

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

NGUYỄN TRỌNG PHƯỚC

**ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ĐỂ NGHIÊN CỨU
CHỌN GIỐNG CHỐNG CHỊU MẶN TRÊN QUẦN THỂ LÚA
TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9420201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

Cần Thơ - 2022

Công trình được hoàn thành tại:

Viện Nghiên Cứu Nông Nghiệp Công Nghệ Cao ĐBSCL
và Viện Lúa ĐBSCL

Người hướng dẫn khoa học:

GVHD 1: GS.TS. Nguyễn Thị Lang

GVHD 2: GS. TS. Bùi Chí Bửu

Phản biện 1: TS. Trần Văn Lợt

Phản biện 2: PGS. TS Nguyễn Đắc Khoa

Phản biện 3: TS. Nguyễn Thị Quỳnh Thuận

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện họp tại Viện lúa ĐBSCL ngày..... tháng..... năm 20.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư Viện Quốc gia
2. Thư Viện Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
3. Thư Viện Viện Nghiên Cứu Nông Nghiệp Công Nghệ Cao ĐBSCL
4. Thư Viện Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết đề tài

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực quan trọng trên thế giới cung cấp nguồn năng lượng chính cho một nửa dân số trên thế giới. Trong đó, ở châu Á, hơn 90% sản lượng lúa được sản xuất và tiêu thụ theo Nirmala Bandumula (2017) [66].

Lúa gạo là một trong năm loại lương thực (lúa nước, lúa mì, ngô, sắn, khoai tây) quan trọng cung cấp cho con người, chiếm hơn một phần ba lương thực trên thế giới. Ở châu Á, lúa gạo được coi là cây lương thực quan trọng nhất. Chiến lược phát triển của thế giới sẽ tập trung vào các nội dung như sau: (1) thích ứng sự thay đổi khí hậu, (2) cải tiến năng suất vượt trần, (3) tạo nền tảng đa dạng di truyền. Để làm được điều ấy, người ta phải thực hiện nghiên cứu trình tự genome, xây dựng quỹ gene (genetic stocks), và cải tiến phương pháp đánh giá kiểu hình. Việc đầu tư nghiên cứu tập trung vào cây lúa chống chịu điều kiện bất lợi như mặn, khô hạn, chống chịu sâu bệnh như vậy cần phải được chuẩn bị. Sàng lọc 100 dòng lúa chịu mặn được thực hiện bởi Nguyễn Thị Lang và Hoàng Thị Ngọc Minh (2006) [15]. Vấn đề đất mặn có thể giải quyết bằng nhiều biện pháp như: Cải tạo đất, dùng hóa chất và thủy lợi để rửa mặn. Nhưng việc này rất tốn kém, khó thực hiện ở những quốc gia chậm phát triển. Vì vậy, cần nghiên cứu phát triển giống cây trồng chống chịu mặn bằng những phương pháp khác để đạt nhiều hiệu quả và tiết kiệm chi phí. Theo Bùi Chí Bửu và ctv., (2007) [1] cho rằng chiến lược tạo chọn giống chống chịu mặn và canh tác mùa vụ thích hợp xem như là cách làm kinh tế và có hiệu quả nhất để gia tăng sản lượng lúa ở vùng nhiễm mặn. Do đó, việc chọn tạo giống lúa chống chịu mặn được thực hiện bằng kỹ thuật ứng dụng chỉ thị phân tử là ưu tiên hàng đầu, bởi tiết kiệm chi phí nghiên cứu, rút ngắn thời gian nghiên cứu và độ thành công tương đối cao.

Vì thế, đề tài ***“Ứng dụng chỉ thị phân tử để nghiên cứu chọn giống chống chịu mặn trên quần thể lúa tại Đồng Bằng Sông Cửu Long”*** được thực hiện nhằm tạo ra nguồn vật liệu có khả năng kháng mặn đáp ứng được nhu cầu cấp thiết trong sản xuất tại các tỉnh ĐBSCL.

2. Mục tiêu của đề tài

- Tuyển chọn và xác định vật liệu bố mẹ và dòng triển vọng bằng chỉ thị phân tử phục vụ cải tiến giống chịu mặn.
- Xác định kiểu gen và kiểu hình thích nghi với vùng bị xâm nhập mặn ở đồng bằng sông Cửu Long.
- Xác định dòng con lai ưu việt trong quần thể hồi giao có khả năng chịu mặn ở giai đoạn mạ.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

3.1. Ý nghĩa khoa học

- Xác định nguồn vật liệu di truyền mang các gen chống chịu mặn trong quá trình lai tạo.

- Khai thác có hiệu quả chỉ thị phân tử để phát hiện gen đích chống chịu mặn trong quần thể con lai đang phân ly và ổn định dòng con lai thông qua hồi giao để gen đích điều khiển tính chịu mặn sớm trở thành trạng thái đồng hợp tử.

3.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Chọn giống lúa mang gen chống chịu mặn phục vụ sản xuất lúa tại ĐBSCL. Tuyển chọn được 13 dòng lúa triển vọng chống chịu mặn mang gen Saltol ở thể hệ BC₃F₃ bao gồm các dòng: dòng số 1: BC₃F₃-11, 2: BC₃F₃-40, 3: BC₃F₃-51, 4: BC₃F₃-52, 5: BC₃F₃-16, 6: BC₃F₃-18, 7: BC₃F₃-34, 8: BC₃F₃-48, (của quần thể OM1490/Pokkali //OM1490) và các dòng 9: BC₃F₃-11, 10: BC₃F₃-16, 11: BC₃F₃-34, 12: BC₃F₃-39 và 13: BC₃F₃-48 (Từ tổ hợp lai OMCS2000/Pokkali//OMCS2000)".

- Khai thác nội dung chọn giống chống chịu mặn nhờ chỉ thị phân tử và quần thể hồi giao làm rút ngắn quá trình cải tiến giống lúa cao sản chịu mặn ở giai đoạn mạ.

4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

4.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là tập đoàn giống lúa mùa, tập đoàn giống lúa cao sản ở đồng bằng sông Cửu Long, những chỉ thị phân tử đã được xác định trước đây trong nghiên cứu bản đồ QTL đã được “fine mapping”.

4.2. Phạm vi nghiên cứu

Phạm vi chuyên môn của luận án là: Phạm vi nghiên cứu của đề tài là xác định kiểu hình, kiểu gen chống chịu mặn của bộ giống lúa mùa cao sản được trồng tại các tỉnh ĐBSCL, ở giai đoạn mạ, có khả năng thích nghi rộng và ổn định về năng suất.

Địa điểm nghiên cứu: Thu thập bộ lúa mùa tại các vùng trồng lúa mùa của 10 tỉnh ĐBSCL. Đề tài được tiến hành tại phòng thí nghiệm công ty công nghệ sinh học PCR; phòng thí nghiệm, hệ thống nhà lưới, nhà kính và lô đất thí nghiệm của Bộ môn Di truyền giống và Bộ môn Di truyền, chọn giống – Viện lúa ĐBSCL từ 06/2014 – 02/2018. Phòng thí nghiệm, hệ thống nhà lưới, nhà kính và lô đất thí nghiệm của Viện Nghiên Cứu Nông Nghiệp Công Nghệ Cao ĐBSCL từ 06/2015 – 09/2021.

5. Tính mới của đề tài luận án

Đề tài cung cấp thông tin di truyền về vật liệu khởi đầu làm bố mẹ trong lai tạo giống lúa mới kháng mặn.

Đánh giá các gen kháng mặn còn hiệu lực tại ĐBSCL.

Bên cạnh mục tiêu chọn tạo giống lúa mang gen kháng mặn, đề tài còn chú ý đến năng suất cao và thời gian sinh trưởng phù hợp. Điều này là điều kiện quyết định để các sản phẩm giống lúa có thể ứng dụng và phát triển rộng khi đề tài kết thúc.

Đề xuất phương pháp lai tạo truyền thống sử dụng chỉ thị phân tử để rút ngắn thời gian chọn tạo giống lúa kháng mặn, qui tụ gen kháng mặn của cây lúa.

6. Cấu trúc của luận án

Phần chính của luận án được trình bày trong 163 trang (không kể phần phụ lục): Mở đầu (5 trang), Chương 1: Tổng quan tài liệu và cơ sở khoa học của đề tài (40 trang), Chương 2: Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu (16 trang), Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận (88 trang), Kết luận và đề nghị (3 trang), Tài liệu tham khảo (11 trang), sử dụng 20 tài liệu Tiếng Việt, 70 tài liệu Tiếng Anh. Luận án có 25 bảng số liệu và 65 hình và 06 phụ lục, 08 công trình đã công bố.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

1.1. Tình hình xâm nhập mặn

Tình trạng xâm nhập mặn xảy ra ở nhiều khu vực trên thế giới. Trường hợp cực đoan nhất của xâm nhập mặn xảy ra ở một số sông của Úc. Xâm nhập mặn là phổ biến rộng rãi trong nông nghiệp tưới tiêu, đặc biệt là các nước châu Á và châu Phi có diện tích đất lớn bị ảnh hưởng ở Ấn Độ và Trung Quốc và tỉ lệ lớn đất được tưới tiêu bị ảnh hưởng ở Argentina, Ai Cập, Iran, Pakistan và Mỹ.

Đồng bằng Sông Cửu Long là nơi có lượng đất đai màu mỡ, khí hậu ôn hòa, hệ thống sông suối, kênh rạch dày đặc, nên rất thuận lợi cho phát triển nông nghiệp. Với diện tích chỉ chiếm 12% tổng diện tích tự nhiên cả nước, bao gồm 13 tỉnh và thành phố với số dân trên 17 triệu người, đồng bằng sông Cửu Long hàng năm đóng góp đến 27% GDP với 90% số lượng gạo xuất khẩu.

1.2. Tác hại của đất mặn đến cây lúa

1.2.1. Tác hại của đất mặn

Mặn ảnh hưởng đến các hoạt động sinh lý của cây.

Sự trao đổi nước: mặn thường cản trở sự hấp thụ nước của cây và có thể gây nên hạn sinh lý và cây bị héo lâu dài.

1.2.2. Phân loại thực vật theo đặc trưng chịu mặn

Thực vật tích lũy muối (euhalophyte)

Thực vật thái muối (crinohalophyte)

Thực vật cách ly muối (localihalophyte)

Thực vật không thấm muối (glycohalophyte)

1.2.3. Ảnh hưởng của mặn đến sinh trưởng của cây trồng

Thách thức chính của đất mặn đối với đất nông nghiệp là ảnh hưởng của chúng đến mối quan hệ nước và cây.

1.2.4. Ảnh hưởng trong giai đoạn nảy mầm và đầu giai đoạn mạ trên cây lúa

Ảnh hưởng của mặn bắt đầu lúc 30, 60, 90 ngày sau khi cấy nhận thấy rằng mặn gây hại nhiều nhất ở thời kỳ non nhất. Khi cây già hơn sự chống chịu của chúng gia tăng.

1.3. Đặc tính chống chịu mặn của cây lúa

Nhiễm mặn gây tổn hại đến cây lúa là do mất cân bằng thẩm thấu và tích lũy quá nhiều ion Cl^- . Nhưng những nghiên cứu gần đây cho thấy rằng nguyên nhân gây tổn hại cho cây lúa trong môi trường mặn là do tích lũy quá nhiều ion Na^+ , ion này trực tiếp gây độc trên cây.

Ion Na^+ có tác động phá vỡ và cản trở vai trò sinh học của tế bào chất trong cây. Ion K^+ có vai trò quan trọng làm kích hoạt enzyme và đóng mở khí khổng, tạo ra tính chống chịu mặn của cây. Hơn nữa, sự mất cân bằng tỷ lệ Na-K trong cây sẽ làm giảm năng suất hạt. Do vậy, cây lúa chống chịu mặn bằng cơ chế ngăn chặn, giảm hấp thu Na^+ và gia tăng hấp thu K^+ để duy trì sự cân bằng Na-K trong chồi.

Theo Yeo và Flowers (1984) [86], những thay đổi sinh lý của cây lúa liên quan đến tính chống chịu mặn được tóm tắt như sau:

Cây lúa không hấp thu (hoặc hạn chế ở mức rất thấp) lượng muối dư thừa nhờ hiện tượng hấp thu có chọn lọc.

Cây lúa hấp thu lượng muối thừa nhưng tái hấp thu lại trong mô libe, do đó Na^+ không di chuyển đến chồi thân.

Sự vận chuyển của Na^+ từ rễ đến chồi là rất thấp.

Lượng muối hấp thu thừa sẽ được vận chuyển đến các lá già và được giữ lại tại đó.

Tăng tính chống chịu của cây lúa do lượng muối hấp thu dư thừa sẽ được giữ lại tại các không bào, làm giảm mức gây hại đến quá trình sinh trưởng của cây lúa.

Cây làm loãng nồng độ muối dư thừa nhờ tăng tốc độ sinh trưởng và gia tăng hàm lượng nước trong chồi.

Tất cả những cơ chế trên đều nhằm hạ thấp nồng độ Na^+ trong các mô chức năng, do đó làm giảm tỉ lệ Na^+/K^+ trong chồi (<1).

1.4. Các nghiên cứu liên quan tính chống chịu mặn trên cây lúa

1.4.1. Nghiên cứu ngoài nước

Trong vòng 40 năm qua, có ít nhất 4,3 triệu km^2 đất trồng trọt của thế giới phải bỏ hoang do đất bị mất bởi stress phi sinh học [30]. Mỗi năm mặn đã làm mất hàng triệu tấn lúa, mà trong đó phổ biến nhất là ở các nước như Thái Lan, Việt Nam, Banglades..., nơi sản xuất hơn 90% lúa gạo thế giới.

Trên thế giới từ những năm giữa thế kỷ XX, các nước phát triển đã xây dựng các khu nông nghiệp công nghệ cao, chẳng hạn như Hoa Kỳ đầu những năm 80 đã có hơn 100 khu khoa học nông nghiệp công nghệ. Ở Anh, đến năm 1988 đã có 38 khu vườn khoa học công nghệ với sự tham gia của hơn 800 doanh nghiệp. Bên cạnh các nước tiên tiến, nhiều nước và khu vực lãnh thổ ở Châu Á cũng đã chuyển nền nông nghiệp theo hướng số lượng là chủ yếu sang nền nông nghiệp chất lượng, ứng dụng công nghệ sinh học, công nghệ tự động hoá, cơ giới hoá, tin học hoá... để tạo ra sản phẩm có chất lượng cao, an toàn, hiệu quả. Viện Lúa quốc tế (IRRI) cũng đã có những nghiên cứu chiều sâu trên cây lúa về các vấn đề mặn, thích ứng biến đổi khí hậu, và đã phóng thích những vật liệu lai, các kỹ thuật phòng lab cũng như kỹ thuật đồng ruộng có liên quan. Những thành tựu này là cơ sở để các quốc gia ứng dụng vào điều kiện thực tế của cụ thể từng khu vực canh tác lúa. Nhiều giống lúa chống chịu mặn ra đời như: *Pokkali*, *FL478*, *Bina Dhan 8*, *BRR1 Dhan 55*, *IR64-saltol*... Các giống chịu bao gồm: *Swarna-sub1*, *IR64-sub1*, *BR11-sub1*.

1.4.2. Nghiên cứu trong nước

Đối với mặn:

Cây lúa vẫn có thể bị mặn gây hại ở giai đoạn mạ, hoặc giai đoạn trổ đến chín. Việc xác định tiêu chuẩn chọn giống chống chịu mặn, xác định các tính trạng cần thiết, cơ chế kháng mặn ở giai đoạn mạ, và giai đoạn phát dục là mục tiêu của nhiều chương trình chọn giống. Tính trạng được quan tâm nhiều là mức độ tổn thương trên lá ở giai đoạn mạ, tỉ lệ hạt bất thụ ở giai đoạn phát dục, tỉ số Na^+/K^+ của chồi thân, trong điều kiện môi trường mặn. Ảnh hưởng

gây hại do mặn trên cây lúa rất phức tạp, chúng ta không chỉ quan sát tính trạng hình thái, mà còn tính trạng sinh lý, sinh hóa, tương tác với môi trường. Do đó, việc chọn lọc cá thể chống chịu mặn không thể căn cứ trên một tính trạng riêng biệt nào đó.

Việt Nam là một nước nông nghiệp với 75% dân số sống dựa vào nông nghiệp. Sản xuất nông nghiệp hiện nay vẫn chủ yếu dựa trên các hộ cá thể, quy mô nhỏ, trình độ khoa học kỹ thuật chưa cao và còn phụ thuộc rất nhiều vào thời tiết, khí hậu. Khi nhiệt độ, tính biến động và dị thường của thời tiết và khí hậu tăng sẽ ảnh hưởng rất lớn tới sản xuất nông nghiệp, nhất là trồng trọt, làm tăng dịch bệnh, dịch hại, giảm sút năng suất của mùa màng.

Vì vậy, việc xác định mức độ đa dạng di truyền của bộ giống lúa bản địa có nguồn gốc ở Đồng bằng sông Cửu Long là vấn đề cấp thiết nhằm thực hiện có hiệu quả trong việc chọn tạo giống, đồng thời để xây dựng định hướng về kiểm tra, quản lý và bảo quản nguồn gen lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long theo Nguyễn Thị Lang (2004) [10].

1.5. Các Phương Pháp Chọn Tạo Giống

*** Chọn Giống Bằng Phương Trồng Dồn**

Phương pháp trồng dồn đã được các nhà chọn tạo giống sử dụng từ lâu ở các vùng nhiệt đới và ôn đới. Mặc dù, phương pháp này có lợi là rất đơn giản nhưng thông qua nhiều năm sử dụng trồng lúa tại vùng Châu Á nhiệt đới đã luôn luôn thất bại không đưa năng suất toàn quốc lên được. Phương pháp trồng dồn chưa đưa đến nhiều tiến bộ đáng kể trong nền sản xuất lúa vùng nhiệt đới vì các nhà khoa học đã không để ý đến hai nguyên tắc căn bản của cải tiến giống:

1. Ảnh hưởng của hình thái của thân trên khả năng cho năng suất và sự cần thiết phải thay thế những dạng cây cao quá, lá rũ bằng những dạng hình có sản lượng cao hơn.

2. Tác dụng loại trừ của sự cạnh tranh trong quần thể phân ly làm giảm đi những cây phân ly có giá trị.

*** Chọn Tạo Giống Theo Phả Hệ**

Phương pháp tuyển chọn theo phả hệ được sử dụng rộng rãi và thành công nhất trong việc cải tiến giống lúa. Tuy nhiên tuyển chọn theo phương pháp này cũng có những thất bại nhất định. Phương pháp này đòi hỏi phải có nhiều thời gian để đánh giá thường xuyên những dòng suốt vụ trồng và giữ các số liệu làm căn cứ cho sự lựa chọn lúc lúa chín. Người ta phải tốn nhiều công sức vì đối với từng cá thể được chọn vừa phải chuẩn bị trồng ngoài đồng, vừa đánh giá trong phòng thí nghiệm về phẩm chất hạt tính kháng sâu, bệnh và về các tính trạng khác đối với những bộ giống đặc biệt. Trong tất cả các phương pháp chọn tạo giống, phương pháp phả hệ đòi hỏi phải quen thuộc với những đặc tính của cây đang sử dụng và sự tương tác giữa kiểu gen với môi trường trên sự biểu hiện các tính trạng.

*** Phương Pháp Hồi Giao (Backcross-BC)**

Đây là phương pháp được các nhà chọn tạo giống lúa sử dụng rộng rãi. Trong phương pháp hồi giao một tính trạng được chuyển sang một giống cải tiến bằng cách được sử dụng lại làm cây cha mẹ để lai lại nhiều lần. Sự bất lợi chủ yếu của phương pháp hồi giao là không có giống duy nhất nào lý tưởng đến nỗi nó chỉ cần cải tiến một tính trạng. Mặc dù, các chương trình chọn tạo giống lúa liên tục tìm ra những giống mới có thể tốt hơn để thay thế những giống cũ nhưng chưa có chương trình dạng hình nào đạt đến sự cải tiến vượt bậc về phẩm chất hạt, năng suất hay sự ổn định tiềm năng cho năng suất cao.

*** Chọn Giống Bằng Chỉ Thị Phân Tử (MAS)**

Sự phát triển của kỹ thuật di truyền và công nghệ sinh học đã tạo thành công rất lớn cho công tác tạo chọn giống cây trồng. Việc ứng dụng các kỹ thuật ở mức độ phân tử cho phép chúng ta chuyển những gen mong muốn hay xác định cá thể có mang gen mong muốn. Kỹ thuật hỗ trợ cho việc chọn giống thường được sử dụng là các chỉ thị phân tử RAPD, RFLP, SSR, STS, AFLP... liên kết chặt với tính trạng mong muốn dựa trên quần thể F_2 hoặc quần thể hồi giao (BC-backcross), quần thể các dòng cận giao tái tổ hợp (RIL - recombinant), quần thể các dòng gần như đẳng gen (NIL - nearly isogenic lines), quần thể đơn bội kép (DH - double haploid) [6] [8].

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

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện tại Viện Nghiên Cứu Nông Nghiệp Công Nghệ Cao ĐBSCL

Thời gian thực hiện từ tháng 06/2015 đến tháng 09/2021

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa: 101 giống lúa mùa và 100 giống lúa cao sản được thu thập từ ngân hàng gen của Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long và Viện Nghiên Cứu Nông Nghiệp Công Nghệ Cao ĐBSCL; của Viện lúa Quốc tế (IRRI) và các nước như Ấn Độ và Nhật. Trong đó, các giống làm bố mẹ là OMCS2000; OM1490, OM6162, Pokkali

Dụng cụ, thiết bị, hóa chất: dụng cụ, thiết bị, hóa chất dùng trong phòng sinh học phân tử, phòng phân tích phân tử.

Chỉ thị phân tử: 52 chỉ thị phân tử dùng trong việc đánh giá đa dạng nguồn gen bố mẹ; 52 chỉ thị sử dụng lập bản đồ GGT.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: *Đánh giá vật liệu bố mẹ sử dụng trong nghiên cứu chọn tạo chịu mặn*

Ly trích DNA từ cây lúa:

Phương pháp ly trích DNA thực hiện theo quy trình của IRRI (2011) [49] và Nguyễn Thị Lang (2002) [9].

Nội dung 2: *Đánh giá hiệu quả chọn lọc tính trạng mục tiêu dựa trên các quần thể lai F_1*

Lai là một phương pháp nhằm kết hợp những đặc trưng, đặc tính của bố mẹ vào cơ thể mới, là phương pháp quan trọng để tái tổ hợp các kiểu gen của bố mẹ nhằm tạo ra tổ hợp mới, từ đó chọn lựa, bồi dưỡng để tạo ra giống mới. Vì thế, việc chọn lựa bố mẹ phù hợp là rất quan trọng trong công tác chọn tạo giống mới.

Nội dung 3: *Chọn tạo quần thể lai hồi giao phục vụ cho gen chống chịu mặn thấp thông qua MAS*

Lai tạo và chọn lọc các quần thể lai hồi giao nhờ các chỉ thị phân tử (BC_1F_1 - BC_nF_1)

Nội dung 4: Chọn lọc các quần thể hồi giao BC_nF_2 thông qua lập bản đồ GGT

2.3.4.1. Kiểm tra kiểu gen của quần thể con lai trên nhiễm sắc thể 1 và 8 dựa trên các chỉ thị phân tử đa hình giữa cây bố và mẹ

Phương pháp ly trích DNA, PCR, kiểm tra sản phẩm PCR được thực hiện tương tự như phần 2.3.1

2.3.4.2. Lập bản đồ GGT đánh giá sự di truyền của quần thể con lai, qua đó chọn lọc các cá thể mang gen mục tiêu mong muốn

Nội dung 5: Đánh giá kiểu hình và kiểu gen liên quan gen saltol trên quần thể con lai

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đánh giá vật liệu bố mẹ sử dụng trong nghiên cứu chọn tạo chịu mặn

Ly trích DNA từ cây lúa:

Phương pháp ly trích DNA thực hiện theo quy trình của IRRI (2011) [49] và Nguyễn Thị Lang (2002) [9].

2.3.2. Đánh giá hiệu quả chọn lọc tính trạng mục tiêu dựa trên các quần thể lai F_1

Lai là một phương pháp nhằm kết hợp những đặc trưng, đặc tính của bố mẹ vào cơ thể mới, là phương pháp quan trọng để tái tổ hợp các kiểu gen của bố mẹ nhằm tạo ra tổ hợp mới, từ đó chọn lựa, bồi dưỡng để tạo ra giống mới. Vì thế, việc chọn lựa bố mẹ phù hợp là rất quan trọng trong công tác chọn tạo giống mới.

2.3.3. Chọn tạo quần thể lai hồi giao phục vụ cho gen chống chịu mặn thấp thông qua MAS

2.3.4. Chọn lọc các quần thể hồi giao BC_nF_2 thông qua lập bản đồ GGT

2.3.4.1. Kiểm tra kiểu gen của quần thể con lai trên nhiễm sắc thể 1 và 8 dựa trên các chỉ thị phân tử đa hình giữa cây bố và mẹ

Phương pháp ly trích DNA, PCR, kiểm tra sản phẩm PCR được thực hiện tương tự như phần 2.3.1

2.3.4.2. Lập bản đồ GGT đánh giá sự di truyền của quần thể con lai, qua đó chọn lọc các cá thể mang gen mục tiêu mong muốn

Phương pháp GGT do Young và Tanksley đề xuất (1989) và sau đó Van Berllo (2008) và Milne và *ctv.* (2010) [62] đã xây dựng phần mềm hữu dụng này theo Singh, S. và *ctv* (2001) [77]

2.3.5. Đánh giá kiểu hình và kiểu gen liên quan gen saltol trên quần thể con lai

Phương pháp kiểu hình thanh lọc mặn

Thanh lọc mặn trong nhà lưới

Thanh lọc mặn ở giai đoạn mạ trong dung dịch Yoshida chứa muối (NaCl) với giống chuẩn kháng Pokkali và chuẩn nhiễm IR29. Thanh lọc mặn được thực hiện theo phương pháp của IRRI, phương pháp cải tiến của Nguyễn Thị Lang và *ctv.* (2001) [70]

2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được nhập và lưu trữ bằng chương trình Microsoft Office Excel 2013.

Phân tích và thống kê số liệu (ANOVA, DUCAN) bằng Microsoft Office Excel, Cropstat 7.2, STAR.

Phân nhóm di truyền sử dụng phần mềm NTSYSpc.

Vẽ biểu đồ sử dụng MicrosoftOffice Excel, R-studio.

Chọn lọc cá thể của quần thể thông qua phân tích Graphical genotypes2 (GGT 2.0).

2.3.7. Khảo nghiệm cơ bản

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Bộ giống khảo nghiệm được thực hiện bằng phương pháp cây (15x20 cm, 1

tép/bụi), phân bón 80-40-30 kg NPK/ha vụ Hè Thu, và 100-40-30 kg NPK/ha vụ Đông Xuân.

Các chỉ tiêu đánh giá: thời gian sinh trưởng, cao cây, số bông/bụi, số bông/m², trọng lượng 1000 hạt, năng suất (QCVN 01-55:2011/BNNPTNT) được ghi nhận tại các điểm khảo nghiệm.

Bón phân

Bón phân đợt 1:

- Các loại phân nên áp dụng là: urea, lân super, DAP (trường hợp không bón lót). Trường hợp có bón lót, thì sử dụng các loại phân hữu cơ như phân chuồng, phân super lân bón khi làm đất.

- Thời gian từ 5-7 ngày sau khi sạ.

- Phân bón: (1/4 N-1/4P₂O₅)

Bón phân đợt 2:

- Thời gian từ 15-25 ngày sau khi sạ.

- Phân bón: (1/2N-1/2P₂O₅-1/2 K₂O)

Bón phân đợt 3:

- Thời gian từ 35-40 ngày sau khi sạ.

- Phân bón: Urea, DAP, KCl (1/4N-1/4P₂O₅-1/2 K₂O).

Thu hoạch, bảo quản

Lúa trở được từ 25-28 ngày thì tiến hành thu hoạch. Nếu đập lúa bằng phương pháp thủ công thì rất tốt nhưng rất khó khăn về công lao động nên có thể dùng máy tuốt. Trước khi tuốt phải tiến hành vệ sinh máy để không bị lẫn tạp với giống tuốt trước.

Trước khi thu hoạch cần kiểm tra cụ thể trên đồng ruộng nhằm tiện việc phân lô bố trí lao động thời gian gặt, bố trí sân phơi, nhà kho để không bị lẫn hưởng chất lượng giống.

Sau khi phơi xong, quạt sạch, đóng tịnh bao xếp vào kho theo lô, theo cấp, có lối đi, thông thoáng, tiện cho việc lấy mẫu kiểm tra. Trong và ngoài bao giống phải có nhãn thẻ ghi rõ: tên giống, cấp giống, nơi sản xuất, vụ sản xuất, khối lượng.

2.3.8. Khảo nghiệm và đánh giá tương tác kiểu gen và môi trường

2.3.8.1 Phân tích tính ổn định, thích nghi về năng suất của các dòng lúa chịu nóng triển vọng

Trong nội dung này thí nghiệm tiến hành trên tám dòng lai có triển vọng và giống đối chứng UC10 và thực hiện tại năm địa điểm là Long An, Cần Thơ, Sóc Trăng, Bạc Liêu, Bến Tre và Trà Vinh. Sáu địa điểm thí nghiệm trên đại diện các đặc điểm chung cho các vùng trồng lúa tại Đồng bằng sông Cửu Long.

2.3.8.2 Phân tích AMMI (Additive Main Effects và Multiplicative Interaction Model)

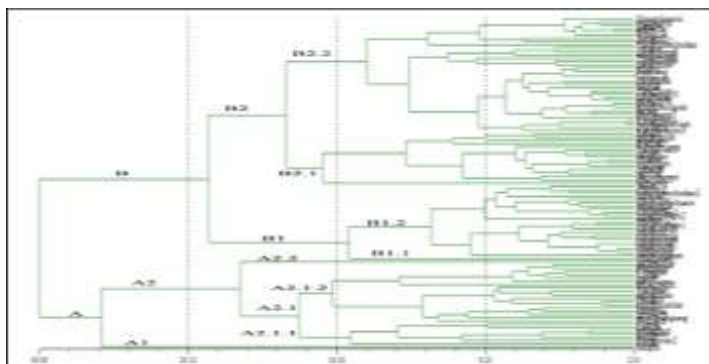
Tương tác giữa kiểu gen và môi trường theo phương pháp kinh điển đã tập trung vào sự kiện ổn định nhiều hơn sự kiện thích nghi. Do đó, phân tích AMMI được tổng hợp trên cơ sở các mô hình của Finlay và Wilkinson (1963) [37], Freeman và Perkin (1971) [39] và nhiều tác giả khác, trong đó có nhiều nhà khoa học của IRRI. Minh họa giản đồ AMMI tương tác gen và môi trường bằng phần mềm IRRISTAT.

Minh họa giản đồ phân nhóm các dòng lai bằng UPGMA hệ số Euclidean trên SAS 9.1.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

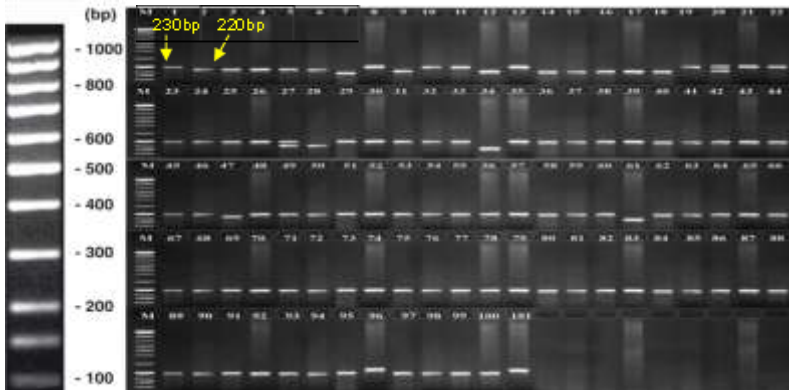
3.1. Đa dạng nguồn gen cây lúa

3.1.1. Thanh lọc mẫn (đo lường kiểu hình) giai đoạn mạ trên lúa mùa



Hình 3.1. Phân nhóm di truyền của 101 giống khác nhau trên lúa mùa

Qua kết quả thanh lọc của 101 giống lúa cao sản có sự khác nhau rõ rệt về thời gian sống sót ở môi trường 8dS/m và 15dS/m. Thời gian sống sót cao nhất ở môi trường 8dS/m là 29,5 ngày còn ở môi trường 15dS/m là 28,8 ngày. Nhìn chung, các giống sống sót ở môi trường 8 dS/m, và ở 15 dS/m các giống chết hầu hết khi qua 30 ngày thanh lọc mặn trong môi trường dinh dưỡng. Môi trường mặn làm cho cây lúa sinh trưởng và phát triển không bình thường, những cá thể lúa chịu ảnh hưởng của stress mặn biểu hiện tình trạng cháy đầu lá, thân rễ kém phát triển hơn bình thường, nếu nghiêm trọng hơn có thể làm cây lúa bị vàng úa, thậm chí cháy khô và chết.



Hình 3.4. Sản phẩm PCR của chỉ thị phân tử RM 3252-S1-1 trên 101 giống chống chịu mặn.

Ghi chú: M: 100bp DNA ladder; (1): Pokkali – 230bp; (2): IR29 – 220bp, sản phẩm PCR được chạy trên 3% agarose gel

Kiểm tra mức độ chính xác giữa việc đánh giá giống theo kiểu hình và dựa vào marker phân tử.

Phương pháp SSR marker với marker RM223 đã được (Nguyễn Thị Lang., 2004) kiểm tra [10], với mức độ chính xác đến 82% giữa kiểu gene và kiểu hình trên giai đoạn phát dục và 92% ở giai đoạn mạ [8]. Tiến hành việc kiểm tra mức độ chính xác của phương pháp SSR marker với marker RM 223.

Kết quả ghi nhận về sự liên hệ giữa kiểu hình và kiểu gene cho thấy trong giống lúa được kiểm tra: trong 13 giống chống chịu mặn tốt về kiểu hình thì

có 13 giống mang kiểu gene kháng (T) chiếm 100%. Quá trình biểu hiện từ kiểu gene ra kiểu hình là một quá trình phức tạp gồm nhiều nhân tố quyết định trong đó quan trọng nhất là sự tương tác giữa kiểu gene và môi trường. Phương pháp này cho thấy khả năng dự đoán kiểu gene chống chịu và kiểu hình chống chịu rất cao, do đó có thể áp dụng để chọn lọc những giống chống chịu cho điều kiện mặn, làm nguồn vật liệu lai cho những chương trình lai tạo giống lúa mới hiện nay.

3.1.2. Thanh lọc bộ giống lúa cao sản

Qua kết quả thanh lọc của 100 giống lúa cao sản có sự khác nhau rõ rệt về thời gian sống sót ở môi trường mặn EC = 8dS/m và môi trường mặn có EC = 15dS/m. Thời gian sống sót cao nhất ở môi trường 8 dS/m là 29,5 ngày còn ở môi trường mặn EC = 15 dS/m là 28,8 ngày. Thời gian sống sót thấp nhất ở môi trường mặn có EC = 8dS/m là 22,1 ngày và ở môi trường EC = 15dS/m là 21 ngày.

Ở môi trường mặn có EC = 0dS/m tất cả các giống sống sót qua 30 ngày thanh lọc. Còn ở môi trường mặn có EC = 8dS/m và 15 dS/m có sự khác biệt về thời gian sống sót.

Môi trường mặn có EC = 8dS/m thời gian sống sót 21 - 23 ngày có 9 giống, 23 - 25 ngày có 24 giống, 25 - 27 ngày có 38 giống, 27 - 29 ngày có 19 giống, 29 - 30 ngày có 1 giống.

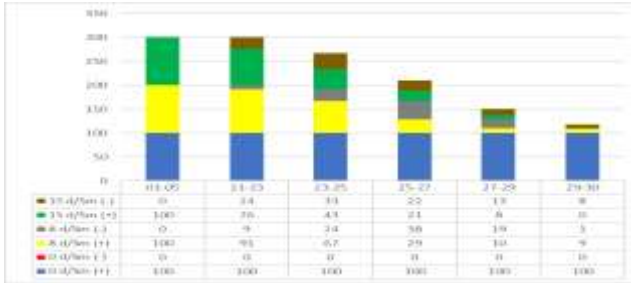
Môi trường mặn có EC = 15dS/m thời gian sống sót từ 21 - 23 ngày có 24 giống, 23 - 25 ngày có 33 giống, 25 - 27 ngày 22 giống, 27 - 29 ngày 13 giống.

Ở môi trường mặn 8 dS/m, qua 30 ngày thanh lọc có rất nhiều cây lúa bị cháy khô, phần xanh của cây chỉ còn lại < 30 %, thậm chí nhiều giống bị chết 100 %. Đa số các giống qua 30 ngày thanh lọc trong môi trường mặn đều biểu hiện cấp độ khô lá ở cấp 9 (68 giống, chiếm tỷ lệ 73,91 %). Có 21 giống ở cấp khô lá cấp 7. Đặc biệt giống OM 10704 biểu hiện cấp khô lá là cấp 5, Pokali (chuẩn kháng) biểu hiện cấp 3.

Ở môi trường mặn EC = 15dS/m, các giống bị cháy khô và chết rất nhiều so với môi trường 8 dS/m, chỉ có một vài giống sống sót, tuy nhiên chúng cũng bị cháy lá nhiều. Đa số các giống trong môi trường này đều biểu hiện cấp

độ khô lá rất cao, cấp 9 với 78 giống, chiếm tỷ lệ 84,78 %. Ở cấp khô lá cấp 7 có 13 giống. Chỉ có giống Pokali là biểu hiện chỉ ở cấp 3 (51 -70 % lá bị khô).

Qua đó, các giống chống chịu tốt được đề nghị bao gồm tiếp tục thanh lọc giai đoạn sinh thực và giai đoạn trở hoa.



Hình 3.5. Đồ thị so sánh sự khác nhau về ngày sống sót giữa 3 nồng độ mặn EC = 0dS/m, nồng độ mặn EC = 8dS/m và nồng độ mặn EC = 15dS/m

Đánh giá tương quan các chỉ tiêu ở ba môi trường mặn EC = 0 dS/m, môi trường mặn EC = 8dS/m và môi trường mặn với EC = 15dS/m.

Bảng 3.2. Môi trường mặn với EC = 0dS/m

| | Ngày sống sót | Chiều dài thân (cm) | Chiều dài rễ (cm) | Trọng lượng khô thân (mg) | Trọng lượng khô rễ (mg) |
|--------------------------------------|---------------|---------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|
| Môi trường mặn với EC = 0dS/m | | | | | |
| Ngày sống sót | 1 | | | | |
| Chiều dài thân (cm) | - | 1 | | | |
| Chiều dài rễ (cm) | - | 0.704** | 1 | | |
| Trọng lượng khô thân (mg) | - | 0.968** | 0.839** | 1 | |
| Trọng lượng khô rễ (mg) | - | 0.987** | 0.701** | 0.971** | 1 |
| Môi trường mặn với EC = 8dS/m | | | | | |
| Ngày sống sót | 1 | | | | |
| Chiều dài thân (cm) | 0.960** | 1 | | | |
| Chiều dài rễ (cm) | 0.681** | 0.842** | 1 | | |
| Trọng lượng khô thân | 0.900** | 0.977** | 0.917** | 1 | |

| (mg) | | | | | |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---|
| Trọng lượng khô rễ | 0.973** | 0.961** | 0.727** | 0.928** | 1 |
| (mg) | | | | | |
| Môi trường mặn với EC = 15dS/m | | | | | |
| Ngày sổng sót | 1 | | | | |
| Chiều dài thân (cm) | 0.953** | 1 | | | |
| Chiều dài rễ (cm) | 0.708** | 0.857** | 1 | | |
| Trọng lượng khô thân | 0.946** | 0.981** | 0.884** | 1 | |
| (mg) | | | | | |
| Trọng lượng khô rễ | 0.995** | 0.962** | 0.734** | 0.958** | 1 |
| (mg) | | | | | |

(Ghi chú: * Có ý nghĩa; ** Rất có ý nghĩa)

Kết quả tạo hạt hồi giao lần thứ nhất (BC₁) cho các quần thể

Trong vụ Hè Thu 2015 chúng tôi tiến hành thu nhận hạt F₁ được tạo ra trong vụ trước, gieo và tạo hạt hồi giao lần thứ nhất (BC₁). Các con lai F₁ đều thuần nhất về tính chống chịu mặn, do đó trên mỗi quần thể lai chúng tôi chọn 30 cây để làm mẹ, lấy phần bố trên các giống bố Pokkali tương ứng để tạo hạt hồi giao, mỗi cây tiến hành lai từ 5 – 7 hạt. Kết quả đã tạo được cây hồi giao với giống Pokkali. Bên cạnh đó, trên các giống tái tục và giống cho gen chống chịu mặn tiếp tục tiến hành tự thụ được từ 20-30 cây cung cấp cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Tìm tính đa hình trên các giống lúa bố mẹ bằng chỉ thị phân tử

Việc chọn giống lúa ứng dụng MAS đã đem lại những thành công nhất định trong thời gian gần đây như: rút ngắn thời gian chọn tạo, chọn được các giống kháng với điều kiện bất lợi, giống kháng bệnh, giống phẩm chất. Do đó, các giống lúa bố mẹ OM được phân tích kiểu gen xem xét có mang gen quy định cho gen chống chịu mặn hay không, đồng thời, đánh dấu phân tử các gen liên quan đến các thành phần năng suất và năng suất.

Phân tích bố mẹ trên các cặp lai với 4 cặp bố mẹ và bộ lai đơn tổ hợp lai để tìm gen chống chịu trên các tổ hợp lai.

Thông qua chỉ thị phân tử SSR đánh giá bố mẹ của 4 cặp lai hồi giao bao gồm: OM6162/pokkali, PM1490/Pokkali; OMCS2000/pokkali, OM7347/Pokkali đánh giá với 4 chỉ thị ghi nhận vị trí kích thước phân tử trên bảng.

Bảng 3.5. Các primers được đánh giá trên 05 giống lúa dùng cho vật liệu lai

| TT | Tên giống | RM 2231 | RM3 252- S1-1 | RM1 324- | RM3412 | RM4 53 | RM51 1 |
|----|-----------|------------|---------------------|-------------|---------|-----------|-----------|
| 1 | OM6162 | 200 | 220 | 300 | 200 | 230 | 210 |
| 2 | Pokkali | 220 | 230 | 220 | 300 | 250 | 200 |
| 3 | OM1490 | 200 | 220 | 300 | 200 | 230 | 210 |
| 4 | OM7347 | 200 | 220 | 220 | 200 | 230 | 210 |
| 5 | OMCS2000 | 200 | 220 | 300 | 200-300 | 250 | 210 |

Kết quả ghi nhận trên bảng 3.5. Đối với primer RM223 số mẫu cho sản phẩm khuếch đại chiếm 100% tổng số. Từ kết quả thu được cho thấy số mẫu tạo băng hình và khác nhau với hai alen thường rõ ở vị trí kích thước marker phân tử. Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các băng hình và có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống. Dựa trên b và ghi nhận cả hai alen, alen A (220bp) và alen B (200bp). Tóm lại với 5 giống lúa ghi nhận các cặp lai cho đa hình: OM1490/Pokkali, OMCS2000/Pokkali và OM6162/Pokkali OM7347/Pokkali.

Đối với primer RM3252-S1-1 số mẫu cho sản phẩm khuếch đại chiếm 100% tổng số. Từ kết quả thu được cho thấy số mẫu tạo băng hình và khác nhau với hai alen thường rõ ở vị trí kích thước marker phân tử. Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các băng hình và có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống. Dựa trên băng hình ghi nhận cả hai alen, alen A (230bp) và alen B (220bp). Dựa vào vị trí băng hình thì có các cặp lai đa hình: OM1490/Pokkali, OMCS2000/Pokkali và OM6162/Pokkali. OMN7347/Pokkali.

Đối với primer RM1324 số mẫu cho sản phẩm khuếch đại chiếm 100% tổng số. Từ kết quả thu được cho thấy số mẫu tạo băng hình và khác nhau với hai alen thường rõ ở vị trí kích thước marker phân tử. Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các băng hình và có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống. Dựa trên băng hình ghi nhận cả hai alen, alen A (300bp) và alen B (200bp). Dựa vào vị trí băng hình thì có các cặp lai đa hình: OM1490/Pokkali, OMCS2000/Pokkali và OM6162/Pokkali còn lại OMN7347/Pokkali cho đơn hình. Khi phân tích chỉ thị marker RM3412. Từ kết quả thu được cho thấy số mẫu tạo b và khác nhau với hai alen thường rõ ở vị trí kích thước marker phân tử. Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các

bvà có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống. Dựa trên băng hình ghi nhận cả hai alen, alen A (300bp) và alen B (200bp). Ghi nhận chỉ có ba cặp lai cho đa hình: OM1490/pokkali; OM6162/Pokkali; OM7347/pokkali. Riêng OMCS2000/pokkali thì cho đa hình và là dominat.

Đối với primer RM453 số mẫu cho sản phẩm khuếch đại chiếm 100% tổng số. Từ kết quả thu được cho thấy số mẫu tạo băng hình và khác nhau với hai alen thường rõ ở vị trí kích thước marker phân tử. Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các băng hình và có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống. Dựa trên băng hình ghi nhận cả hai alen, alen A (250bp) và alen B (230bp). Xét về góc độ phân tử các tần số alen. Ghi nhận chỉ có bốn cặp lai cho đa hình: OM1490/pokkali; OM6162/Pokkali; OM7347/Pokkali.

Đối với primer RM511 số mẫu cho sản phẩm khuếch đại chiếm 100% tổng số. Từ kết quả thu được cho thấy số mẫu tạo băng hình và khác nhau với hai alen thường rõ ở vị trí kích thước marker phân tử. Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các băng hình và có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống. Dựa trên băng hình ghi nhận cả hai alen, alen A (210bp) và alen B (200bp). Dựa vào vị trí băng hình ghi nhận các cặp lai đa hình: OM1490/Pokkali, OMCS2000/Pokkali và OM6162/Pokkali.

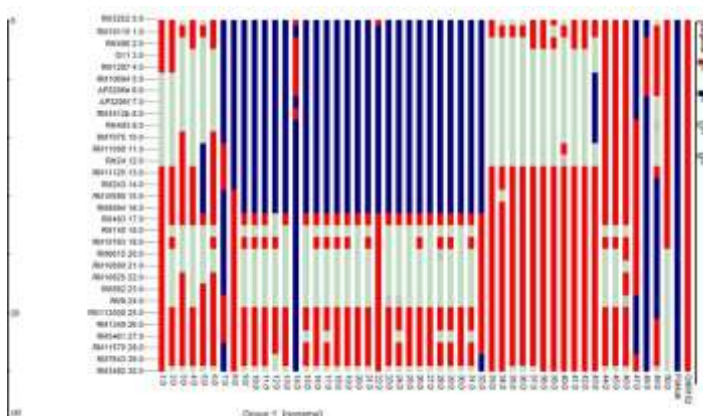
Thông qua chỉ thị phân tử SSR đánh giá bố mẹ của 4 cặp lai hồi giao bao gồm: OM1490/pokkali; OM6162/Pokkali; OM7347/Pokkali. OMCS2000/pokkali. Có ba primers cho đa hình trên 4 cặp lai này là RM223, RM RM3252-S1-1 và RM453. Tuy nhiên đối với RM453 Cho đa hình trên OMCS2000/Pokkali là dominat nên xét góc độ di truyền thì khó chọn lựa quần thể này trên cặp lai này với chỉ thị RM453.

Có ba primers cho đa hình ba cặp lai là RM 511, RM1324 và RM3412. Trên RM511 cho ba cặp lai đa hình OMCS2000/ Pokkali, OM1490/ Pokkali; OM6162/ Pokkali. Riêng cặp lai Pokkali/ OM7347 cho đơn hình. Đối với RM1324 và RM3412 ghi nhận chỉ có ba cặp lai cho đa hình: OM1490/pokkali; OM6162/Pokkali; OM7347/pokkali. Riêng OMCS2000/Pokkali thì cho đơn hình với hai RM 1324 và RM 3412.

Dựa trên cơ sở vị trí gen chống chịu mặn gen chính nằm trên nhiễm sắc thể số 1 liên kết với chỉ thị RM3252-S1-1 và RM 223 nằm trên nhiễm sắc thể số 8 tiếp tục chọn lọc bốn tổ hợp lai phát triển tiếp trong quá trình lai hồi giao: OM1490/ Pokkali, OMCS2000/ Pokkali và OM6162/ Pokkali. OM7347/ Pokkali.

3.5.1. Chọn lọc các cá thể BC_3F_3 của quần thể lai hồi giao $OM6162/Pokkali//OM6162$

Mười dòng BC_3F_2 của tổ hợp $OM6162/Pokkali //OM6162$ được chọn lọc và cho tự thụ tạo quần thể BC_3F_3 . Quần thể BC_3F_3 được trồng trên đồng ruộng trong vụ Hè Thu 2018. Năm mươi cá thể được đánh dấu, thu mẫu và kiểm tra kiểu gen. Qua hình cho thấy trên 31 chỉ thị phân tử liên kết trên nhiễm sắc thể số 1. Tuy nhiên chưa ghi nhận các dòng chống chịu mặn trên quần thể $OM6162/Pokkali //OM6162$. Hầu hết các dòng này còn phân ly ở thế hệ BC_3F_3 . Do đó các dòng trên cần phải lai tiếp thế hệ hồi giao cho BC_4 . Có thể lựa chọn các dòng đang phân ly nghiên về tính chịu mặn cho tiếp tục tự thụ BC_3F_4 nhưa dòng số 7, 14, và dòng 48.



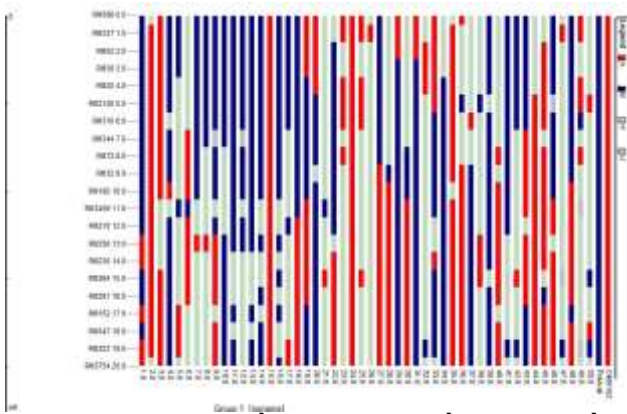
Hình 3.37. Sự đa dạng di truyền các gen từ bố mẹ của quần thể lai hồi giao $OM6162/Pokkali//OM6162$ trên nhiễm sắc thể số 1

Qua kết quả cho thấy, màu xanh dương thể hiện kiểu gen theo cây bố (Pokkali), gen kháng mặn, màu đỏ thể hiện kiểu gen theo cây mẹ (OM6162) gen nhiễm mặn, màu xám thể hiện thế hệ con lai mang gen dị hợp tử.

3.5.2. Chọn lọc các cá thể BC_3F_3 của quần thể lai hồi giao $OM6162/Pokkali//OM6162$ trên nhiễm sắc thể số 8

Mười dòng BC_3F_2 của tổ hợp $OM6162/Pokkali//OM6162$ trên được chọn lọc và cho tự thụ tạo quần thể BC_3F_3 . Quần thể BC_3F_3 được trồng trên đồng ruộng trong vụ Hè Thu 2018. Năm mươi cá thể được đánh dấu, thu mẫu và

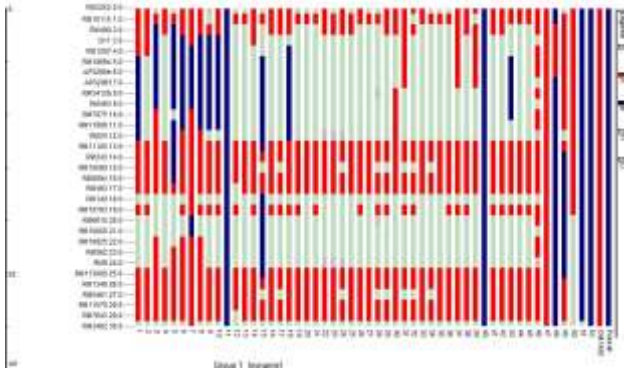
kiểm tra kiểu gen. Qua hình cho thấy trên nhiễm sắc thể số 8, Chưa ghi nhận các dòng cho gen chống chịu mặn. Giống như các dòng được phân tích trên nhiễm sắc thể số 1. Quần thể này cần khai thác tính mặn gen phụ trên nhiễm sắc thể số 8. Tuy nhiên các dòng thế hệ BC_3F_3 đang còn phân ly khá mạnh trên tổ hợp này. Cần tiếp tục cho lai tiếp thế hệ BC_4F_1 hoặc cho tự thụ tiếp thế hệ BC_3F_4 .



Hình 3.38. Sự đa dạng di truyền các gen từ bố mẹ của quần thể lai hồi giao OM6162/Pokkali//OM6162 trên nhiễm sắc thể số 8

3.5.3. Chọn lọc các cá thể BC_3F_3 của quần thể lai hồi giao OM1490/Pokkali//OM1490 trên quần thể số 1

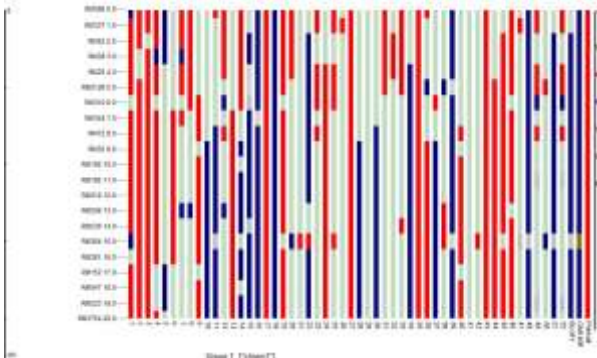
Mười dòng BC_3F_2 của tổ hợp OM1490/Pokkali//OM1490 được chọn lọc và cho tự thụ tạo quần thể BC_3F_3 . Quần thể BC_3F_3 được trồng trên đồng ruộng trong vụ Hè Thu 2018. Năm mươi cá thể được đánh dấu, thu mẫu và kiểm tra kiểu gen. Qua hình cho thấy trên nhiễm sắc thể số 1, các dòng **BC_3F_3-11 , BC_3F_3-40 , BC_3F_3-51 và BC_3F_3-52** của quần thể OM1490/Pokkali //OM1490 là các dòng triển vọng được tuyển chọn để tiếp tục phát triển các thế hệ kế tiếp cho đến dòng thuần chủng.



Hình 3.39. Sự đa dạng di truyền các gen từ bố mẹ của quần thể lai hồi giao OM1490/Pokkali//OM1490 trên nhiễm sắc thể số 1

3.5.4. Chọn lọc các cá thể BC₃F₃ của quần thể lai hồi giao OM1490/Pokkali//OM1490 trên nhiễm sắc thể số 8

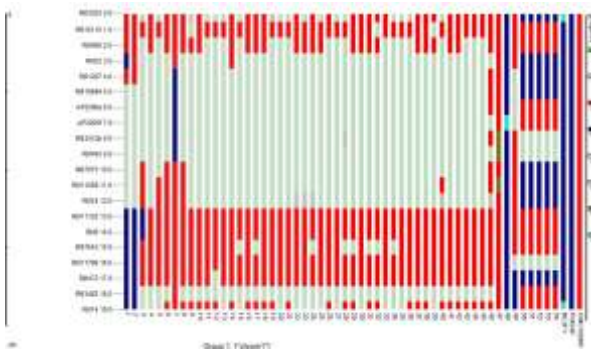
Mười dòng BC₃F₂ của tổ hợp OM1490/Pokkali //OM1490 được chọn lọc và cho tự thụ tạo quần thể BC₃F₃. Quần thể BC₃F₃ được trồng trên đồng ruộng trong vụ Hè Thu 2018. Năm mươi cá thể được đánh dấu, thu mẫu và kiểm tra kiểu gen. Qua hình cho thấy trên nhiễm sắc thể số 8, Các dòng **BC₃F₃-16**, **BC₃F₃-18**, **BC₃F₃-34**, **BC₃F₃-48** và **BC₃F₃-51** của quần thể OM1490/Pokkali//OM1490 là các dòng triển vọng được tuyển chọn để tiếp tục phát triển các thế hệ kế tiếp cho đến dòng thuần chủng.



Hình 3.40. Sự đa dạng di truyền các gen từ bố mẹ của quần thể lai hồi giao OM1490/Pokkali//OM1490 trên nhiễm sắc thể số 8

3.5.5. Chọn lọc các cá thể BC_3F_3 của quần thể lai hồi giao OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 trên nhiễm sắc thể số 1

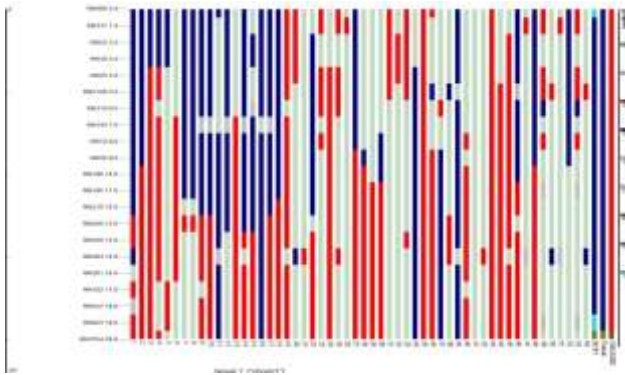
Mười dòng BC_3F_2 của tổ hợp OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 được chọn lọc và cho tự thụ tạo quần thể BC_3F_3 . Quần thể BC_3F_3 được trồng trên đồng ruộng trong vụ Hè Thu 2018. Năm mươi cá thể được đánh dấu, thu mẫu và kiểm tra kiểu gen. Qua hình cho thấy trên nhiễm sắc thể số 1, chỉ có 1 dòng Các dòng BC_3F_3 -48 của quần thể OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 là các dòng triển vọng được tuyển chọn để tiếp tục phát triển các thế hệ kế tiếp cho đến dòng thuần chủng mang gen chịu mặn



Hình 3.41. Sự đa dạng di truyền các gen từ bố mẹ của quần thể lai hồi giao OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 trên nhiễm sắc thể số 1

3.5.6. Chọn lọc các cá thể BC_3F_3 của quần thể lai hồi giao OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 trên nhiễm sắc thể số 8

Mười dòng BC_3F_2 của tổ hợp OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 được chọn lọc và cho tự thụ tạo quần thể BC_3F_3 . Quần thể BC_3F_3 được trồng trên đồng ruộng trong vụ Hè Thu 2018. Năm mươi cá thể được đánh dấu, thu mẫu và kiểm tra kiểu gen. Qua hình cho thấy trên nhiễm sắc thể số 8, Các dòng BC_3F_3 -11, BC_3F_3 -16, BC_3F_3 -34, BC_3F_3 -39, của quần thể OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 là các dòng triển vọng được tuyển chọn để tiếp tục phát triển các thế hệ kế tiếp cho đến dòng thuần chủng.



Hình 3.42. Sự đa dạng di truyền các gen từ bố mẹ của quần thể lai hồi giao OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 trên NST số 8

Tóm lại

Đánh giá quần thể BC₃F₃ của tổ hợp lai hồi giao OM6162/ Pokkali//OM 6162 với 50 dòng đánh giá chưa có dòng chống chịu mặn tốt tại EC=15dS/m và được phát hiện mang gen chống chịu mặn trên cả NST1 và NST8. Do đó cần nên theo dõi các thể hệ phân ly của tổ hợp này.

Trong khi đó, trên tổ hợp OMCS2000/Pokkali//OMCS2000 với 50 dòng được đánh giá đã ghi nhận có 3 dòng triển vọng mang gen chống chịu mặn (BC₃F₂-2-4, BC₃F₂-2-9 và BC₃F₂-2-12). Tuy nhiên về kiểu hình thì chỉ có dòng BC₃F₂-2-4 là chống chịu tốt ở EC=15dS/m.

Tổ hợp OM1490/Pokkali//OM1490 được đánh giá với 53 dòng. 2 dòng, BC₃F₂-3-10 và BC₃F₂-3-40, chống chịu mặn tốt tại EC=15dS/m và mang gen mặn được phát hiện trên cả 2 nhiễm sắc thể 1 và 8.

Khảo nghiệm cơ bản

Tập trung hai tổ hợp để trồng và đánh giá các năng suất và thành phần năng suất của bộ giống trước khi đưa thử nghiệm diện rộng. Kết quả chọn 13 dòng lúa chống chịu mặn được ghi nhận như sau: dòng số 1:BC₃F₃-11, 2:BC₃F₃-40, 3:BC₃F₃-51, 4:BC₃F₃-52, 5:BC₃F₃-16; 6:BC₃F₃-18; 7:BC₃F₃-34; 8:BC₃F₃-48; (của quần thể OM1490/Pokkali //OM1490) và các dòng 9:BC₃F₃-11, 10:BC₃F₃-16, 11:BC₃F₃-34, 12:BC₃F₃-39 và 13:BC₃F₃-48 (Từ tổ hợp lai OMCS2000/Pokkali//OMCS2000) 14: UC10 đối chứng.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Đề tài nghiên cứu “*Ứng dụng chỉ thị phân tử để nghiên cứu chọn giống chống chịu mặn trên quần thể lúa tại Đồng Bằng Sông Cửu Long*” được thực hiện trong bốn năm, với kết quả như sau:

1) Vật liệu lai bao gồm 101 mẫu giống lúa bản địa và 100 mẫu giống lúa cao sản đã được thanh lọc mặn ở giai đoạn mạ, được đánh giá tính trạng nông học. Nguồn vật liệu cao sản làm được chọn là OMCS2000, OM1490, OM6162, OM7347. Nguồn vật liệu cho gen đích *SalTol* là Pokkali.

2) Kết quả ứng dụng chọn dòng lúa chịu mặn bằng chỉ thị phân tử trên quần thể hồi giao cho thấy: hai chỉ thị RM 223 và RM 3252-1 thực sự có hiệu quả; dòng con lai BC_3F_1 của 3 tổ hợp lai hồi giao mang gen đích *SalTol* biểu hiện băng hình dị hợp; chỉ có 4 dòng biểu hiện băng hình đồng hợp theo alen của bố (donor).

3) Quần thể con lai BC_3F_3 được chạy trên bản đồ GGT hỗ trợ quyết định chọn dòng hồi giao ưu việt có alen của giống cho gen đích *SalTol* vượt trội là: BC_3F_3 -11, BC_3F_3 -40, BC_3F_3 -51, BC_3F_3 -52, BC_3F_3 -16, BC_3F_3 -18, BC_3F_3 -34, BC_3F_3 -48; (tổ hợp lai OM1490/Pokkali) và các dòng BC_3F_3 -11, BC_3F_3 -16, BC_3F_3 -34, BC_3F_3 -39 và BC_3F_3 -48 (tổ hợp lai OMCS2000/Pokkali). Tổ hợp OM6162/Pokkali cần được hồi giao tiếp ở thế hệ BC_4 , BC_5 .

4) Phân tích tương tác kiểu gen và môi trường của 13 dòng lúa cao sản triển vọng được thực hiện tại 6 địa điểm, trong hai vụ canh tác (Đông Xuân 2019-2020 và Hè Thu 2019). Kết quả 13 dòng này so với dòng đối chứng UC10 có năng suất cao hơn rất ý nghĩa về thống kê. Dòng triển vọng có năng suất ổn định và thích nghi rộng với môi trường được ghi nhận là BC_3F_3 -11 thích hợp cho vụ Đông Xuân; dòng BC_3F_3 -51 và BC_3F_3 -39 thích hợp cho vụ Hè Thu.

2. Đề nghị

- Tiếp tục phát triển các dòng lúa triển vọng để chọn ra giống lúa phục vụ cho các tỉnh.

- Tiếp tục khai thác cặp lai OM6162/Pokkali ở giai đoạn con lai đồng hợp từ RILs hoặc BC_4 trở đi, phục vụ nghiên cứu dữ liệu LD (linkage disequilibrium), nhằm bổ sung cho kết quả phân tích “association” theo kỹ thuật NGS.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Trọng Phước**, Nguyễn Thị Lang, Trần Thị Thanh Xà, Nguyễn Công Trứ, Bùi Chí Bửu., (2016) “Chọn dòng và đánh giá các dòng lúa ưu tú theo mục tiêu chịu mặn và hàm lượng amylose thấp”, *Tạp Chí Viện Khoa Học Nông Nghiệp Việt Nam*. Trang 280-284.
2. **Nguyễn Trọng Phước**, Nguyễn Thị Lang, Bùi Hữu Thuận, Bùi Chí Bửu., (2019), “Selection of Elite Rice Varieties from BCF_{3;4} Population from OM10252/ Pokkali//OM10252 for Salinity Tolerance in Rice”, *Tạp chí ScholArena.*?
3. **Nguyễn Trọng Phước**, Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu., (2021), “Ứng dụng chỉ thị phân tử trọng chọn giống lúa chống chịu mặn (*Oryza sativa. L*)”, *Tạp Chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*.
4. Nguyễn Thị Lang, Bùi Phước Tâm, Phạm thị Chúc Loan, **Nguyễn Trọng Phước**, Trần Bảo Toàn, Bùi chí Bửu, Abdelbagi M.Smail. Glenn Gregorio, russell Reinke, Reiner Wassmann., (2016), “Sàng lọc gen chống chịu mặn trên bộ giống ngắn ngày ở giai đoạn mạ”, *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn*, T.4 trang 19-29.
5. Nguyễn thị Lang, **Nguyễn trọng Phước**, Trần Bảo Toàn, Trần Minh Tài, Bùi Chí Bửu., (2016), “Bản đồ di truyền QTL chống chịu mặn cây lúa giai đoạn mạ thông qua phân tích quần thể phân ly hồi giao bằng kỹ thuật SSR marker”, *Kỷ yếu về Hội thảo quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ hai 8/2016* trang 344-350.
6. **Nguyễn trọng Phước**, Trần Bảo Toàn, Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang., (2018), “Sàng lọc bộ giống lúa mùa chịu mặn giai đoạn mạ và trổ hoa”, *Tạp chí Khoa học Công Nghệ Việt Nam*, số 6.(67) trang 13-18.
7. Nguyễn Thị Lang, Phạm công trứ, **Nguyễn Trọng Phước**, Trần Minh Tài, Bùi Chí Bửu., (2016), “Nghiên cứu chống gen mặn và hạn trên tổ hợp lai hồi giao phục vụ ĐBSCL”, *Tạp chí Khoa học Công Nghệ Việt Nam*, số 6.(67) trang 19-24.
8. Nguyễn Thị Lang, Biện Anh Khoa, **Nguyễn Trọng Phước**, Bùi Chí Bửu., (2018), “Sàng lọc gen kháng mặn trên 100 giống lúa dùng làm nguồn vật liệu lai.”, *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông Thôn*, số 12. Trang: 3-10.