chính, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Đinh Thị Phòng (2003). Chọn tạo dòng ngô thuần bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 862-865.
 10. Nguyễn Hữu Cường, Nguyễn Thị Kim Anh, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình (2003). Mối tương quan giữa hàm lượng proline và tính chống chịu ở cây lúa. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (1): 85-93.
 11. Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Xuân Trường, Đỗ Năng Vịnh (2003). Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống và nuôi trồng phong lan *Phalaenopsis* (Lan Hồ Điệp). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 850-855.
 12. Nguyễn Thị Kim Liên, Nông Văn Hải, Nguyễn Đức Thành (2003). Kết quả bước đầu của việc ứng dụng chỉ thị SSR trong chọn dòng chịu hạn ở lúa cạn. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 898-901.
 13. Phan Thị Bảy, Quách Thị Liên, Đào Thị Hạnh, Phạm Việt Hùng, Lê Thị Muội, Nguyễn Đức Thành (2003). Sử dụng chỉ thị phân tử STS trong đánh giá tính kháng bệnh đạo ôn và chất lượng gạo ở một số dòng lúa lai và một số dòng từ nuôi cấy bao phấn cây F1. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 740-744.

14. Trần Phương Liên, Lương Thị Thu Hường, Trần Thị Trường, Lê Thị Muội (2004). Sự phân ly các chỉ thị SSR trong thế hệ F3 của tổ hợp lai giữa hai giống đậu tương Cúc Vàng và ĐT2000. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(1): 1-8.
15. Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải, Lê Thị Muội (2003). Protein của một số giống đậu tương có khả năng chịu nóng, chịu hạn khác nhau. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (1): 95-101.
16. Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải, Lê Thị Muội, Trần Đình Long (2003). Một số đặc tính liên quan đến chất lượng hạt và khả năng chịu nóng, chịu hạn ở đậu tương. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội 12-17/12: 771-775.
17. Trần Thị Phương Liên, Lê Thị Muội.(2003). Nghiên cứu đa dạng di truyền một số giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử SSR. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1(3): 347-354.
18. Vũ Hoài Sâm, Phạm Văn Hiền, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Đinh Thị Phòng (2003). Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây ba kích (*Morinda officinalis* How Rubiaceae). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 795-798.
19. Vũ Ngọc Phượng, Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Minh Tuấn, Thái Xuân Du (2003), Bước đầu nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây điều *Anacardium occidentale* L. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội 16-17/12: 949-952.
20. Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Thắng, Lê Thị Muội (2004), Sử dụng chỉ thị SSR để phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc (*Arachis hypogaea* L.) Việt Nam kháng bệnh rỉ sắt (đã gửi đăng TCKHCN).
21. Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Nguyễn Thị Hải Hà, Lê Duy Thành, Nguyễn Văn Việt (2004), Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá lúa vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* bằng kỹ thuật RAPD. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng nông lâm nghiệp miền núi*. Thái Nguyên 23/9: 571-574.
22. Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình (2004), Kết quả chọn tạo giống lúa DR3. *Tạp chí KH và CN* (Gửi đăng 2002).

23. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Vũ Thị Hoài, Nguyễn Thị Lý Anh (2004), Nghiên cứu quy trình kỹ thuật sau in vitro cho cây địa lan (gửi đăng Tạp chí NN và PT nông thôn).
24. Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Quang Thạch (2004), Nghiên cứu tạo củ lily trồng từ củ in vitro (gửi đăng Tạp chí NN và PT nông thôn).
25. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Thị Hoài (2004), Nghiên cứu nhân nhanh in vitro giống địa lan thương mại *Miss Kim* (gửi đăng Tạp chí NN và PT nông thôn).
26. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Thị Hoài (2004), Nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân nhanh *in vitro* một số giống Lan có giá trị (gửi đăng tạp chí KHKTNN trường ĐHNNT).
27. D.T. Phong, E.S. Mace, H.D. Upadhyaya, S. Chandra, J.H. Crouch (2005), Microsatellite marker analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases (Đang chuẩn bị gửi đăng tạp chí Euphytica).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Tĩnh, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, (1998), Kết quả chọn tạo và triển khai hai giống lúa mới DR1 và DR2 bằng công nghệ tế bào thực vật, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, XXXVI, 4, tr. 6-14.
2. Ahn S.W., Bollich C.N., Tanksley S.D., (1992), RFLP tagging of a gene for aroma in rice. *Theor. Appl. Genet.* 87: 27-32.
3. Ayres N.M., Mc Clung A.M., Larkin P.D., Bligh H.F.J., Jones C.A., Park W.D., (1997), Microsatellite ADN a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 94: 773-781
4. Bao J.S., Corke H., Sun M., (2002), Microsatellites in starch- synthesizing genes in relation to starch physiochemical properties in waxy rice (*O.zativa sativa* L.). *Theor. Appl. genet.* 105: 898-905.
5. Barghchi M., Alderson P.G., (1983), In vitro production of *Pistacia* species. *Acta Hort.* 131, 49-60.
6. Bộ KHCN & MT. *Sách đỏ Việt Nam*. NXB KHKT, Hà Nội, 1996.

7. Berner D.K. Hoft B.J., (1986), Inheritance of scent in America long grain rices. *Crop Sci.* 26:157-159
8. Bùi Văn Thắng, Trần Văn Dương, Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Thắng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, (2003), *Báo cáo khoa học*, Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội, 805-809.
9. Boggetti B., Jasik J., Mantell S., (1999), In vitro multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. *Plant Cell Rep.* 18: 456-461.
10. Cao H., Imparato R., Radosevich J.M., Guan H., Keeling P.L., James M.G., Myers A.M., (1999), Identification of soluble starch synthase activity of maize endosperm. *Plant Physiol.* 120: 205-215.
11. Chakravarty A.K., (1948), A genetic study of the botanical characters in rice. *Bull. Bot. Bengal* 2:50-57
12. Chang T.T., Li C.C., (1991), Genetics and breeding. In : Luh BS . *Rice production* . Van Nostrand Reinhold , New York pp32-101
13. Dương Tấn Nhựt, Da Silva J.A.T., Bùi Văn Lệ, Kiên Trần Thanh Vân, (2003), Thin cell layer (TCL) morphogenesis as a powerful tool in woody plant and fruit crop micropropagation and biotechnology, floral genetics and genetic transformation. In: Jain SM & Ishii K (eds.) *Micropropagation of woody trees and fruits*, pp. 783-814, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
14. Das S., Jha T.B., Jha S., (1996), In vitro propagation of cashew nut. *Plant Cell Rep.* 15: 615-619.
15. Dhulappanavar C.V., (1976), Inheritance of scent in rice. *Euphytica* 25: 659-662.
16. Dhulappanavar C.V., Mensikai S.W., (1969), Inheritance of scent in rice. *Karnataka Univ. J.* 14:125-129.
17. Dice L.R., (1945). *Ecology* 262: 97-302.
18. Dong J.Y., Tsuzuki E., Terao H., (2000), Inheritance of aroma in four rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *IRRI International Rice Research Notes* 25.

19. Dwivedi S.L., Crouch J.H., (2003), *Proceeding of a Workshop for the Asian Development Bank supported Project on molecular breeding of sorghum, groundnut ADN chickpea*, ICRISAT: 28-43.
20. Dwivedi S.L., Gurtu S., Chandra S., Yuejin W., Nigam S.N, (2001), *Plant breeding* 120: 345-349.
21. Egnin M., (1996), Protocol of DNA isolation. Plant biotechnology lab. Milbank Hall RM 104.
22. FAO (2002) <http://www.fao.org>T.
23. Ferguson M.E., Burow M., Schultz S., Bramel P., Paterson A., (2003), *Euphytica*, Submitted.
24. Ghose R.L.M., Butany W.T., (1952), Studies on the inheritance of some characters in rice. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 12:26-30.
25. Gimenes M.A., Lopes C.R., Valls J.F.M., (2002), *Genetics ADN Molecular Biology* 25(3): 349-353.
26. Goh C.J., Lakshmanan P., Loh C.S., (1994), High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Plant Sci.* 101: 173-180.
27. Govindewami và Ghose, (1969), The time of harvest, moisture content ADN method of drying on milling quality of rice . *Oryza* 6: 54-66.
28. Halward T., Stalker H.T., Korchert G., (1992), *Plant Mol. Bio.* 18:315-325.
29. Halward T., Stalker H.T., Korchert G., (1993), *Theor. Appl. Genet* 87:379-384.
30. Halward T.M., Stalker H.T., LaRue E., Kochert G., (1991), *Genome* 34:1013-1020.
31. He G., Meng R., Newman M., Gao G., Pittman R.N., Prakash C.S., (2003), *BMC Plant Biology* 3: 3-9.
32. He G., Prakash C.S., (1997), *Euphytica* 97: 143-149.
33. He G., Prakash C.S., (2001), *Genetic Resources ADN Crop Evolution* 48: 347-352.
34. He P., Li S.G., Qian Q., Ma Y.Q., Li J. Z ., Wang W.M., Chen Y., Zhu L. H., (1999), Genetic analysis of rice grain quality. *Theor. Appl. Genet.* 98: 502-508.

35. Hopkins M.S., Casa A.M., Wang T., Mitchell S.E., Dean R.E., (1999), *Crop Sci.* 39: 1243-1247.
36. Huang N., Angeles E.R., Domigo J., (1997), Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR, *Theo. Appl. Genet*, 313-320.
37. IRRI (1996), *StADNard Evlution System* . International rice research Institute , Los banos, The Philippine.
38. Jaccard P., (1908). *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44 223-270.
39. Jain S.M., Greert-JanDeKlerk, (1998), Somaclonal Variation in Breeding and Propagation of Ornamental, *Plant Tiss. Cult. Bio.*, 4 (2),63-75.
40. Kadam B.S., Patankar V.K., (1938), Inheritance of aroma in rice. *Chron. Bot. IV.* 6:496-497.
41. Kolodny G.M, (1984), *Anal. Biochem.* 138(1): 66-67.
42. Kozai T., (1991), Micropropagation under photoautotrophic conditions. *In: Debergh PC ADN Zimmerman RH (eds): Micropropagation, Technology ADN Application*, pp. 447-469, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The NetherlADNs.
43. Kruskal J.B., Wish M., (1978), Multidimensional Scaling. Sage, Newbury Park .
44. Kuipers A.G.J., Jacobsen E., Visser R.G.F., (1994), Formation ADN deposition of amylose in the potato tuber starch granule are affected by the reduction of granule-bound starch synthase gene expression . *Plant Cell* 6: 43-52.
45. Ladner E.S., Botstein D., (1989), Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage map. *Genetics* 121:185-199.
46. Lance G.N., Williams W.T., (1967), *Computer J.* 9: 373-380.
47. Lanham P.G., Fennell S., Moss J.P., Powel W., (1992), *Genome* 35 885-889.
48. Leva A.R., Falcone A.M., (1990), Propagation ADN organogenesis in vitro of *Anacardium occidentale* L. *Acta Hort.* 280: 143-145.
49. Li Y,F,, Gong D.H., Yang M., Zhao Y.M., Luo Z.P., (2003), Inhibition of the oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis*, a Chinese traditional herbal

- medicine, on the corticosteron induced apoptosis in PC12 cells. *Life Sci.* 72(8): 933-42.
50. Li Y.F., Yuan L., Xu Y.K., Yang M., Zhao Y.M., Luo Z.P., (2001), *Antistress effect of oligosaccharides extracted from Morinda officinalis in mice ADN rats*. *Acta Pharmacol. Sin.* 22(12):1084-8.
51. Litt M., Luty J.A., (1989), - *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
52. Litz R.E., Knight Jr. R.J., Gazit S., (1984), In vitro somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. *Sci. Hort.* 22: 233-240.
53. Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishma T.G., Yano M., Bhatia C.R., (1997), *Mol. Breed*: 387-103.
54. Murashige T., Skoog F., (1962), A revised medium for rapid growth ADN bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
55. Nagaraju M, D Chaudhary, MJB Rao. 1975. A simple technique to identify scent in rice ADN inheritance pattern of scent. *Curr. Sci.* 44: 599
56. Nei M., Li W.H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
57. Nguyễn Chiêu, (1978), *Phân bố ba kích ở miền Bắc Việt Nam*. Thông báo dược liệu 10, 30.
58. Nguyễn Chiêu, (2001), *Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp Bộ KHYD 02-21R - Viện Dược liệu*.
59. Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Kim Linh, Đoàn Thị Ái Thuyền, Thái Xuân Du, (2002), Effects of nutrient concentration ADN ventilation condition of the culture vessel on the growth of Paulownia (*Paulownia fortunei*) cultured in vitro. *Advan. Nat. Sci. Vol.3* (3): 281-287.
60. Paik-Ro O.G., Smith R.L., Knauff D.A., (1992), *Theor. Appl. Gene.* 85: 550-560.
61. Panaud T., Chen O.X., McCouch S.R., (1996), *Mol. Gen. Genet* 252:597-607.
62. Paramasivam K., Jayasekhar M., Rajasekharan R., (1990), *Madras Agricultural Journal* 7750-52.

63. Philip V.J., Unni P.N., (1984), In vitro propagation of cashew for crop improvement. *In: Bhaskara Rao EVV & Khan HH (eds.) Cashew Research ADN Development*, pp. 77-82, CPCRI, Kasargod, India.
64. Philip V.J., Unni P.N., (1984), In vitro propagation of cashew for crop improvement. *In: Bhaskara Rao E.V.V., Khan H.H. (eds.), Cashew Research ADN Development*, pp. 77-82, CPCRI, Kasargod, India.
65. Pierik R. L. M., (1987), *In vitro culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
66. Pooni H.S., Kumar, Khush G.S., (1992), A comprehensive model for disomically inherited metrical traits expressed in triploid tissues . *Heredity* 69: 166-174.
67. Reddy R.P., Sathyanarayanaiah K., (1980), Inheritance of aroma in rice. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 40:327-329.
68. Richharia R.H., Minsro B., Kulkani V.A., (1965), Studies in the world genetic stock of rice. IV. Distribution of scent rice. *ORYZA* 2:57-59.
69. Rohlf F.J., (2000), *Applied Biostatistics* Inc., New York.
70. Rongwen J., Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Lavi U., Cregan P.B., (1995). *Theor. Appl. Genet.* 90: 43-48.
71. Sadavisam, Manikam, (1992), *Biochemical method for agricultural sciences* Wiley Eastern, New Delhi ,India.
72. Seung Yeob Lee , Joong Ho Lee , Tae Oh Kwon, (2003), Selection of salt tolerance doubled haploids in rice anther culture. *Plant Cell, tissue ADN Organ Culture* 74:143-149.
73. Shi C.H., Zhu J., Zhang R.C., Chen G.L., (1997), Genetic ADN heterosis analysis for cooking quality traits of indica rice in different environments. *Theor. Appl. Genet* 95:294-300.
74. Sibi M., (1976), La moyion de program genetique chez les vegetaus superieurs. II Aspect experimental obtention do variants par culture de.
75. Singh A.K., Mehan K.S.N., (1997), *Information Bulletin No. 50*, ICRISAT.

76. Sneath P.H., Sokal R.R., (1973), *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman ADN Co. San Francisco 573.
77. Sokal R.R., Michener C.D., (1958), *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38: 1409-1438.
78. Sood B.G., Siddiq E.A., (1978), A rapid technique for scent determination in rice. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 38:268-271
79. Soon Y.Y., Tan B. K. H., (2002), Evaluation of the hypoglycemic ADN anti-oxydant activities of *Morinda officinalis* in the streptozotoin-induced diabetic rats. *Singapore Medical Journal*, 43(2): 77-85.
80. Subranmanian V., Gurtu S., Rao R.C.N., Nigam S.N., (2000), *Genome* 43:656-660.
81. Sun G., Bond M., Nass H., Martin R., Dong Z., (2003), *Theor. Appl. Genet.* 106: 1059-1067.
82. Tang S.X., Khush G.S., Mohanty B.O., (1991), Genetic of gel consistency in rice . *Indian J. Genet.* 70(2) : 69-78.
83. Trần Thanh Vân K., (2003), Thin cell layer concept. *In*: Duong Tan Nhut, Van Le B., Tran Thanh Van K., Thorpe T, (eds.) Thin cell layer culture system: regeneration ADN transformation applications, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The NetherlADNs. pp. 1-16.
84. Tripathi R.S., Rao M.J.B.K., (1979), Inheritance ADN linkage relationship of scent in rice. *Euphytica* 28:319-323
85. Tsuzuki E., Shimokawa E., (1990), Inheritance of aroma in rice. *Euphytica* 46:157-159.
86. Van Sint Jan V., (1992), Selection *in vitro* on characterization of lines of cells on plants *Ozyra Sativa* L. tolerant aluminum., PhD. Thesis, University Catholique de Louvain.
87. Viện Dược liệu, *Tài nguyên cây thuốc Việt Nam*. NXB KHKT, Hà Nội, 1993.
88. Viện Dược liệu. *Selected Medicinal Plants in Vietnam*, NXB KHKT, 1999 (in English).
89. Weir B.S., (1990), *Methods for discrete genetic data*. Sinauer Associates, Inc., SunderlADN. Mass. 125.

90. Yamamori M., Fujita S., Hayakawa K., Matsuki J., Yasui T. (2000), Genetic elimination of a starch granule protein , SGP-1 of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *Theor. Appl. Genet* 101:21-29.
91. Yanagisawa T., Kiribuch-Otobe C., Hirano H., Suzuki Y., Fujita M., (2003). Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker. *Theor. Appl. Genet* 107:84-88.
92. Yoshikawa M., Yamaguchi S., Nishisaka H., Yamahara J., Murakami N., (1995), *Chemical constituents of Chinese natural medicine, morinda radix, the dried roots of Morinda officinalis How: structures of morindolide ADN morofficinaloside*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 43(9): 1462-5.
93. Zhang Z.Q., Yuan L., Yang M., Luo Z.P., Zhao Y.M., (2002), *The effect of Morinda officinalis How, a Chinese traditional medicinal plant, on the DRL 72-s schedule in rats ADN the forced swimming test in mice*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 72(1-2): 39-34.
94. Zheng K., Hoang N., Bennett J.F.F.T., Khush G.S., (1995), *PCR-Based marker assisted selection in rice breeding*. IRRR.

VKH&CNVN
VCNSH

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Báo cáo tóm tắt tổng kết khoa học và kỹ thuật Đề tài:
NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO
VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHỤC VỤ
CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG

Mã số: KC.04.08

Chủ nhiệm: PGS.TSKH. Lê Thị Muội
Thư ký: TS. Đinh Thị Phòng

Cơ quan chủ trì: Viện Công nghệ Sinh học
Cơ quan quản lý: Viện KH và CN Việt Nam
Thời gian thực hiện: 36 tháng (từ 10/2001 đến 10/2004)

Hà Nội, 12/2004

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

AFLP:	Đa hình chiều dài các phân đoạn ADN được nhân bản
CTPT:	Chỉ thị phân tử
DNA:	Deoxyribonucleic axit
ICRISAT:	Viện nghiên cứu cây trồng màu Quốc tế
IRRI:	Viện Nghiên cứu lúa quốc tế
KHCN và MT:	Khoa học Công nghệ và Môi trường
KHKTTN:	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp
KT:	Kỹ thuật
LĐBSCL:	Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long
MAS:	Chọn giống có hỗ trợ của chỉ thị phân tử
MDS:	Biểu đồ đa chiều
NC và TN:	Nghiên cứu và Thực nghiệm
NCBP:	Nuôi cấy bao phấn
NCCN:	Nghiên cứu cây ngô
NCCTR:	Nghiên cứu cây trồng rừng
PCR:	Phản ứng trùng hợp chuỗi DNA
PIC:	Hàm lượng thông tin về tính đa hình
RAPD:	Đa hình đoạn DNA được nhân bản ngẫu nhiên
SHND:	Viện Sinh học nhiệt đới
SHNN:	Viện Sinh học Nông nghiệp
SHPT:	Sinh học phân tử
SSRs:	Các trình tự lặp lại đơn giản
TH:	Trung học
TT:	Trung tâm
TTKHSX:	Trung tâm khoa học sản xuất.

Danh sách các cơ quan phối hợp nghiên cứu và những người thực hiện

Tên đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống cây trồng.

Mã số: KC.04.08

Thuộc chương trình: Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học

Thời gian thực hiện: 10/2001 – 10/2004

Cơ quan chủ trì: Viện Công nghệ sinh học

Cơ quan chủ quản: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Các cán bộ tham gia:

TT	Họ tên	Đơn vị
1	PGS.TSKH. Lê Thị Muội	Viện Công nghệ Sinh học
2	PGS.TS. Lê Trần Bình	Viện Công nghệ Sinh học
3	TS. Đinh Thị Phòng	Viện Công nghệ Sinh học
4	NCS. Lê Xuân Đắc	Viện Công nghệ Sinh học
5	CN. Bùi Văn Thắng	Viện Công nghệ Sinh học
6	CN. Phan Trọng Hoàng	Viện Công nghệ Sinh học
7	KTV. Nguyễn Thị Nhị	Viện Công nghệ Sinh học
8	CN. Bùi Chi Lăng	Viện Công nghệ Sinh học
9	KTV. Nguyễn Thị Dưa	Viện Công nghệ Sinh học
10	CN. Trương Thu Thủy	Viện Công nghệ Sinh học
11	CN. Nguyễn Minh Hùng	Viện Công nghệ Sinh học
12	CN. Nguyễn Hồng Châu	Viện Công nghệ Sinh học
13	CN. Từ Duy Thắng	Viện Công nghệ Sinh học
14	CN. Nguyễn Thị Yến An	Viện Công nghệ Sinh học
15	TS. Nghiêm Như Vân	Viện Công nghệ Sinh học
16	ThS. Cao Thị Lợi	Viện Công nghệ Sinh học
17	KTV. Lê Xuân Sách	Viện Công nghệ Sinh học
18	CN. Phạm Bích Ngọc	Viện Công nghệ Sinh học
19	KS. Đỗ Xuân Đồng	Viện Công nghệ Sinh học
20	KS. Đỗ Tiến Phát	Viện Công nghệ Sinh học
21	SV. Nguyễn Thị Hải Hà	Viện Công nghệ Sinh học
22	SV. Chu Thị Thu Thủy	Viện Công nghệ Sinh học
23	SV. Nguyễn Thị Hải	Viện Công nghệ Sinh học
24	PGS. TS. Nguyễn Đức Thành	Viện Công nghệ Sinh học
25	TS. Phan Thị Bảy	Viện Công nghệ Sinh học
26	KS. Nguyễn Thuý Hạnh	Viện Công nghệ Sinh học
27	ThS. Quách Thị Liên	Viện Công nghệ Sinh học
28	KTV. Đào Thị Hạnh	Viện Công nghệ Sinh học
29	ThS. Lê Thị Bích Thủy	Viện Công nghệ Sinh học
30	TS. Trần Thị Phương Liên	Viện Công nghệ Sinh học
31	ThS. Huỳnh Thị Thu Huệ	Viện Công nghệ Sinh học
32	CN. Lương Thị Thu Hương	Viện Công nghệ Sinh học
33	TS. Trần Thị Trường	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
34	ThS. Nguyễn Văn Thắng	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
35	VS. TSKH. Trần Đình Long	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
36	TS. Nguyễn Thị Bình	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ

37	KS. Nguyễn Thị Loan	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
38	KS. Nguyễn Thị Mỹ Hạnh	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
39	CN. Nguyễn Văn Dương	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
40	ThS. Nguyễn Thị Yến	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
41	ThS. Phan Quốc Gia	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
42	KS. Nguyễn Xuân Thu	Trung Tâm TN và NC cây đậu đỗ
43	TS. Bùi Mạnh Cường	Viện nghiên cứu cây Ngô
44	GS. TS. Ngô Hữu Tinh	Viện nghiên cứu cây Ngô
45	KS. Ngô Thị Minh Tâm	Viện nghiên cứu cây Ngô
46	KS. Nguy. Hương Lan	Viện nghiên cứu cây Ngô
47	KS. Đinh Công Chính	Viện nghiên cứu cây Ngô
48	KS. Đoàn Thị Bích Thảo	Viện nghiên cứu cây Ngô
49	CN. Nguyễn Văn Trường	Viện nghiên cứu cây Ngô
50	CN. Huỳnh Hữu Đức	Viện nghiên cứu cây Ngô
51	TS. Nguyễn Thị Quỳnh	Viện Sinh học Nhiệt đới
52	CN. Nguyễn Đình Sỹ	Viện Sinh học Nhiệt đới
53	TS. Thái Xuân Du	Viện Sinh học Nhiệt đới
54	CN. Nguyễn Minh Tuấn	Viện Sinh học Nhiệt đới
55	TS. Phạm Văn Hiến	Viện Dược liệu
56	CN. Vũ Hoài Sâm	Viện Dược liệu
57	ThS. Nguyễn Trần Hy	Viện Dược liệu
58	CN. Tạ Như Thực Anh	Viện Dược liệu
59	KS. Trần Thị Liên	Viện Dược liệu
60	TS. Nguyễn Thị Lang	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
61	PGS. TS. Bùi Chí Bửu	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
62	CN. Đặng Minh Tâm	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
63	CN. Lê Thị Mui	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long
64	GS.TS. Nguyễn Quang Thạch	Viện Sinh học nông nghiệp
65	TS. Nguyễn Lý Anh	Viện Sinh học nông nghiệp
66	CN. Hoàng Thị Nga	Viện Sinh học nông nghiệp
67	CN. Vũ Ngọc Lan	Viện Sinh học nông nghiệp
68	CN. Nguyễn Xuân Trường	Viện Sinh học nông nghiệp
69	ThS. Đoàn Thị Mai	Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng
70	CN. Lê Sơn	Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng
71	CN. Lương Thị Hoan	Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng

MỤC LỤC

trang

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC	1
1.1. Nhân nhanh <i>in vitro</i>	1
1.2. Tạo giống cây trồng bằng công nghệ tế bào thực vật	1
1.3. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng mới	2
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	2
2.1. Trích lược những điểm chính của thuyết minh đề tài	2
2.1.1. Xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ nhân nhanh <i>in vitro</i>	2
2.1.2. Sử dụng công nghệ tế bào thực vật để tạo giống lúa xuất khẩu, lúa chất lượng cao kháng bệnh đạo ôn dùng trong nội địa, ngô năng suất kháng bệnh khô vằn và phục tráng giống cây Ngưu tất	2
2.1.3. Khai thác, thiết kế, triển khai kỹ thuật CTPT vào đánh giá đa dạng tập đoàn giống nhằm lựa chọn bố mẹ cặp lai và đánh giá sớm các dòng chọn tạo được	2
2.1.4. Khảo nghiệm và triển khai sản xuất các dòng cây ưu tú	3
2.1.5. Mở rộng đối tượng nghiên cứu của đề tài	3
2.1.6. Số lượng sản phẩm đăng ký giao nộp	3
2.2. Mục tiêu của đề tài	3
2.2.1. Nhân vô tính <i>in vitro</i>	3
2.2.2. Sử dụng kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu đa dạng và ứng dụng trong tạo giống	3
2.2.3. Chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn đối với lúa, ngô và cây Ngưu tất	4
2.2.4. Kết luận được 2-3 dòng cây có triển vọng	4
2.2.5. Mở rộng sản xuất giống lúa DR3	4
2.3. Đối tượng nghiên cứu	4
2.4. Phương pháp nghiên cứu	4
CHƯƠNG 3. CÁC KẾT QUẢ CHÍNH ĐÃ THU ĐƯỢC	4
3.1. Nghiên cứu và hoàn thiện quy trình nhân nhanh một số giống cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i>	4
3.1.1. Cây Keo lai và Bạch đàn lai	5
3.1.2. Cây Ba kích	5
3.1.3. Hoa Địa lan	5
3.1.4. Lúa bất dục Nhị 32A và BoA	5
3.1.5. Điều cao sản PN1 và BO1	5
3.2. Tạo giống mới bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn ở lúa, ngô và phục tráng cây Ngưu tất	5
3.2.1. Lúa chất lượng cao dùng trong nước	5
3.2.2. Lúa xuất khẩu	6
3.2.3. Lúa kháng bệnh đạo ôn	6
3.2.4. Ngô năng suất kháng khô vằn	6
3.2.5. Phục tráng cây Ngưu tất	7

3.3. Nghiên cứu kỹ thuật SHPT vào việc đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn một số giống cây trồng nhằm lựa chọn bố mẹ cặp lai ưu tú và đánh giá sớm các dòng có triển vọng thành giống	8
3.3.1. Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn	9
3.3.2. Đối với cây lạc	9
3.3.2.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn lạc kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn	9
3.3.2.2. Kết quả đánh giá phản ứng kháng bệnh của các giống thu thập	9
3.3.2.3. Phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc kháng bệnh héo xanh vi khuẩn	9
3.3.2.4. Kết quả phân tích đa dạng tập đoàn 33 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt bằng các chỉ thị RAPD	10
3.3.2.5. Xác định các chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc	10
3.3.2.6. Lai hữu tính, tạo quần thể và chọn lọc giống kháng bệnh rỉ sắt ở lạc	11
3.3.2.7. Nghiên cứu sàng lọc sớm các dòng lạc F ₃ của cặp lai ICG950166 x L12 với các chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt	11
3.3.3. Tóm tắt kết quả tạo giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử	12
3.3.3. Đối với cây đậu tương	12
3.3.3.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn	12
3.3.3.2. Nghiên cứu chọn một số cặp mỗi RADP và SSR thích hợp cho nghiên cứu	12
3.3.3.3. Tạo giống đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt có sự phối hợp của CTPT	14
3.3.3.4. Tóm tắt kết quả tạo giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử	14
3.4. Đánh giá sớm các dòng lúa và ngô chọn lọc được bằng các chỉ thị phân tử liên quan	15
3.4.1. Đánh giá sớm các dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao với các chỉ thị STS	15
3.4.2. Đánh giá sớm các dòng lúa xuất khẩu với các chỉ thị STS	15
3.4.3. Kết quả chọn tạo các dòng ngô mới có sự trợ giúp của chỉ thị phân tử	16
3.5. Kết quả khảo nghiệm và triển khai sản xuất thử các dòng lúa, ngô và đậu tương	17
3.6. Mở rộng sản xuất giống lúa mới DR3	18
CHƯƠNG 4. TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC	19
4.1. Kết quả nổi bật của đề tài và khả năng áp dụng	19
4.1.1. Kết quả nổi bật	19
4.1.2. Trình độ công nghệ	19
4.1.3. Khả năng áp dụng	20
4.1.4. Những đóng góp mới của đề tài	20
4.2. Đào tạo	21
4.3. Sản phẩm của đề tài	21
4.3.1. Sản phẩm công nghệ của đề tài	21
4.3.2. Sản phẩm giao nộp	22
4.4. Tồn tại của đề tài	26
4.5. Hợp tác quốc tế	26
4.6. Tình hình sử dụng kinh phí	26
CHƯƠNG V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	26
5.1. Kết luận	26
5.2. Kiến nghị	27
Các công trình công bố	27
Tài liệu tham khảo	29

MỞ ĐẦU

Công nghệ tế bào thực vật đã trở thành những kỹ thuật thông dụng trong việc nhân nhanh, duy trì, phục tráng và tạo các giống cây trồng mới ở nhiều viện nghiên cứu như Viện Công nghệ Sinh học, Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Sinh học Nhiệt đới,... Nhiều quy trình công nghệ nhân nhanh trên một số đối tượng cây trồng như khoai tây, dưa sồi, khoai lang, chuối, mía, cỏ ngọt... đã được áp dụng triển khai ở hầu hết các sở Khoa học và Công nghệ trong cả nước.

Gần đây, việc chọn tạo giống dưới sự trợ giúp của chỉ thị phân tử đang được ứng dụng rộng rãi ở các Viện nghiên cứu trên thế giới (Mỹ, Trung Quốc, IRRI, Ấn Độ). Chỉ thị phân tử liên kết chặt chẽ với các gen sẽ được sử dụng để chọn lọc các cá thể ngay ở giai đoạn sớm mà không phải phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Chọn giống dưới sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử (Marker Assisted Selection = MAS) rất có hiệu quả trong tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá, cà chua chịu bệnh nấm sương, đậu tương kháng sâu đục quả,... Kỹ thuật chỉ thị phân tử đảm bảo cho các nhà chọn tạo giống nhận diện chính xác các gen liên quan ở giai đoạn sớm mà không bị chi phối bởi điều kiện môi trường và thời gian tạo giống rút ngắn xuống từ 2-3 năm.

Xuất phát từ những nội dung đăng ký của đề tài KC.04.08 giai đoạn 2001 - 2004, Viện CNSH đã phối hợp với Viện nghiên cứu Lúa ĐBSCL, Viện SHNN, Viện SHND, Viện NCCN, Trung tâm NCCTR, Trung tâm NC và TN cây đậu đỗ và Viện Dược liệu để thực hiện các việc: (i) Xây dựng và hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* một số giống cây lâm nghiệp, cây dược liệu, cây hoa địa lan, lúa bất dục và cây điều; (ii) Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào thực vật để tạo giống lúa chất lượng, năng suất và kháng bệnh (đạo ôn/bạc lá) phục vụ nhu cầu tiêu dùng trong nước và đáp ứng thị trường xuất khẩu, ngô năng suất kháng khô vằn và phục tráng cây Ngưu tất có thời gian sinh trưởng dài, củ ít xơ; (iii) Nghiên cứu triển khai kỹ thuật chỉ thị phân tử vào việc chọn tạo giống lúa kháng bệnh đạo ôn, lạc kháng bệnh rỉ sắt và đậu tương chịu hạn/ kháng bệnh rỉ sắt.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.1. Nhân nhanh *in vitro*

Ngay từ năm 1959 kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được ứng dụng để cải tạo và nhân nhanh giống cây trồng có giá trị thương mại ở nhiều nước trên thế giới (Bajaj, 1990; Jain và CS, 1998). Công nghệ nhân giống *in vitro* một số loại cây cảnh và cây thân gỗ đã mang lại lợi nhuận cao ở nhiều nước trên thế giới (Phillip và CS, 1995). Ở Hà Lan, Ấn Độ và Thái Lan, công nghệ nhân giống *in vitro* đối với cây ăn quả (xoài, dưa,...) và cây hoa (hoa hồng, phong lan, tulip,...) đã trở thành một ngành công nghiệp mang lại nguồn thu hàng năm tới 4 triệu USD (Jain và Klerk, 1997). Hiện nay, Thái Lan, Malaysia, Nhật Bản là những nước triển khai các công nghệ nhân giống *in vitro* ở quy mô công nghiệp trên nhiều đối tượng cây trồng có giá trị (đu đủ, chuối, mía, măng tây, tre trúc,...).

Ở Việt Nam, kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật đã được nghiên cứu và thử nghiệm trên 30 năm nay. Các quy trình công nghệ để nhân nhanh các giống cây trồng có giá trị trên các đối tượng như cây thực phẩm (khoai tây, khoai sọ), cây công nghiệp (cà phê, mía, dưa sồi), cây ăn quả (chuối, mía, dưa cayen), cây hoa (phong lan, đồng tiền kép, cẩm chướng), cây dược liệu (trinh nữ hoàng cung, cà gai, tam thất, sâm Ngọc Linh), cây Keo lai hoặc Bạch đàn lai bằng nuôi cấy *in vitro* cũng rất thành công. Tuy nhiên hệ số nhân giống của các loại cây trồng nêu trên (đặc biệt là cây rừng và cây hoa Lan) mới chỉ đạt quy mô phòng thí nghiệm. Để đáp ứng được nhu cầu cây giống đối với các loại cây trồng này, thì cần phải nghiên cứu cải tiến một số môi trường nhân cây trong nuôi cấy thì mới có thể đạt được quy trình nhân giống quy mô công nghiệp.

1.2. Tạo giống cây trồng bằng công nghệ tế bào thực vật

Tạo giống cây trồng mới bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và tạo dòng thuần bằng nuôi cấy bao phấn đã trở thành công cụ hỗ trợ tạo giống truyền thống. Mức độ biến dị và tính ổn định di truyền của các giống cây trồng mới từ cây tái sinh cũng đã được chứng minh ở mức độ phân tử

(Mezencev và CS, 1997). Đến nay đã có hàng loạt các công bố thành công trong lĩnh vực này (Adkins và CS, 1995; Bertin và CS, 1997; Stephen và CS, 1998; Jan và CS, 1997; Van Sint Jan, 1992). Bằng cách này, nhiều dòng lúa đã trở thành giống và được sản xuất rộng ở Trung Quốc, Nhật Bản (Sun và CS, 1991).

Ngay ở Việt Nam, công nghệ tế bào thực vật cũng đã thu được nhiều kết quả có giá trị thực tiễn như ở Viện CNSH và Viện NCLĐBSCL đã tạo ra được giống lúa mới như Khao 39, Khao 85, DR1, DR2 và DR3,... được sản xuất chấp nhận. Việc ứng dụng công nghệ tế bào thực vật để tạo ra các dòng cây trồng mới ở lúa và ngô luôn là yêu cầu của thực tiễn sản xuất.

1.3. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng mới

Từ năm 1983, kỹ thuật chỉ thị phân tử đã trở thành công cụ đắc lực hỗ trợ phương pháp truyền thống trong việc chọn tạo giống cây trồng mới. Các chỉ thị phân tử cho phép các nhà tạo giống nhận dạng chính xác những gen quan tâm ở bất cứ bộ phận nào của cây ở giai đoạn sớm mà không bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường và thời gian lại rút ngắn. Hiện nay, có nhiều giống cây trồng mới đã được tạo bằng phương pháp này như Huang và CS (1997) đã tạo được giống lúa mang 4 gen kháng bệnh bạc lá, Zheng và CS (1995) tạo được giống lúa mang 3 gen kháng bệnh đạo ôn. Tuy nhiên ở Việt Nam, chỉ thị phân tử mới đang được triển khai ứng dụng đối với lúa kháng bệnh rầy nâu.

CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Trích lược những điểm chính của thuyết minh đề tài

2.1.1. Xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ nhân nhanh *in vitro*

- **Cây lâm nghiệp:** Hoàn thiện công nghệ nhân nhanh giống Keo lai và Bạch đàn lai bằng công nghệ nuôi cấy *in vitro* đáp ứng đủ giống cho các cơ sở sản xuất.
- **Cây dược liệu:** Hoàn thiện quy trình nhân nhanh *in vitro* giống Ba kích (*Morinda officinalis* Hoai-Rubiaceae) làm nguyên vật liệu sử dụng trong y dược.
- **Hoa Địa lan:** Xây dựng quy trình nhân nhanh bằng tạo dễ hành (protocorm) trong nuôi cấy lát mỏng một số giống hoa Địa lan quý thích hợp đối với khu vực phía Bắc bằng công nghệ nuôi cấy mô thực vật ở quy mô công nghiệp 10000 cây/năm.
- **Lúa bất dục:** Xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* hai dòng lúa bất dục Nhị 32A và BoA phục vụ việc sản xuất hạt lai F1 trong nước.
- **Cây Điều:** Xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* đối với hai giống Điều cao sản BO1 và PO1 để mở rộng diện tích trồng điều đáp ứng nhu cầu xuất khẩu.

2.1.2. Sử dụng công nghệ tế bào thực vật để tạo giống lúa xuất khẩu, lúa chất lượng cao kháng bệnh đạo ôn dùng trong nội địa, ngô năng suất kháng bệnh khô vằn và phục tráng giống cây Ngưu tất

- **Đối với lúa:** Tạo giống lúa thuần từ các tổ hợp lai có đủ tiêu chuẩn gạo xuất khẩu cho phía Nam; Cải tạo giống lúa đặc sản theo hướng hạ thấp chiều cao cây, rút ngắn thời gian sinh trưởng,... Tiếp tục mở rộng sản xuất dòng lúa DR3 tạo được bằng chọn dòng tế bào trong giai đoạn trước đạt quy mô khu vực hoá; Tạo giống lúa kháng đạo ôn/bạc lá bằng chỉ thị phân tử.
- **Đối với cây ngô:** Triển khai kỹ thuật truyền tính cảm ứng nuôi cấy bao phấn tạo dòng ngô đơn bội kép và ứng dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử để chọn tạo giống kháng bệnh khô vằn có năng suất từ 6-8 tấn/ha.
- **Cây Ngưu tất:** Sử dụng công nghệ nuôi cấy lát mỏng và chọn dòng tế bào để phục tráng giống Ngưu tất (*Achyranthe bidentata* Blume-Amaranthaceae) có thời gian sinh trưởng dài, củ ít xơ.

2.1.3. Khai thác, thiết kế, triển khai kỹ thuật CTPT vào đánh giá đa dạng tập đoàn giống nhằm lựa chọn bố mẹ cặp lai và đánh giá sớm các dòng tạo được

- Sử dụng các chỉ thị để đánh giá đa dạng tập đoàn các giống lúa kháng bệnh bạc lá, giống ngô năng suất kháng bệnh khô vằn, giống lạc kháng bệnh héo xanh, rỉ sắt, giống đậu tương chịu hạn/kháng bệnh rỉ sắt.
- Nghiên cứu và đề xuất các chỉ thị phân tử (RAPD, SSR,...) vào việc chọn tạo các giống lúa chất lượng kháng bệnh đạo ôn, ngô năng suất kháng bệnh khô vằn, đậu tương và lạc có năng suất cao, kháng được bệnh rỉ sắt/chịu hạn khá (đậu tương); kháng được bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn (lạc).

2.1.4. Khảo nghiệm và triển khai sản xuất các dòng cây ưu tú

- Triển khai mở rộng sản xuất giống lúa DR3 để xin công nhận giống tạm thời.
- Khảo nghiệm và sản xuất thử các dòng lúa ưu tú.

2.1.5. Mở rộng đối tượng nghiên cứu của đề tài

Do nhu cầu của thực tiễn sản xuất, việc nhân nhanh những giống điều quý bằng phương pháp *in vitro* có hiệu quả gấp nhiều lần so với phương pháp truyền thống. Vì vậy đề tài đã đưa thêm nội dung này vào trong quá trình thực hiện.

2.1.6. Số lượng sản phẩm đăng ký giao nộp

TT	Tên sản phẩm	Số lượng đăng ký	Chỉ tiêu Kinh tế - kỹ thuật đăng ký
1	Quy trình công nghệ nuôi cấy mô.	03	Quy mô 10000 cây/năm)
2	Xác định chỉ thị phân tử liên quan đến bệnh đạo ôn (lúa), khô vằn (ngô), rỉ sắt, héo xanh và chịu hạn ở lạc và đậu đỗ.	04	Áp dụng rộng rãi trong tạo giống
3	Tạo dòng mới có triển vọng đối với lúa, ngô, đậu tương, lạc và cây Ngưu Tất: - Lúa chất lượng, năng suất, kháng bệnh đạo ôn - Khu vực hoá giống lúa chịu hạn DR3 - Ngô kháng bệnh khô vằn và năng suất - Lạc/đậu đỗ kháng bệnh rỉ sắt/ héo xanh/ chịu hạn - Ngưu Tất có chất lượng tốt	03 dòng 01 giống 02 dòng 01 dòng 01 dòng	- Năng suất 5 -6 tấn/ha, chất lượng tốt, đạt tiêu chuẩn xuất khẩu - Trồng vùng đất khó khăn về nước, năng suất: khoảng 5 tấn/ha - Năng suất 6-8 tấn/ha, kháng khô vằn - Năng suất: 2-3 tấn/ha/vụ đủ tiêu chuẩn xuất khẩu - Năng suất đạt 3-4 tấn/ha - Chất lượng như giống gốc

2.2. Mục tiêu của đề tài

Xây dựng và áp dụng có hiệu quả công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử trong chọn tạo, nhân nhanh giống cây trồng mới có năng suất cao, phẩm chất tốt chống chịu sâu bệnh và điều kiện bất thuận; Đồng thời hoàn thiện các quy trình công nghệ ở quy mô sản xuất nhằm chuyển giao cho các cơ sở nghiên cứu triển khai; Đào tạo cán bộ trình độ cao trên lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật. Các mục tiêu chính như sau:

2.2.1. Nhân vô tính *in vitro*: Hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* quy mô 10000 cây/năm đối với cây lâm nghiệp, một số giống hoa Địa lan quý và cây Ba kích đáp ứng nhu cầu cây giống đồng đều cho các cơ sở sản xuất. Nghiên cứu quy trình nhân giống quy mô phòng thí nghiệm đối với 2 dòng lúa bất dục, cây điều.

2.2.2. Sử dụng kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu đa dạng và tạo giống: Sử dụng kỹ thuật phân tử để nghiên cứu khoảng cách di truyền nhằm xác định ưu thế lai về năng suất đối với lúa kháng bệnh bạc lá, ngô năng suất kháng khô vằn, lạc và đậu tương năng suất và chịu bệnh/hạn; Sử dụng chỉ thị

RAPD và SSR để phát hiện các dòng có khả năng kháng bệnh khô vằn ở ngô; Ứng dụng các chỉ thị phân tử (AFLP, SSR,...) vào việc chọn tạo các giống đậu tương và lạc có năng suất cao trên 3 tấn/ha kháng được bệnh rỉ sắt và chịu hạn khá đối với đậu tương và kháng được bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn đối với lạc.

2.2.3. Chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn đối với lúa, ngô và cây Ngưu tất: (1) đối với lúa: cải tạo năng suất, độ thuần, kháng bệnh đạo ôn bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và chỉ thị phân tử cho một số giống lúa có chất lượng cao tiêu dùng trong nội địa (Tám Xoan, Tám Ấp bẹ, Dục Thơm, Tẻ Di hương, Hương thơm 1, Bắc Thơm số 7 (cho phía Bắc) và lúa Một Bụi, Nàng thơm chợ Đào, Tài Nguyên (cho phía nam). **(2) Đối với ngô:** truyền tính cảm ứng nuôi cấy bao phấn từ 3 dòng có khả năng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây *in vitro* sang 200 nguồn vật liệu ưu tú có giá trị trong tạo giống ngô lai thương mại. Tạo dòng đơn bội kép. Xác định được từ 2-3 tổ hợp có năng suất cao khảo nghiệm trong sản xuất. **(3) Đối với cây Ngưu tất:** Sử dụng công nghệ nuôi cấy lát mỏng và chọn dòng tế bào để phục tráng giống Ngưu tất (*Achyranthe bidentata* Blume) có thời gian sinh trưởng dài, củ ít xơ.

2.2.4. Kết luận được 2-3 dòng cây có triển vọng: Khảo nghiệm các dòng ưu tú với lúa, ngô, đậu tương và lạc.

2.2.5. Mở rộng sản xuất giống lúa DR3 để xin công nhận giống tạm thời (khu vực hoá).

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Bao gồm tập đoàn gồm 532 giống cây trồng, cụ thể: 65 giống lúa (Tám Xoan, Tám Ấp bẹ, Dục thơm, Tẻ di hương, Một bụi, Nàng thơm chợ Đào, Tài nguyên, Khao Dawk Mali 105, IR64, OM1490, OMCS2000, Khao 39, Moroberekan, WAB56-125, Nhị 32A, BoA...), 58 các giống ngô lai, giống địa phương và nhập nội, 170 giống và dòng lạc, 220 giống và dòng đậu tương, 6 giống cây lâm nghiệp, 2 loại cây thuốc, 2 giống cây điều và 9 giống cây hoa Địa lan do các Viện, các Trung tâm nghiên cứu trong nước và quốc tế cung cấp.

2. 4. Phương pháp nghiên cứu

Bao gồm các phương pháp:

- Thu thập và đánh giá một số đặc điểm nông học của tập đoàn giống
- Nhân giống bằng nuôi cấy *in vitro*.
- Tạo dòng thuần ở ngô và lúa bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn.
- Chọn dòng biến dị soma.
- Các phương pháp về sinh học phân tử như kỹ thuật PCR, chạy điện di, phân tích sản phẩm,...
- Phân tích số liệu bằng các phần mềm chuyên dụng (Ntsys 2.0, Genstat...)
- Các thí nghiệm ngoài đồng ruộng, phân tích sinh hoá,... theo quy định của ngành.

CHƯƠNG 3. CÁC KẾT QUẢ CHÍNH ĐÃ THU ĐƯỢC

3.1. Nghiên cứu và hoàn thiện quy trình nhân nhanh một số giống cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*: (i) Hoàn thiện quy trình nhân giống vô tính *in vitro* ở quy mô bán sản xuất (công suất 10000 cây/năm) đối với cây Keo lai, Bạch đàn lai và hoa Địa lan; (ii) Hoàn thiện quy trình nhân giống quy mô phòng thí nghiệm đối với cây Ba kích, hai dòng lúa bất dục (Nhị32A và BoA) và hai giống cây điều (PN1 và BO1).

3.1.1. Cây Keo lai và Bạch đàn lai

- *Giai đoạn trước, Trung tâm nghiên cứu cây trồng rừng cũng đã nghiên cứu quy trình nhân giống đối với một số dòng cây Keo lai và Bạch đàn lai mới, nhưng hệ số nhân giống còn thấp. Giai đoạn 2001 – 2004, đề tài tập trung chủ yếu vào việc cải tiến môi trường nhân chồi và điều kiện nuôi cấy để tăng hệ số nhân giống đạt quy mô 1 vạn cây/năm cho một số dòng cây mới đó là: 03 dòng Keo lai mới tạo được đó là BV10, BV16, BV32 (lai giữa hai loài *Acacia mangium* và *Acacia auriculiformis*) và 03 dòng Bạch đàn cao sản mới tạo được U29C3, U29E1, U29U24 (lai giữa loài *Eucalyptus urophylla*) và loài *E.camaldulnessis*). Nhân giống bằng nuôi cấy mô bao gồm các công đoạn chính đã hoàn thiện là: tạo chồi, lấy mẫu, khử trùng, nhân chồi trong môi trường MS cải tiến (bổ sung Riboflavin 0,1 mg/l, Biotin 0,1 mg/l), cho ra rễ, huấn luyện cây con, cấy cây vào bầu và kỹ thuật chăm sóc (Hình 11).*

- Các đơn vị đã được chuyển giao công nghệ và giống gốc
 - Trung tâm Phát triển Khoa học Công nghệ Hà Tĩnh
 - Trường trung học kinh tế – kỹ thuật và dạy nghề tỉnh Tuyên Quang
 - Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Quảng Trị

3.1.2. Cây Ba kích

Đã hoàn thiện quy trình nhân nhanh *in vitro* cây Ba kích từ khâu lấy mẫu, đưa mẫu vào khử trùng, nhân cụm chồi, tạo mô sẹo, ra rễ trong ống nghiệm và ra bầu. Theo tính toán, hệ số nhân của quy trình này đạt trung bình 20⁴/năm (Hình 12).

3.1.3. Hoa Địa Lan

Nghiên cứu đã tiến hành trên 40 thí nghiệm, 9 giống khác nhau (07 giống thương mại: Xanh Chiếu; Trung Quốc Xanh; Trung Quốc Đỏ; Trung Quốc Vàng; Hồng Bệt; 717; 749 và 02 giống bản địa: Phượng Hoàng Thơm, Mạ nâu lá lớn) ở tất cả các giai đoạn và đã đúc rút ra quy trình nhân Địa lan *in vitro* áp dụng cho các giống thí nghiệm từ giai đoạn tạo vật liệu sạch khởi đầu, đến giai đoạn nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh và sau *in vitro* (Hình 13). Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm về thời vụ ra cây, tiêu chuẩn cây *in vitro* trước khi đưa ra vườn ươm, giá thể, chế độ tưới, chế độ dinh dưỡng tại hai vùng khác nhau (Hà Nội và Sapa) trong suốt thời gian từ tháng 12/2002 đến tháng 7/2004 và thu được các kết quả như sau:

- Xác định được tiêu chuẩn cây *in vitro* để đưa ra vườn ươm, cây *in vitro* phải đạt khối lượng >1gr đảm bảo cho cây sinh trưởng phát triển tốt ngoài vườn ươm.
- Xác định được thời vụ ra cây *in vitro* thích hợp là vụ Đông Xuân (ở Hà Nội); Vụ Xuân (ở Sapa - Lào Cai)
- Xác định được giá thể ra cây *in vitro* thích hợp là dớn cho tỷ lệ sống đạt 90% (ở vườn ươm cấp 1); ở vườn ươm cấp 2, giá thể dương xỉ (điều kiện Hà Nội), giá thể 1/2 mùn địa phương + 1/4 dương xỉ + 1/4 phân dê (điều kiện Sapa - Lào Cai).
- Xác định được dinh dưỡng thích hợp cho cây sinh trưởng phát triển ở vườn ươm cấp 1 là phân bón lỏng của Úc (AB) tỷ lệ 1 : 1, nồng độ 1/250, vườn ươm cấp 2 là phân bón tổng hợp NPK tỷ lệ 30 : 10 : 10 kết hợp với vitamin và vi lượng.

3.1.4. Lúa bất dục Nhị 32A và BoA

Hoàn thiện quy trình nhân vô tính *in vitro* với hệ số nhân giống cao (4000 cây/m² diện tích nuôi cấy) có thể giải quyết công việc khó khăn trước đây là phải duy trì các dòng bất dục bằng phương pháp giữ gốc rạ và nhất thiết phải dưới điều kiện nhiệt độ nghiêm ngặt (25°C), rất bị động, tốn kém nhưng không ổn định (Hình 14).

3.1.5. Điều cao sản PN1 và BO1

Đã nghiên cứu thành công quy trình nhân giống điều cao sản BO1 và PN1 bằng phương pháp: Nuôi cấy quang tự dưỡng và lớp mỏng từ cành non và cây mầm (Hình 14).

Cây điều *in vitro* đã tăng trưởng tốt trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng (môi trường không đường và vitamin). Cần tìm hiểu thêm về các điều kiện ánh sáng, nồng độ CO₂ và giá thể nuôi cấy tác động lên sự tăng trưởng cũng như tạo rễ của cây cấy mô để hoàn thiện quy trình nhân giống và có thể ứng dụng trong điều kiện sản xuất.

3.2. Tạo giống mới bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma và nuôi cấy bao phấn ở lúa, ngô và cây Ngưu Tất

3.2.1. Lúa chất lượng cao dùng trong nước

Các giống lúa đặc sản của Việt Nam: Tám Xoan, Tám Ấp Bẹ, Dự thơm, Tẻ Di hương, do Trung tâm tài nguyên di truyền thực vật, Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam cung cấp được sử dụng làm nguyên liệu tạo mô sẹo và gây đột biến nhân tạo bằng tia gamma Co⁶⁰. Từ kết quả nghiên cứu cho phép chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Các giống lúa Tám Xoan, Tám Ấp Bẹ, Dự thơm, Tẻ Di hương đều có khả năng tạo mô sẹo tốt trên môi trường MS có bổ sung 0,1mg/l NAA + 0,2mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D với tỷ lệ tạo mô sẹo tương ứng là: 90%; 93,3%; 93% và 95%
- Xác định liều chiếu xạ thích hợp cho mô sẹo của 4 giống lúa nghiên cứu từ 7 Krad đến 9 Krad.
- Đã trồng được 577 dòng cây trên đồng ruộng thế hệ RM₀ và thu được 363 dòng có hạt chắc.

- Bước đầu đã chọn lọc được 38 dòng của 4 giống cần quan tâm theo dõi ở thế hệ tiếp theo (Tám Xoan 17 dòng, Tám Ấp bẹ 5 dòng, Dự Thơm 9 dòng, Tẻ Di hương 8 dòng).
- Đã thu được 20 dòng không cảm quang với ánh sáng ngày dài (trở được cả 2 vụ), trong đó có dòng Tám xoan TXL7-01-01 có độ thuần cao, thấp cây và chín sớm (Hình 15).

3.2.2. Lúa xuất khẩu (Hình 16)

- Đã thiết lập và tiến hành phép lai cho 17 tổ hợp lai để nuôi cấy bao phấn và 12 giống lúa phục vụ chọn dòng biến dị soma. Túi phấn từ các tổ hợp lai dùng trong thí nghiệm có khả năng phát triển thành mô sẹo trên môi trường khảo sát. Trong đó, tổ hợp lai IR64/Jasmine85 tạo mô sẹo tốt trên môi trường N6+ 2mg/l 2,4D+ 1mg/l NAA. Các mô sẹo có khả năng tái sinh khác biệt trên các tổ hợp lai. Hai tổ hợp lai IR64/Jasmine85 và OM1490/Khao105 tái sinh cây xanh tốt trên môi trường MS+ 0,5mg/l NAA+ 2mg/l BA và MS +1mg/l Kin. Các cây xanh nhân chồi hoàn chỉnh tốt trên môi trường MS + 2mg/l BA và tạo rễ trên môi trường MS+0,5mg/l NAA.
- Môi trường cấy phải thay đổi phù hợp yếu tố di truyền theo từng lứa tuổi của túi phấn để cho cây phát triển. Môi trường đầy đủ các thành phần vô cơ và dinh dưỡng theo yêu cầu sinh lý của cây. Thêm vào các nhân cơ bản như muối và vitamine, hormone thúc đẩy việc tạo thành phôi và mô sẹo. Kinetin là tối cần thiết để tạo mô từ hạt phấn trên nhiều cây ngoại trừ thuốc lá. Auxin 2,4-D gia tăng phôi trên các loài ngũ cốc. Đối với cây tái sinh, cytokinin và nồng độ auxin thấp là yếu cầu cần thiết.
- Kết quả đánh giá năng suất của các giống trong vụ Hè Thu 2003 cho thấy các giống đều có năng suất cao nhưng phẩm chất không tốt. Còn các dòng có năng suất thấp lại có phẩm chất tốt. Một số dòng có gạo thơm nhưng dài ngày và nhiễm sâu bệnh, cao cây, dễ đổ ngã. Để khắc phục trường hợp này chúng tôi tiếp tục cho lai tạo và lai ngược để tạo các dòng đạt cả 3 yếu tố năng suất cao, phẩm chất và chịu khá với điều kiện bất lợi môi trường.
- Đã tạo được 50 dòng ưu tú, trong đó nổi bật là dòng OM3566 năng suất cao tạo được bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn và Năng thơm chợ đào đột biến 5 (NTCĐĐB-5) cho năng suất cao, gạo ngon, nhưng mất mùi thơm.

3.2.3. Lúa kháng bệnh đạo ôn (Hình 17)

- Đã tạo được 14 cặp lai giữa các giống kháng đạo ôn và chất lượng cao.
- Các dòng cây F1 từ các cặp lai khác nhau ở lúa cho khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây khác nhau: tỷ lệ tạo mô sẹo dao động từ 5,1 –32,7%, tỷ lệ tái sinh cây 14,4 –723%, tỷ lệ tạo cây xanh trong quần thể cây tái sinh từ 5-34%. Các cây xanh tái sinh từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn cây lai F1 trồng ra ruộng thí nghiệm có 47% cây đơn bội và 53% cây nhị bội. Nhận được 93 dòng cây từ bao phấn của 10 cặp lai.
- Qua theo dõi đánh giá một số đặc điểm nông học, tính kháng bệnh đạo ôn và chất lượng gạo (mùi thơm, độ mềm cơm) bằng cảm quan của 71 dòng thế hệ con lai và 61 dòng cây từ bao phấn đã chọn được 2 dòng cây F3, F5 và 2 dòng cây đơn bội kép từ nuôi cấy bao phấn của một số tổ hợp lai.
- Đã trồng kiểm tra dòng HPKW1 chất lượng cao ở vụ Mùa 2003 trước khi gửi đi khảo nghiệm giống.

3.2.4. Ngộ năng suất kháng khô vằn

Bao gồm các vật liệu ưu tú có giá trị trong tạo giống thương mại lai với các dòng có tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây cao. Các thí nghiệm nuôi cấy tạo dòng thuần tham gia các tổ hợp lai đơn của đề tài là kết quả nghiên cứu của giai đoạn 1996 – 2000. Giai đoạn 2001-2004, tiến hành các thí nghiệm truyền tính cảm ứng nuôi cấy, tạo và đánh giá một số đặc điểm nông học của các dòng đơn bội kép, khả năng chịu bệnh khô vằn, xác định các chỉ thị liên quan tính kháng bệnh khô vằn, xác định ưu thế lai, đánh giá các dòng triển vọng...

Tạo dòng thuần bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn: Truyền tính cảm ứng sang 250 nguồn vật liệu. Đến vụ Xuân năm 2003 xác định được 19 nguồn vật liệu có tỷ lệ tạo cấu trúc phôi trung bình là 9,5%, tái sinh cây là 10,4% ổn định qua các vụ. Trong số 19 nguồn vật liệu đó có 7 nguồn vật liệu có tỷ lệ tạo cấu trúc phôi dưới 10%, 2 nguồn vật liệu có tỷ lệ tạo cấu trúc phôi trên 20%. Vụ Thu 2003 nuôi cấy 64 nguồn vật liệu đã xác định được 25 nguồn có khả năng tạo phôi và tái sinh cây.

Đã thành lập được tập đoàn vật liệu phục vụ nuôi cấy bao phấn bao gồm 43 nguồn với tỷ lệ tạo

phôi trung bình là 9,08%, tái sinh cây 11,26%. Vụ Xuân 2004 nuôi cấy 51 nguồn vật liệu, xác định được 18 nguồn tạo phôi (35,29%) với tỷ lệ phản ứng tạo phôi trung bình là 9,67% và 13 nguồn tái sinh (25,49%) với tỷ lệ tái sinh cây trung bình là 14,53%. Đồng thời với việc nâng cao được tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi của các nguồn vật liệu thì tỷ lệ tái sinh cây cũng được cải thiện. Như vậy, nhược điểm của kỹ thuật nuôi cấy bao phần là tỷ lệ phản ứng tạo cấu trúc phôi và tái sinh cây thấp đã được khắc phục.

Tạo cây đơn bội kép: Tính đến hết vụ Thu 2003, đã tạo mới được 105 dòng đơn bội kép, bao gồm 80 dòng ở thế hệ S_2 , 19 dòng ở thế hệ S_3 và 6 dòng ở thế hệ S_1 đang được đánh giá trên đồng ruộng. Trong vụ Xuân 2004 tạo được thêm 9 dòng mới nâng tổng số dòng tạo được lên 114 dòng. Đánh giá khả năng kết hợp của 5 dòng S_6 đã xác định được 2 tổ hợp lai có khả năng cho năng suất cao, chống chịu tốt, có nhiều triển vọng ứng dụng trong sản xuất đó là dòng F145 và F154 (Hình 18).

Kết quả chọn lọc và khảo nghiệm các tổ hợp lai triển vọng

Xác định tổ hợp lai có triển vọng: Trên cơ sở tập đoàn dòng đơn bội kép và kết quả phân tích đa dạng di truyền, đã tiến hành lai tạo 300 tổ hợp lai, đánh giá trên đồng ruộng qua các vụ Xuân và Thu 2002 và vụ Xuân và Thu 2003. Kết quả đã xác định được một số tổ hợp lai triển vọng.

Kết quả khảo nghiệm và thử nghiệm một số dòng ngô mới

Từ vụ Xuân 2003 tiến hành khảo nghiệm một số dòng ngô có triển vọng ở các vùng sinh thái (kết quả từ nuôi cấy bao phần và phân tích đa dạng di truyền).

Bảng 1. Kết quả khảo nghiệm một số dòng trong sản xuất (Thu Đông 2003)

TT	Tên dòng	TGST (ngày)	Năng suất (tạ/ha)				Năng suất Trung bình (tấn/ha)
			Tam Dương	Mê Linh	Đan Phượng	Kim Bảng	
1	CN4 (11x7)*	105	61,4	57,7	96,1	-	7,2
2	CN5 (8x7)*	105	65,6	62,4	94,7	67,0	7,2
3	F145 (C56NxVN38)*	97	71,8	-	95,4	69,8	7,9
4	CN2 (VN38xTU373)*	95	72,4	64,0	79,5	69,0	7,1
5	LVN4 (Đối chứng)	110	64,9	61,8	90,1	-	7,2

Ghi chú *: tổ hợp lai đơn

Khảo nghiệm Quốc gia hai dòng ngô CN4 và F145 trong vụ Xuân 2004 và được đánh giá là những dòng có năng suất cao, vượt đối chứng (LVN4) từ 5-10%, có khả năng chống chịu tốt với hạn và bệnh khô vằn, hai dòng này được đánh giá là dòng có triển vọng thành giống.

Tóm tắt về tạo dòng ngô mới năng suất kháng khô vằn

- 1) Nghiên cứu thành công việc truyền tính cảm ứng nuôi cấy *in vitro* sang 250 nguồn. Thành lập được tập đoàn vật liệu phục vụ nuôi cấy bao phần bao gồm 51 nguồn vật liệu, xác định được 18 nguồn tạo phôi (35,29%) với tỷ lệ phản ứng tạo phôi trung bình là 9,67% và 13 nguồn tái sinh (25,49%) với tỷ lệ tái sinh cây trung bình là 14,53%.
- 2) Kết hợp với Viện Bảo vệ Thực vật phân lập, giám định được 5 chủng *Rhizoctonia*. Đánh giá trực tiếp các vật liệu trên đồng ruộng và gây nhiễm nhân tạo. Xác định được 2 nguồn dòng kháng được bệnh khô vằn trong tổng số 11 nguồn dòng ở thế hệ S_4 . Thông qua phương pháp chọn lọc truyền thống và gây nhiễm nhân tạo trên đồng ruộng ở ngô đã xác định được 02 nguồn dòng là C177 và C305 và dòng CN2 (tạo được từ tổ hợp lai giữa dòng VN38 và TU373) chịu được bệnh khô vằn.
- 3) Đã tạo được 114 dòng đơn bội kép. Đánh giá khả năng kết hợp của 5 dòng S_6 xác định được 2 tổ hợp có khả năng cho năng suất cao, chống chịu tốt, có triển vọng phát triển thành giống đó là dòng F145 và F154.

3.2.5. Phục tráng cây Ngưu tất

Ngưu tất là cây có nhiều hạt và nhân giống khá dễ dàng bằng hạt. Mục tiêu là thiết lập quy trình nhân nhanh *in vitro* không phải để trồng lấy dược liệu mà để phục vụ cho việc nhân nhanh các cá thể đầu dòng. Các cá thể này sẽ được trồng để thu hạt giống, sau đó dùng hạt giống để trồng lấy dược liệu theo cách làm thông thường (Hình 19).

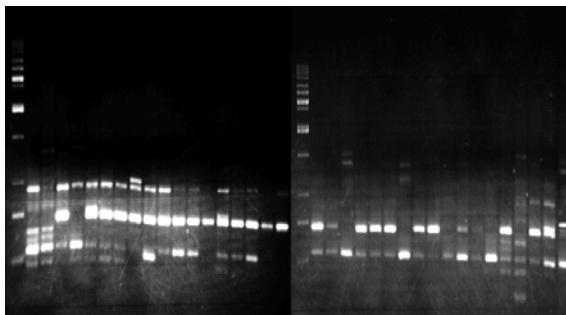
- Môi trường tạo chồi *in vitro* sơ cấp tốt nhất là MS + 0,1 mg/l IBA.
- Môi trường tốt nhất để nhân nhanh và tạo rễ từ lát cắt đốt thân và ngọn chồi là MS không có chất ĐTST. Ở môi trường này, tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 90% nhưng cây khoẻ, không kèm theo mô sẹo và đạt tỷ lệ sống 100% khi chuyển ra vườn ươm.
- Có thể tạo mô sẹo từ gian đốt thân trong môi trường MS + 1mg/l NAA + 0,2mg/l BAP và từ hypocotyl trong môi trường MS +1mg/l IBA.
- Mô sẹo ngưng tất từ cả hai nguồn nguyên liệu đều bị hoá nâu trong quá trình cấy chuyển.
- Đang tiếp tục nghiên cứu khắc phục hiện tượng hoá nâu của mô sẹo trong nuôi cấy để tiến hành chọn dòng Ngưu tất có thời gian sinh trưởng dài, củ ít xơ, chất lượng tốt.

3.3. Nghiên cứu kỹ thuật sinh học phân tử vào việc đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn một số giống cây trồng nhằm lựa chọn bố mẹ cặp lai ưu tú và đánh giá sớm các dòng có triển vọng thành giống

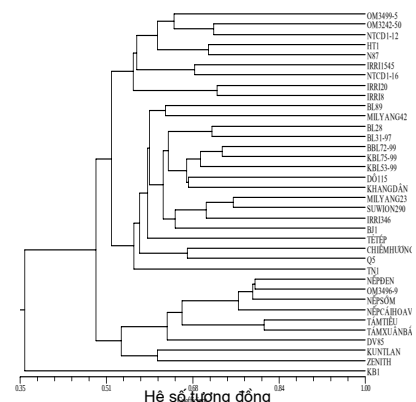
Ngay từ năm 1990, kỹ thuật sinh học phân tử đã trở thành công cụ rất có hiệu quả trong phân tích đa dạng, bảo tồn và tiến hoá giống loài ở sinh vật. Các phép phân tích đa dạng giúp các nhà nghiên cứu xác định việc chọn bố mẹ cặp lai theo mục đích nghiên cứu. Đặc biệt các kết quả phân tích phân tử kết hợp với phân tích kiểu hình đã cho phép các nhà nghiên cứu nhận dạng chính xác chỉ thị liên quan đến một số đặc điểm nông học quan trọng ở một số loại cây trồng như lúa, lúa mì, cao lương, ngô,... Mục đích đặt ra trong đề tài là sưu tập, khai thác các CTPT để đánh giá đa dạng tập đoàn giống lúa kháng bệnh bạc lá, lác kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh, đậu tương chịu hạn/kháng bệnh rỉ sắt,... nhằm từng bước đưa kỹ thuật SHPT trực tiếp vào việc chọn tạo giống cây trồng có năng suất, chất lượng và chống chịu với điều kiện bất lợi môi trường.

3.3.1. Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn (*Xanthomonas Oryzae*)

Phân tích mối quan hệ di truyền của 36 giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn bằng kỹ thuật RADP, nhận được trong nghiên cứu cho thấy 36 giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn khi phân tích với 21 mỗi RAPD rõ ràng có sự sai khác ở mức độ phân tử từ 22 %- 64%. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử vào việc xác định mối quan hệ di truyền tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn phổ biến ở đồng bằng Sông Hồng. Dựa vào một số tính trạng đã biết như tiềm năng năng suất, chất lượng của mỗi giống và hệ số sai khác di truyền sẽ cho phép các nhà tạo giống lựa chọn bố mẹ cặp lai theo mục đích. Chẳng hạn có thể lai giữa giống kháng bệnh cao như giống DV85 (điểm bệnh là 1) với các giống lúa nhiễm bệnh nặng như SUWION290 hoặc Chiêm hương (cả hai giống có điểm bệnh là 9) để tạo quần thể dùng trong lập bản đồ tính kháng bệnh (hệ số di truyền khác nhau là 50% và 55%, tương ứng); Các giống lúa chất lượng như OM3242-50, OM3496-9, NTCD1-12, NTCD1-16 có thể lai với giống có tính kháng bệnh cao như DV85 (hệ số di truyền khác nhau là 51%, 64%, 51% và 52%, tương ứng) để tạo ra giống lúa kháng bệnh, năng suất và chất lượng (Hình 1; 2).



Hình 1. Điện di sản phẩm RAPD của 36 giống lúa có mức độ kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn với mỗi RA36



Hình 2. Sơ đồ hình cây của 36 giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá vi khuẩn

3.3.2. Đối với cây lạc

3.3.2.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn lạc kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh vi khuẩn

Đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh là một trong những nhiệm vụ quan trọng nhằm tìm ra nguồn gen kháng đồng thời phục vụ cho việc phân tích đa dạng di truyền tập đoàn giống có tính kháng bệnh khác nhau. Vì vậy, đề tài đã tiến hành thu thập được 170 mẫu giống lạc có tính kháng khác nhau đối với hai bệnh quan tâm ở cả trong nội địa và trên thế giới. Hoàn thiện phương pháp đánh giá một đặc điểm nông học trong đó chú trọng đến đánh giá tính kháng bệnh rỉ sắt và héo xanh (Hình 20).

3.3.2.2. Kết quả đánh giá phản ứng kháng bệnh của các giống thu thập: Kết quả là đã đánh giá phản ứng của 50 mẫu giống lạc đối với bệnh rỉ sắt, 120 mẫu giống với bệnh héo xanh theo phương pháp hàng nhiễm (infector row) để đánh giá và sàng lọc khối lượng lớn nguồn vật liệu ngoài đồng và phương pháp lá tách (detached leaf technique). Kết quả đã tìm ra:

- 10 giống kháng cao (điểm từ 1 đến 3) với bệnh rỉ sắt là: ICG 11325, ICGX 950084, ICGV 99003, ICGX 950166, ICGV 99019, ICGV 86699, ICG 11312, ICGV 99051, ICGV 99052, ICGV 99005. 12 giống kháng trung bình và số còn lại là nhiễm bệnh nặng.

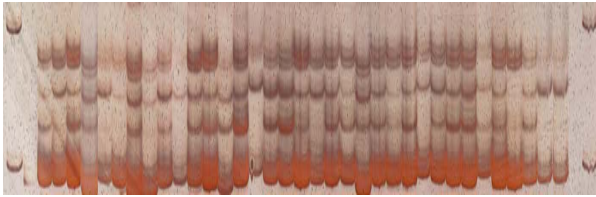
- Đã xác định 01 giống kháng cao với bệnh héo xanh - Gié Nho Quan; 6 giống kháng trung bình: MD7, ICGV11505, L14, L02, LVT; 3 giống nhiễm: V79, ICG3704, L05.

- Đánh giá 17 đặc tính hình thái và nông sinh học của 22 mẫu giống lạc kháng rỉ sắt cho thấy có sự đa dạng và biến động về các đặc tính nghiên cứu.

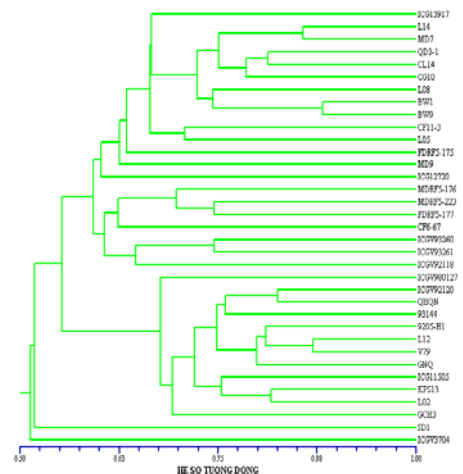
- Các mẫu giống được đánh giá tính kháng bệnh để lựa chọn cho việc phân tích phân tử phục vụ chọn tạo giống lạc mới năng suất, chất lượng và kháng khá với bệnh rỉ sắt, héo xanh.

3.3.2.3. Phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc kháng bệnh héo xanh vi khuẩn

- Khi phân tích 20 cặp mỗi SSR với với tập đoàn 35 giống lạc có phản ứng khác nhau đối với bệnh héo xanh vi khuẩn thì 19 cặp mỗi cho tính đa hình trừ cặp mỗi L26. Giá trị PIC dao động từ 0,284 (L29) đến 0,615 (L36). Trong đó 8/19 cặp mỗi cho tính đa hình phong phú nhất với giá trị PIC $\geq 0,5$.
- Kết quả phân tích trên sơ đồ hình cây cho thấy: các giống chủ yếu tập trung vào 2 nhóm chính. Hai giống là ICGV3704 và SĐ1 nằm riêng biệt. Hệ số di truyền sai khác giữa 35 giống dao động từ 12% đến 49% (Hình 3; 4).
- Như vậy kết quả phân tích tính đa hình 35 giống lạc bằng kỹ thuật SSR với 20 mỗi SSR đã cho ta thấy sự khác nhau giữa chúng rất rõ ràng ở mức độ phân tử, điều đáng lưu ý là các giống có cùng nguồn gốc hoặc cùng mức độ kháng bệnh lập thành một nhóm nhỏ.



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR với cặp mỗi L45 của 35 giống lạc.



Hình 4. Sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ giữa 35 giống lạc tập đoàn kháng bệnh héo xanh

3.3.2.4. Kết quả phân tích đa dạng tập đoàn 33 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt bằng các chỉ thị RAPD

Kết quả phân tích tính đa hình ADN: Sàng lọc 80 đoạn mỗi ngẫu nhiên đã được dùng để nghiên cứu tính đa hình ADN của 33 giống lạc, kết quả là chỉ 11 đoạn mỗi (RA31, RA36, RA40, RA45, RA142, RA143, RA159, UBC3, UBC776, OPL3 và OPH08) biểu hiện tính đa hình với tổng số 2651 phân đoạn ADN được nhân bản ngẫu nhiên. Số phân đoạn ADN nhân bản của mỗi đoạn mỗi cho từng giống dao động từ 2 (RA45) đến 15 (RA40), bình quân mỗi đoạn mỗi nhân bản được 7 phân đoạn ADN kích thước khoảng 0,5-3,0 Kb.

- Phân tích đa hình ADN của 33 giống lạc với 11 đoạn mỗi ngẫu nhiên, nhận được 109 phân đoạn ADN. Trong đó có 66 phân đoạn đa hình, chiếm 60,6%. Điều này cho thấy giữa 33 giống lạc nghiên cứu có sự khác nhau về mặt di truyền, mức sai khác từ 4% (1 - 0,96) đến 18% (1 - 0,82).
- Kết quả phân tích tính đa hình ADN cho thấy các giống lạc ở cùng một vùng địa lý, sinh thái được tập trung thành từng nhóm.
- Giữa các giống chống chịu bệnh rỉ sắt của tập đoàn giống ICRISAT và các giống năng suất trong nước không nằm trong cùng một nhánh. Vì thế có thể lựa chọn các cặp bố mẹ mong muốn để phục vụ cho công tác chọn tạo giống mới.

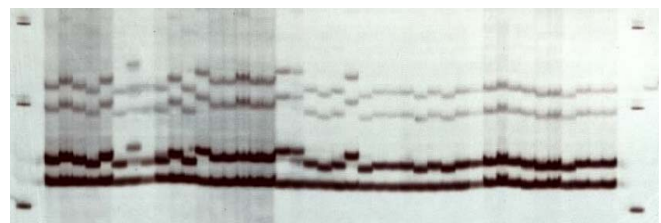
3.3.2.5. Xác định các chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

23 cặp mỗi SSR được sử dụng cho phân tích đa dạng tập đoàn 42 giống lạc có mức độ kháng khác nhau với bệnh rỉ sắt. Kết quả tất cả 23 cặp mỗi SSR đều cho tính đa hình với giá trị PIC từ 0,239 (L47) đến 0,616 (L42), 12/23 cặp mỗi SSR cho tính đa hình cao với giá trị PIC $\geq 0,5$ (52%) (bảng 2). Đã thu được tổng số 139 allen được nhân bản, trung bình số allen là 6,04/ locus (Hình 5).

Mối liên quan giữa kiểu gen (chỉ thị SSR) và kiểu hình (điểm kháng bệnh rỉ sắt): các số liệu phân tích SSR (sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn ADN của 23 cặp mỗi SSR với 42 giống lạc) với tính kháng bệnh rỉ sắt của từng giống (điểm đánh giá tính kháng bệnh của từng giống) đã được phân tích bằng phần mềm Genstat. Những chỉ thị được xem như là có liên quan đến tính kháng bệnh khi có giá trị $P < 0,05$. Kết quả phân tích nhận được ở (Bảng 2 và Bảng 3) đã chỉ ra **8 chỉ thị L26, L50, L40, L43, L44, L31 và L38 được xem như là có liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc**. Trong các chỉ thị nhận biết ở đây, có hai chỉ thị L43 và L38 cũng đã được nhận biết vị trí nhờ định vị (QTLs) trong kết quả lập bản đồ tính kháng bệnh rỉ sắt trên quần thể F7 lai giữa giống kháng và giống nhiễm (số liệu chưa công bố). Tuy nhiên, để xác định sự liên kết thực sự giữa kiểu gen (SSR) và kiểu hình (bệnh rỉ sắt) cần phải có thêm các nghiên cứu ở mức độ chính xác hơn như lập bản đồ liên kết phân tử và kiểm tra thực tiễn tính kháng bệnh của các dòng trên đồng ruộng.

Bảng 2. Các allen có liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

Số vị trí của allen	Mỗi	Allen (bp)	Giá trị P
25	L26	120	0,013
27	L26	160	0,044
48	L50	250	0,014
70	L40	280	0,053
73	L43	280	0,004
75	L43	290	0,005
91	L44	150	0,001
123	L31	300	0,044
132	L38	280	0,032



Hình 5. Điện di sản phẩm PCR của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt với cặp mỗi L26 trên gel poly acrylamid

Bảng 3. Trình tự nucleotide của các cặp mỗi SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt

Tên cặp mỗi	Trình tự các nucleotide	Tên cặp mỗi	Trình tự các nucleotide
L26	5' cgtcggatttatctgccagt 5' agtaggggcaaggggtgatg	L38	5' cgttctttgccgttgattct 5' agcacgctcgttctctcatt
L28	5' ctttcgcgcttgttgaaat ' 5' aagctgcgtgtaaaagggtc	L43	5'tgaccaaagtgatgaagg ga 5'aagtgtttgtacatctgtcatcg
L32	5' ggacagccgatgctattta 5' acatgagtccttttccctt	L52	5' attcgtctccttcttttggc 5' ttttgctccaaatggcttc
L36	5' gcaactaggggttaggccgt 5' caaccctatacaccgaggga	L54	5' catgccatcatcacacaca 5' ggaggaagcaatggtttcag

3.3.2.6. Lai hữu tính, tạo quần thể và chọn lọc giống kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

Từ các kết quả nghiên cứu về sinh học phân tử, đề tài đã tiến hành lai hữu tính giữa các giống kháng và nhiễm theo hướng kháng bệnh rỉ sắt và bệnh héo xanh, cụ thể là:

- Đối với bệnh rỉ sắt: đã tạo được 67 cá thể F_2 của tổ hợp lai ICGV950166 x L12 và 206 dòng của tổ hợp lai L08 x ICGV95051.

- Đối với bệnh héo xanh tạo được 194 cá thể F_2 của tổ hợp lai Gié Nho Quan x L08.

Các cá thể F_3 của hai tổ hợp lai tạo giống lạc kháng bệnh rỉ sắt đã được sử dụng để nghiên cứu phân tích với các chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt.

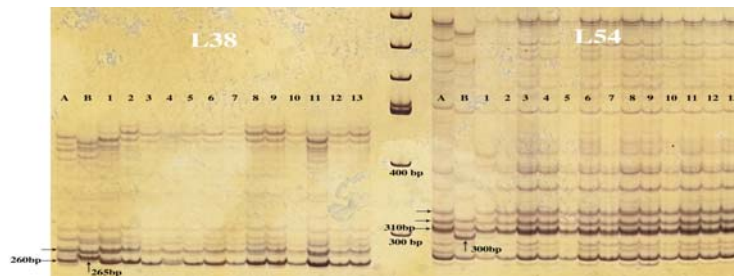
- Tất cả bố mẹ của cặp lai và các cá thể F_3 đã được đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo trong phòng thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm do Bộ môn miễn dịch học, Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam thực hiện.

3.3.2.7. Nghiên cứu sàng lọc sớm các dòng lạc F_3 của cặp lai ICG950166 x L12 với các chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt

- Kết quả phân tích kiểu gen kháng bệnh rỉ sắt các dòng lạc tự phối F_3

Phân tích 51 cá thể F_3 của tổ hợp lai kháng bệnh rỉ sắt thu được 13 cá thể (ký hiệu B24, B37, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110), mang chỉ thị liên quan đến khả năng kháng bệnh rỉ sắt (Hình 6).

Kết quả đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh rỉ sắt: Để có cơ sở cho nghiên cứu áp dụng kỹ thuật MAS trong tạo giống lạc kháng bệnh rỉ sắt, chúng tôi đã tiến hành đánh giá tính kháng bệnh rỉ sắt đối với 51 cá thể lạc bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo. Kết quả nhận được là 8 cá thể (B24, B37, B46, B60, B102, B108, B12 và B110) đều kháng với bệnh rỉ sắt ở mức điểm từ 1-3.



Hình 6. 13 cá thể F_3 cặp lai ICG950166 x L12 mang chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt phân tích với mỗi L38 và L54 (Kích thước đoạn ADN liên quan là 260bp đối với L38 và 310 bp đối với chỉ thị L54).

3.3.2.8. Tóm tắt kết quả về tạo giống lạc có sự hỗ trợ của sinh học phân tử

- Đã thu thập và lưu giữ được tập đoàn 170 mẫu giống lạc trong đó có 10 giống kháng cao với bệnh rỉ sắt, 6 giống kháng khá với bệnh rỉ sắt và 01 giống kháng cao với bệnh héo xanh (Gié Nho Quan).
- Hoàn thiện phương pháp đánh giá chính xác bệnh rỉ sắt và héo xanh dùng trong nghiên cứu chỉ thị phân tử. Đó là phương pháp hàng nhiễm (infecter row) để đánh giá sàng lọc khối lượng lớn nguồn vật liệu ngoài đồng và phương pháp lá tách (detached leaf technique); Phương pháp nhiễm hạt nảy mầm hoặc gây tổn thương rễ cho hiệu quả cao đối với bệnh héo xanh.
- Hoàn thành việc phân tích đa dạng ADN tập đoàn 35 giống lạc có mức độ kháng khác nhau với bệnh héo xanh vi khuẩn; Tập đoàn 33 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt; Thông qua các phép phân tích sự phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình bước đầu đã tìm ra được 7 chỉ thị SSR là L26, L50, L40, L43, L44, L31 và L38 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt lạc.
- Dựa vào kết quả phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc đã xác định được các tổ hợp lai ưu tú. Kết quả là đối với bệnh rỉ sắt đã tạo được 67 cá thể F_2 của tổ hợp lai ICGV950166 X L12 và 206 dòng của tổ hợp lai L08 X ICGV95051; Đối với bệnh héo xanh, đã tạo được 194 cá thể F_2 của tổ hợp lai Gié Nho Quan X L08.
- Trong số 51 cá thể F_3 cặp lai ICG950166 x L12, đã sàng lọc được 13 cá thể B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110 có sự xuất hiện chỉ thị đặc trưng liên kết với tính kháng bệnh rỉ sắt ở cả hai cặp mỗi L38 với kích thước phân đoạn ADN là 265 bp và 310 bp đối với cặp mỗi L54. Tất cả các dòng này đều có tính kháng cao (điểm 1-2) đối với bệnh rỉ sắt khi thực hiện việc lây nhiễm bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm.
- Các cá thể lạc lai F_3 đã được đánh giá phân tử đang được tiếp tục theo dõi để phát triển thành giống.

3.3.3. Cây đậu tương

3.3.3.1. Thu thập và đánh giá tập đoàn giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn

- Đã tiến hành thu thập được 220 mẫu giống đậu tương có tính kháng khác nhau đối với bệnh rỉ sắt và tính chịu hạn quan tâm ở cả trong nước và nước ngoài.
- Kết quả của thí nghiệm đã phân tích các mẫu giống thành nhóm chịu hạn, nhiễm bệnh rỉ sắt khác nhau làm cơ sở cho phân tích tính đa dạng ADN: Các giống chịu hạn khá giỏi: ĐT80, Cúc vàng, CM60, 95389, Đỗ lạng; Các giống chịu hạn khá: M103, D140; Các giống chịu hạn trung bình: ĐT12, VX92, Đơn ca chỉ lạng, JS4; Các giống chịu hạn yếu: VX-93, ĐT2000.

3.3.3.2. Nghiên cứu chọn một số cặp mỗi RADP và SSR thích hợp cho nghiên cứu

Đối với các cặp mỗi RAPD: Chọn được 10 mỗi có chiều dài 10 nucleotide và 2 cặp mỗi 20 nucleotide phục vụ nghiên cứu.

Đối với các cặp mỗi SSR: Chúng tôi đã chọn ra 5 cặp mỗi SSR trong vùng mạnh nhất của các nhóm liên kết kể trên đối với tính chịu hạn, trình tự của chúng được liệt kê trên bảng 3.

Đã chọn được 7 cặp mỗi SSR cho phân tích tính đa dạng trên các nhóm liên kết. Đây là những chỉ thị SSR có hệ số đa dạng di truyền cao. Như vậy, việc phát hiện ra khả năng di truyền các tính trạng liên kết cùng các chỉ thị này dễ dàng hơn.

Bảng 3. Chỉ thị SSR liên quan đến tính chịu hạn ở đậu tương

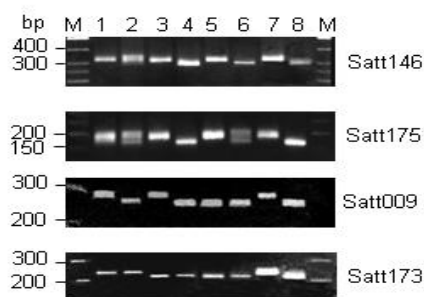
Stt	SSR	Trình tự các nucleotide	Nhóm liên kết	Kích cỡ ADN
1	Satt557	F- gcgggatccaccatgtaatatgtg R- gcgcactaaccctttattgaa	C2	207 bp
2	Satt 489	F-cgtgtgcttgcttctcttagactgact R-gcgtactacttaccctgtttgtctaaaa	C2	261 bp
3	Satt373	F- tccgcagataaattcgtaaaat R-ggccagatacccaagttgtacttgt	L	248 bp
4	Satt567	F-ggctaaccgctctatgt R- gggccatgcacctgctact	M	113 bp
5	Satt150	F-aagcttgaggttattcgaaaatgac R-tgccatcaggtgtgtgaagtgt	M	201 bp

Sự đa dạng di truyền của nguyên liệu khởi đầu

Bảy giống đậu tương: Cúc Vàng, ĐT12, ĐT80, ĐT2000, VX91, V74, CM60 được chọn làm nguyên liệu khởi đầu để tạo giống chịu hạn, kháng bệnh rỉ sắt đồng thời có năng suất cao. Trong đó, các giống vụ hè: giống địa phương Cúc Vàng (còn gọi là Cúc Lục Ngạn, Cúc Hà Bắc); ĐT80 (giống lai giữa Vàng Mộc Châu và V70); ĐT12 (còn gọi là TN12- giống nhập nội từ Trung Quốc, chống chịu sâu bệnh khá). Giống kháng bệnh rỉ sắt: ĐT2000 (giống nhập nội từ AVDC) và VX91. Giống năng suất cao: CM60 và ĐT2000. Giống miễn cảm với bệnh rỉ sắt: V74.

Đã phát hiện được 38 allele trong số các kiểu gen được nghiên cứu. Tất cả các cặp mỗi đều cho sự đa hình giữa các giống đậu tương kể trên. Như vậy, trung bình 3,7 allele cho mỗi locus và hệ số đa dạng di truyền trung bình là 0,6326 (Hình 7).

Chúng tôi chọn được 2 cặp lai là ĐT2000 X Cúc vàng và ĐT2000 X ĐT12 làm nguyên liệu khởi đầu theo hướng năng suất, chịu nóng, hạn cho vụ hè.



Hình 7. Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng các cặp mỗi SSR của các giống đậu tương. Cúc Vàng(1), ĐT2000(8), và các dòng lai F3: 2-ĐC4; 3-ĐC5; 4-ĐC6; 5-ĐC7; 6-ĐC8; 7-ĐC10.

Nghiên cứu các giống lai đã được thuần hóa và khu vực hóa: Qua phân tích thăm dò ba giống bố mẹ là Cúc vàng, M103, V74 bằng SSR thấy rằng chúng có sự đa dạng, vì vậy chúng tôi đã nghiên cứu 7 giống trong các tổ hợp lai của chúng: M103, V74, MV1, MV4, MV1-C; Cúc Vàng, ĐT93. Trong đó, tổ hợp lai M103 X V74 và 2 giống lai MV1, MV4; tổ hợp MV1 X Cúc Vàng và giống lai MV1-C; giống ĐT93 là giống lai giữa giống 821 có hệ gen Cúc vàng và giống 134 của Nhật Bản. Việc nghiên cứu bản chất di truyền và sự ổn định các tính trạng quý được di truyền từ bố mẹ ở các giống lai sau nhiều năm thuần hóa và khu vực hóa là điều cần thiết. Kết quả cho thấy trong 12 cặp mỗi SSR, có 9 cặp còn lại cho đa hình rõ rệt. Phát hiện tổng số 25 allele trên 9 cặp mỗi này (trung bình là 2,7 allele/locus). ĐT93 mang nhiều ưu điểm của Cúc Vàng, MV1 và MV4 mang đặc điểm của M103- giống đột biến chịu nóng, hạt to, năng suất cao. MV1-C trung gian, có đồng thời đặc điểm của bố và mẹ. Đây là giống có thể sử dụng gieo trồng tất cả các vụ trong năm.

Sự phân ly các chỉ thị SSR trong các tổ hợp lai ĐT2000 X Cúc Vàng và tổ hợp ĐT2000 X ĐT12: Khảo sát các dòng F3 trong tổ hợp lai ĐT2000 X Cúc Vàng bằng 12 cặp mỗi SSR cho thấy 9 cặp mỗi cho sự đa dạng giữa các dòng F3, các dòng đều mang tính trạng của bố và mẹ ở các mức độ khác nhau. Các dòng lai mang các chỉ thị di truyền của Cúc Vàng và ĐT2000 có thể chia thành hai nhóm. Trong tổ hợp lai ĐT2000- ĐT12, các dòng đều mang tính di truyền của cả giống bố mẹ. Kết quả phân tích cũng cho thấy chúng chia thành 2 nhóm. Nghiên cứu đa dạng di truyền giữa một số giống đậu tương có khả năng kháng bệnh rỉ sắt khác nhau: G1, G2, G3 là các giống miễn cảm với bệnh rỉ sắt; G4, G7 - kháng bệnh ở mức trung bình; G8, G9, G10 - kháng bệnh rỉ sắt tốt. Sử dụng 12 chỉ thị SSR để khảo sát sự khác nhau giữa các giống này đã cho kết quả bước đầu: tám giống nghiên cứu có thể chia thành 2 nhóm: nhóm 1: gồm các giống đậu tương G1, G2, G3; nhóm 2: G4, G7, G8, G9, G10 và ĐT2000. Trong nhóm 2 lại có thể chia thành 2 nhóm: G8, G9 tách riêng so với 4 giống đậu tương còn lại. Gen kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương chưa được nghiên cứu kỹ, chưa định vị được trên bộ gen. Vì vậy những kết quả này bước đầu góp phần tìm kiếm các chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng này.

3.3.3.3. Kết quả tạo giống đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt có sự phối hợp của chỉ thị phân tử (Hình 21)

Từ kết quả nghiên cứu đa dạng, đề tài đã tiến hành tổ hợp lai ĐT2000 x Cúc vàng ĐT2000 x ĐT12 để chọn tạo giống đậu tương năng suất, kháng được bệnh rỉ sắt và có khả năng chịu hạn khá. Các dòng triển vọng F6 đã được thử nghiệm ở một số vùng sinh thái khác nhau. Sau đây là kết quả thử nghiệm đại diện vụ **xuân 2004 tại vùng nước trời Thanh Hà, Hoà Bình**.

- Mẫu dòng ĐT213.4.347, ĐT320.2.176 đạt năng suất 3,0–3,1 tấn/ha, vượt so với DT84 16% và tăng so với ĐT12 từ 30–40% ở Hà Nội. Mẫu giống ĐT213.5.250 có khả năng sinh trưởng, phát triển tương đối tốt và đạt năng suất cao nhất (**2437kg/ha**) sau đến ĐC98.1.120 (2156kg/ha) tại Hoà Bình.
- Các mẫu dòng trên đều cứng cây, chống đổ khá tốt, nhiễm bệnh ở mức nhẹ đến trung bình, đặc biệt cải tiến được một số tính trạng (màu vỏ hạt, rốn hạt, độ rạn nứt vỏ hạt) so với mẫu giống bố mẹ ĐT2000.
- Qua các vụ thử nghiệm ở các vùng sinh thái khác nhau và kết hợp với phân tích các chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn đã chọn được 3 dòng triển vọng là **ĐT213.4.347 (ĐT4), ĐT320.2.176 (ĐT7), ĐT213.5.250 (ĐT5)**. Phản ứng với mùa vụ của các dòng: Vụ xuân: mẫu dòng **ĐT213.4.347 (ĐT4), ĐT320.2.176 (ĐT7)** có thời gian sinh trưởng 96–98 ngày, năng suất đạt 3106–3166kg/ha, vượt so với DT84 16% và tăng so với ĐT12 từ 30–40%. Mẫu dòng **ĐT213.5.250 (ĐT5)** sinh trưởng, phát triển tốt nhất tại vùng nước ở Hoà Bình có thời gian sinh trưởng 87–94 ngày, năng suất đạt (2156–2437kg/ha). Vụ đông: mẫu dòng ĐT320.2.176 (ĐT7), ĐT213.4.347 (ĐT4) và ĐT213.5.250 (ĐT5).
- Các mẫu dòng chọn lọc đều cứng cây, chống đổ khá tốt, nhiễm sâu, bệnh ở mức nhẹ đến trung bình.
- Dòng DT213.4.347 (ĐT4) (**ký hiệu dòng gửi đi khảo nghiệm là ĐT26**) đã được gửi sang Trung tâm khảo kiểm nghiệm giống cây trồng TƯ để tham gia khảo nghiệm ở vụ Đông 2004 (vụ thứ nhất).

3.3.3.4. Tóm tắt kết quả tạo giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử

- Chọn được các chỉ thị phân tử SSR để nghiên cứu tính đa dạng và liên quan đến tính chịu hạn: Satt005, Satt042, Satt146, Satt175, Satt173, Satt 009; Satt431, Satt150; Satt373; Satt489, Satt557, Satt567.
- Các chỉ thị phân tử: Satt489, Satt373, Satt150 có thể sử dụng để chọn dòng có khả năng chịu hạn.
- Các chỉ thị Satt042, Satt173 có thể có liên quan đến gen kháng bệnh rỉ sắt và có thể chọn để nghiên cứu định vị gen này trong bộ gen.
- Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của 7 nguyên liệu khởi đầu đã tìm ra các giống có khoảng cách di truyền xa hơn các giống khác để sử dụng trong lai tạo: tổ hợp ĐT2000 và Cúc vàng; tổ hợp ĐT2000 và ĐT12.
- Nghiên cứu sự phân ly và di truyền các chỉ thị SSR của một số dòng F3 tổ hợp lai ĐT2000 và Cúc Vàng có thể dự đoán các dòng ĐC4, ĐC5, ĐC7 ĐC10 có triển vọng để nghiên cứu theo dõi tiếp; còn tổ hợp lai ĐT2000 và ĐT12 có thể lưu ý đến các dòng ĐT1, ĐT4, ĐT5, ĐT7.
- Thông qua các vụ thử nghiệm ở các vùng sinh thái khác nhau và kết hợp với phân tích các chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn đã chọn được 3 dòng triển vọng **ĐT213.4.347 (ĐT4), ĐT320.2.176 (ĐT7), ĐT213.5.250 (ĐT5)**.
- Các tính trạng của các con lai phần lớn đều thể hiện trung gian của bố mẹ, đặc biệt con lai cải tiến được một số nhược điểm của giống bố mẹ ĐT2000 như rốn đen, vỏ hạt vàng xám, rạn và tính trạng này ổn định qua các thế hệ. Các mẫu dòng chọn lọc đều cứng cây, chống đổ khá tốt, nhiễm sâu, bệnh ở mức nhẹ đến trung bình.
- Dòng DT213.4.347 (ĐT4) (**ký hiệu dòng gửi đi khảo nghiệm là ĐT26**) đã được gửi sang Trung tâm khảo kiểm nghiệm giống cây trồng TƯ để tham gia khảo nghiệm ở vụ Đông 2004 (vụ thứ nhất).

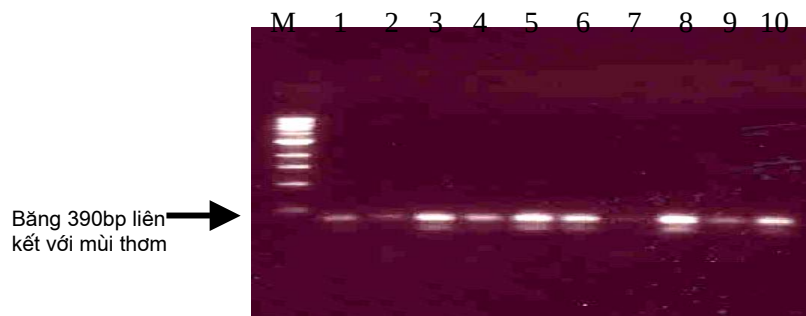
3.4. Đánh giá sớm các dòng lúa và ngô chọn lọc được bằng các chỉ thị phân tử liên quan

3.4.1. Đánh giá sớm các dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao với các chỉ thị STS

- Hai chỉ thị STS liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn và 5 chỉ thị liên quan đến chất lượng lúa gạo (trình tự nucleotide của các chỉ thị như trong bảng 4) đã được sử dụng cho việc phân tích các dòng lúa chất lượng mới tạo được. Kết quả phân tích bước đầu chọn được 5 dòng lúa đơn bội kép (HPMD4,

Bảng 4. Trình tự các chỉ thị STS liên quan đến tính kháng đạo ôn và chất lượng lúa gạo

TT	Tên môi	Trình tự môi	Kích cỡ đoạn ADN (bp)	Gen liên kết
1	RG64	5- gtt gttgagctctcaatgcctgttc -3 5- ctgcagtgcgaatgtacggccagg-3	1155	đạo ôn
2	RZ536	5-ataggaggaggagggcaa -3 5- acttgtcatgccagcta -3	213	đạo ôn
3	Wxa	5- gtatacagcaataaacccatgagtc -3 5- tagctgttgctgtggaagatc -3	2487	hàm lượng Amyloza
4	RG171	5- tgacaggttgctgtctcc -3 5- ttcccccctttgggtt -3	557	độ bền gel
5	RZ284	5- ggaacagttctcagtttc -3 5- gcactgaaggatcagct -3	343	dài hạt
6	RG28	5-gatgggtagactagacca -3 5-taccaatctaccaatcag -3	390	mùi thơm
7	G243A	5- ccaactaggaatgcat -3 5-ttgaagtaagagaagc -3	143	độ bền gel



Hình 8 . Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN một số cây lúa lai với môi RG28. 1: WAB56125; 2: KDMKL105 (cây lúa thơm đã được xác định); 3: Tế tếp; 4-10: Các cây lai F5 của cặp lai WAB56,125 và KDML105 (WK).

HPMD6 và HPMD9, HPMD13, HPMD20) mang đoạn ADN liên kết với gen kháng bệnh đạo ôn Pi-2(t) và 2 dòng cây F3 (F3C1 và F3C10) vừa có tính kháng bệnh đạo ôn vừa có các đặc điểm chất lượng gạo tốt từ tổ hợp lai Moroberekan và WAB56-125. Hình 8 là kết quả phân tích một số dòng chọn được với chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn và chất lượng lúa gạo.

- Đã khảo nghiệm Quốc gia một dòng (HPKW1) chất lượng cao ở vụ Mùa 2004. Dự kiến năm 2005 sẽ đưa đi khảo nghiệm tiếp 02 dòng lúa chất lượng kháng đạo ôn.

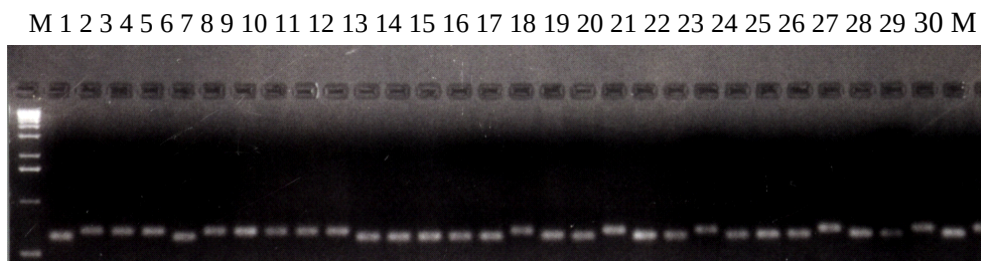
3.4.2. Đánh giá sớm các dòng lúa xuất khẩu với các chỉ thị STS

Đánh giá hàm lượng amylose với chỉ thị STS liên quan: Để có cơ sở cho nghiên cứu, chúng tôi đã sử dụng các chỉ thị Wxa liên quan đến hàm lượng amylose để phân tích tập đoàn các giống lúa trong nghiên cứu. Kết quả đã chỉ ra tính đa hình ở các giống lúa mùa có hai phân đoạn ADN với kích thước khác nhau. Tính đa hình được phân biệt giữa hàm lượng amylose cao và thấp trên các quần thể lúa mùa.

Đánh giá mùi thơm thông qua kiểu gen: Phân tích các dòng cây lai BC1F2 của một số tổ hợp lai với chỉ thị RG28 (chỉ thị liên quan đến mùi thơm ở gạo) đã chỉ ra kết quả đáng lưu ý. Chẳng hạn kết quả phân

tích của quần thể BC1F2 cặp lai IR64 (không thơm) x DS20 (thơm) với chỉ thị RG28 ở hình 9 cho thấy sự khác nhau rõ rệt giữa các cá thể con lai so với bố mẹ. Những cá thể mang phân đoạn ADN có kích thước là 800 bp (như giống lúa DS20) là các dòng lúa mang chỉ thị liên quan đến mùi thơm, còn các dòng mang phân đoạn ADN kích thước 750 bp (giống như giống lúa IR64) sẽ không có mùi thơm.

Nghiên cứu sự phân ly của các locút liên quan đến mùi thơm khi phân tích trên quần thể F1 và BC1F1 với các chỉ thị RG28 đã không chỉ ra tính đa hình. Nhưng đối với quần thể F2 cho tỷ lệ 12% đa hình, đối với các dòng BC1F2 có tỷ lệ là 9,5%. Điều này, cho thấy sự phân ly theo cách phân tích các tổ hợp có kết quả tương tự.



Hình 9. Kết quả phân tích marker phân tử với marker RG28 tách quần thể BC 1F2 trên cặp lai IR 64/ DS 20; M: là marker chuẩn 1Kb; băng 1: là IR 64, 2: DS20, Từ 3 tới 32 là cá thể từ BC1F2.

3.4.3. Kết quả chọn tạo các dòng ngô mới có sự trợ giúp của chỉ thị phân tử

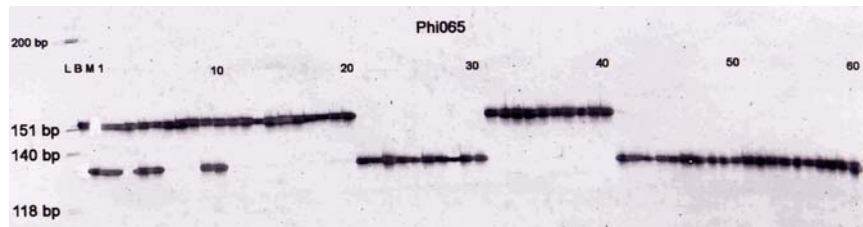
Xác định ưu thế lai thông qua kết quả phân tích đa dạng di truyền tập đoàn giống ngô bằng kỹ thuật RAPD và SSR: Thông qua việc phân tích đa dạng di truyền tập đoàn 29 dòng ngô thuần có nguồn gốc khác nhau với 60 chỉ thị RAPD đã xác định được 2 nhóm ưu thế lai. Khoảng cách di truyền tương quan thuận với năng suất hạt của các tổ hợp lai F1. Đã xác định 3 tổ hợp lai có thời gian sinh trưởng trung bình, năng suất cao hơn đối chứng từ 9 - 14%, màu hạt đẹp, chống đổ tốt. Kết quả là đã tạo được dòng ngô mới CN4 và CN5 có triển vọng làm giống.

Chọn lọc sớm các dòng ngô kháng bệnh khô vằn bằng các chỉ thị phân tử liên quan: Hiện nay, có một số chỉ thị SSR đã được công bố là liên quan đến tính kháng bệnh khô vằn ở ngô. Để đánh giá các dòng ngô chọn tạo được, chúng tôi đã tiến hành phân tích các dòng ngô tạo được với các chỉ thị SSR liên quan. Kết quả bước đầu đã xác định được hai chỉ thị Phi065 và Phi123, trình tự các nucleotide như trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Trình tự các nucleotide của hai chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh khô vằn ở ngô

TT	Tên mỗi	Trình tự các nucleotide	Kích cỡ đoạn ADN (bp)
1	phi065	5'- agggacaatacgtggagacacag -3 5'- cgatctgcacaagtggagtaggtc -3	131-151
2	phi123	5'- ggagacgaggtgctacttcttcaa -3 5'- tgtggctgaggctaggaatctc -3	146-160

Hình 10 là kết quả phân tích 60 dòng ngô thế hệ S4 với chỉ thị Phi63 và đã phát hiện ra 30 dòng ngô mang phân đoạn ADN liên quan tính kháng bệnh khô vằn có kích thước khoảng 151 bp. Kết quả phân tích phân tử cũng phù hợp với kiểu hình tính kháng. Tuy nhiên để khẳng định kết quả cần phải có các nghiên cứu tiếp.



Hình 10. Phân tích tính kháng bệnh khô vằn của thế hệ S4 với chỉ thị Phi 065

Một số kết quả chọn tạo giống ngô năng suất kháng bệnh khô vằn có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử:

- Thông qua phép phân tích phân tử với tập đoàn 29 dòng ngô bằng các chỉ thị RAPD và 80 dòng thuần bằng chỉ thị SSR đã xác định được 300 tổ hợp lai theo hướng tạo giống ngô năng suất, chất lượng và kháng bệnh khô vằn. Xác định 10 tổ hợp lai có triển vọng tốt.
- Bước đầu đã xác định được 02 chỉ thị SSR đó là Phi123 và Phi065 liên quan tới tính kháng bệnh khô vằn ở ngô.
- Thông qua phương pháp gây nhiễm nhân tạo trên đồng ruộng và phân tích với chỉ thị phân tử liên quan bệnh khô vằn ở ngô, đã xác định được 02 dòng ngô C177 và C305 và 01 tổ hợp lai (CN2) kháng được bệnh khô vằn.
- Các dòng ngô CN4, CN5 và F145 đã tham gia khảo nghiệm quốc gia vụ Xuân 2004. Trong đó dòng F145 được đánh giá là dòng triển vọng và đang tiến hành thử nghiệm rộng để xin công nhận giống vào năm 2005.

3.5. Kết quả khảo nghiệm và triển khai sản xuất thử các dòng lúa, ngô và đậu tương

Từ các kết quả phân tích một số đặc điểm nông học, sinh lý, sinh học phân tử, chất lượng lúa gạo... Đề tài đã chọn được 7 dòng cây trồng ưu tú, trong đó có 03 dòng lúa (NTCĐDB-5, OM3566 và HPKW1) ba dòng ngô (CN4, CN5 và F145) và một dòng đậu tương. Số vụ khảo nghiệm và diện tích sản xuất thử của các dòng như trong bảng 6:

Bảng 6. Số vụ khảo nghiệm và diện tích sản xuất thử của các dòng cây trồng tạo được

TT	Tên dòng	Số vụ khảo nghiệm cơ bản	Diện tích sản xuất thử (ha)	Ghi chú
Lúa				
1	NTCĐDB-5	3	3673	Hạt gạo dài, năng suất đạt trên 5 tấn/ha, chất lượng gạo khá. Dự kiến xin công nhận giống tiến bộ vào năm 2005
2	OM3566	1	1	Hạt gạo dài, năng suất đạt 5,6 tấn/ha, kháng đạo ôn khá.
3	HPKW1	1 (vụ Mùa 2004)	0,2	Chất lượng gạo khá, kháng đạo ôn
Ngô				
4	CN4	1 (vụ Xuân 2004)	50	Năng suất đạt 66,55 tạ/ha, chịu khá bệnh khô vằn
5	CN5	1 (vụ Xuân 2004)	50	Năng suất đạt 67,1 tạ/ha, chịu khá bệnh khô vằn
6	F145	1 (vụ Đông 2004)	50	Năng suất đạt 75 tạ/ha, chịu khô vằn khá. Sẽ xin công nhận giống tiến bộ vào năm 2005
Đậu tương				
7	ĐT26	1 (vụ Đông 2004)	5	Năng suất đạt trên 3 tấn/ha, chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt khá.

Kết quả đánh giá khảo nghiệm một số chỉ tiêu nông sinh học của các dòng được trình bày trong bảng 7 và 8. Sau đây là trích lược một số kết quả chính của khảo nghiệm cơ bản về các dòng chọn tạo được (Dòng lúa HPKW1, dòng ngô F145 và dòng đậu tương ĐT26 chưa có kết quả báo cáo của khảo nghiệm cơ bản).

Bảng 7 . Thống kê một số đặc điểm nông học của các dòng lúa khảo nghiệm

Loại cây	Tên dòng	TGST (ngày)	Cao cây	Dài hạt (mm)	Rộng hạt (mm)	D/R	Chất lượng gạo	Điểm bệnh đạo ôn	Năng suất (tấn/ha)
Lúa	NTCĐDB-5	97-100	100-110	7,6	2,3	3,3	ngon, mất mùi thơm	5	4,92
	OM3566	95-100	95-105	7,2	2,2	3,2	ngon, hạt gạo trong không bạc bụng	3	4,98
	HPKW1	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-) chưa có kết quả của khảo nghiệm, TGST: Thời gia sinh trưởng, D/R: dài/rộng của hạt gạo

Bảng 8. Thống kê một số đặc điểm nông học của các dòng ngô khảo nghiệm

TT	Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây(cm)	Điểm đều cây	Điểm chịu bệnh khô vằn	Dạng và màu sắc hạt	Năng suất	
							Tấn/ha	Vượt đ/c (%)
1	CN4	100	206,6	2,0	Tốt	Bầu răng ngựa, vàng cam	6,7	+11,9
2	CN5	117	186	2,0	Trung bình	Răng ngựa, vàng sáng	6,6	+11,1
3	F145	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (điểm bệnh khô vằn: 1- không nhiễm, 2 - nhiễm nhẹ, 3- nhiễm trung bình; 4- nặng; 5- rất nặng); (-): chưa có kết quả của khảo nghiệm.

Song song với khảo nghiệm cơ bản các dòng cây tạo được, chúng tôi cũng đã tiến hành sản xuất thử, trong đó đáng chú ý nhất là dòng lúa NTCĐDB- 5 đã sản xuất với diện tích 3673 ha và dòng ngô F145 với diện tích 100 ha. Đây là hai dòng cây có nhiều ưu việt so với các giống đang được gieo trồng về năng suất, chất lượng và tính chống chịu. Nhận xét của các địa phương gieo trồng hai dòng cây mới: Dòng lúa NTCĐDB-5: thích ứng rộng, năng suất đạt 5 tấn/ha, cơm mềm và ngon cơm, nhưng mất mùi thơm, chịu khá với các loại sâu bệnh. Dòng ngô 145: đều cây, chống đổ tốt, chịu hạn và khô vằn, năng suất đạt trên 7 tấn/ha, có nơi như Nam Hà và Sơn La đạt đến 8 tấn/ha.

3.6. Mở rộng sản xuất giống lúa mới DR3 ở 12 tỉnh và thành phố với tổng diện tích sản xuất đạt gần 3000 ha. Giống lúa DR3 đã được Hội đồng giống, Bộ NN và PTNT phê duyệt công nhận là Giống tạm thời ngày 16/1/2004.

Tóm tắt chung nhận xét của các địa phương tham gia sản xuất lúa DR3: Độ thuần giống khá, trổ tập trung, đẻ khỏe, dạng hình đẹp, cứng cây. Chịu nóng và chịu hạn khá, tương đối sạch sâu bệnh, năng suất đạt khoảng 60tạ/ha. Thời gian sinh trưởng ngắn hơn CR203 là 5 ngày, dạng hạt thon dài, chất lượng gạo khá hơn DR2, có ưu thế rõ trong vụ Mùa.

CHƯƠNG IV. TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC

4.1. Kết quả khoa học nổi bật và khả năng áp dụng của đề tài

4.1.1. Kết quả khoa học nổi bật

- 1) Chuyển giao quy trình công nghệ nhân giống quy mô sản xuất cây Keo lai và Bạch đàn lai cho 03 đơn vị nghiên cứu và sản xuất trong nước đó là:
 - Trung tâm Phát triển Khoa học Công nghệ Hà Tĩnh
 - Trường trung học kinh tế – kỹ thuật và dạy nghề tỉnh Tuyên Quang
 - Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Quảng Trị
- 2) Nghiên cứu thành công phương pháp chuyển tính cảm ứng nuôi cấy để tạo dòng thuần ở ngô và hoàn thiện kỹ thuật chọn dòng biến dị soma kết hợp xử lý chiếu xạ mô sẹo các giống lúa đặc sản (Tám Xoan, Tám Ấp Bẹ, Dự Thơm, Tẻ Di hương).
- 3) Lần đầu tiên ở Việt Nam đã triển khai kỹ thuật sinh học phân tử vào việc đánh giá đa dạng tập đoàn giống phục vụ lựa chọn bố mẹ cặp lai để tạo dòng lạc kháng bệnh rỉ sắt, đậu tương chịu hạn, ngô kháng bệnh khô vằn.
- 4) Phát hiện được 02 chỉ thị liên quan đến bệnh khô vằn ở ngô, 08 chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc, 03 chỉ thị SSR liên quan đến tính chịu hạn và 02 chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương. Các chỉ thị đã được sử dụng để sàng lọc nhanh các dòng ưu tú giai đoạn sớm. Từng bước đưa kỹ thuật chọn giống cây trồng có sự giúp đỡ của chỉ thị phân tử vào việc tạo các giống lúa kháng đạo ôn, ngô năng suất kháng khô vằn, lạc và đậu tương năng suất kháng rỉ sắt/chịu hạn.
- 5) Khảo nghiệm cơ bản 03 dòng lúa (NTCĐDB 5, OM3566 và HPKW1), 03 dòng ngô (CN4, CN5 và F145) và 01 dòng đậu tương (ĐT26).
- 6) Sản xuất thử được trên 3673 ha lúa NTCĐDB-5 và trên 200 ha dòng ngô CN4, CN5 và F145. Trong đó lúa NTCĐDB-5 và ngô F145 được các địa phương đánh giá là những giống triển vọng. Dự kiến vào năm 2005 sẽ xin công nhận giống khu vực đối với dòng lúa NTCĐDB-5 và dòng ngô F145.
- 7) Giống lúa DR3 đã được Hội đồng giống, Bộ NN và PTNT phê duyệt công nhận là Giống Tạm thời ngày 16/1/2004.

4.1.2. Trình độ công nghệ

- 1) Lần đầu tiên ở Việt Nam đã triển khai thành công kỹ thuật sinh học phân tử vào việc tạo các giống cây trồng năng suất, chất lượng và chịu khá với sâu bệnh và điều kiện bất lợi của môi trường ở lúa, ngô, đậu và lạc.
- 2) Các kết quả nghiên cứu thu được đã khẳng định trình độ của các cán bộ khoa học nước ta trên lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại ngang tầm với các nước trong khu vực và thế giới. Các kết quả thu được vừa có ý nghĩa khoa học và vừa có ý nghĩa thực tiễn cao trong việc cải tiến giống cây trồng và nhân giống *in vitro*.
- 3) Đặc biệt đề tài đã tiếp cận tạo giống cây trồng có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử đạt trình độ quốc tế.
- 4) Các bước đánh giá một số đặc điểm nông học, chất lượng của các dòng/giống tạo được tuân thủ theo quy định hiện hành của Bộ NN và PTNT.

4.1.3. Khả năng áp dụng

TT	Tên tiến bộ kỹ thuật	Cơ quan tạo ra	Nơi được chuyển giao	Hiệu quả kinh tế	Pháp lý cho việc áp dụng
1	Công nghệ nhân giống <i>in vitro</i> cây Keo Lai, cây Bạch Đàn lai	Trung tâm nghiên cứu cây trồng rừng	- TTKHSX Lâm nghiệp Đông Nam Bộ. - Sở KHCNMT Hà Tĩnh, Quảng Trị - TT Giống và KT lâm nghiệp Phú Yên. - Trường TH kinh tế kỹ thuật Tuyên Quang.	Giải quyết nhu cầu cây con đồng đều phục vụ quy mô trồng rừng	Sẽ đăng ký quyền tác giả
2	Công nghệ nhân giống <i>invitro</i> Ba Kích	Viện Dược liệu	- Các Sở KHCNMT các tỉnh - Các vùng miền núi của các tỉnh như Thanh Hoá, Quảng Ninh, Phú Thọ,...	Duy trì nguồn dược liệu và cung cấp đủ cây giống để sản xuất quy mô lớn	Sẽ đăng ký quyền tác giả
3	Công nghệ nhân giống <i>invitro</i> hoa Địa lan	Viện Sinh học nông nghiệp	- Các Sở KHCNMT các tỉnh - Các vùng trồng hoa ven đô. - Các công ty trồng hoa xuất khẩu	Cung cấp cây giống đồng loạt để đáp ứng được nhu cầu thị hiếu người tiêu dùng	Sẽ đăng ký quyền tác giả
4	Công nghệ nhân giống <i>invitro</i> hai giống điều	Viện Sinh học Nhiệt đới	- Các sở KHCNMT tỉnh Phía Nam - Các vùng trồng điều ở phía Nam	Mở rộng diện tích trồng điều đáp ứng xuất khẩu	Sẽ đăng ký quyền tác giả
5	Cây Ngưu tất	Viện Dược liệu	Các địa phương trồng cây thuốc	Tạo được giống phù hợp với đặc thù khí hậu Việt Nam	Sẽ đăng ký quyền tác giả
6	Các giống ngô kháng bệnh, năng suất	Viện nghiên cứu cây ngô	- Cơ quan tạo giống - Các địa phương sản xuất hạt ngô lai F1	Tăng năng suất do giảm thiệt hại bệnh khô vằn	Sẽ đăng ký quyền tác giả
7	Các dòng lúa chất lượng khá và kháng đạo ôn	Viện Công nghệ Sinh học	- Các cơ quan tạo giống - Các địa phương	Tăng năng suất do giảm thiệt hại bệnh và cải tạo năng suất chất lượng giống	Sẽ đăng ký quyền tác giả
8	Các dòng lúa đủ tiêu chuẩn xuất khẩu	Viện NC lúa Ô Môn	- Các địa phương trồng lúa xuất khẩu	Đáp ứng thị trường gạo xuất khẩu	Sẽ đăng ký quyền tác giả
9	Các dòng lúa đặc sản năng suất	Viện Công nghệ Sinh học	Các địa phương	Tăng vụ và cải tạo năng suất	Sẽ đăng ký quyền tác giả
10	Các dòng lạc, đậu tương	Viện Công nghệ Sinh học	Các địa phương	Tăng năng suất do giảm thiệt hại về bệnh, hạn	Sẽ đăng ký quyền tác giả
11	Giống lúa DR3	Viện Công nghệ Sinh	Các địa phương	Cải thiện năng suất ở vùng đất	Đã đăng ký quyền tác

		học		bạc màu thiếu nước	giả
12	Phương pháp xác định chỉ thị SSR liên quan đến bệnh khô vằn (ngô), rỉ sắt và chịu hạn (đậu tương), rỉ sắt (lạc), đạo ôn (lúa).	Viện Công nghệ Sinh học	Các viện Nghiên cứu	Rút ngắn thời gian tạo giống	Đào tạo và sẽ đăng ký quyền tác giả

4.1.4. Những đóng góp mới của đề tài

1. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã nghiên cứu thành công phương pháp truyền tính cảm ứng nuôi cấy *in vitro* để tạo dòng thuần ở ngô.
2. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã triển khai kỹ thuật sinh học phân tử vào việc đánh giá đa dạng tập đoàn giống phục vụ lựa chọn bố mẹ cặp lai để tạo dòng lạc kháng bệnh rỉ sắt, đậu tương chịu hạn, ngô kháng bệnh khô vằn.
3. Nghiên cứu triển khai kỹ thuật ứng dụng chỉ thị phân tử vào việc chọn tạo các giống lúa kháng đạo ôn và có chất lượng gạo khá, ngô năng suất kháng khô vằn, lạc và đậu tương năng suất kháng rỉ sắt/chịu hạn.

4.2. Đào tạo: 02NCS; 07 Thạc sĩ; 13 Cử nhân; 03 Kỹ sư.

4.3. Sản phẩm của đề tài

4.3.1. Sản phẩm công nghệ của đề tài

- Quy trình công nghệ nhân giống *in vitro* quy mô bán sản xuất (10000 cây/năm): 04 (Keo lai, Bạch đàn lai, Ba kích, Địa lan).
- Quy trình nhân giống *in vitro* quy mô phòng thí nghiệm: Lúa bất dục và cây Điều: 02.
- Hợp đồng chuyển giao công nghệ (Keo lai và Bạch đàn lai): 03
- Tập đoàn giống lúa, ngô, đậu tương, lạc, keo lai...: 532 giống
- Phương pháp nghiên cứu tạo giống lúa, ngô, lạc và đậu tương: 06
- Tạo được dòng cây nguyên liệu mới: 414 dòng (lúa, ngô, lạc, đậu tương)
- Khảo nghiệm cơ bản: 03 dòng lúa, 03 dòng ngô và 01 dòng đậu tương
- Mỗi phân tử liên quan đến kháng đạo ôn và chất lượng gạo: 22 chỉ thị (trong đó 2 chỉ thị đánh giá tính kháng đạo ôn và 05 chỉ thị đánh giá chất lượng ở lúa gạo; 02 chỉ thị liên quan tới tính kháng bệnh khô vằn ở ngô; 8 chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt lạc; 03 chỉ thị liên quan đến khả năng chịu hạn và 02 chỉ thị Satt042, Satt173 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương).
- Bảng số liệu về đặc điểm và trình tự chỉ thị liên quan đến việc đánh giá đa dạng di truyền và phân tích một số tính trạng quan tâm đối với lúa, ngô, lạc và đậu đỗ làm cơ sở cho việc lai tạo giống: 6 bảng.
- Đào tạo: 02 nghiên cứu sinh; 07 cao học; 13 cử nhân và 03 kỹ sư.
- Đào tạo nâng cao: 50 cán bộ.
- Công bố 26 bài báo, và 01 bài sẽ đăng Tạp chí Euphytica
- Báo cáo khoa học: 7 báo cáo.
- Cử 02 cán bộ sang trao đổi hợp tác và học tập ở Ấn Độ

4.3.2. Sản phẩm giao nộp của đề tài đã ký trong Hợp đồng nghiên cứu với Chương trình KC.04

TT	Tên sản phẩm	Số lượng đăng ký	Chỉ tiêu KT - KT đăng ký	Kết quả đạt được		Đánh giá (so với Hợp đồng)
				Số lượng sản phẩm	Chất lượng sản phẩm	
1	Quy trình công nghệ nuôi cấy mô.	03 quy trình	Quy mô bán sản xuất (1 vạn cây/năm)	04 (Cây Keo lai, Bạch đàn lai, Ba Kích và Địa lan)	Quy mô 1 vạn cây/năm	Vượt mức (01 quy trình cây Ba Kích)
2	Xác định chỉ thị phân tử liên quan đến bệnh đạo ôn (lúa), khô vằn (ngô), rỉ sắt, héo xanh và chịu hạn ở lạc và đậu đỗ.	04 loại	Áp dụng rộng rãi trong tạo giống	6 loại chỉ thị: - 07 chỉ thị SSR liên quan kháng bệnh rỉ sắt ở lạc. - 03 chỉ thị SSR liên quan tính chịu hạn ở đậu tương. - 02 chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương - 02 chỉ thị STS liên quan tính kháng bệnh đạo ôn. - 06 chỉ thị STS liên quan đến chất lượng ở lúa gạo. - 02 chỉ thị SSR liên quan kháng bệnh khô vằn ở ngô	Áp dụng rộng rãi trong tạo giống lạc kháng bệnh rỉ sắt, đậu tương chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt; lúa chất lượng và kháng đạo ôn; Ngô năng suất kháng khô vằn	Vượt mức (01 loại chỉ thị liên quan đến chất lượng lúa gạo)
3	Tạo dòng mới có triển vọng đối với: - Lúa chất lượng, năng suất, kháng bệnh đạo ôn	3 dòng	- Năng suất 5 - 6 tấn/ha, chất lượng tốt, đạt tiêu chuẩn xuất khẩu	- Hoàn thành khảo nghiệm cơ bản với 3 dòng: Dòng lúa NTCĐDB-5 (3 vụ), dòng, OM3566 và HPKW1 (vụ thứ nhất). <u>Thử nghiệm trồng 3673 ha dòng NTCĐDB-5.</u>	Hạt gạo dài đủ tiêu chuẩn xuất khẩu, cơm ngon dẻo, NS đạt trên 5 tấn/ha, kháng đạo ôn.	Vượt mức
	- Khu vực hoá giống lúa chịu hạn DR3	01 giống	- Trồng vùng đất khó khăn về nước, NS: đạt tới 5 tấn/ha.	- 1 giống: DR3 đã được công nhận giống Tạm thời 16/12004 (khu vực hoá)	- Trồng trên ruộng khó khăn về nước NS đạt 5 tấn/ha.	Hoàn thành
	- Ngô kháng bệnh khô vằn và năng suất	2 dòng	- Năng suất 6-8 tấn/ha, kháng khô vằn	- 3 dòng: Hoàn thành cơ bản vụ thứ nhất đối với dòng CN4, CN5 và F145. <u>Triển khai sản xuất thử 200 ha các dòng CN4, CN5 và F145.</u>	- NS đạt 6,6-7,5 tấn/ha, chịu khá bệnh khô vằn, hạt vàng đều, bắp dài 23 cm.	Vượt mức
	- Lạc và đậu tương kháng bệnh rỉ sắt/ héo xanh/ chịu hạn	1 dòng	Năng suất đạt 3-4 tấn/ha	- 1 dòng: Gửi khảo nghiệm vụ thứ nhất (vụ đông 2004) dòng đậu tương ĐT213.4.347 (ĐT26). <u>Triển khai sản xuất thử 5 ha</u>	NS đạt trên 3 tấn/ha, chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt.	Hoàn thành
	- Ngưu Tắt có chất lượng tốt	1 dòng	Chất lượng như giống gốc	- Các dòng mô sẹo đang được tiếp tục nghiên cứu	Chưa đánh giá được	Đang tiến hành



Hình 11. Tái sinh chồi Bạch đàn lai (A); Ra cây *in vitro* Bạch đàn lai (B) và Ra cây *in vitro* Keo lai trong vườn ươm (C)



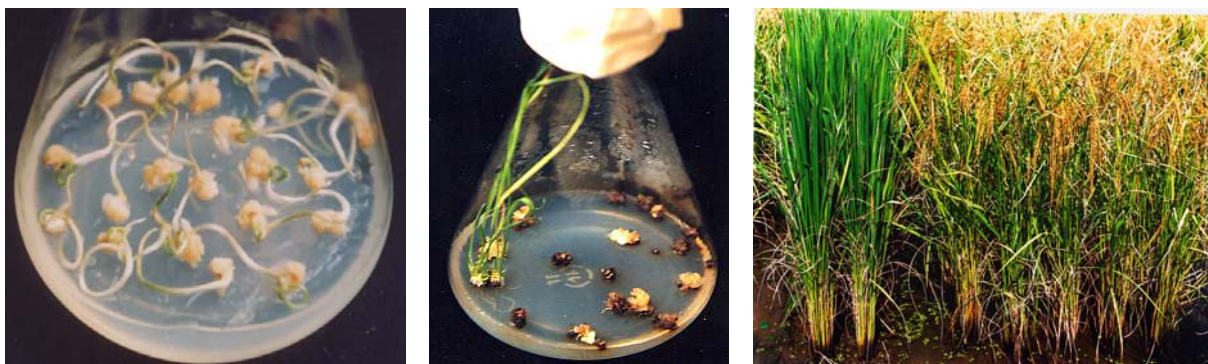
Hình 12. Tái sinh chồi cây Ba kích, tạo rễ và ra cây *in vitro* trong vườn ươm



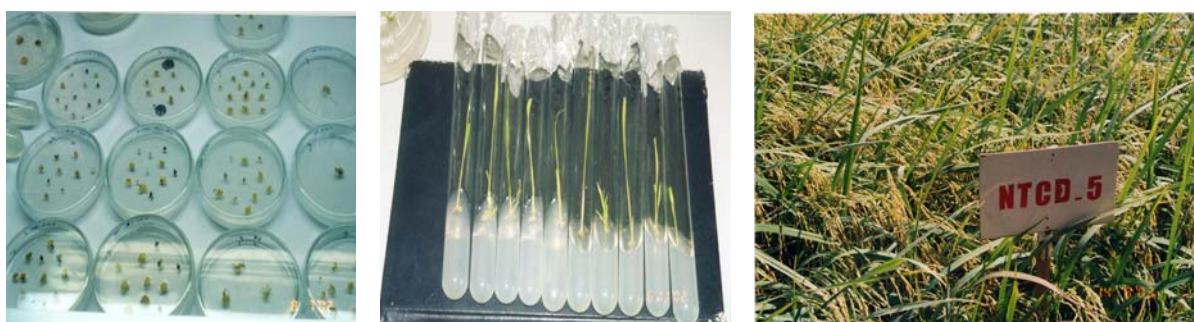
Hình 13. Một số hình ảnh trong quy trình nhân nhanh *in vitro* các giống hoa Địa lan



Hình 14. Một số hình ảnh trong quy trình nhân nhanh giống Điều và giống lúa bất dục đực



Hình 15. Một số hình ảnh trong quy trình chọn tạo giống lúa chất lượng cao từ đột biến soma



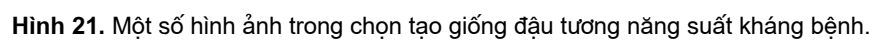
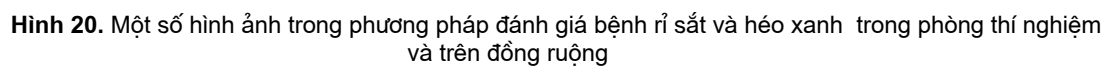
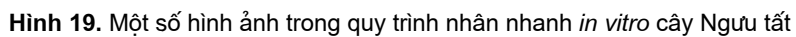
Hình 16. Một số hình ảnh trong quy trình chọn tạo giống lúa xuất khẩu qua nuôi cấy bao phấn



Hình 17. Một số hình ảnh trong quy trình chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn.



Hình 18. Một số hình ảnh trong quy trình tạo giống ngô mới năng suất kháng khô vằn.



4.4. Tồn tại của đề tài

Cần tối ưu các điều kiện nuôi cấy để khắc phục hiện trạng hoá nâu trong khi nuôi cấy mô sẹo và tăng hệ số nhân đối với cây Ngưng tất.

4.5. Hợp tác quốc tế

- Viện nghiên cứu cây trồng màu Quốc tế (ICRISAT), Ấn Độ.
- Trường Đại học tổng hợp Tuskegee, Mỹ.
- Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI).
- Công ty hoa, Thái Lan.
- Trung tâm công nghệ gen và công nghệ sinh học Quốc tế (ICGEB).

4.6. Tình hình sử dụng kinh phí

- Kinh phí SNKH: 3.000.000.000 đồng
- Tổng kinh phí đã quyết toán: 2.909.165.590 đồng

Các khoản mục đã chi như sau:

TT	Mục chi	Kinh phí (đồng)	Ghi chú
1	114+101: Thuê khoán chuyên môn	1.161.500.000	
2	119+109: Nguyên vật liệu + năng lượng	1.278.000.000	
3	117: Sửa chữa nhỏ	78.000.000	
4	145: Thiết bị máy móc	210.000.000	
5	134: Chi khác	181.665.590	Còn 90.834.410 chưa chi hết của mục 115: Đoàn ra
	Tổng	2.909.165.590	

CHƯƠNG V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận

- 1) Nghiên cứu hoàn thiện 04 quy trình công nghệ nhân giống *in vitro* quy mô bán sản xuất (công suất 10000 cây/năm) đối với cây Keo lai và Bạch đàn lai (ba dòng Keo lai: BV10, BV16, BV32 và ba dòng Bạch đàn lai: U29C3, U29E1, U29U24; đây là các dòng cây mới chọn tạo được), hoa Địa Lan (7 giống thương mại và 2 giống bản địa) và cây Ba kích. Hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* quy mô phòng thí nghiệm đối với hai giống lúa bất dục đực (Nhị 32A và BoA) và hai giống điều cao sản (PN1 và BO1).
- 2) Đã chuyển giao công nghệ nhân giống *in vitro* và giống gốc đối với cây Keo lai và Bạch đàn lai cho ba cơ sở nghiên cứu và sản xuất đó là:
 - Trung tâm Phát triển Khoa học Công nghệ Hà Tĩnh
 - Trường trung học kinh tế – kỹ thuật và dạy nghề tỉnh Tuyên Quang
 - Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Quảng Trị
- 3) Lần đầu tiên ở Việt Nam đã kết hợp giữa phương pháp tạo giống truyền thống với phương pháp sinh học hiện đại trong chọn tạo các giống chất lượng, năng suất và chịu khá với điều kiện bất lợi (sâu bệnh, hạn...) ở lúa, ngô, lạc và đậu tương.
- 4) Thông qua việc đánh giá đa dạng tập đoàn giống lúa (kháng bệnh bạc lá vi khuẩn), ngô (năng suất, chất lượng và kháng bệnh khô vằn), lạc (kháng bệnh héo xanh vi khuẩn và rỉ sắt) và đậu

tương (chịu hạn và kháng bệnh rỉ sắt) đã xác định bố mẹ các tổ hợp lai ưu tú theo mục đích chọn tạo, cụ thể như sau:

- Tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá: có thể lai các giống OM3242-50, OM3496-9, NTCD1-12, NTCD1-16 với giống có tính kháng bệnh cao như DV85.
 - Tạo giống ngô năng suất chất lượng kháng khô vằn: dòng 11 x dòng 7 (tạo được dòng ngô CN4), dòng 8 x dòng 7 (tạo được dòng CN5), dòng 10 x dòng 7 (tạo được dòng ngô F145).
 - Tạo giống lạc năng suất kháng bệnh rỉ sắt: ICG950166 x L12, ICG99501 x L08, L12 x ICG11312; Tạo giống lạc kháng bệnh héo xanh vi khuẩn: Gié nho quan x L08, Gié nho quan x L05, BW40 x V79...
 - Đậu tương năng suất và chịu hạn: ĐT2000 x Cúc vàng ĐT2000 x ĐT12...
- 5) Đã xác định và sử dụng 22 chỉ thị phân tử để chọn nhanh ra các dòng có triển vọng làm giống ở giai đoạn sớm, cụ thể: 02 chỉ thị RG64, RZ536 liên kết gen kháng bệnh đạo ôn và 05 chỉ thị Wxa, RG171, G243, RZ284 và RG28 liên quan đến chất lượng ở lúa gạo (hàm lượng amylose, độ bền gen, mùi thơm, độ dài hạt...); 02 chỉ thị Phi123 và Phi065 liên quan tới tính kháng bệnh khô vằn ở ngô; 8 chỉ thị L26, L50, L40, L43, L44, L31, L54 và L38 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc; ba chỉ thị Satt489, Satt373, Satt150 liên quan tính chịu hạn và hai chỉ thị Satt042, Satt173 liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương.
 - 6) Đề tài đã tạo được gần 3000 dòng cây làm vật liệu đầu dòng cho nghiên cứu chọn lọc tiếp theo. Đến nay đã thu 414 dòng ưu tú ở các thế hệ thứ 3, cụ thể: 200 dòng lúa, 114 dòng ngô và 100 dòng đậu tương và lạc.
 - 7) Đã tiến hành khảo nghiệm cơ bản các dòng mới tạo được: Hoàn tất việc khảo nghiệm cơ bản 3 vụ dòng lúa NTCĐDB-5, vụ thứ nhất đối với hai dòng lúa OM3566 (lúa xuất khẩu) và hai dòng ngô CN4, CN5. Đang tiến hành khảo nghiệm vụ thứ nhất dòng lúa HPKW1 (lúa chất lượng kháng đạo ôn), dòng ngô F145 và dòng đậu tương ĐT213.4.347 (ĐT26).
 - 8) Triển khai sản xuất thử dòng NTCĐDB-5 với diện tích 3673 ha ở nhiều tỉnh phía Nam và 100 ha dòng ngô F145. Dự kiến đăng ký xin công nhận giống Tiến bộ vào năm 2005 cho cả hai giống này.
 - 9) Mở rộng sản xuất giống lúa mới DR3 với tổng diện tích sản xuất quy mô đạt gần 3000 ha. Năng suất luôn vượt các giống đang trồng như Khang dân và Q5 từ 10-20 % trên các chân ruộng bạc màu thiếu nước. Giống lúa mới DR3 đã được bộ NN & PTNT công nhận là giống khu vực hoá ngày 16/1/2004.
 - 10) Đã công bố được 26 bài báo, 01 bài sẽ gửi đăng Tạp chí Euphytica; đào tạo được 02 NCS, 07 Thạc sĩ, 13 Cử nhân và 03 Kỹ sư, đào tạo 50 lượt cán bộ nâng cao cho các đơn vị phối hợp, 7 báo cáo khoa học. Cử 02 cán bộ sang trao đổi hợp tác và học tập ở Ấn Độ.

5.2. Kiến nghị

Cho kéo dài đề tài thêm 02 năm nữa để tiếp tục đánh giá tính ổn định di truyền một số tính trạng chọn lọc (chống chịu sâu bệnh, năng suất và chất lượng) các dòng triển vọng làm giống ở lúa, ngô và đậu lạc để phát triển thành giống và hoàn tất nội dung nghiên cứu tạo dòng chịu nóng đối với cây Ngưu tất.

Các công trình công bố

1. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn, Lương Thị Hoan, Lê Trần Bình, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội (2003). Nhân giống một số loài cây trồng rừng có năng suất, chất lượng cao bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 910-914.
2. Bùi Mạnh Cường, Đoàn Thị Bích Thảo, Ngô Thị Minh Tâm, Nguyễn Hương Lan, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Đinh Thị Phòng (2003). Sử dụng chỉ thị RAPDs trong nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn giống và ứng dụng để chọn lọc tổ hợp ngô lai năng suất cao phục vụ sản xuất. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 745-749.

3. Bùi Văn Thắng, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Nguyễn Văn Thắng, Trần Văn Dương (2003). Đánh giá tính đa dạng của một số giống lạc trong tập đoàn giống chống chịu bệnh gỉ sắt bằng kỹ thuật RAPD. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 805-809.
4. Dinh Thi Phong, Emma Mace, Jonathan H. Crouch (2003). Application of SSR markers in ndiversity analysis of groundnut genotypes resistant to early leaf spot. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (3): 333-346.
5. Lê Thị Bích Thủy, Nguyễn Đức Thành (2003). Kiểm tra tính chịu hạn ở một số dòng lúa lai được chọn lọc dựa vào chỉ thị phân tử STS liên quan đến tính chịu hạn ở lúa. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (2): 227-236.
6. Lê Xuân Đắc, Bùi Văn Thắng, Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Lê Duy Thành (2003). Nghiên cứu ảnh hưởng của tia gamma (Co^{60}) đến khả năng sống sót và tái sinh cây từ mô sẹo ở một số giống lúa địa phương. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 750-753.
7. Lê Xuân Đắc, Bùi Văn Thắng, Lê Trần Bình, Lê Duy Thành, Lê Thị Muội (2003). Đánh giá đa dạng di truyền của một số giống lúa Tám ở Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (4): 493-501.
8. Lê Xuân Thám, Hồ Quang Cua, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Ngọc Ngân, Nguyễn Thị Ngọc Tú, Lê Trần Bình, Lê Xuân Đắc (2003). Các dòng đột biến phóng xạ thuần giống lúa tám thơm (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 962-966.
9. Ngô Hữu Tình, Bùi Mạnh Cường, Ngô Thị Minh Tâm, Ngụy Hương Lan, Đinh Công Chính, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Đinh Thị Phòng (2003). Chọn tạo dòng ngô thuần bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 862-865.
10. Nguyễn Hữu Cường, Nguyễn Thị Kim Anh, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình (2003). Mối tương quan giữa hàm lượng proline và tính chống chịu ở cây lúa. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (1): 85-93.
11. Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Xuân Trường, Đỗ Năng Vịnh (2003). Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống và nuôi trồng phong lan *Phalaenopsis* (Lan Hồ Điệp). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 850-855.
12. Nguyễn Thị Kim Liên, Nông Văn Hải, Nguyễn Đức Thành (2003). Kết quả bước đầu của việc ứng dụng chỉ thị SSR trong chọn dòng chịu hạn ở lúa cạn. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 898-901.
13. Phan Thị Bảy, Quách Thị Liên, Đào Thị Hạnh, Phạm Việt Hùng, Lê Thị Muội, Nguyễn Đức Thành (2003). Sử dụng chỉ thị phân tử STS trong đánh giá tính kháng bệnh đạo ôn và chất lượng gạo ở một số dòng lúa lai và một số dòng từ nuôi cấy bao phấn cây F1. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 740-744.
14. Trần Phương Liên, Lương Thị Thu Hương, Trần Thị Trường, Lê Thị Muội (2004). Sự phân ly các chỉ thị SSR trong thế hệ F3 của tổ hợp lai giữa hai giống đậu tương Cúc Vàng và ĐT2000. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(1): 1-8.
15. Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải, Lê Thị Muội (2003). Protein của một số giống đậu tương có khả năng chịu nóng, chịu hạn khác nhau. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1 (1): 95-101.
16. Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải, Lê Thị Muội, Trần Đình Long (2003). Một số đặc tính liên quan đến chất lượng hạt và khả năng chịu nóng, chịu hạn ở đậu tương. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội 12-17/12: 771-775.
17. Trần Thị Phương Liên, Lê Thị Muội.(2003). Nghiên cứu đa dạng di truyền một số giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử SSR. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1(3): 347-354.
18. Vũ Hoài Sâm, Phạm Văn Hiền, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Đinh Thị Phòng (2003). Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây ba kích (*Morinda officinalis* How Rubiaceae). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội: 795-798.
19. Vũ Ngọc Phượng, Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Minh Tuấn, Thái Xuân Du (2003), Bước đầu nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây điều *Anacardium occidentale* L. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội 16-17/12: 949-952.
20. Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Thắng, Lê Thị Muội (2004), Sử dụng chỉ thị SSR để phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc (*Arachis hypogaea* L.) Việt Nam kháng bệnh rỉ sắt (đã gửi đăng TCKHCN).
21. Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Nguyễn Thị Hải Hà, Lê Duy Thành, Nguyễn Văn Viết (2004), Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá lúa

- vikhuẩn *Xanthomonas oryzae* bằng kỹ thuật RAPD. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng nông lâm nghiệp miền núi*. Thái Nguyên 23/9: 571-574.
22. Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình (2004), Kết quả chọn tạo giống lúa DR3. *Tạp chí KH và CN* (Gửi đăng 2002).
 23. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Vũ Thị Hoài, Nguyễn Thị Lý Anh (2004), Nghiên cứu quy trình kỹ thuật sau in vitro cho cây địa lan (gửi đăng *Tạp chí NN và PT nông thôn*).
 24. Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Quang Thạch (2004), Nghiên cứu tạo củ lily trồng từ củ in vitro (gửi đăng *Tạp chí NN và PT nông thôn*).
 25. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Thị Hoài (2004), Nghiên cứu nhân nhanh in vitro giống địa lan thương mại *Miss Kim* (gửi đăng *Tạp chí NN và PT nông thôn*).
 26. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Thị Hoài (2004), Nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân nhanh *in vitro* một số giống Lan có giá trị (gửi đăng *tạp chí KHKTNN trường ĐHNHI*).
 27. D.T. Phong, E.S. Mace, H.D. Upadhyaya, S. Chandra, J.H. Crouch (2005), Microsatellite marker analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases (Đang chuẩn bị gửi đăng *tạp chí Euphytica*).

Tài liệu tham khảo

1. Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Tĩnh, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998), Kết quả chọn tạo và triển khai hai giống lúa mới DR1 và DR2 bằng công nghệ tế bào thực vật, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, XXXVI, 4, tr. 6-14.
2. Bao.J.S, corke H., Sun M. (2002), Microsatellites in starch- synthesizing genes in relation to starch physiochemical properties in waxy rice (*O.zativa sativa* L.) *Theor Apply genet* .105:898-905.
3. Dương Tấn Nhựt, Da Silva JAT, Bùi Văn Lệ, Kiêm Trần Thanh Vân (2003), Thin cell layer (TCL) morphogenesis as a powerful tool in woody plant and fruit crop micropropagation and biotechnology, floral genetics and genetic transformation. *In: Jain SM & Ishii K (eds.) Micropropagation of woody trees and fruits*, pp. 783-814, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
4. Dwivedi S.L., Crouch J.H. (2003), Proceeding of a Workshop for the Asian Development Bank supported Project on molecular breeding of sorghum, groundnut and chickpea, ICRISAT 28-43.
5. Dwivedi S.L., Gurtu S., Chandra S., Yuejin W. , Nigam S.N - *Plant breeding* 120 (2001), 345-349.
6. Ferguson M.E., M. Burow, S. Schultz, P. Bramel, A. Paterson – *Euphytica*, Submitted (2003),
7. Gimenes M.A., C.R. Lopes, J.F.M. Valls - *Genetics and Molecular Biology* 25(3) (2002) 349-353.
8. He G., R. Meng, M. Newman, G. Gao, C.S. Prakash. *BMC Plant Biology* 3 (2003) 3-9.
9. Huang N., Angeles E.R., Domingo J. (1997), Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR, *Theo Appp Genet*, 313-320.
10. Jain S.M.; Greert-JanDeKlerk, (1998), Somaclonal Variation in Breeding and Propagation of Ornamental, *Plant Tiss Cult Bio*, 4 (2),63-75.
11. Li Y.F, Gong D.H, Yang M, Zhao Y.M, Luo Z.P. (2003), *Inhibition of the oligosaccharides extracted from Morinda officinalis, a Chinese traditional herbal medicine, on the corticosteron induced apoptosis in PC12 cells*. *Life Sci*. 72(8): 933-42.
12. Li Y.F, Yuan L, Xu YK, Yang M, Zhao Y.M, Luo Z.P.(2001), *Antistress effect of oligosaccharides extracted from Morinda officinalis in mice and rats*. *Acta Pharmacol. Sin.*, 22(12):1084-8.
13. Nguyễn Thị Lang, 2002. Nghiên cứu cơ bản trong công nghệ sinh học. Nhà xuất bản NN.
14. Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Kim Linh, Đoàn Thị Ái Thuần, Thái Xuân Du (2002), Effects of nutrient concentration and ventilation condition of the culture vessel on the growth of *Paulownia (Paulownia fortunei)* cultured in vitro. *Advan. Nat. Sci. Vol.3* (3): 281-287.
15. Philip V.J & Unni P.N (1984), In vitro propagation of cashew for crop improvement. *In: Bhaskara Rao E.V.V & Khan H.H (eds.) Cashew Research ADN Development*, pp. 77-82, CPCRI, Kasargod, India.
16. Seung Y.L., Joong H.L, Tae O.K (2003), selection of salt tolerance doubled haploids in rice anther culture . *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 74:143-149.

17. Sun G., M. Bond, H. Nass, R. Martin, Z. Dong -*Theor. Appl. Genet* 106 (2003), 1059-1067.
18. Trần Thanh Vân K (2003), Thin cell layer concept. *In: Duong Tan Nhut, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T (eds.) Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications*, pp. 1-16, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
19. Van Sint Jan V. (1992), Selection *in vitro* on characterization of lines of cells on plants *Oryza Sativa* L. tolerant aluminum., PhD Thesis, University Catholique de Louvain.
20. Yanagisawa.T, Kiribuch-Otobe C., Hirano H., Suzuki Y., Fujita M.(2003), Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker. *Theo appl genet* 107:84-88.
21. Zheng K., Hoang N., Bennett J.F.F.T., Khush G.S. (1995), PCR-Based marker assisted selection in rice breeding. *IRRR*.