

HOÀNG THỊ HUỆ, TRẦN ĐÌNH LONG



**PHƯƠNG PHÁP CHỌN TẠO GIỐNG LÚA  
KHÁNG ĐẠO ÔN VÀ CHỊU MẶN**  
(Sách chuyên khảo)

HÀ NỘI, 2022

# MỤC LỤC

## LỜI MỞ ĐẦU

### PHẦN I. CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ [7]

#### CHƯƠNG 1. KHÁI NIỆM VÀ NGUYÊN LÝ CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ [7]

1. Khái niệm về chọn giống phân tử [7]
2. Nguyên lý của chọn giống phân tử [7]

#### CHƯƠNG 2. CHỈ THỊ PHÂN TỬ ADN TRONG CHỌN GIỐNG CÂY TRỒNG [11]

1. Khái niệm về chỉ thị phân tử [11]
2. Các loại chỉ thị phân tử ADN [11]
  - 2.1. Chỉ thị RFLP [11]
  - 2.2. Chỉ thị RAPD [12]
  - 2.3. Chỉ thị AFLP [13]
  - 2.4. Chỉ thị STS [14]
  - 2.5. Chỉ thị CAPS [14]
  - 2.6. Chỉ thị microsatelite [15]

#### CHƯƠNG 3. TỔNG QUAN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN VÀ CHỊU MẶN [16]

1. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn [18]
  - 1.1. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng trên thế giới [18]
  - 1.2. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng ở Việt Nam [23]
2. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa chịu mặn [27]
  - 2.1. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng trên thế giới [27]
  - 2.2. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng ở Việt Nam [37]

### PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN [47]

#### CHƯƠNG 4. BỆNH ĐẠO ÔN HẠI LÚA [47]

1. Nấm đạo ôn hại lúa [47]
  - 1.1. Phân loại và đặt tên [47]
  - 1.2. Đặc điểm hình thái [47]
  - 1.3. Chu trình nhiễm và phát triển của nấm đạo ôn [48]
  - 1.4. Ảnh hưởng của bệnh đạo ôn đến sản xuất lúa [49]
2. Kháng đạo ôn ở lúa [51]
  - 2.1. Tính kháng đạo ôn ở lúa [51]
    - 2.1.1. Tính kháng định tính [51]
    - 2.1.2. Tính kháng định lượng [53]
    - 2.1.3. Tính kháng lâu bền [54]
  - 2.2. Phản ứng bệnh đạo ôn ở lúa [54]
  - 2.3. Di truyền tính kháng bệnh đạo ôn ở lúa [55]

## **CHƯƠNG 5. KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN [57]**

### **1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu [57]**

#### **1.1. Vật liệu nghiên cứu [57]**

#### **1.2. Nội dung nghiên cứu [57]**

#### **1.3. Phương pháp nghiên cứu [57]**

##### **1.3.1. Thu thập và phân lập mẫu nấm đạo ôn [57]**

##### **1.3.2. Phân tích đa dạng di truyền nấm đạo ôn bằng chỉ thị phân tử [58]**

##### **1.3.3. Đánh giá tính kháng đạo của các giống lúa [61]**

##### **1.3.4. Lập bản đồ gen kháng đạo ôn ở lúa [64]**

##### **1.3.5. Nhận dạng ADN của các giống lúa [65]**

##### **1.3.6. Phương pháp chọn tạo giống lúa mang gen kháng đạo ôn bằng chỉ thị phân tử [67]**

### **2. Kết quả nghiên cứu [69]**

#### **2.1. Xác định các chủng nấm đạo ôn [69]**

##### **2.1.1. Thu thập và phân lập nấm đạo ôn [69]**

##### **2.1.2. Phân tích xác định các chủng nấm bằng chỉ thị phân tử [73]**

#### **2.2. Xác định các gen kháng đạo ôn ở lúa [86]**

##### **2.2.1. Đánh giá tính kháng đạo ôn của các giống lúa [86]**

##### **2.2.2. Xác định gen kháng đạo ôn ở lúa [88]**

#### **2.3. Kết quả chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn [91]**

##### **2.3.1. Lai quy tụ gen kháng bệnh đạo ôn vào lúa [91]**

##### **2.3.2. Sử dụng chỉ thị phân tử để chọn các cây lúa mang gen kháng đạo ôn [97]**

#### **2.4. Đánh giá và tuyển chọn giống lúa kháng đạo ôn [102]**

##### **2.4.1. Đánh giá tính kháng đạo ôn [102]**

##### **2.4.2. Đánh giá một số đặc điểm nông học chính của các dòng lúa [104]**

##### **2.4.3. Kiểm tra sự có mặt của gen kháng Pi-1&Pi-5 trong dòng lúa NB-01 [107]**

##### **2.4.4. Kết quả khảo nghiệm và sản xuất thử [108]**

##### **3.3.3.5. Kết quả khảo nghiệm Quốc gia [114]**

## **PHẦN III. KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU MẶN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ [122]**

### **CHƯƠNG 6. ĐẤT NHIỄM MẶN VÀ DI TRUYỀN TÍNH CHỊU MẶN Ở LÚA [122]**

#### **1. Khái niệm đất nhiễm mặn [122]**

#### **2. Phân loại đất nhiễm mặn [124]**

#### **3. Các vùng đất nhiễm mặn ở Việt Nam [126]**

##### **3.1. Đồng bằng sông Cửu Long [126]**

##### **3.2. Đồng bằng sông Hồng [130]**

#### **4. Cơ chế di truyền tính chịu mặn ở lúa [132]**

##### **4.1. Cơ chế chịu mặn ở lúa [132]**

##### **4.2. Di truyền tính chịu mặn ở lúa [136]**

## **CHƯƠNG 7. KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU MẶN [138]**

### **1. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu [138]**

#### **1.1. Vật liệu nghiên cứu [138]**

#### **1.2. Nội dung nghiên cứu [139]**

#### **1.3. Phương pháp nghiên cứu [139]**

##### **1.3.1. Đánh giá khả năng chịu mặn của lúa [139]**

##### **1.3.2. Lai quy tụ gen chịu mặn vào giống lúa [141]**

##### **1.3.3. Đánh giá đặc điểm nông sinh học của các giống lúa [143]**

##### **1.3.4. Nhận dạng ADN của lúa [144]**

##### **1.3.5. Xác định cây lúa mang gen chịu mặn [146]**

##### **1.3.6. Phân tích và xử lý số liệu [146]**

### **2. Kết quả nghiên cứu [147]**

#### **2.1. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa [147]**

**2.1.1. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm [147]**

**2.1.2. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa trên đồng ruộng [152]**

#### **2.2. Kết quả xác định chỉ thị phân tử liên kết với gen chịu mặn [154]**

#### **2.3. Tuyển chọn giống lúa chịu mặn [157]**

**2.3.1. Lai chuyển gen chịu mặn vào lúa [157]**

**2.3.2. Tuyển chọn giống lúa chịu mặn [160]**

**2.3.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và độ thuần đồng ruộng của các dòng lúa [163]**

**2.3.4. Đánh giá năng suất của các dòng lúa [165]**

**2.3.5. Đánh giá khả năng chống chịu sâu, bệnh hại chính của các dòng lúa [166]**

**2.3.6. Đánh giá chất lượng của các dòng lúa [167]**

**2.3.7. Kết quả khảo nghiệm các dòng lúa [170]**

**2.3.7.1. Kết quả khảo nghiệm tác giả các dòng lúa [170]**

**2.3.7.2. Kết quả khảo nghiệm Quốc gia [172]**

## LỜI MỞ ĐẦU

Lúa (*Oryza sativa* L) là cây trồng hàng năm chủ lực của nước ta. Lúa gạo vừa là nguồn lương thực quan trọng, vừa là mặt hàng xuất khẩu chiến lược của Việt Nam. Trung bình một năm, Việt Nam sản xuất khoảng 26 - 28 triệu tấn gạo, sau khi dành cho tiêu thụ trong nước, khối lượng gạo xuất khẩu khoảng 6 - 6,5 triệu tấn gạo/năm, trong đó, vùng Đồng bằng sông Cửu Long - vựa lúa chính chiếm đến hơn 50% sản lượng và hơn 90% lượng gạo xuất khẩu của cả nước. Hàng năm, lượng gạo của Việt Nam xuất khẩu chiếm khoảng 15% tổng lượng gạo xuất khẩu toàn thế giới. Đóng góp vào thành công của sản xuất lúa gạo của Việt Nam có nhiều yếu tố, trong đó không thể thiếu vai trò của công tác chọn tạo và phát triển giống lúa mới đáp ứng cơ cấu chủng loại gạo theo chiến lược tiêu thụ trong nước và xuất khẩu.

Hiện nay có rất nhiều phương pháp được sử dụng để chọn tạo giống cây trồng nói chung như chọn lọc dựa trên sự lai hữu tính (còn gọi là chọn giống truyền thống); (ii) phương pháp chọn tạo giống dựa trên các kỹ thuật gây đột biến bằng phóng xạ và hoá chất; (iii) phương pháp chọn giống dựa trên sự ứng dụng các kỹ thuật của công nghệ sinh học như: nuôi cấy mô-tế bào, lai tế bào soma, chọn giống phân tử...

Trong vài thập kỷ trở lại đây, hướng chọn giống phân tử (Marker Assisted Selection, viết tắt là MAS) đã được hình thành và phát triển mạnh mẽ ở trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Bản chất của hướng chọn giống này là kết hợp giữa phương pháp lai tạo truyền thống và chọn lọc bằng chỉ thị phân tử để rút ngắn thời gian và nâng cao hiệu quả chọn tạo giống. Trong thực tế nếu chỉ sử dụng các phương pháp truyền thống như lai tạo và chọn lọc thông qua sự biểu hiện kiểu hình, không những tốn kém: tiền của, thời gian mà kết quả chọn lựa còn phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện môi trường và kinh nghiệm của nhà chọn giống; chính vì vậy sẽ dẫn tới việc chọn tạo giống gặp nhiều khó khăn hoặc không thành công. Nhờ hướng chọn tạo giống phân tử chúng ta đã khắc phục được những trở ngại nói trên và đem lại kết quả chọn tạo có hiệu quả cao hơn.

Chọn tạo giống phân tử đã được áp dụng trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau như: lúa, ngô, đậu tương, rau, cây ăn quả.v.v. và đem lại kết quả rất đáng khích lệ. Chẳng hạn ở lúa, các nhà chọn tạo giống đã áp dụng MAS để chọn ra những giống lúa mang gen Pi-1, Pi-2, Pi-5.v.v. kháng tốt với bệnh đạo ôn, hoặc các giống lúa mang gen: Xa-1, Xa-2, Xa-3, Xa-4, xa-5, Xa-10, xa-13, Xa-21.v.v. kháng tốt với bệnh bạc lá.v.v.

Với kinh nghiệm cũng như kết quả đạt được trong nhiều năm áp dụng hướng nghiên cứu chọn giống phân tử đối với tính trạng kháng đạo ôn và chịu mặn ở lúa. Trong cuốn sách này, nhóm tác giả tập trung vào phương pháp chọn tạo giống lúa hiện đại, dựa trên sự tổng hợp những kiến thức cơ bản nhất về chọn giống phân tử cũng như các kết quả nghiên cứu áp dụng hướng nghiên cứu chọn giống phân tử đối với tính kháng đạo ôn và chịu mặn ở lúa với mong muốn được chia sẻ kinh nghiệm và kết quả nghiên cứu cùng các nhà khoa học để góp phần nâng cao hiệu quả công tác nghiên cứu nói chung và chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn, chịu mặn nói riêng.

Trong quá trình chuẩn bị và biên soạn cuốn sách này; ngoài việc tham khảo nhiều tài liệu của các đồng nghiệp trong, ngoài nước, nhóm tác giả chân thành cảm ơn PGS.TS Lã Tuấn Nghĩa, Giám đốc Trung tâm Tài nguyên thực vật, Chủ nhiệm nhiệm vụ đã cho phép sử dụng kết quả trong các đề tài nghiên cứu. Tuy vậy; cuốn sách này có thể vẫn còn nhiều thiếu sót khó tránh khỏi; bởi vậy, nhóm tác giả rất mong có được sự chia sẻ và đóng góp của bạn đọc.

***Xin trân trọng cảm ơn!.***  
**NHÓM TÁC GIẢ**

## CHƯƠNG 1. KHÁI NIỆM VÀ NGUYÊN LÝ CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ

### 1. Khái niệm về chọn giống phân tử

Nhờ những tiến bộ của công nghệ sinh học, đặc biệt là công nghệ ADN đã giúp cho quá trình chọn tạo giống cây trồng trở nên dễ dàng và hiệu quả hơn. Nếu chỉ đơn thuần sử dụng các phương pháp truyền thống như lai tạo và chọn lọc thông qua sự biểu hiện kiểu hình, không những tốn kém: tiền của, thời gian mà kết quả chọn lựa còn phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện môi trường và kinh nghiệm của nhà chọn giống; các yếu tố nói trên sẽ là nguyên nhân dẫn tới việc chọn tạo giống gặp nhiều khó khăn hoặc không thành công. Ứng dụng công nghệ ADN trong chọn tạo giống sẽ là giải pháp tốt nhất để khắc phục các trở ngại nói trên và đem lại kết quả chọn tạo có hiệu quả cao hơn. Sự kết hợp giữa các phương pháp truyền thống và công nghệ ADN trong chọn tạo giống đã hình thành những hướng đi mới đó là: Chọn tạo giống phân tử (Marker Assisted Selection) hay còn gọi là MAS.

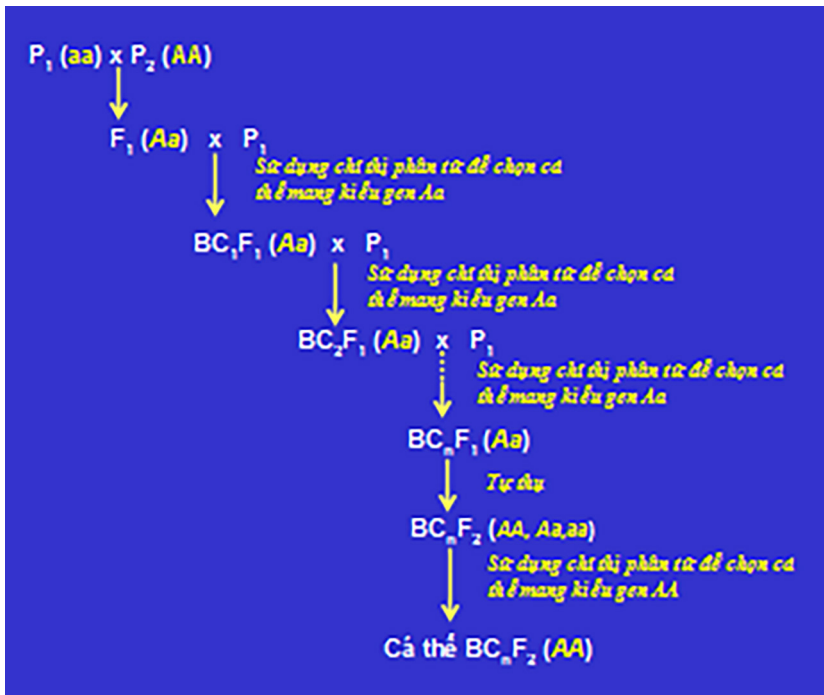
Trong chọn giống phân tử; yêu cầu trước tiên đó là phải xác định được chỉ thị phân tử liên kết chặt ( $< 5\text{cM}$ ) với các gen mục tiêu quy định tính trạng nông học như: năng suất, chống chịu và chất lượng.v.v để từ đó sử dụng các chỉ thị liên kết này xác định các cá thể mang gen mục tiêu trong quần thể tạo giống.

### 2. Nguyên lý của chọn giống phân tử

Nguyên lý của chọn giống phân tử có thể được phác họa qua ví dụ sau: Giả sử có hai giống lúa gồm giống  $P_1$  không chịu



hạn (mang kiểu gen là: aa) nhưng có những tính trạng ưu việt khác (năng suất cao, chất lượng tốt..v.v.); giống P<sub>2</sub> chịu hạn tốt (mang kiểu gen là: AA) nhưng năng suất, chất lượng có thể kém. Tiến hành lai hai giống P<sub>1</sub> và P<sub>2</sub> qua một số thế hệ lai trở lại (backcross) như biểu hiện ở sơ đồ ở dưới.



Hình 1. Sơ đồ nguyên lý lai, chọn giống bằng chỉ thị phân tử.

Theo sơ đồ thì (hình 1) khi lai hai giống với nhau, ở thế hệ F<sub>1</sub> có kiểu gen về tính trạng chịu hạn là Aa (một nửa kiểu gen của giống P<sub>1</sub> và một nửa của giống P<sub>2</sub>). Khi tiến hành lai trở lại sử dụng giống P<sub>1</sub> làm cây bố để nhận những đặc tính ưu việt của nó thì trong các thế hệ lai trở lại tiếp theo kiểu gen của giống P<sub>1</sub> sẽ tăng dần và kiểu gen của giống P<sub>2</sub> sẽ giảm dần. Vì ở mỗi thế



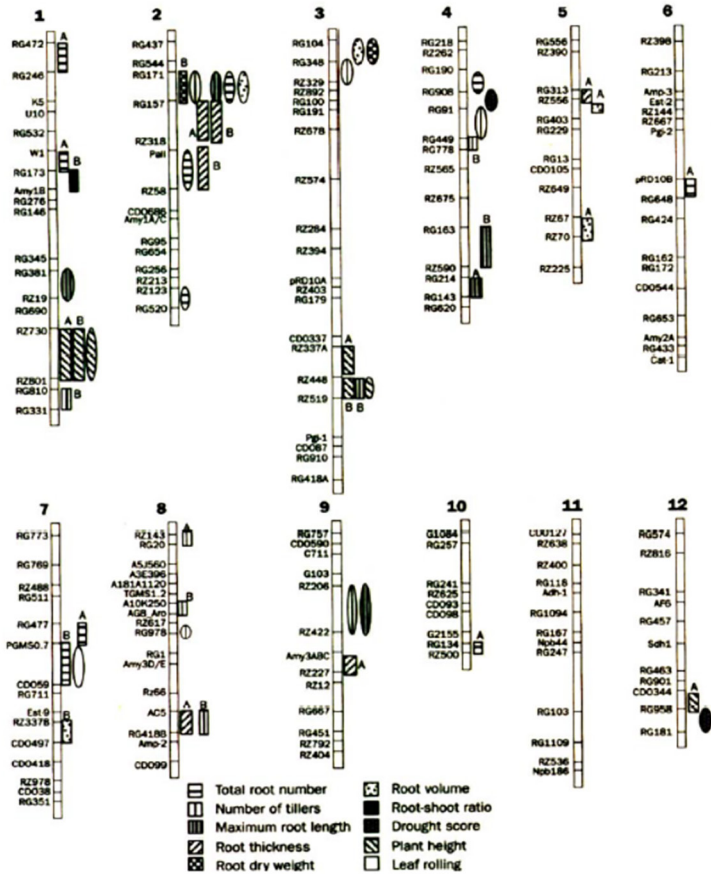


hệ, chúng ta đều chọn những alen chịu hạn (alen A), nên mặc dù kiểu gen của  $P_2$  giảm nhưng các thế hệ con lai vẫn giữ được gen chịu hạn. Đến một thế hệ nào đó đạt được mục đích mong muốn, chúng ta cho các dòng lúa tự thụ thì ở thế hệ ngay sau đó sẽ thu được các dòng mang kiểu gen chịu hạn đồng hợp tử AA. Ở bước chọn tạo cuối cùng, chúng ta sẽ thu được các dòng mang gen chịu hạn có những tính trạng ưu việt của giống  $P_1$ .

Trong thực tế sản xuất, nhiều giống cây trồng có được những tính trạng quý như: năng suất cao nhưng khả năng chống chịu lại kém, vì vậy các nhà chọn tạo giống phải tập trung cải tạo, nâng cao những tính trạng yếu kém mà vẫn giữ được những tính trạng có giá trị. Thường các tính trạng được sử dụng phải biểu hiện rõ ràng, hiệu quả cao và ổn định. Quan trọng hơn là những chỉ thị phân tử liên kết với gen quy định các tính trạng đó phải được xác định từ trước. Hiện tại, nhiều gen có tính trạng nông học quý như khả năng kháng sâu bệnh hại (đạo ôn, bạc lá, rầy nâu.v.v.) cũng như chịu các điều kiện môi trường bất thuận (mặn, hạn.v.v.) ở cây trồng đã được lập bản đồ (hình 2), xác định chỉ thị liên kết; đó chính là điều thuận lợi cho áp dụng hướng chọn tạo giống phân tử.

Quá trình chọn tạo giống phân tử chỉ cần tiến hành trong phạm vi phòng thí nghiệm và nhà kính, sử dụng lượng mẫu nhỏ và có thể xác định cây mang gen mục tiêu ở giai đoạn sớm. Chẳng hạn với lúa, có thể chọn được ngay những cây mang gen sau khi gieo hạt một tuần mà không cần triển khai ngoài đồng ruộng để theo dõi hoặc chờ đợi đến khi thu hoạch. Quá trình chọn giống này đã cho thấy một hướng đi đơn giản hơn nhiều mà hiệu quả lại rất cao.





Hình 2. Bản đồ QTL liên quan đến khả năng chịu hạn trên quần thể đơn bội kép của cặp lai IR64 x Azucena (Islam và cs., 2013).



## CHƯƠNG 2. CHỈ THỊ PHÂN TỬ ADN TRONG CHỌN GIỐNG CÂY TRỒNG

### 1. Khái niệm về chỉ thị phân tử

Chỉ thị ADN (DNA marker) bao gồm các chỉ thị RFLP, PCR.v.v., các chỉ thị này được dùng để phát hiện, phân tích và tổng hợp ra những đoạn ADN mới. Về cơ bản có hai loại chỉ thị đó là: chỉ thị RFLP và PCR. Chỉ thị RFLP là những đoạn ADN (hoặc ARN) được sử dụng để lai với ADN của hệ gen cần phân tích. Chỉ thị PCR thường được phân thành các loại khác nhau như: AFLP, RAPD, SSR, RGA, STS, CAPS.v.v.; chỉ thị PCR là những đoạn ADN (mỗi) sợi đơn có kích thước phổ biến khoảng từ 10 đến 30 nucleotide và chúng được sử dụng làm đoạn khởi đầu trong phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để tổng hợp nhân tạo ra những đoạn ADN mới.

### 2. Các loại chỉ thị phân tử ADN

#### 2.1. Chỉ thị RFLP

Chỉ thị RFLP có ý nghĩa rất quan trọng và đang được ứng dụng rộng rãi trong lập bản đồ gen, phân lập gen, xác định số bản sao của gen, phân tích cấu trúc và chức năng gen, xác định nồng độ và kích thước của mRNA.v.v. RFLP được viết tắt từ cụm từ tiếng Anh là: Restriction Fragment Length Polymorphism, có nghĩa là đa hình độ dài đoạn giới hạn.

RFLP là một phương pháp nhận dạng ADN hoặc ARN bằng cách lai giữa hai phân tử axit nucleic. Trong phương pháp này phân tử axit nucleic (ADN) được cắt bằng enzym giới hạn thành những đoạn nhỏ hơn có kích thước khác nhau, những đoạn này được điện di tạo sự phân giải, sau đó được đưa lên và



cố định trên một loại màng đặc biệt, gọi là màng lai. Các đoạn ADN cố định trên màng lai được cho lai với đoạn ADN mẫu dò (probe) đã được đánh dấu sẵn để giúp xác định kết quả sau khi lai; nếu trình tự của mẫu dò bổ sung với trình tự của một đoạn ADN nào đó trên màng lai thì chúng sẽ lai bắt cặp với nhau. Thông qua đoạn ADN mẫu dò đã được đánh dấu, chúng ta sẽ xác định được kết quả lai, từ đó giúp cho việc phân tích theo những mục tiêu đã định như: xác định đa hình, xác định gen.v.v.

## 2.2. Chỉ thị RAPD

RAPD là viết tắt của cụm từ tiếng Anh: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Đa hình ADN được nhân bản ngẫu nhiên). Nó là kỹ thuật được xây dựng dựa trên nguyên lý PCR, với những mẫu được thiết kế ngẫu nhiên có chiều dài khoảng 10 nucleotide. Trong phản ứng, các mẫu RAPD gắn ngẫu nhiên vào ADN khuôn ở bất kỳ vị trí nào có trình tự bổ sung với nó. Phản ứng sau đó xảy ra với sự tham gia xúc tác của enzym Taq, dNTP và các thành phần khác. Kỹ thuật này chỉ sử dụng một lượng nhỏ ADN khuôn (khoảng 25ng). Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose và phát hiện bằng cách nhuộm với dung dịch ethidium bromide, kích thước sản phẩm có chiều dài từ 200bp đến 2000 bp. Về cơ bản; chỉ thị RAPD là loại chỉ thị trội, nghĩa là sử dụng chỉ thị này không phân biệt được cá thể dị hợp tử trong quần thể  $F_2$ .

RAPD là một loại chỉ thị thao tác đơn giản, không mất nhiều thời gian và tốn kém. Chỉ thị này rất phù hợp cho phân tích đa dạng di truyền và lập bản đồ gen sử dụng quần thể RIL (Recombinant Inbred Line). Hạn chế lớn nhất của chỉ thị RAPD đó là nó rất nhạy cảm với nhiều yếu tố như: các thành phần



tham gia phản ứng và đặc biệt là nhiệt độ gắn mỗi; chính vì vậy khi sử dụng chỉ thị này cần hết sức lưu ý tới các điều kiện nói trên.

### 2.3. Chỉ thị AFLP

Chỉ thị AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) được phát triển dựa trên nguyên lý PCR để nhân bản những đoạn ADN đã được phân cắt bởi enzym giới hạn (restriction enzyme). Điểm cơ bản nhất của chỉ thị này đó là sự thiết kế mỗi PCR đặc trưng.

Quy trình thiết kế mỗi PCR được tiến hành như sau: trước tiên, ADN tổng số được cắt bởi các enzym giới hạn; nhiều nghiên cứu sử dụng hai loại enzym EcoRI (enzym nhận biết 6 nucleotit) và MseI (enzym nhận biết 4 nucleotit). Khi xử lý với enzym giới hạn, ADN sẽ bị cắt thành vô số mảnh có kích thước khác nhau mà mỗi mảnh đều biết được trình tự nucleotide của chúng ở hai đầu cắt. Dựa vào trình tự đã biết ở đầu cắt để thiết kế các đoạn gắn (adapter) và gắn chúng vào mỗi đầu. Dựa vào trình tự adapter người ta thiết kế mỗi PCR, mỗi gồm hai phần: một phần có trình tự nucleotide bổ sung với adapter và phần còn lại là những nucleotide được thêm vào tùy ý, thông thường từ 1 đến 3 nucleotide. Với mỗi thiết kế như vậy thì chỉ có những đoạn ADN có trình tự ở hai đầu bổ sung với trình tự mỗi mới được nhân bản. Do kết hợp được những đặc điểm của kỹ thuật RFLP và kỹ thuật RAPD nên kỹ thuật AFLP có nhiều ưu điểm như: đơn giản, ổn định, khả năng ứng dụng rộng và do có thể thêm các nucleotide khác nhau vào cuối mỗi nên số lượng mỗi có thể được thiết kế và tiềm năng ứng dụng rất lớn. Về cơ bản AFLP là chỉ thị trội, do vậy nếu dùng chỉ thị này cũng không nhận biết được cá thể dị hợp tử ở quần thể  $F_2$ .



## 2.4. Chỉ thị STS

STS (Sequence Tagged Sites) có thể được xem như là một chỉ thị thay thế cho các chỉ thị RFLP và RAPD. Trong các chỉ thị ADN thì RFLP rất phức tạp, tốn kém và khó thực hiện nhất; trong khi đó RAPD lại được xem như một chỉ thị không ổn định, kết quả có thể không đồng nhất nếu thực hiện phản ứng trong cùng điều kiện nhưng ở hai máy PCR khác nhau.v.v. Để khắc phục những nhược điểm này, người ta đã phát triển chỉ thị STS. Nguyên lý của STS đó là: trước tiên người ta xác định trình tự các nucleotide ở hai đầu của các đoạn ADN sử dụng làm mẫu dò trong kỹ thuật RFLP hoặc sản phẩm của chỉ thị RAPD; sau đó dựa vào trình tự đã xác định, người ta đã thiết kế những mồi PCR có chiều dài khoảng 18 đến 20 nucleotide. Với những mồi như vậy, chúng có thể tổng hợp nên những đoạn ADN nằm trong vùng sản phẩm RFLP hoặc RAPD. Vì dựa trên nguyên lý PCR nên dễ thực hiện, không tốn kém, hơn nữa lại sử dụng mồi đặc hiệu nên kết quả ổn định.

## 2.5. Chỉ thị CAPS

Do sự đa hình giữa các cá thể sinh vật được xác định dựa vào kết quả so sánh kích thước các băng ADN của chúng, vì vậy mà sản phẩm PCR gồm các băng ADN của các mẫu sinh vật có thể không khác nhau về kích thước nhưng lại có thể khác nhau về trình tự sắp xếp các nucleotide. Từ lý giải nói trên, các nhà khoa học đã sử dụng các enzym giới hạn để cắt sản phẩm RAPD, STS., SSR.v.v. nếu trình tự nucleotide của các sản phẩm đó chứa vị trí nhận biết của enzym nào đó thì nó sẽ bị cắt tại đó. Sự đa hình sẽ được phát hiện khi sản phẩm cắt tiếp tục được điện di trong gel.



## 2.6. Chỉ thị microsatelite

Khi nghiên cứu genom của một số sinh vật người ta đã phát hiện ra những đoạn ADN có chiều dài khác nhau phân bố một cách ngẫu nhiên mà trình tự của nó bao gồm các nhóm nucleotide giống nhau nhắc lại nhiều lần; các nhóm này thường có số lượng không vượt quá 5 nucleotide ví dụ như  $(TG)_n$  hoặc  $(AAT)_n$ , ở lúa các nhóm nucleotide đã phát hiện được gồm GA, GT, CAT, CTT. Những đoạn ADN lặp lại như vậy được gọi là Microsatelite hay còn có các tên khác như: SSLPs (single sequence length polymorphisms), SSRs (simple sequence repeats), STRs (short tADNom repeats). Các đoạn ADN nhắc lại này có trình tự hai đầu rất đặc trưng cho mỗi đoạn; bởi vậy mà trình tự đặc trưng ở hai đầu của đoạn nhắc lại này đã được sử dụng để thiết kế mồi cho PCR. Do có sự khác nhau về chiều dài giữa các đoạn nhắc lại, bởi vậy mà kỹ thuật nhận dạng ADN Microsatelite rất phù hợp trong nghiên cứu đa hình; lập bản đồ và phân lập gen. Cũng giống như chỉ thị RAPD; chỉ thị SSR đơn giản, thuận tiện, không tốn kém; mặt khác microsatelites là chỉ thị đồng trội nên sử dụng nó sẽ phát hiện được cá thể dị hợp tử ở quần thể  $F_2$ .



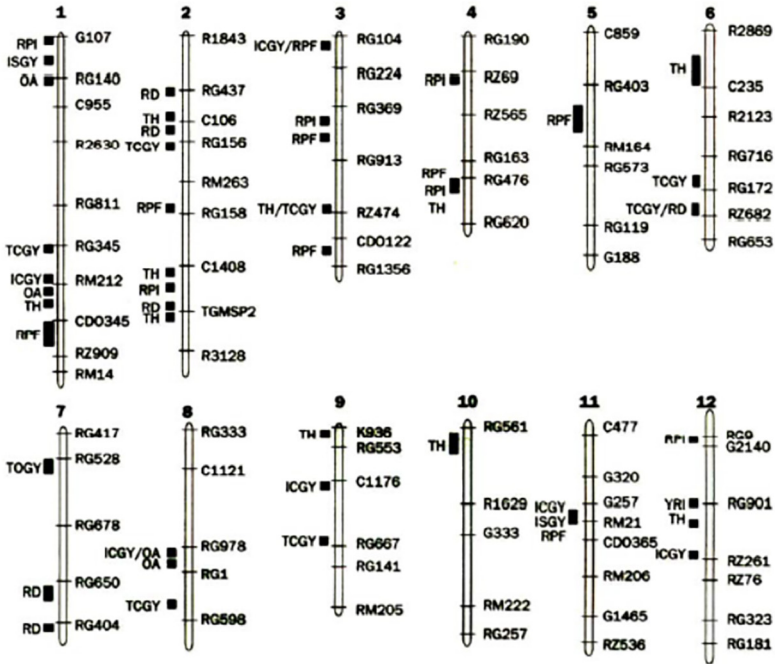
### CHƯƠNG 3. TỔNG QUAN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN VÀ CHỊU MẶN

Thông thường để chọn tạo thành công một giống mới sử dụng phương pháp truyền thống mất khoảng từ 4 đến 6 năm. Hơn nữa quá trình chọn tạo gặp rất nhiều khó khăn do thí nghiệm cần phải triển khai với số lượng và diện tích lớn, tốn kém nhiều công sức để loại bỏ những dạng kém giá trị, việc phân tích phải tiến hành trên từng cây; bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu lại bị ảnh hưởng rất lớn vào điều kiện môi trường và kinh nghiệm chọn tạo giống.v.v. (Trần Duy Quý, 1997). Để khắc phục những trở ngại trong quá trình chọn giống truyền thống; hướng chọn giống phân tử đã được áp dụng ngày càng rộng rãi trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Ở lúa, bản đồ di truyền lần đầu tiên được xây dựng vào năm 1988 (McCouch và cs., 1988) nhờ sử dụng chỉ thị RFLP và sau đó đã có hàng nghìn chỉ thị được thiết lập và ứng dụng trong nghiên cứu chọn tạo giống lúa. Khi các CTPT được xác định liên kết với gen quy định tính trạng ở cây như: chịu mặn, hạn, úng; kháng sâu, bệnh; phẩm chất gạo.v.v. nó sẽ được sử dụng trong chọn tạo giống (hình 3). Hiện nay đã có hàng trăm vị trí genom liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn, bạc lá, virút, gen quy định tính bất dục nhạy cảm với quang chu kỳ.v.v. ở lúa được xác định cùng với các chỉ thị liên kết với chúng (Zheng và cs, 1995).







Hình 3. Bản đồ QTL liên quan đến tính trạng năng suất trong điều kiện khô hạn trên quần thể DH của cặp lai giữa CT9993-5-10-1-M x IR62266-42-6-2 (McCouch và cs., 1988).

Những gen kháng bạc lá đã được phát hiện ở lúa như: Xa-1, Xa-2, Xa-3, Xa-4, xa-5, Xa-10, xa-13, Xa-21.v.v.; những gen này đã được đưa vào giống lúa mang gen có khả năng kháng đặc thù với các chủng nấm bệnh. Một số dòng lúa mang tổ hợp các gen như: Xa-4 và xa-5, Xa-4 và Xa-10.v.v., những dòng lúa mang tổ hợp các gen này được kiểm tra với 8 chủng bạc lá đã cho thấy khả năng kháng rất cao và đặc biệt dòng mang Xa-4 và Xa-10 không bị nhiễm bệnh. Cho đến nay đã có nhiều giống lúa mang các tổ hợp khác nhau của các gen kháng bạc lá như: xa-5 và Xa-21, xa-13 và Xa-21, xa-5 và Xa-7, Xa-4 và xa-13, xa-5 và xa-



13, Xa-4 và Xa-7, Xa-4, xa-5 và xa-13, Xa-4, xa-5 và Xa-21, Xa-4, xa-5, xa-13 và Xa-21. Các tổ hợp gen này đang được sử dụng trong chọn tạo giống lúa kháng.

## 1. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn

Trong thực tế, việc chọn giống kháng bệnh đạo ôn áp dụng phương pháp truyền thống mà chủ yếu thông qua quan sát, đánh giá kiểu hình là rất khó và hiệu quả không cao. Tuy nhiên, với sự trợ giúp của chỉ thị phân tử mà công việc xác định gen và chọn tạo giống kháng trở lên dễ dàng, chủ động và chính xác hơn.

Về cơ bản các loại chỉ thị ADN nêu ở phần trên đều có thể được ứng dụng trong nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn. Tuy nhiên, mỗi loại chỉ thị có ưu nhược điểm riêng; vì thế tùy vào mục đích, yêu cầu và điều kiện cụ thể của mỗi nghiên cứu mà lựa chọn sử dụng chỉ thị nào cho thích hợp. Trong số các chỉ thị phân tử ADN thì đối với lúa, chỉ thị SSR có nhiều ưu điểm đó là số chỉ thị hiện tại có thể áp dụng cho nghiên cứu là rất lớn, lên tới hàng nghìn chỉ thị và được nghiên cứu, hiểu biết về nhiều khía cạnh như: vị trí nhiễm sắc thể, sự liên kết với gen.v.v.

### 1.1. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng trên thế giới

Năm 1992, Mackill và Bonman đã phát triển bộ dòng lúa mang gen kháng đạo ôn trên nền di truyền của giống Co39, đa số các dòng này mang các gen kháng như Pi-1, Pi-2(t), Pi-3(t), Pi-4(t). Năm 1995, khi tiến hành sử dụng kỹ thuật RAPD với 468 mẫu ngẫu nhiên Naweed và cs. đã xác định được 2 chỉ thị liên kết với gen Pi-10(t) ở giống lúa Tongil (Naweed và cs., 1995).



Tsunemastru và cs. (2000) đã giới thiệu bộ dòng lúa mang đơn gen kháng đạo ôn trên nền di truyền của giống LTH, bộ này gồm 31 dòng mang 24 gen kháng bệnh đạo ôn khác nhau.

Theo công bố của Liu (2004), giống lúa SHZ2 mang 3 gen kháng chính gồm: Pi-GD-1, Pi-GD-2, Pi-GD-3. Trong đó, Pi-GD-1 nằm trên nhiễm sắc thể số 8 và liên kết với chỉ thị phân tử RFLP CG11, cách chỉ thị này 3,3cM; gen Pi-GD-2 nằm trên nhiễm sắc thể số 10, giữa hai chỉ thị r16 và r14 với khoảng cách tương ứng là 3,9cM và 7,7cM; gen Pi-GD-3 nằm trên nhiễm sắc thể số 12 và cách chỉ thị RM179 là 4,8cM. Wu (2003) đã sử dụng chỉ thị RGA và SSR để kiểm tra và đánh giá tính kháng của 80 dòng lúa ở thế hệ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>; kết quả phân tích ADN cho thấy, trong quần thể BC<sub>3</sub> có trên 85% cá thể mang gen kháng chủng nấm đạo ôn P06-6.

Qing Hua và cs. (2003) đã sử dụng chỉ thị SSR và RAPD để đánh giá tính kháng và lập bản đồ phân tử của gen Pi-15 sử dụng quần thể F2 của cặp lai giữa giống lúa GA25 (mang gen kháng Pi-15) và Q61 (nhiễm bệnh đạo ôn); kết quả phân tích ADN cho tỷ lệ kháng/nhiễm là 3:1; gen kháng Pi-15 nằm trên nhiễm sắc thể số 9 và liên kết với các gen kháng Pi-1, Pi-3 và Pi-5. Sandhu và cs. (2003) đã sử dụng 7 marker RAPD (OPA5, OPG17, OPG18, OPG19, OPF9, OPF17 và OPF19) để phân tích đa hình giữa các dòng kháng và nhiễm đạo ôn của 3 giống lúa trồng ở Braxin; kết quả đã chỉ ra sự khác biệt rõ ràng giữa các dòng kháng và dòng nhiễm, 9 băng ADN được khuếch đại bởi 7 marker PCR là các chỉ thị trội sử dụng cho chọn các dòng lúa kháng đạo ôn (Sandhu và cs., 2003).

Wu và cs. (2004) đã sử dụng một số cặp marker STS để phân tích,



chọn lựa những cá thể mang gen kháng từ quần thể con lai  $F_3$  của cặp lai giữa giống lúa C101LAC (kháng đạo ôn, mang gen Pi-1) và CO39 (nhiễm bệnh đạo ôn); kết quả đã chọn lọc được các dòng lúa mang gen kháng Pi-1. Năm 2008, Masahiro và cs. cũng đã phát triển được một chỉ thị STS sử dụng cho chọn các dòng lúa mang gen kháng Pi-b trong bảy giống lúa nội địa của Hàn Quốc. Năm 2004, Chen và cs. thông qua sử dụng chỉ thị phân tử RFLP (G1314A và G45) đã phân lập và xác định được 02 gen kháng đạo ôn là Pi-d(t)1 và Pi-d(t)2 nằm trên nhiễm sắc thể số 2 của giống lúa Digu. Năm 2005, Sobir và cs. đã sử dụng 2 chỉ thị SCAR để xác định sự có mặt của gen kháng Pi-b và Pi-ta trong 28 kiểu gen ở lúa (gồm 22 dạng trồng trọt và 6 dạng hoang dại); kết quả phân tích chỉ ra, 15 kiểu mang cả hai gen trong đó có *Oryza rufipogon*, 6 kiểu mang gen Pi-b trong đó có *Oryza glumaepatula*, *Oryza officinalis*, *Oryza latifolia* và *Oryza malapuzhaensis*.

Padmavathi và cs. (2005) dựa trên phân tích tính kháng của các giống lúa Zenith (mang gen: Pi-Z, Pia và Pi-i), Dular (mang gen Pi-ka), Tetep (mang gen Pi-kh), Tadukan (mang gen Pi-ta) đã tiến hành lai quy tụ các gen kháng vào giống lúa Co39; kết quả đã tạo ra được dòng lúa mang gen kháng hiệu quả với các chủng nấm đạo ôn. Năm 2007; Koizumi khi tiến hành nghiên cứu, sử dụng các chỉ thị phân tử ADN liên kết chặt với các gen kháng nhằm phát triển các phương pháp điều khiển gen kháng đạo ôn trong các giống lúa khác nhau. Năm 2009, Jia đã lai giống lúa gồm: giống japonica nhiệt đới Katy chứa gen kháng đạo ôn Pi-ta với giống japonica ôn đới M202; kết quả cho ra thế hệ con lai có sức kháng cao với nấm đạo ôn.

Năm 2009, Matsushita và cs. đã nghiên cứu khả năng kháng bệnh đạo ôn của giống lúa Chumroo, đây là giống lúa thường



được trồng ở các vùng cao thuộc Nhật Bản; trải qua hơn 20 năm, giống lúa này được xem là kháng bền với đạo ôn và chưa có bằng chứng nào cho thấy chúng bị nhiễm. Giống Chumroo được lai với giống lúa Koshihikari để tạo ra các giống lúa kháng bệnh và năng suất, chất lượng cao.

Kobayashi và cs. (2009) khi tiến hành xác định các gen kháng đạo ôn ở nhiều giống lúa gốc IRRI bằng phân tích sự phân ly, tác giả đã xác định được 7 gen kháng đạo ôn là: Pi-20, Pi-ta, Pi-k, Pi-a, Pi-b, Pik-s và Piz-t. Năm 2014, Jayawardna và cs. đã sử dụng các chỉ thị liên kết chặt với gen kháng đạo ôn (chỉ thị RM206 liên kết với gen Pi kh; chỉ thị RM246 liên kết với gen Pi t(p); chỉ thị YL155 liên kết với gen Pi ta) để tiến hành chọn lựa các dòng mang gen kháng; kết quả, nhóm tác giả đã lựa chọn được 17 dòng mang gen kháng và kháng tốt với các chủng nấm đạo ôn nghiên cứu.

Mục tiêu cải thiện khả năng kháng bệnh đạo ôn của các giống lúa được canh tác trong vùng nhiễm bệnh là một trong những mục tiêu quan trọng nhất của chương trình chọn tạo giống lúa ở nhiều nước trên thế giới. Tanweer FA et al (2015) đã sử dụng chiến lược lai Backcross để cải thiện khả năng kháng bệnh đạo ôn của giống lúa MR219 – một giống lúa phổ biến nhất của Malaysia. Nghiên cứu đã ứng dụng chỉ thị RM 208 nằm trên nhiễm sắc thể số 2 liên kết với gen Pi-b và chỉ thị RM206 nằm trên nhiễm sắc thể số 11 liên kết với gen Pi-kh để chọn lọc gen kháng mục tiêu của các dòng lai. Kết hợp với sàng lọc kiểu hình các dòng cải tiến kháng bệnh đạo ôn đã cho thấy khả năng kháng mạnh mẽ với bệnh đạo ôn P7.2 đang lưu hành trong vùng nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu này đã đóng góp vai trò quan trọng trong duy trì sản xuất lúa gạo của Malaysia.



Cho đến nay, đã có hơn 100 gen kháng đạo ôn và bản nhân dòng của trên 30 gen kháng đã được xác định như Pish, Pi35, Pi37, Pi64, Pit, Pi-b, pi21, Pi63, PiPR1, Pi9, Pi2, Piz-t, Pi50, Pizh, Pigm, Pi-d2, Pi-d3, Pi25, Pi36, Pi5, Pii, Pi56, Pb1, Pik, Pik-p, Pikm, Pike, Pi1, Pik-h/Pi54, Pi54rh, Pi54of, Pia, Pi-CO39, Pi-ta, Ptr, và Pi65 (Yin et al. 2021; Wang et al. 2022). Nhiều chỉ thị DNA liên kết chặt với gen kháng đạo ôn là công cụ hỗ trợ cổ điển trong việc chọn tạo giống cải thiện tính kháng đạo ôn đã được sử dụng. Như nghiên cứu của Sudarsanam Vijay et al. 2019, đã sử dụng chỉ thị RM 224 để xác định các cây mang gen kháng Pi-1 nhằm xác định các dòng lai giữa cây Samba Mahsuri và C101LAC. Kết quả đã xác định được 5 dòng Viz ở thế hệ BC2F4 có mức độ kháng bệnh đạo ôn cao, trong đó có một dòng được xác định giống số bông/cây, chiều dài bông và năng suất hạt so với dòng bố mẹ. Dòng này đã được chọn để nâng cao nhằm phát triển và sử dụng cho chương trình nhân giống kháng bệnh đạo ôn trong tương lai.

Nghiên cứu của Manojkumar HB et al, 2020 đã sử dụng 20 chỉ thị liên kết chặt với gen kháng đạo ôn để xác định khả năng mang gen kháng của 84 mẫu giống lúa đang được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp Zonal (ZARS) Ấn Độ. Kết quả, cho thấy một số giống mang các gen kháng phổ rộng như Pi1, Pi2, Pi54, Pi9, Pi40, Pi20, Pita cho thấy khả năng kháng nhiều chủng nấm đạo ôn.

Nghiên cứu của Teerasan W. et al, 2022 đã sử dụng kỹ thuật PCR để sàng lọc 10 gen đặc hiệu kháng đạo ôn (Pi9, Piz-t, Pi50, Pigm (t), Pid2, Pid3, Pia, Pik, Pi54 và Pita) của 451 giống lúa bao gồm: 363 giống lúa Thái Lan, 21 giống lúa cải tiến của Thái Lan, 43 giống lúa Nhật Bản và 24 giống lúa trên thế giới. Kết quả cho thấy 382 (99,48%) giống lúa Thái Lan có ít nhất một



gen kháng bệnh và hai giống lúa ‘Hom’ và ‘Bak muay’, chứa tám trong số mười gen kháng bệnh đạo ôn được sàng lọc. 320 giống lúa (83,33%) chứa ba gen kháng đạo ôn trở lên. Tần số của gen kháng bệnh đạo ôn dao động từ 9,64% - 7,76 %, trong đó gen Pi3 có tần số cao nhất và gen Pi54 có tần số thấp nhất. Hai gen kháng chính được tìm thấy trong các giống lúa Nhật Bản là gen Pik (76,74%) và gen Pi9 (72,09%). Trong khi hai gen kháng chính được tìm thấy ở các giống lúa quốc tế là gen Pi9 (66,67%) và gen Pi54 (62,50%). Dữ liệu gen kháng bệnh đạo ôn của từng giống lúa thu được từ nghiên cứu này sẽ có lợi cho chương trình nhân giống kháng trong tương lai.

## 1.2. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng ở Việt Nam

Đạo ôn là một bệnh hại nghiêm trọng đối với sản xuất lúa ở nước ta; trong thực tế khi dịch bệnh xảy ra đã làm giảm sản lượng lúa trong cả nước tới 30% và gây thiệt hại lớn về kinh tế đối với người trồng lúa.

Ở đồng bằng sông Cửu Long, ước tính năng suất lúa giảm khoảng 20% khi giống bị nhiễm bệnh. Từ năm 2000 cho đến 2005, bệnh có nguy cơ bùng phát trên diện rộng đối với hầu hết các giống ngắn ngày đang sản xuất lớn chủ yếu ở ĐBSCL như: OM 1490, OM 2514, OM 4498, OMCS2000, DS 20, OM 3536, OM 2031, IR 64, Jasmine-85.v.v. Trong vụ Đông xuân 2005-2006 bệnh đạo ôn lá và cổ gie đã gây thiệt hại nặng nề cho giống OM1490 ở tất cả các nơi nhất là ở An Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ, thiệt hại về năng suất ước tính 20-80%.

Trong năm 1992, dịch bệnh đã xảy ra ở hầu hết các tỉnh trồng lúa phía Bắc với tổng diện tích lúa bị nhiễm là 600.000 trăm nghìn hecta và một phần tư trong số diện tích nói trên đã bị nhiễm



bệnh trầm trọng và bị thất thu. Mặc dù tại thời điểm đó, nhiều biện pháp phòng trừ được áp dụng, song năng suất lúa vẫn bị giảm từ 10 - 15%. Duyên Hải miền Trung, chỉ tính ở Phú Yên thiệt hại do bệnh đạo ôn gây ra vào năm 1992 là 70 tỷ đồng, còn ở tỉnh Thái Bình người nông dân đã phải sử dụng tới 250 tấn thuốc hoá học để bảo vệ lúa trước dịch bệnh. Từ sau năm 1992, bệnh thường xuyên xảy ra gây khó khăn trở ngại lớn cho sản xuất lúa ở miền Bắc. Theo thông kê của Cục bảo vệ Thực vật, vụ Đông Xuân 2003-2004, tổng diện tích lúa bị nhiễm đạo ôn ở miền Bắc là: 178.147 ha (đạo ôn lá), trong đó diện tích nhiễm nặng là 4.348 ha và đạo ôn cổ bông là 24.752 ha, trong đó diện tích nhiễm nặng là 1.801 ha. Hầu hết các giống lúa đang gieo trồng như: IR17494, IR38, IR1820, Q5, lúa lai D.ưu 527, tạp giao 828, Nhị ưu 838, VN10, Khang dân 18, Bắc thơm, DT10, DT 11, DT13, Khâm dục.v.v. đều bị nhiễm bệnh vừa đến nhiễm rất nặng. Để phòng đạo ôn, nông dân ĐBSH đã phải sử dụng thuốc hoá học và thậm chí có những nơi như ở Thái Bình người dân phải phun thuốc tới 9 lần để phòng trừ bệnh.

Nghiên cứu chọn tạo các giống lúa kháng bệnh đạo ôn, đặc biệt là các giống lúa kháng bền vững luôn được xem như là biện pháp pháp hữu hiệu, ít tốn kém và ít ảnh hưởng đến môi trường trước nguy cơ dịch bệnh luôn có khả năng bùng phát, các chủng nấm bệnh mới luôn có khả năng hình thành. Trong những năm qua đã có nhiều kết quả nghiên cứu về chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn sử dụng chỉ thị phân tử được công bố ở nước ta.

Kết quả nghiên cứu đã xác định được 3 gen kháng đạo ôn (trong đó có 2 gen trội và một gen lặn) ở giống lúa Tẻ tếp và OM-44. Tác giả Nguyễn Thị Minh Nguyệt (2002) đã khảo sát và





dùng chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng đạo ôn để đánh giá các giống lúa bố mẹ phục vụ cho công tác nghiên cứu chọn tạo giống lúa có khả năng kháng bền vững; đã xác định được dòng BL123 mang 3 gen kháng chính: Pi-1(t), Pi-2(t) và Pi-3(t); đây là một trong những dòng lúa có khả năng kháng tốt đối với các chủng nấm đạo ôn ở Việt Nam và được chọn làm dòng cho gen trong các tổ hợp lai CR203 x BL123; A20 x BL123; Nếp 415 x BL123; DT21 x BL123. Nguyễn Thị Ninh Thuận (2003) đã tiến hành nghiên cứu trên giống lúa Chiêm bắc của Việt Nam đã xác định được hai gen kháng trội là Pi-12 và Pi-VT7; đồng thời tác giả đã tiến hành lập bản đồ hai gen kháng này trên nhiễm sắc thể số 2. Nguyễn Thị Lang và cs. (2008) sử dụng chỉ thị phân tử SSR-RM21 để xác định gen kháng trên các tổ hợp lai giữa các giống lúa OM2514 x IR64, C53 x IR64, OM2514 x IR24 và C53 x CR24 đã xác định được hai gen kháng Pi-5 và Pi-3 có mặt ở các con lai. Năm 2008, Lã Tuấn Nghĩa và cs. đã nghiên cứu và lập bản đồ QTL kháng đạo ôn trên quần thể F6 của tổ hợp lai giữa giống lúa Tám thơm x CR203, kết quả đã xác định được 4 QTL là: qBLASTI-3a-TXC, qBLASTI-3b-TXC, qBLASTI-9-TXC, qBLASTI-11-TXC; năm 2011 tác giả đã tiến hành sử dụng hai chỉ thị là r14 và RM179 liên kết với các gen Pi-GD-2, Pi-GD-3 để xác định các dòng lúa mang gen kháng đạo ôn của cặp lai giữa CR203 và ZHZ2; kết quả đã xác định được một dòng lúa kháng đạo ôn có năng suất trên 9,5 tấn/ha để phát triển trong sản xuất. Đặc biệt hơn là tác giả Lã Tuấn Nghĩa và cs. đã ứng dụng phương pháp chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn và chọn tạo được giống lúa NB-01 kháng đạo ôn có năng suất và chất lượng tốt, công trình nghiên cứu đã nhận được giải thưởng bông lúa vàng Việt Nam năm 2015.

Để đáp ứng nhu cầu thâm canh và thích nghi với biến đổi



khí hậu ở Việt Nam thì các nghiên cứu xác định gen kháng đạo ôn với phổ kháng rộng và tính ổn định cao là vấn đề cần được quan tâm hiện nay. Nhiều nghiên cứu sàng lọc gen kháng đạo ôn ở các giống lúa địa phương và các nghiên cứu lai tạo chuyển gen kháng vào giống lúa có năng suất, chất lượng đã được tập trung nghiên cứu ở Việt Nam. Năm 2016, tác giả Phan Hữu Tôn đã công bố kết quả khảo sát khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn, rầy nâu của 4 giống lúa Nếp Đèo Đàng, Tẻ PuDe, Blechâu và Khẩu Dao; Nghiên cứu đã sử dụng chỉ thị MP2 để xác định khả năng chứa gen kháng Xa4, chỉ thị P3 xác định gen kháng Xa7, chỉ thị YL155/YL 87 phát hiện khả năng chứa gen Pi-ta kháng bệnh đạo ôn và chỉ thị RG457L phát hiện gen Bph10 kháng rầy nâu. Kết quả thu được giống Blechâu chứa 3 gen kháng Xa4, Xa7 và Pi-ta, Khẩu dao mang gen Xa4 và Bph10, giống nếp Đèo đàng chứa gen Xa7 và Pi-ta, tẻ Pude mang gen Xa4 và Bph10. Các giống chứa các gen kháng đều kháng tốt hữu hiệu với các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu được nghiên cứu.

Năm 2018, nghiên cứu của Phạm Thiên Thành và cs, đã sử dụng chỉ thị phân tử để khảo sát nguồn gen kháng bệnh đạo ôn của 50 nguồn gen lúa được thu thập tại các vùng sinh thái của Việt Nam; Kết quả đã xác định được 40 mẫu giống mang kiểu gen kháng mục tiêu và biểu hiện kiểu hình kháng vừa đến kháng cao với bệnh đạo ôn, trong đó có 11 giống lúa bản địa và 29 giống lúa cải tiến. Năm 2019, nhóm cộng sự của tác giả Phạm Thiên Thành tiếp tục ứng dụng chỉ thị phân tử ADN để chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn; Chỉ thị RM 1337 được sử dụng để hỗ trợ quá trình lai trở lại (MABC) và chọn lọc quá trình phân ly, kết quả đã chọn được dòng BC15-03 ở thế hệ BC<sub>5</sub>F<sub>5</sub> triển vọng mang lại hiệu quả kinh tế cao.



## 2. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa chịu mặn

Từ việc triển khai đưa vào sản xuất giống lúa IR66946 có khả năng chịu mặn tốt và đạt được những kết quả rất khả quan; IRRI đã hình thành một hướng nghiên cứu quan trọng đó là lai chuyển gen chịu mặn từ giống Pokkali vào một số giống lúa mùa địa phương cao sản thích nghi với từng vùng sinh thái bằng phương pháp lai trở lại. Hướng nghiên cứu này đã giải quyết được vấn đề quan trọng trong công tác gieo trồng và phát triển các giống lúa ở những vùng bị nhiễm mặn (Thomson và cs., 2010).

Tuy nhiên, nhược điểm chính của phương pháp truyền thống vẫn là cần nhiều thời gian cũng như sự phụ thuộc vào môi trường và kinh nghiệm của nhà chọn tạo giống (Islam và cs., 2011). Với mục tiêu làm chủ việc khai thác các gen quy định tính chịu mặn một cách hiệu quả, các nhà khoa học đã xây dựng hướng chọn tạo giống chịu mặn nhờ chỉ thị phân tử.

### 2.1. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng trên thế giới

Năm 1998, Lin và cs. đã tiến hành lập bản đồ QTL tính trạng chịu mặn ở lúa trên cơ sở sử dụng 142 dòng tái tổ hợp (RIL-F7) của cặp lai giữa Tesanai 2 và CB; 60 chỉ thị RFLP phân bố trên 12 nhiễm sắc thể cây lúa đã được sử dụng. Kết quả, nhóm tác giả đã xác định được các chỉ thị RG104, RG143, RG13, RG716 lần lượt nằm trên các nhiễm sắc thể số 3, 4, 5 và 6 liên kết với các gen quy định tính chịu mặn ở cây lúa. Trong đó, chỉ có chỉ thị RG13 đóng vai trò chính, liên kết với QTL chịu mặn (Lin và cs., 1998).

Tiến hành lập bản đồ QTL tính chịu mặn ở giai đoạn mạ



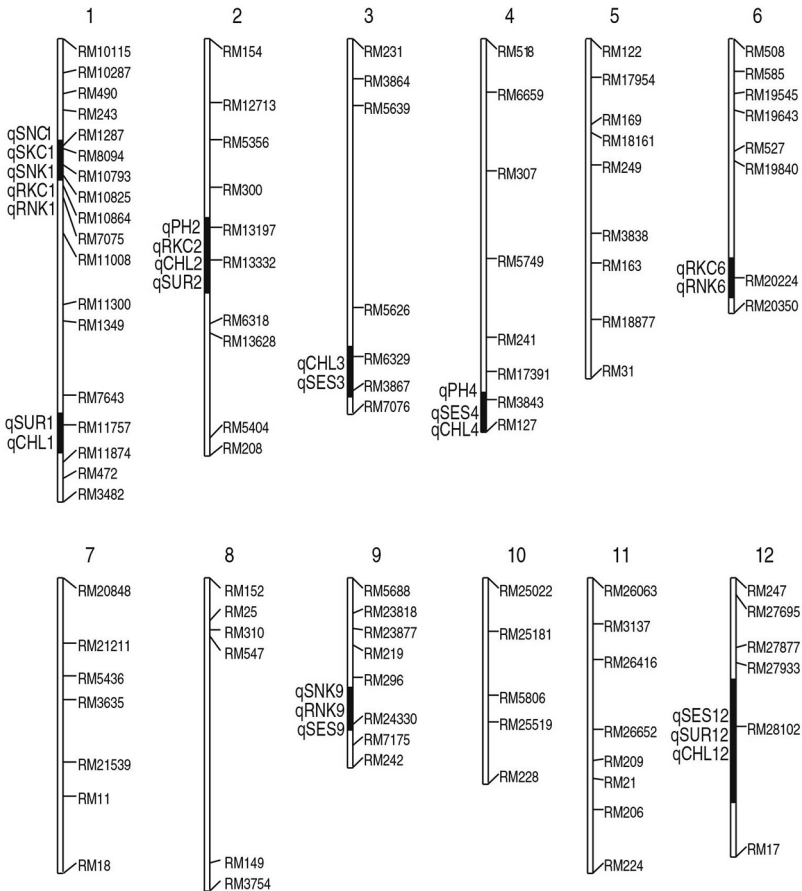
thông qua đánh giá nhân tạo 200 dòng  $F_2/F_3$  của cặp lai giữa CSR27 (giống có năng suất cao và chịu mặn tốt) và MI-48 (giống nhiễm mặn); 89 chỉ thị SSR cho đa hình phân bố trên 12 nhiễm sắc thể lúa được sử dụng để tiến hành lập bản đồ di truyền liên kết liên quan đến tính trạng chịu mặn. Kết quả đã xác định được 01 bản đồ di truyền liên kết có tổng chiều dài là 1.634,5cM; 06 QTL liên quan đến tính chịu mặn có chỉ số LOD > 2 và được đặt tên là QTL1, QTL2, QTL3, QTL4, QTL43 và QTL44. Trong đó, QTL1 và QTL2 được xác định nằm trên nhiễm sắc thể số 1, có chỉ số LOD và phần trăm đóng góp lần lượt là 2,80 - 5,77% và 2,33 - 14,38%; QTL3 và QTL4 nằm trên nhiễm sắc thể số 4, có chỉ số LOD và phần trăm đóng góp lần lượt là 2,32 - 5,13% và 2,54 - 7,11%; QTL43 nằm trên nhiễm sắc thể số 3, có chỉ số LOD và phần trăm đóng góp là 2,62 - 25,8%; QTL44 nằm trên nhiễm sắc thể số 5, có chỉ số LOD và phần trăm đóng góp là 2,24 - 8,7%. Các chỉ thị biên được xác định là RM84-RM259 (QTL1), RM572-RM294 (QTL2), RM5320-RM3648 (QTL3), RM3648-RM280 (QTL4), RM563-RM186 (QTL43), RM233B-RM334 (QTL44). QTL2 có vị trí tương ứng với gen chịu mặn Saltol1 trên nhiễm sắc thể số 1 (Ammar và cs., 2007).

Năm 2010, Thomson và cs. đã sử dụng: 140 dòng RILs (recombinant inbred lines) của cặp lai giữa hai giống lúa Pokkli & IR29; 100 chỉ thị SSR cho đa hình và phân bố đều trên 12 nhiễm sắc thể để phân tích đánh giá các QTL liên quan đến khả năng chống chịu mặn ở giai đoạn mạ. Các đặc tính sinh lý sinh hóa như: tính chống chịu mặn của mạ (SES - Standard Evaluation System Tolerance), chiều cao cây mạ (PH - Seedling Height), nồng độ  $Na^+$  trong chồi (SNC - Shoot  $Na^+$  Concentration), nồng độ  $K^+$  trong chồi (SKC - Shoot  $K^+$  Concentration), tỷ lệ giữa nồng độ  $Na^+/K^+$  trong chồi (SNK - Shoot Na-K Ratio), nồng độ  $K^+$  trong



rễ (RKC - Root  $K^+$  Concentration), tỷ lệ giữa nồng độ  $Na^+/K^+$  trong rễ (RNK - Root Na-K Ratio), hàm lượng chlorophyll trong lá (CHL - Leaf Chlorophyll Content).v.v. Kết quả, đã xác định được 24 QTL liên quan đến tính chống chịu mặn ở cây lúa (hình 4). Trong đó, đặc điểm chiều cao cây mạ (PH) xác định được 02 QTL là qPH2 (nằm trên nhiễm sắc thể số 2 với 02 cặp chỉ thị biên là RM13197-RM6318) và pPH4 (nằm trên nhiễm sắc thể số 4 với 02 cặp chỉ thị biên là RM17391-RM127); nồng độ ion  $Na^+$  trong chồi mạ xác định được 01 QTL là qSNC1 (nằm trên nhiễm sắc thể số 1 với 02 cặp chỉ thị biên là RM1287-RM10793); nồng độ ion  $K^+$  trong chồi mạ xác định được 01 QTL là qSKC1 (nằm trên nhiễm sắc thể số 1 với 02 cặp chỉ thị biên là RM8094-RM10825); tỷ lệ giữa nồng độ ion  $Na^+/K^+$  trong chồi mạ xác định được 02 QTL là qSNK1 (nằm trên nhiễm sắc thể số 1 với 02 cặp chỉ thị biên là RM1287-RM10825) và qSNK9 (nằm trên nhiễm sắc thể số 9 với 02 cặp chỉ thị biên là RM296-RM7175); nồng độ  $Na^+$  trong rễ mạ xác định được 03 QTL là qRKC1 (nằm trên nhiễm sắc thể số 1 với 02 cặp chỉ thị biên là RM1287-RM10825), qRKC2 (nằm trên nhiễm sắc thể số 2 với 02 cặp chỉ thị biên là RM13197-RM6318) và qRKC6 (nằm trên nhiễm sắc thể số 6 với 02 cặp chỉ thị biên là RM19840-RM20350); tỷ lệ giữa nồng độ ion  $Na^+/K^+$  trong rễ mạ xác định được 03 QTL là qRNK1, qRNK6 và qRNK9, (nằm trên nhiễm sắc thể số 1, 6 và 9 với các cặp chỉ thị biên lần lượt là RM1287-RM10825, RM19840-RM20350 và RM296-RM7175); khả năng chống chịu mặn của các dòng lúa ở giai đoạn mạ xác định được 02 QTL là qSES4 và qSES9 (nằm trên nhiễm sắc thể số 4 và 9 với các cặp chỉ thị biên lần lượt là RM3843-RM127 và RM296-RM7175); và hàm lượng chlorophyll trong lá mạ xác định được 03 QTL là qCHL2, qCHL3 và qCHL4 (nằm trên nhiễm sắc thể số 2, 3 và 4 với các cặp chỉ thị biên lần lượt là RM12713-RM6318, RM6329-RM3867 và RM3843-RM127).





Hình 4. Bản đồ QTL quy định tính trạng chịu mặn được thiết lập trên quần thể của tổ hợp lai giữa giống lúa IR29 và Pokkali (Thomson và cs., 2010).

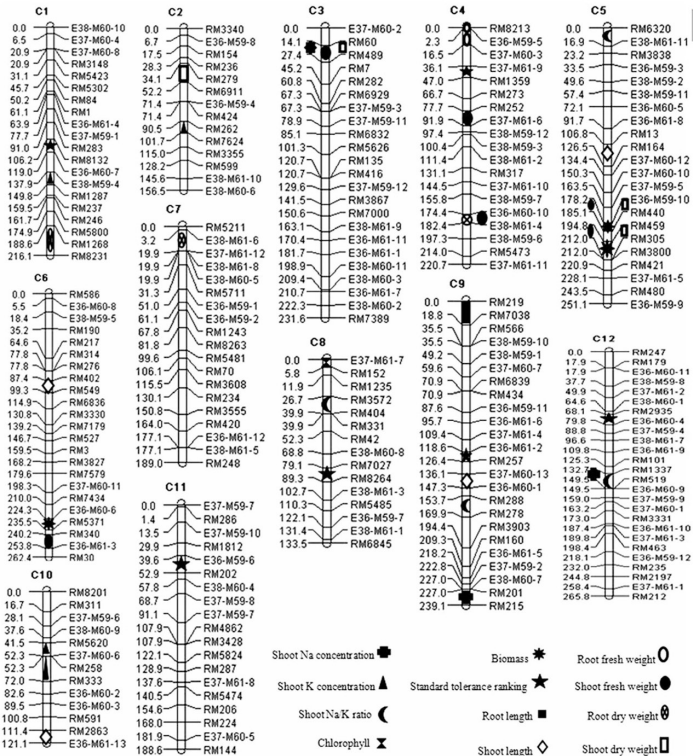
Khi tiến hành sử dụng 131 chỉ thị SSR, 105 chỉ thị AFLP phân bố đều trên 12 nhiễm sắc thể của cây lúa để lập bản đồ sử dụng 148 cây lúa F2 và dòng F4 của cặp lai giữa 02 giống lúa Gharib (có khả năng chịu mặn tốt) và Sepidoud (không chịu mặn). Tiến hành phân tích xác định các QTL chịu mặn ở giai đoạn mạ; dựa trên chỉ tiêu như: khối lượng rễ tươi của cây mạ (RFW - Root



Fresh Weight), khối lượng chồi tươi của cây mạ (SFW - Shoot Fresh Weight), khối lượng rễ khô (RDW - Root Dry Weight), khối lượng chồi khô (SDW - Shoot Dry Weight), chiều dài rễ (RL - Root Length), độ dài chồi (SHL - Shoot Length), nồng độ ion  $\text{Na}^+$  trong chồi (SNC - Shoot  $\text{Na}^+$  Concentration), nồng độ ion  $\text{K}^+$  trong chồi (SKC - Shoot  $\text{K}^+$  Concentration), tỷ lệ giữa nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong chồi (SNK - Shoot  $\text{Na-K}$  Ratio), hàm lượng chlorophyll trong lá (CHL - Leaf Chlorophyll Content).v.v. Ghomi và cs. (2013) đã thu được kết quả như sau: i) 01 bản đồ di truyền liên kết phân bố trên 12 nhiễm sắc thể cây lúa với tổng chiều dài là 2.475,7 cM, khoảng cách trung bình giữa 02 chỉ thị đạt 10,48cM; và ii) 41 QTL liên quan đến tính chịu mặn ở cây lúa. Trong đó, tính trạng khối lượng rễ tươi xác định được 02 QTL là qRFW-4a và qRFW-4b (nằm trên nhiễm sắc thể số 4); tính trạng khối lượng chồi tươi xác định được 6 QTL là qSFW-3 (nằm trên NST số 3), qSFW-4a, qSFW-4b (nằm trên NST số 4), qSFW-5a, qSFW-5b (nằm trên NST số 5) và qSFW-6 (nằm trên các nhiễm sắc số 6); tính trạng khối lượng rễ khô xác định được 03 QTL là qRDW-1 (nằm trên NST số 1), qRDW-4 (nằm trên NST số 4), qRDW-7 (nằm trên NST số 7); tính trạng khối lượng chồi khô xác định được 04 QTL là qSDW-2 (nằm trên NST số 2), qSDW-3 (nằm trên NST số 3), qSDW-5a và qSDW-5b (nằm trên NST số 5); đặc tính sinh khối của cây mạ xác định được 04 QTL là qBM-3 (nằm trên NST số 3), qBM-5a, qBM-5b (nằm trên NST số 5) và qBM-6 (nằm trên NST số 6); đặc tính chống chịu mặn của cây mạ xác định được 06 QTL là qSTR-1 (nằm trên NST số 1), qSTR-4 (nằm trên NST số 4), qSTR-8 (nằm trên NST số 8), qSTR-9 (nằm trên NST số 9), qSTR-11 (nằm trên NST số 11) và qSTR-12 (nằm trên NST số 12); tính trạng dài rễ xác định được 01 QTL là qRL-9 (nằm trên NST số 9); tính trạng chiều dài chồi xác định được 04 QTL là qSHL-5 (nằm trên NST số 5), qSHL-6 (nằm trên NST số 6),



qSHL-9 (nằm trên NST số 9), qSHL-10 (nằm trên NST số 10); đặc tính nồng độ ion Na<sup>+</sup> trong chồi mạ xác định 02 QTL là qSNC-9 (nằm trên NST số 9) và qSNC-12 (nằm trên NST số 12); đặc tính nồng độ ion K<sup>+</sup> trong chồi mạ xác định 04 QTL là qSKC-1 (nằm trên NST số 1), qSKC-2 (nằm trên NST số 2), qSKC-10a và qSKC-10b (nằm trên NST số 10); tỷ lệ giữa nồng độ ion Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> trong chồi mạ xác định được 04 QTL là qSNK-5 (nằm trên NST số 5), qSNK-8 (nằm trên NST số 8), qSNK-9 (nằm trên NST số 9) và qSNK-12 (nằm trên NST số 12); và hàm lượng chlorophyl trong lá mạ xác định được 01 QTL là qCHL-8 (nằm trên NST số 8).



Hình 5. Bản đồ QTL quy định tính chịu mặn được thiết lập trên quần thể của tổ hợp lai giữa giống lúa Gharib và Sepidroud (Ghomi và cs., 2013).





Xu và cs. (1997) đã chuyển gen hval của lúa mạch vào giống lúa Nipponbare. Cây lúa chuyển gen và không chuyển gen sau 3 tuần tuổi được xử lý mặn 2 lần: lần đầu với 200 mM NaCl trong 10 ngày, tiếp theo là không xử lý mặn 10 ngày; lần hai xử lý mặn 30 ngày với 50 mM NaCl. Tác giả ghi nhận là cây lúa chuyển gen có tốc độ sinh trưởng và phục hồi tốt hơn cây lúa không chuyển gen khi bị xử lý mặn và không xử lý mặn.

Gregorio và cs. (2002) đã báo cáo kết quả nuôi cấy tế bào soma lúa để tạo ra các biến dị soma chịu mặn. Từ giống lúa Pokkali, tác giả đã thu được dòng biến dị soma TCCP226-2-49-B-B-3 là giống lúa cao sản, thấp cây, sinh trưởng mạnh, chịu mặn cao như giống Pokkali, gạo có màu trắng và phẩm chất gạo tốt hơn giống gốc, cho năng suất cao hơn nhiều so với giống Pokkali. Giống lúa TCCP226-2-49-B-B-3 đã được sử dụng trong các chương trình tạo giống lúa chịu mặn tại nhiều trung tâm nghiên cứu lúa trên thế giới (Gregori và cs., 2002).

Ohta và cs. (2002) cũng đã chuyển gen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antipoter vào giống lúa nhiễm mặn Kinhuikari. Cây lúa chuyển nạp gen sống sót sau khi xử lý mặn ở mức 300 mM NaCl trong 3 ngày, các cây lúa không được chuyển gen đều chết.

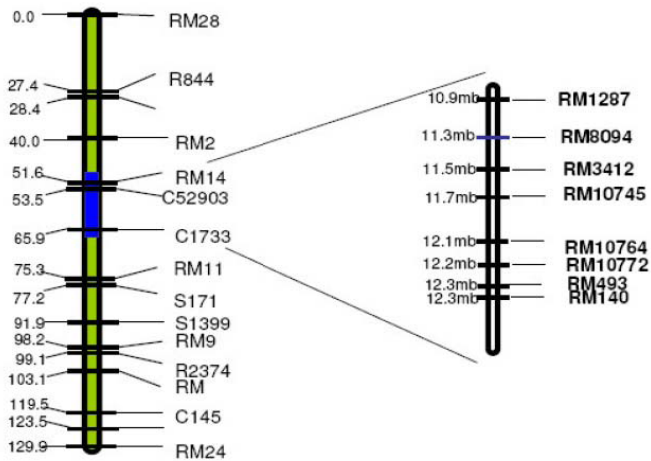
Nagamiya và cs. (2007) chuyển nạp gen kat E vào giống lúa japonica. Các cây lúa được chuyển gen sống và phát triển hơn 14 ngày trong môi trường mặn có hàm lượng muối 250mM, trở bông và cho hạt ở nồng độ muối 100mM. Khi đánh giá mức độ biểu hiện của gen trong cây lúa được chuyển gen, hoạt động của enzyme catalase tăng lên khoảng 1,5-2,5 lần so với cây lúa không được chuyển gen.



Theo thống kê của BINA (Bangladesh Institute of Nuclear Agriculture), hiện nay Bangladesh có hơn một triệu ha đất trồng lúa bị nhiễm mặn. Việc nghiên cứu phát triển giống lúa chống chịu mặn đã được đầu tư phát triển. Trong đó các giống lúa Binadhan (Binadhan-5, Binadhan-7, Binadhan-10.v.v.) là những giống lúa có tỷ trọng lớn nhất trong cơ cấu của các vùng nhiễm mặn ở Bangladesh, chiếm từ 40 - 50% diện tích gieo trồng (<http://www.bina.gov.bd>).

Mohamadi-Nejad và cs. (2010) thử nghiệm 33 chỉ thị SSR đã hình trên đoạn Saltol của nhiễm sắc thể số 1 nhằm xác định mức độ liên kết và hữu dụng của các chỉ thị này trong chọn giống chống chịu mặn. Các chỉ thị SSR này được sử dụng để thử nghiệm trên 36 giống lúa được phân loại thành 5 nhóm là: i) Nhóm rất chịu mặn; ii) Nhóm chịu mặn; iii) Nhóm chịu mặn trung bình; iv) Nhóm nhiễm mặn; và v) Nhóm rất nhiễm mặn; thông qua thí nghiệm xử lý mặn nhân tạo. Trong số 33 chỉ thị, có 6 chỉ thị (RM10745, RM1287, RM8094, RM3412, RM493 và RM140) liên kết chặt với đoạn Saltol ở vị trí 10,8 đến 12,28 Mb. Đoạn gen Saltol có thể nằm trong vị trí có chứa các chỉ thị RM8094, RM3412 và RM493. Các giống lúa: IR70023, IR65858, IR69588, IR74105, IR71832, IR74099, Cherivirrupo và IR66946-3R-178-1-1 (FL478) có sản phẩm PCR giống như sản phẩm PCR của giống Pokkali khi được nhân PCR sử dụng chỉ thị RM8094 và cho có tính chịu mặn rất tốt. Chỉ thị RM8094 thể hiện liên kết chặt với tính chịu mặn ở giai đoạn mạ. Nghiên cứu này cũng khuyến cáo việc sử dụng hai chỉ thị RM8094 và RM10745 trong xác định kiểu gen của cây lúa chịu mặn có mang đoạn QTL Saltol trong các chương trình lai tạo lúa chịu mặn (hình 6).





Hình 6. Gen Saltol được định vị trên nhiễm sắc thể số 1 của lúa (theo IRGSP, 2005)

Tiến hành thực hiện phép lai trở lại giữa dòng SM61 (dòng có khả năng chịu mặn tốt) và giống IR64 (có các đặc điểm nông sinh học tốt: năng suất, chất lượng; có khả năng thích ứng trên nhiều điều kiện khí hậu khác nhau). Thông qua sử dụng chỉ thị phân tử và đánh giá khả năng chịu mặn nhân tạo (trong môi trường xử lý 200 mM NaCl). Kết quả, đã xác định được 03 dòng lúa ST12, ST18 và ST59 (thế hệ BC<sub>3</sub>F<sub>4</sub>) có khả năng kháng mặn tốt, chất lượng và có tiềm năng năng suất (>5 tấn/ha) khá (Chen và cs., 2013).

Các nghiên cứu sàng lọc kiểu gen chịu mặn dựa vào biểu hiện kiểu hình sẽ mất nhiều thời gian và thiếu độ chính xác, vì vậy việc sàng lọc dựa vào chỉ thị phân tử giúp giảm bớt quá trình này. Năm 2019, nghiên cứu của Islam Mirza et al. đã đánh giá 22 mẫu giống lúa tại viện Nông nghiệp hạt nhân



Bangladesh (BINA) về khả năng chịu mặn ở giai đoạn mạ và giai đoạn trổ; nghiên cứu sử dụng 4 chỉ thị liên kết gồm Viz. AP3206f, RM1287, RM7075 và RM10793 để xác định khả năng chịu mặn; nghiên cứu này giúp phát triển lai tạo giống lúa chịu mặn nhờ MAS, lập bản đồ QTL.v.v.. Đồng quan điểm với Islam Mirza et al, tác giả Rasheed A. et al (2019) cũng cho rằng cơ chế di truyền hẹp ở cây lúa đã hạn chế sự thành công của các phương pháp nhân giống thông thường, do đó các kĩ thuật phân tử như lập bản đồ các locus tính trạng số lượng (QTL), kĩ thuật di truyền (GE), phân tích các yếu tố phiên mã (TF),v.v. là đáng tin cậy để tìm các gen chịu mặn. Cũng theo tác giả này, các phương pháp lai tạo liên tục đã làm suy giảm đáng kể đa dạng di truyền lúa gạo, và công cụ nhân giống phân tử sẽ giúp bảo tồn sự đa dạng di truyền bằng cách tìm kiếm nguồn gen hoang dại cho chương trình nhân giống chịu mặn. Hiện nay, có hàng trăm QTL tiềm năng liên quan đến khả năng chịu mặn ở lúa đã được lập bản đồ. Một số QTL nắm giữ vai trò làm tăng khả năng chịu mặn ở lúa. Năm 2020, nghiên cứu của Yadav A.K. et al đã sử dụng kĩ thuật MACB nhằm chuyển QTL Saltol từ giống FL478 sang Pusa Basmati 1509- một giống cho năng suất cao và chín sớm; Các chỉ thị AP3206f, RM3412b và RM10793 liên kết với Saltol để chọn lọc các dòng lai kết hợp với đánh giá qua nhiều mùa đã xác định được một số dòng NIL có năng suất cao hơn, chất lượng hạt và chất lượng nấu tương đương với Pusa Basmati 1509. Các dòng NIL của Pusa Basmati 1509 chịu mặn sẽ hữu ích để ổn định sản xuất tại các vùng bị ảnh hưởng của nhiễm mặn.

Nghiên cứu của Le et al, 2021 đã nghiên cứu lập bản đồ QTL về khả năng chịu mặn ở các giống lúa địa phương ở Việt Nam bằng 21.623 chỉ thị SNP, cây được biểu hiện với 100nM



NaCl, các tính trạng chịu mặn như SIS, hàm lượng chlorophyll, hàm lượng nước và hàm lượng  $\text{Na}^+$  và  $\text{Cl}^-$  đã được nghiên cứu; Kết quả đã có 26 QTL được xác định, trong đó có 10 QTLs liên quan đến các đặc điểm khác nhau tham gia vào kiểm soát một số phản ứng dưới điều kiện stress mặn, 21 QTL được xác định cùng vị trí với các QTL có chức năng liên quan đến khả năng chịu stress do mặn đã công bố trước đây; Nghiên cứu này đã cung cấp các QTL đầy triển vọng cho chương trình nhân giống và xác định gen ứng viên cần được nghiên cứu thêm về chức năng nhằm hiểu rõ cơ chế chống chịu mặn ở lúa.

## 2.2. Tổng quan kết quả nghiên cứu, ứng dụng ở Việt Nam

Việt Nam có đường bờ biển 3.260 km nằm trải dài từ Bắc vào Nam; hiện tượng xâm thực của nước biển ngày càng trở lên nghiêm trọng làm ảnh hưởng đến năng suất cây trồng nông nghiệp đặc biệt là cây lúa, một cây trồng chủ đạo trong nền nông nghiệp của nước ta (Nguyễn Tấn Hình và cs., 2006).

Sản xuất lúa gạo ở vùng nhiễm mặn đang phải đối mặt với những tác động của sự biến đổi khí hậu. Theo báo cáo về chỉ số rủi ro khí hậu toàn cầu năm 2010 do tổ chức Germanwatch công bố tại Đan Mạch thì Việt Nam là một trong 10 quốc gia (Việt Nam, Bangladesh, Myanma, Honduras, Nicaragua, Haiti, Ấn Độ, Cộng hòa Đominica, Philippines và Trung Quốc) bị ảnh hưởng nhiều nhất do biến đổi khí hậu. Theo kết quả nghiên cứu và dự báo của Ủy ban liên chính phủ về biến đổi khí hậu của Liên hiệp quốc (IPPC) và Ngân hàng Thế giới thì trong vòng 100 năm tới, nước biển sẽ dâng 1m, nhiệt độ sẽ tăng thêm 2°C. Nếu nước biển dâng cao 1m thì vùng đồng bằng sông Cửu Long sẽ có 1,5-2 triệu ha và vùng đồng bằng sông Hồng sẽ có khoảng 0,3-0,5 triệu ha đất trồng lúa bị ngập nước.



Cho đến nay, nhiều giống lúa có khả năng chống chịu mặn như: OM732, OM861, OM1314, OM1490, OM2031, OM1314, OM576, IR42, OM344, OM924, Trắng Điệp, Móng Chim Rơi, Móng Chim, Nếp Áo Già, Nếp Bờ Giếng, Nàng Quốc Đỏ, Rồng Xanh, Đốc Phụng, Nhỏ Đỏ, Tám Vuốt, TD2, CM1, CM5, M6, MT6, MT163, BM9855, BM9820, BM9830.v.v. đã được triển khai trên diện rộng ở vùng đồng bằng sông Cửu Long và sông Hồng (Ngô Đình Thức, 2006; Nguyễn Tấn Ninh và cs., 2006).

Trong vòng 3 năm (1992 - 1995) Viện Khoa học Nông nghiệp Miền Nam đã tiến hành đánh giá mặn 88 giống lúa địa phương và 100 giống lúa của IRRI, kết quả chọn được 14 giống chịu mặn, có triển vọng, trong đó có 02 giống từ bộ giống của IRRI là: FRG67 và ROHYD15; 12 giống lúa từ tập đoàn giống lúa địa phương: lúa Tiêu, Ba Lê, Đốc Đỏ, Nàng Thước Dài, Chân Hương, Tam Sắc, Nàng Quốc Nhuyễn, Nàng Hương 2, Nàng Hương 3, Nàng Co đỏ, Bảy dảnh, Một bụi. Giống FRG67 có nguồn gốc từ Pakistan cho năng suất cao, chống chịu mặn và phẩm chất gạo tốt (Đỗ Khắc Thịnh và cs., 1997).

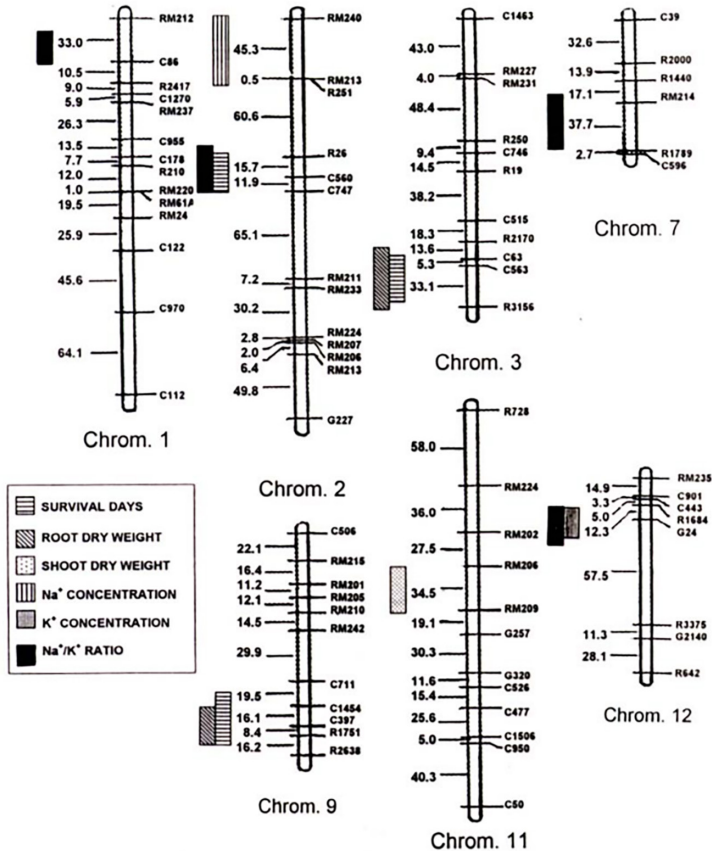
Bùi Bá Bổng và Nguyễn Duy Bảy (1997) đã tiến hành đánh giá khả năng chống chịu mặn 15 giống lúa trong đó 8 giống lúa địa phương và 7 giống lúa cao sản ngắn ngày. Kết quả cho thấy ở nồng độ muối EC = 12dSm, giống Pokkali và Thần nông đỏ có tính chống chịu mặn cao và giống Nàng hương rần và OM997-6 có tính chống chịu mặn trung bình.

Năm 2003, Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang. đã tiến hành phân tích bản đồ QTL tính chịu mặn dựa trên quần thể cận giao tái tổ hợp bao gồm 108 dòng từ tổ hợp lai Tenasai 2 và CB (hình 7). Trong đó, Tenasai 2 là giống mang gen chịu mặn có nguồn



gốc từ Trung Quốc và CB là giống nhiễm có nguồn gốc từ Mỹ. Những tính trạng được quan sát trong điều kiện mặn 12 dS/m là: số ngày cây mạ sống sót (SD), khối lượng rễ khô, khối lượng chồi khô, nồng độ ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  và tỉ lệ giữa nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong chồi. Nhóm tác giả đã tiến hành sử dụng 108 chỉ thị phân tử (RFLP và SSR) nằm trên 12 nhiễm sắc thể của cây lúa để phân tích bản đồ di truyền liên kết. Kết quả đã xác định được 01 bản đồ di truyền liên kết với tổng chiều dài là 2.340,5cM, khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 21,68cM. Những chỉ thị phân tử liên kết với gen thể hiện tính chịu mặn phần lớn nằm trên các nhiễm thể số 1, 2, 3, 9, 11 và 12. Thông qua phân tích, đánh giá nhóm tác giả đã xác định được 13 QTL liên quan đến tính chịu mặn ở cây lúa. Trong đó tính trạng số ngày sống sót (SD) do 04 QTL, khối lượng chồi khô do 01 QTL, khối lượng rễ khô do 02 QTL, sự hấp thu nồng độ ion  $\text{Na}^+$  do 01 QTL, sự hấp thu nồng độ ion  $\text{K}^+$  do 01 QTL, và tỉ lệ giữa nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  do 04 QTL điều khiển. Những QTL điều khiển tính trạng RD và khối lượng rễ khô, RD và tỷ lệ giữa nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nằm trên nhiễm thể 3 và 9. Những QTL điều khiển chung tính trạng giữa tỷ lệ nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  và nồng độ ion  $\text{K}^+$  nằm trên nhiễm thể số 12. Kết quả này đã giải thích hiện tượng biến thiên vượt trội của con lai so với bố mẹ đối với các tính trạng có liên quan đến khả năng chống chịu mặn.





Hình 7. Bản đồ QTL kiểm soát tính chịu mặn được lập dựa trên quần thể F<sub>2</sub> của tổ hợp lai giữa Tenasai 2 và CB (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2003).

Trong giai đoạn từ năm 2001-2005, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm đã nghiên cứu chọn tạo giống lúa chịu mặn cho các vùng lúa ven biển phía Bắc và đã tạo ra giống lúa chịu mặn M6 (của cặp lai giữa Bầu Hải Phòng và 1548) và một số giống khác như MT6, MT163, BM9855, BM9820 và BM9830. Các giống này tỏ ra thích ứng trên các chân đất ven biển và vùng bị





nhiễm phèn mặn ở phía Bắc. Ngoài ra Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cũng đã chọn lựa được 44 giống lúa chịu mặn, trong đó 15 giống lúa có khả năng chịu mặn cao và 10 giống lúa có khả năng chịu mặn trung bình đang được sử dụng là vật liệu chính trong công tác chọn lọc giống lúa chịu mặn (Nguyễn Tấn Hình và cs., 2006).

Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang và cs. (2007) đã tiến hành đánh giá tính chịu mặn của 62 giống lúa cổ truyền, với Pokkali là giống chuẩn chịu mặn và giống IR29 là giống chuẩn nhiễm đã thu được các giống chịu mặn là: Nếp áo Già, Trắng Điệp, Móng Chim, Móng Chim Rơi và Nếp Bờ Giếng.

Đặng Minh Tâm và Nguyễn Thị Lang (2003) đã nuôi cấy mô 10 giống, bao gồm lúa mùa địa phương và cao sản chống chịu mặn khá (cấp 3-5). Kết quả cho thấy: trong môi trường có chứa NaCl ở mức 1,0 - 1,5% cho tỷ lệ tái sinh cao (Tam và Lang, 2003).

Theo Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang (2003), đã chia một số giống lúa chịu mặn có triển vọng đã được phát triển ở ĐBSCL trong những năm qua thành hai nhóm chính là: nhóm lúa trung mùa (thời gian sinh trưởng 125 - 140 ngày) gồm: IR42, OM344, OM723, OM861, OM916, OM924, OM1571, OM1346, OM1348, OM1849 và Tép Hành đột biến; nhóm lúa cao sản ngắn ngày (thời gian sinh trưởng 85-105 ngày gồm: Hầm Trâu (OM576), OM1314, OM1490, OM2031.

Đỗ Hữu Ất (2005) đã nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong cải tạo một số giống lúa địa phương vùng đồng bằng ven biển Bắc Bộ. Kết quả gây đột biến nguồn Cobalt (Co60) đã cho ra những biến dị có lợi cho chọn giống. Các giống lúa CM1,



CM5.v.v. là những giống được chọn tạo ra để phục vụ sản xuất cho những vùng bị nhiễm mặn, kết hợp được những đặc tính chống chịu mặn, kháng đổ ngã, kháng bệnh và cho năng suất cao.

Ngô Đình Thúc (2006) đánh giá 172 giống lúa mùa địa phương và cao sản ở giai đoạn nảy mầm với 1,5% NaCl và giai đoạn mạ với EC = 12dS/m cho thấy có 8 giống lúa mùa địa phương chống chịu mặn cấp 3, tương đương với giống Pokkali là Nàng Quốc Đỏ, Canh Nông Lùn, Rồng Xanh, Đốc Phụng, Nhỏ Đỏ, Tám Vuốt, Trắng Điệp, TD2. Hai giống lúa trung mùa chống chịu tốt với mặn tương đương với giống Pokkali là Thần Nông Đỏ và OM1352-5. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô và nuôi cấy túi phấn trong chọn tạo giống lúa chịu mặn. Tác giả tạo được 8 dòng biến dị soma từ OM576, IR64, Basmati và VD20 có khả năng chống chịu mặn ở cấp 5 khi thanh lọc ở giai đoạn mạ với EC = 12dS/m.

Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long từ năm 2009 đến nay đã bước đầu tìm 30 dòng lúa có triển vọng chịu mặn là những dòng lúa kế thừa, được phát hiện chịu mặn qua nhiều lần xử lý trong phòng thí nghiệm và nhà lưới. Một số giống lúa mới của Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long xác định có khả năng chịu mặn khá cao như: OM6976, OM6677, OM5464, OM5629, OM5166, OM5451, OM4059 và OM6164 đã và đang được khảo nghiệm ở một số tỉnh như Sóc Trăng, Kiên Giang, Bến Tre, Bạc Liêu.

Lê Hùng Lĩnh và cs. (2012), thông qua sử dụng phương pháp MAB (marker assisted backcross) để lựa chọn các cá thể BC mong muốn của cặp lai giữa Bắc thơm 7 (giống lúa chất



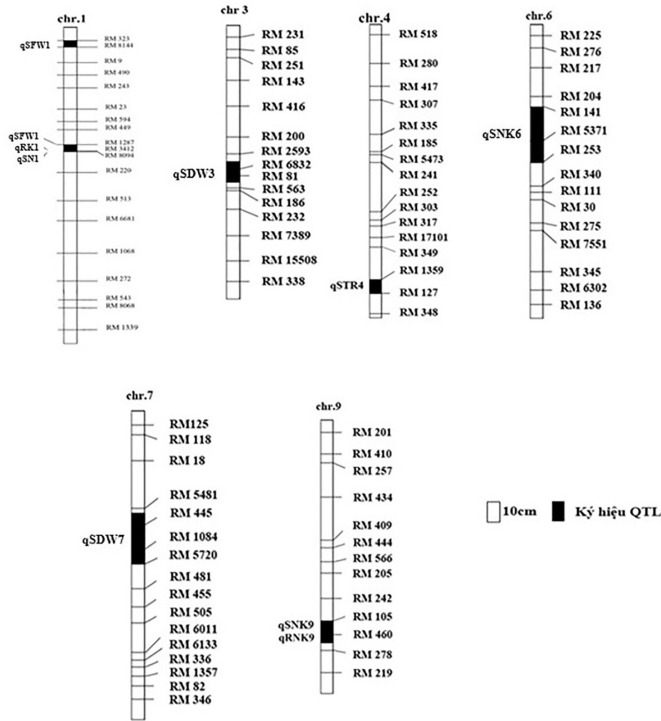
lượng, nhưng bị nhiễm mặn) và FL478 (giống lúa có khả năng chống chịu mặn tốt, mang QTL kháng mặn Saltol1). Kết quả, thông qua đánh giá, tuyển chọn đã lựa chọn được 02 dòng lúa triển vọng: IL-30 và IL-32; kế thừa được những đặc tính quý của bố, mẹ về năng suất, chất lượng.v.v. đặc biệt còn có khả năng chống chịu mặn cao. Với những đặc điểm trên IL-30 và IL-32 được đánh giá là những dòng lúa triển vọng đối với người dân ở những vùng nhiễm mặn của vùng đồng bằng sông Hồng.

Năm 2013, Lê Xuân Thành và Trần Nhân Dũng đã tiến hành xử lý mặn nhân tạo 244 giống lúa đồng thời tiến hành sử dụng chỉ thị phân tử RM206 để xác định các giống lúa có khả năng chống chịu mặn. Kết quả đã xác định được 13 giống lúa có khả năng chịu mặn ở mức độ từ 0,4% đến 0,6% là: MTL461, MTL463, MTL504, MTL664, CL8, DH2, OM6976; OM1348, OM6677, Một bụi đỏ, ST20, DH4, DH5.

Năm 2014, Lã Hoàng Anh và cs. đã tiến hành lập bản đồ QTL tính chịu mặn ở giai đoạn mạ trên quần thể F2/F3 của cặp lai giữa giống Chành trụi và Khang dân 18. Kết quả nghiên cứu đã xác định được 10 QTLs liên quan đến tính kháng mặn nằm trên các nhiễm sắc thể số 1, 3, 4, 6, 7 và 9; các QTL được đặt tên là: *qSFW-1a-CK*, *qSFW-1b-CK*, *qRK-1-CK*, *qSN-1-CK*, *qSDW-3-CK*, *qSTR-4-CK*, *qSNK-6-CK*, *qSDW-7-CK*, *qSNK-9-CK*, *qRNK-9-CK* và có các chỉ thị biên (chỉ thị nằm hai bên) là: RM323-RM8144, RM449-RM8094, RM1287-RM8094, RM3412-RM220, RM2593-RM563, RM1359-RM127, RM141-RM253, RM5481-RM5720, RM242-RM460, RM105-RM287; Sáu QTL (*qSFW-1b-CK*, *qRK-1-CK*, *qSN-1-CK*, *qSTR-4-CK*, *qSNK-6-CK*, *qSDW-7-CK*) có giá trị AE âm, giá trị âm này đã thể hiện giống Khang dân 18 đóng góp alen làm tăng tính kháng mặn (hình 8). Trong số các QTL đã



phát hiện, *qSTR-4-CK* nằm trên nhiễm sắc thể số 4 được xem là QTL chính, có vai trò quan trọng quy định tính kháng mặn trong quần thể nghiên cứu do có chỉ số LOD và phần trăm đóng góp tới kiểu hình lớn nhất, tương ứng 13,25 và 39%.



Hình 8. Bản đồ vị trí các QTL liên quan đến tính chịu mặn được xác định dựa trên tổ hợp lai giữa giống lúa Chành trụi và Khang dân 18 (Lã Hoàng Anh và cs., 2014).

Năm 2015, Hồ Viết Thế và cs. đã tiến hành sử dụng quần thể lúa ở thế hệ F3 từ tổ hợp lai Kalarata và Azucena để lập bản đồ liên kết gen với tổng cộng 100 chỉ thị phân tử SSR được sử dụng. Bản đồ liên kết thu được bao phủ 1.405 cM với khoảng cách trung bình giữa các locus là 14,05 cM (hình 9).





Bắc Thơm số 7 (BT7) × FL478 (giống cho gen mang locus gen Saltol). Cụ thể, SHPT15, chọn dòng cá thể từ thế hệ BC<sub>3</sub>F<sub>6</sub>, đã được kiểm tra có mặt của locus gen Saltol ở trạng thái đồng hợp tử bằng hai chỉ thị phân tử. Đánh giá kiểu hình cho thấy dòng lúa SHPT15 có khả năng chịu được mặn 6‰ trong điều kiện nhân tạo ở giai đoạn cây non trong 15 ngày xử lý. Dòng lúa SHPT15 có các đặc tính nông sinh học tốt, thời gian sinh trưởng ngắn, tương đương so với BT7. Trong điều kiện vụ Xuân và vụ Mùa, năng suất thực thu của SHPT15 cao hơn so với BT7, đạt 6,37 tấn/ha (vụ Xuân) và 6,14 tấn/ha (vụ Mùa).

Năm 2021, nhóm tác giả Nguyễn Trọng Phước và cs đã công bố kết quả ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa chịu mặn (*Oryza sativa*L.). Nghiên cứu này áp dụng bản đồ GGT từ quần thể BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> trên tổ hợp lai OM 1490/ Pokkali mang gen chịu mặn thông qua ứng dụng chỉ thị phân tử để cải tiến giống lúa chống chịu mặn. Trong quần thể OM 1490/ Pokkali có sự đa hình với 2 chỉ thị RM3252-S1-1 trên nhiễm sắc thể số 1 và RM223 trên nhiễm sắc thể số 8. Kết quả này có được nhờ sử dụng 31 chỉ thị trên nhiễm sắc thể số 1 với khoảng cách di truyền 1-97 cM và 21 chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể số 8, khoảng cách di truyền từ 0 – 56 cM. Các cá thể con lai được lựa chọn phải mang gen đồng hợp trội trên vùng nhiễm sắc thể với 4 dòng BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-11, BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-40, BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-51 và BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-52 có 100% vùng gen đồng hợp trội trên vùng nhiễm sắc thể với cá thể bố (pokkali), mang gen mục tiêu mặn nhờ sắc thể số 8. Các cá thể được chọn có mang gen mặn và ghi nhận có dòng BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-40, BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-51 và BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-52 cho năng suất cao nhất có ý nghĩa so với đối chứng. Kết quả này là tài liệu tham khảo quan trọng phục vụ cho việc chọn tạo giống lúa chịu mặn.



## CHƯƠNG 4. BỆNH ĐẠO ÔN HẠI LÚA

### 1. Nấm đạo ôn hại lúa

#### 1.1. Phân loại và đặt tên

Việc định loại và đặt tên cho nấm đạo ôn vẫn luôn là một đề tài được tranh luận sôi nổi ngay từ khi các nhà khoa học bắt đầu nghiên cứu về loại nấm gây bệnh này.

Năm 1891, Cavara lần đầu tiên mô tả một loài thuộc chi *Pyricularia* gây bệnh trên lúa và đặt tên là *Pyricularia oryzae*. Bên cạnh đó còn một số tên khác như *Pyricularia grisea*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe poae*, *Trichothecium griseum*.v.v. cũng được sử dụng để làm tên gọi cho nấm đạo ôn.

Theo tài liệu phân loại của Nguyễn Nghĩa Thìn và Đặng Thị Sy (Hệ thống học thực vật, 1998), thì nấm đạo ôn thuộc:

- Giới : Nấm (Fungi),
- Ngành : Nấm thật (Mycota),
- Lớp : Nấm túi (Ascomycetes),
- Bộ : Moniliales,
- Chi : *Pyricularia*,
- Loài : *Pyricularia oryzae* Br. et Cavara

#### 1.2. Đặc điểm hình thái

Hình thái của nấm thay đổi tùy thuộc vào từng giai đoạn trong chu kỳ sống của nấm và vật chủ bị nhiễm; theo các kết quả nghiên cứu cho thấy nấm đạo ôn có một số đặc điểm hình thái chính như sau:

*Bào tử nấm*: Thường có hình bầu dục, một hoặc hai vách ngăn. Kích thước và hình dạng bào tử thay đổi thường xuyên, đặc biệt là khi kí sinh trên các cây chủ khác nhau;



**Ống nấm:** Trong quá trình phát triển, bào tử nấm bị hydrat hoá hình thành bào tử dính. Sau khi tiếp xúc với bề mặt cây chủ, bào tử dính nhanh chóng nảy mầm và hình thành ống nấm;

**Đĩa bám:** Đĩa bám được hình thành từ ống nấm, có dạng hình cầu hoặc hình giọt lệ. Chiều dài đĩa bám từ 9,1 - 14,0  $\mu\text{m}$ , chiều rộng từ 7,0 - 11,5  $\mu\text{m}$ ;

**Sợi xuyên:** Sợi xuyên được hình thành từ đĩa bám, chiều rộng khoảng 0,4  $\mu\text{m}$ ;

**Sợi nhiễm:** Sợi nhiễm là do sợi xuyên phát triển phình to tạo thành, chiều rộng khoảng 2,8 - 3,5  $\mu\text{m}$ .

### 1.3. Chu trình nhiễm và phát triển của nấm đạo ôn

Đầu tiên bào tử dính xâm nhập lên bề mặt cây chủ. Các bào tử nhanh chóng tạo thành ống nấm, ống nấm phát triển kéo dài và phình to ở đỉnh tạo thành đĩa bám. Quá trình hình thành ống nấm và đĩa bám phụ thuộc rất nhiều vào hàm lượng nước có trên bề mặt cây chủ. Độ ẩm cao là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của giai đoạn này. Khi quan sát thấy rằng: nếu mặt lá ướt thì sự hình thành ống nấm và đĩa bám xảy ra trong vòng 3 giờ, nếu bề mặt lá khô thì quá trình nảy mầm bị gián đoạn và dừng lại.

Khi đĩa bám đã hoàn thiện, các tế bào đĩa bám bị melanin hoá hình thành sức căng trong đĩa bám. Đồng thời trong quá trình nhiễm, nấm tiết ra enzym hydrolaza phân huỷ màng polysaccharit của tế bào cây chủ.

Nhờ có enzym phân huỷ màng polysaccharit và áp suất bên trong đĩa bám cao mà sợi nhiễm có thể dễ dàng xuyên qua tế bào biểu bì và nhu mô của cây chủ. Quá trình xâm nhập của sợi nhiễm diễn ra trong vòng 48 giờ. Ngay sau khi nhiễm, vết bệnh





có thể quan sát được trên cây chủ.

Sự phát sinh bào tử thường xảy ra ở điều kiện độ ẩm cao (hơn 80%), trên vùng có màu xám của vết thương. Bào tử được hình thành từ bào tử đỉnh nhờ quá trình phân chia vô tính. Tùy thuộc vào điều kiện nhiệt độ, quá trình hình thành bào tử có thể diễn ra từ 3 - 8 ngày sau khi vết thương xuất hiện. Quá trình này có thể kéo dài 20 ngày.

Sau khi được hình thành, bào tử sẽ phát tán, bắt đầu chu trình nhiễm mới hoặc hình thành bào tử hậu. Bào tử hậu có thể sống được hai năm (Lê Lương Tế và cs., 1998). Sự phát tán của bào tử nấm thường xảy ra vào ban đêm và sáng sớm nhờ gió.

Mỗi chu kì nhiễm và phát triển kéo dài 6-8 ngày phụ thuộc vào mức độ tương thích giữa nấm bệnh, cây chủ, độ ẩm và nhiệt độ. Nếu độ ẩm đạt 100%, bào tử nấm phát sinh rất nhanh, chu trình nhiễm rút ngắn chỉ còn 3 - 4 ngày.

#### 1.4. Ảnh hưởng của bệnh đạo ôn đến sản xuất lúa

Bệnh đạo ôn ở lúa do nấm *Magnaporthe oryzae* (Faivre-Rampant và cs., 2011) gây ra, được ghi nhận và mô tả ở Trung Quốc vào năm 1637, tiếp đó tại các nước khác như Nhật Bản (1704), Ý (1828), Hoa Kỳ (1876).v.v. Đây là bệnh có phổ phân bố rộng, gây thiệt hại nghiêm trọng về năng suất và chất lượng lúa. Hiện có khoảng hơn 80 quốc gia khác nhau có lúa bị nhiễm đạo ôn. Đặc biệt, những quốc gia có khí hậu ôn hoà, độ ẩm cao, sẽ là môi trường thuận lợi cho nấm bệnh phát triển và phát tán mạnh.

Theo tổ chức FAO ước tính, thiệt hại do đạo ôn gây ra làm giảm năng suất lúa trung bình từ 0,7-17,5%, thậm chí có những



nơi thiệt hại lên tới 80% (Bonman và cs., 1991; Tsai, 1998). Theo nghiên cứu của Moffat (1994), thiệt hại do bệnh đạo ôn gây ra cho người dân trồng lúa ở vùng Nam Á, Nhật Bản, Philippines lên tới 5 tỉ USD/năm.

Theo Viện lúa quốc tế (IRRI), mỗi năm Ấn Độ mất hơn 266.000 tấn lúa hay khoảng 0,8% tổng sản lượng do bệnh đạo ôn. Ở Nhật Bản, bệnh đạo ôn gây hại cho 865.000 ha trồng lúa. Còn tại Philippines, bệnh đã làm giảm năng suất trên 50% sản lượng của hàng nghìn ha lúa.

Ở Việt Nam, bệnh đạo ôn xuất hiện ở cả 3 miền Bắc, Trung và Nam. Tuy nhiên mức độ bệnh xảy ra ở miền Bắc và miền Trung thường trầm trọng hơn (Ngô Vĩnh Viễn và cs., 1997). Khi dịch bệnh xảy ra nó có thể gây thiệt hại cho lúa vào khoảng 10-25% (NIPP, 1992). Năm 1992, trong tổng số 5 triệu ha diện tích trồng lúa có tới 600.000 ha đã bị nhiễm đạo ôn, 1/4 trong số diện tích này đã bị nhiễm bệnh trầm trọng. Năng suất lúa trên diện tích bị nhiễm đã giảm từ 15-30% (NIPP, 1992). Ở tỉnh Phú Yên thiệt hại do bệnh đạo ôn gây ra vào vụ Đông Xuân 1992-1993 ước tính khoảng 70 tỷ đồng. Cũng vào thời gian này ở 2 tỉnh Thái Bình và Nam Hà người nông dân đã phải sử dụng 250 tấn thuốc hoá học để phòng trừ bệnh, tuy nhiên năng suất lúa đã bị giảm rất nhiều.

Trước những biến đổi bất lợi của điều kiện ngoại cảnh, bệnh đạo ôn có nguy cơ bùng phát trên diện rộng và có thể phát triển thành dịch nếu không được phát hiện kịp thời. Theo thống kê của Cục Bảo vệ thực vật, vụ Đông Xuân 2003-2004 tổng diện tích lúa bị nhiễm đạo ôn ở miền Bắc là 202.998 ha. Trong đó, diện tích bị nhiễm đạo ôn lá là 178.147 ha (diện tích bị nặng là



4.348 ha); diện tích bị nhiễm đạo ôn cổ bông là 24.752 ha. Tại đồng bằng sông Cửu Long, vụ Đông Xuân 2005-2006 bệnh đạo ôn gây thiệt hại lớn ở hầu hết các địa phương như: An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ.v.v. trên các giống lúa đang trồng phổ biến như OM1490 OMCS2000.v.v.; thiệt hại về năng suất ước tính giảm từ 20-80%. Để phòng trừ bệnh đạo ôn, nông dân thường sử dụng thuốc hóa học như một phương thức hữu hiệu, ở một số nơi khác nông dân thường tiến hành phun nhiều lần và trộn nhiều loại thuốc với nhau, điều này đã gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe của chính người nông dân đồng thời cũng làm cho môi trường xung quanh bị ô nhiễm.

## 2. Kháng đạo ôn ở lúa

### 2.1. Tính kháng đạo ôn ở lúa

Trên thực tế, có rất nhiều cách gọi tên cho tính kháng bệnh, nhưng xét về bản chất các cách gọi đó đều có những điểm tương đồng. Dựa vào sự kiểm soát của gen kháng đạo ôn đối với cây chủ, người ta chia tính kháng bệnh đạo ôn ở lúa thành ba kiểu chính: kháng định tính, kháng định lượng, và kháng lâu bền.

#### 2.1.1. Tính kháng định tính

Tính kháng định tính là khả năng của giống lúa ngăn chặn được sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm đạo ôn này nhưng lại dễ dàng bị nhiễm bởi chủng nấm đạo ôn khác. Do vậy, tính kháng định tính được coi là tính kháng không ổn định.

Tính kháng định tính thường được kiểm soát bởi đơn gen và thường là những gen kháng chính. Các gen kháng này có khả năng bảo vệ hoặc làm giảm sự gây bệnh của các chủng nấm gây bệnh đối với cây chủ. Tuy nhiên khi có chủng mới xuất hiện, do



không có những gen kháng tương ứng, khả năng kháng của cây chủ sẽ mất, dẫn đến chúng bị nhiễm bệnh.

Tính kháng định tính được mô tả dựa trên hình dạng, kích thước, màu sắc của vết thương. Sự phản ứng bệnh được ghi nhận trên cây sau khi tiến hành lây nhiễm bệnh lên cây chủ từ 7 - 10 ngày. Mức độ bệnh được đánh giá thông qua việc cho điểm và phân cấp bệnh.

Năm 1986, Bonman đã đưa ra thang đánh giá gồm 6 điểm từ điểm 0 đến điểm 5 và sau đó được bổ sung thêm điểm 3<sup>+</sup>, cụ thể như sau:

- Điểm 0: Không phát hiện bất cứ vết thương nào trên cây.
- Điểm 1: Vết thương màu nâu có đường kính nhỏ hơn 0,5 mm.
- Điểm 2: Vết thương màu nâu có đường kính khoảng từ 0,5-1 mm.
- Điểm 3: Vết thương có dạng hình tròn hoặc hình hơi elip, đường kính 1-3 mm vùng trung tâm có màu xám và được bao quanh màu nâu.
- Điểm 3<sup>+</sup>: Biểu hiện gần giống điểm 3 nhưng xuất hiện 1 hoặc 2 vết thương nghiêng về điểm 4.
- Điểm 4: Vết thương dạng hình elip rõ ràng, đường kính lớn hơn 3 mm, trung tâm màu xám và được bao quanh màu nâu.
- Điểm 5: Vết thương dạng 4 nhưng có 1/2 hoặc hơn 1 hoặc 2 lá bị chết.

Từ kết quả cho điểm chúng ta sẽ xác định được sự kháng bệnh của lúa. Có hai cách thức đánh giá sự kháng bệnh của một giống lúa đối với đạo ôn.

- Cách 1: Điểm từ 0 - 3 là kháng, từ 3<sup>+</sup> - 5 là nhiễm;
- Cách 2: Điểm từ 0 - 2 là kháng, 3 là kháng trung bình, từ 3<sup>+</sup> - 5 là nhiễm.



- Kato (1993) đã đánh giá phản ứng của các giống lúa với nấm bệnh đạo ôn theo thang phân 5 cấp:
- Cấp 0: Không có vết bệnh, được xem là kháng cao (Ký hiệu: HR-high resistance);
- Cấp 1: Vết bệnh là một chấm nhỏ đầu kim, được xem là kháng (Ký hiệu: R- resistance);
- Cấp 2: Vết bệnh to hơn, màu nâu nhạt đến nâu tối, được xem là kháng (Ký hiệu: MR-moderate resistance);
- Cấp 3: Vết bệnh to hơn, có màu xám ở giữa vết bệnh, được xem là nhiễm (Ký hiệu: S-susceptible);
- Cấp 4: Vết bệnh điển hình (dạng hình thoi màu xám ở giữa), được xem là nhiễm nặng (Ký hiệu: HS-high susceptible).

### 2.1.2. Tính kháng định lượng

Tính kháng định lượng là khả năng của giống lúa hạn chế được sự phát triển của nhiều chủng nấm gây bệnh khác nhau. Do vậy, tính kháng định lượng được coi là tính kháng tương đối bền vững.

Những cây có tính kháng định lượng thường mang nhiều gen kháng, có thể là sự kết hợp của cả gen kháng chính và gen kháng phụ hoặc chỉ gồm các gen kháng chính hoặc chỉ gồm các gen kháng phụ. Sự đa gen kháng trong một cây chủ sẽ làm giảm sự phát triển của bất kỳ chủng gây bệnh nào và đó cũng là một lý do để giải thích sự không đặc thù chủng của tính kháng định lượng.

Để mô tả tính kháng định lượng người ta dựa trên % vùng lá bị bệnh, kích thước và số lượng vết bệnh. Phương pháp này thường được dùng nhiều trong việc lập bản đồ tính kháng định lượng và xác định số gen kháng của một giống lúa.



### 2.1.3. Tính kháng lâu bền

Tính kháng lâu bền là khả năng của một giống lúa có thể kháng lại bệnh đạo ôn trong thời gian dài (trên 5 năm), trên diện tích gieo trồng rộng và trong điều kiện môi trường thích hợp cho sự phát triển của nấm bệnh (Johnson, 1983). Xét về bản chất tính kháng bền của cây chủ cũng được xem như là tính kháng định lượng.

Tính kháng bền là do sự kết hợp của nhiều gen kháng tạo nên. Hiện tượng này còn được gọi là đặc tính kháng đa gen (Bonman và cs., 1986). Đặc tính kháng đa gen được thể hiện rất rõ ở giống lúa có tính kháng bền Moroberekan. Khi phân tích bản chất di truyền của giống lúa này người ta phát hiện được nó mang hơn 10 gen kháng chính và nhiều gen kháng phụ khác. Đặc tính kháng đa gen cũng được tìm thấy ở một số giống lúa như: OS6, Lac23, BL123, Tẻ tếp, IR24.v.v.

## 2.2. Phản ứng bệnh đạo ôn ở lúa

Đầu tiên bào tử đỉnh xâm nhập lên bề mặt cây chủ. Các bào tử nhanh chóng tạo thành ống nấm, ống nấm phát triển kéo dài và phình to ở đỉnh tạo thành đĩa bám. Quá trình hình thành ống nấm và đĩa bám phụ thuộc rất nhiều vào hàm lượng nước có trên bề mặt cây chủ. Độ ẩm cao là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của giai đoạn này. Khi quan sát thấy rằng: nếu mặt lá ướt thì sự hình thành ống nấm và đĩa bám xảy ra trong vòng 3 giờ, nếu bề mặt lá khô thì quá trình nảy mầm bị gián đoạn và dừng lại.

Khi đĩa bám đã hoàn thiện, các tế bào đĩa bám bị melanin hoá hình thành sức căng trong đĩa bám. Đồng thời trong quá trình nhiễm, nấm tiết ra enzym hydrolaza phân huỷ màng



polysaccharit của tế bào cây chủ.

Nhờ có enzym phân huỷ màng polysaccharit và áp suất bên trong đĩa bám cao mà sợi nhiễm có thể dễ dàng xuyên qua tế bào biểu bì và nhu mô của cây chủ. Quá trình xâm nhập của sợi nhiễm diễn ra trong vòng 48 giờ. Ngay sau khi nhiễm, vết bệnh có thể quan sát được trên cây chủ.

Sự phát sinh bào tử thường xảy ra ở điều kiện độ ẩm cao (hơn 80%), trên vùng có màu xám của vết thương. Bào tử được hình thành từ bào tử đỉnh nhờ quá trình phân chia vô tính. Tuy thuộc vào điều kiện nhiệt độ, quá trình hình thành bào tử có thể diễn ra từ 3 - 8 ngày sau khi vết thương xuất hiện. Quá trình này có thể kéo dài 20 ngày (Kato, 1977).

Sau khi được hình thành, bào tử sẽ phát tán, bắt đầu chu trình nhiễm mới hoặc hình thành bào tử hậu. Bào tử hậu có thể sống được hai năm. Sự phát tán của bào tử nấm thường xảy ra vào ban đêm và sáng sớm nhờ gió.

Mỗi chu kì nhiễm và phát triển kéo dài 6-8 ngày phụ thuộc vào mức độ tương thích giữa nấm bệnh, cây chủ, độ ẩm và nhiệt độ. Nếu độ ẩm đạt 100%, bào tử nấm phát sinh rất nhanh, chu trình nhiễm rút ngắn chỉ còn 3 - 4 ngày.

### 2.3. Di truyền tính kháng bệnh đạo ôn ở lúa

Nấm đạo ôn là một loài có phổ chủ rất rộng, chúng có thể nhiễm vào hơn 40 chi thuộc họ cỏ và nhiều chi khác không thuộc họ cỏ (Ou, 1986). Tuy nhiên, mỗi nòi nấm chỉ có thể gây bệnh ở một hoặc một số loài nhất định (Kato, Yamaguchi, 1982; Mackill; Bonman, 1992). Năm 1922 Sasaki đã nhận ra tính độc khác nhau của các loài nấm đạo ôn. Từ đó, hàng trăm nòi nấm



gây bệnh đã được phát hiện trên các giống lúa trồng ở nhiều vùng khác nhau trên thế giới nhờ dựa vào phản ứng bệnh của các giống lúa (Atkin và cs.,1967).

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy nấm đạo ôn có sự biến đổi vật chất di truyền dẫn tới hình thành chủng mới (Ou và cs., 1968; Zeigler và cs., 1994). Sự hình thành chủng mới thường xảy ra ít nhất sau ba thế hệ phát sinh bào tử. Tuy nhiên, tính ổn định của chủng vẫn là một vấn đề gây tranh luận (Ou, 1980). Ou và Ayada (1968) và nhiều tác giả khác như Giatyong và Frederiksen (1969) đã khẳng định tính không ổn định của nấm đạo ôn, song điều này không thường xuyên diễn ra trong một chủng đơn.

Ou và Ayada (1968) cũng chỉ ra rằng mỗi bào tử có thể đại diện cho một chủng gây bệnh. Một số tác giả khác cũng đưa ra những kết luận tương tự. Bên cạnh đó, một số nhà nghiên cứu lại quan sát thấy tính tương đối bền vững của mỗi chủng nấm đạo ôn. Ở hầu hết các chủng nấm, dù nuôi cấy 10 - 20 năm vẫn giữ nguyên đặc tính ban đầu, độc tính của chúng không thay đổi trên các giống lúa. Năm 1987, Bonman đã chỉ ra rằng, có một số lượng nhỏ các bào tử con cháu có sự sai khác ở mức độ thấp so với bố mẹ chúng về phản ứng bệnh.





## CHƯƠNG 5. KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN

### 1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 1.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu này gồm các chủng nấm đạo ôn và các giống lúa đó là:

Các mẫu nấm bệnh thu thập, phân lập từ miền Bắc và miền Trung Việt Nam được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền quần thể nấm bệnh.

78 giống lúa gồm: các giống lúa địa phương, lúa nhập nội và chọn tạo mới.

#### 1.2. Nội dung nghiên cứu

Các nội dung được tiến hành trong nghiên cứu đó là: Thu thập và phân lập nấm đạo ôn; phân tích đa dạng di truyền nấm đạo ôn bằng chỉ thị phân tử; đánh giá tính kháng đạo ôn của các giống lúa; lập bản đồ gen kháng đạo ôn ở lúa và chọn tạo giống lúa mang gen kháng đạo ôn bằng chỉ thị phân tử.

#### 1.3. Phương pháp nghiên cứu

##### 1.3.1. Thu thập và phân lập mẫu nấm đạo ôn

- *Địa điểm thu thập*: Mẫu bệnh được thu vào các tháng ba và tháng tư thuộc vụ lúa Đông Xuân, thời gian này bệnh đạo ôn thường xảy ra trên lúa. Khu vực thu mẫu là các tỉnh thuộc miền Bắc, miền Trung và ở những nơi có lịch sử xuất hiện bệnh hoặc bệnh đang xảy ra trầm trọng.

- *Cách thu mẫu*: Mẫu bệnh được thu thập trên các giống lúa khác nhau ở mỗi nơi thu (xã, huyện, tỉnh) của vùng. Mỗi giống



lúa bị nhiễm có cấp bệnh lớn hơn điểm 4 được thu 5 mẫu bệnh. Mẫu bệnh được thu trên các phần: lá, cổ bông, thân của cây lúa bị nhiễm bệnh. Mỗi lá bị bệnh đã được thu một mẫu có kích thước khoảng 5 cm, sau đó đặt các mẫu lá trên giấy thấm đã làm ướt trong đĩa petri ở nhiệt độ phòng (24°C-28°C) trong 24 giờ.

- *Phân lập nấm đạo ôn*: Mẫu nấm nuôi cấy được kiểm tra sự phát sinh bào tử dưới kính hiển vi; sau đó sử dụng que cấy (que thủy tinh đã được khử trùng bằng đốt nóng đầu) thu bào tử bằng cách chạm nhẹ đầu que cấy lên vết bệnh. Bào tử được cấy trên môi trường thạch (4%) có chứa streptomycin (10mg / 250ml môi trường). Sau khi cấy khoảng 24 giờ; đặt đĩa thạch có chứa bào tử nấm dưới kính hiển vi, dùng que cấy có đầu nhọn và nhỏ (kim) thu những bào tử đơn đứng riêng biệt một mình.

Các bào tử đơn nấm sau đó được nuôi cấy trên môi trường PDA (200g khoai tây; 20g đường glucoza; 20g thạch trong 1 lít dung dịch, pH 6,8) hoặc nước chiết cám (50 g cám gạo; 18 g agar; 20 g đường saccarose trong 1 lít nước). Các bào tử đơn này có thể được giữ lâu dài trong điều kiện nhiệt độ thấp hoặc được sử dụng cho các bước tiếp theo.

### 1.3.2. Phân tích đa dạng di truyền nấm đạo ôn bằng chỉ thị phân tử

- *Nuôi cấy nhân sinh khối nấm đạo ôn*: Mỗi mẫu nấm bệnh sau khi phân lập được phát triển tạo thành một dòng phân lập, sau đó tiến hành nuôi lắc (100-200v/p ở 28°C) trong môi trường lỏng (15g glucose, 5 g ammonium trartrate, 1 g ammonium nitrate, 1 g monopotassium phosphate, 0,15 g calcium chloride; 0,1 g NaCl; 0,5 g dịch chiết nấm men và 0,5 g



casein thủy phân trong 1 lít dung dịch) từ 4 - 7 ngày để nhân sinh khối.

- *Tách ADN của nấm đạo ôn*: Ngay sau khi thu, sinh khối được rửa sạch ba lần bằng nước cất và đông khô; sinh khối đã đông khô được nghiền trong niơ lỏng thành bột mịn.

Chuyển khoảng 20 - 30 mg bột nấm sang ống Eppendorf 2ml hòa tan trong 500 $\mu$ l đệm chiết (50mM Tris-HCl, pH=8; 150mM NaCl; 100mM EDTA, pH=8);

Cho thêm vào 50 $\mu$ l 10% SDS trộn đều, lắc nhẹ ở 37°C trong 1 giờ;

Bổ sung thêm 75 $\mu$ l NaCl trộn đều nhẹ nhàng, cho thêm 65 $\mu$ l dung dịch CTAB (10% CTAB trong dung dịch 0.7M NaCl) trộn đều để ở 65°C trong 20 phút;

Cho thêm 700 $\mu$ l dung dịch chloroform : isoamylalcohol (tỷ lệ 24:1) lắc mạnh trong 5 phút;

Ly tâm ở 10.000 vòng/phút (v/p) trong 12 phút và chuyển lớp dịch phía trên sang ống Eppendorf mới có chứa 450 $\mu$ l (0,6 thể tích) 2-propanol để tạo kết tủa;

Ly tâm hỗn hợp 10.000 v/p trong 12 phút loại dung dịch lỏng và thu kết tủa; làm khô và hoà tan kết tủa trong 200 $\mu$ l dung dịch TE (10mM Tris-HCl, pH = 8; 1mM EDTA, pH=8; trong 1lít dung dịch);

Cho 2 $\mu$ l RNase (10mg/ml) vào dung dịch đã hoà tan, trộn đều để ở 37°C trong 30 phút; sau đó cho thêm 1 thể tích (200 $\mu$ l) phenol : chloroform (tỷ lệ 1:1), trộn đều, ly tâm 10.000 v/p trong 10 phút sau đó chuyển lớp dung dịch phía trên sang Eppendorf mới;

Cho 40 $\mu$ l Na-Acetate 3M (1/5 thể tích) và 500 $\mu$ l cồn tuyệt đối (2,5 thể tích) để kết tủa ADN;



Ly tâm dung dịch hoà tan ở 10.000 v/p trong 10 phút, loại dịch lỏng thu ADN kết tủa, làm khô và hoà tan ADN trong 200µl TE. ADN được đo quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8% để kiểm tra phẩm chất và nồng độ.

- *Nhận dạng ADN nấm đạo ôn*: ADN của nấm đạo ôn được tiến hành nhận dạng theo quy trình của George và cs (1998).

+ *Phản ứng PCR*: Sử dụng kỹ thuật Pot2 rep-PCR để nhận dạng ADN của nấm đạo ôn. Mỗi phản ứng PCR được tiến hành với 25µl dung dịch tổng số gồm: 2,5µl B9 buffer (10mM tris, pH=9,2); 25mM KCl; 1,5mM MgCl<sub>2</sub> và 15mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 185 µM mỗi dNTP; 0,5 µM mỗi MG1 và MG2; 2 đơn vị enzym Taq DNA polymeraza; 100ng ADN.

Trình tự của hai mồi là:

MG1: 5'CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT3'

MG2: 5'CCCTCATTCGTCACACGTTC 5'

Các bước chạy phản ứng PCR:

95°C -----	5 phút	
94°C -----	1 phút	} 4 chu kỳ
62° -----	1 phút	
65°C -----	10 phút	
94°C -----	30 giây	} 26 chu kỳ
62°C -----	1 phút	
65°C -----	10 phút	
65°C -----	15 phút	
4°C -----	∞	



+ Điện di và phát hiện sản phẩm PCR:

\* Chuẩn bị gel: Cân theo tỷ lệ 0,7% synergel và 0,5% agarose; trộn đều trong dung dịch 0,5XTBE (dung dịch 5XTBE gồm: 108g Tris base (MW = 121,10); 27,5g Axít boric (MW = 61,83); 2ml 0,5M EDTA, pH = 8,0; tất cả được hoà tan trong một lít dung dịch); đun nóng chảy, lắc đều chờ khi gel nguội tới 60°C đổ gel vào khuôn gel (20cm x 14cm).

\* Điện di: Cho dung dịch nhuộm vào mỗi sản phẩm PCR trộn đều, ly tâm để tách pha và hút 12,5ml của mỗi mẫu tra vào giếng gel. Điện di ở 120V khoảng 7 giờ trong dung dịch 0,5X TBE; sau đó nhuộm gel 30' trong dung dịch ethidium bromide; kiểm tra và ghi nhận kết quả dưới đèn cực tím.

### 1.3.3. Đánh giá tính kháng đạo của các giống lúa

- Chuẩn bị các giống lúa: Ngâm thóc và ủ cho nảy mầm, sau đó gieo hạt nảy mầm trong các chậu, vại.v.v. Với mỗi giống lúa gieo 10 hạt với 3 lần nhắc lại. Khi cây mạ được 10 - 14 ngày tuổi (có 3-5 lá thật), sử dụng phương pháp lây nhiễm nhân tạo lên mạ.

- Chuẩn bị nấm đạo ôn cho lây nhiễm: Chuyển các ống giữ giống bào tử nấm ra ngoài từ 7 - 10 ngày, để ở nhiệt độ phòng.

Dùng que cấy chuyển từ ống giống đạo ôn có sợi nấm đang phát triển sang hộp lồng (đĩa petri) chứa môi trường PDA hay môi trường nước chiết cám để tiến hành nhân sinh khối bào tử nấm đạo ôn.

Để đĩa petri đã cấy nấm đạo ôn vào trong tủ nuôi (nhiệt độ 28°C) tới khi sợi nấm mọc kín đĩa petri.

Thu bào tử nấm, pha trong nước cất. Lọc dung dịch bào tử để loại bỏ những mẫu thạch vụn.



Đếm số lượng bào tử nấm bằng dụng cụ “hemacytometer”. Điều chỉnh nồng độ bào tử đạt  $10^5$  bào tử/1ml.

Bổ sung dịch chiết cám (không có agar) vào dung dịch chứa bào tử nấm giúp tăng độ bám dính của dung dịch lên cây lúa cũng như tạo điều kiện cho bào tử nấm phát triển trên môi trường dinh dưỡng cao.

- *Phương pháp lây nhiễm bệnh đạo ôn trên lúa*: Thông thường có hai cách lây nhiễm bệnh đó là:

+ *Lây nhiễm bệnh trong ống nghiệm*: Ống nghiệm được sử dụng có chiều dài và đường kính là 30cm x 2cm, mỗi ống chứa 20ml môi trường thạch loãng (0,6%). Mỗi giống lúa gieo trong 10 ống nghiệm, mỗi ống gieo 1 hạt lúa; thí nghiệm lây nhiễm với 3 lần nhắc lại. Khi lúa đạt 14 - 21 ngày tuổi (có 3-5 lá) được sử dụng để lây nhiễm.

+ *Lây nhiễm bệnh trong nhà lưới*: Gieo hạt lúa đã nảy mầm trong khay nhựa; mỗi giống lúa gieo 10 hạt/hàng với 3 lần nhắc lại. Khi lúa được 14 - 21 ngày tuổi (có 3-5 lá) được sử dụng cho lây nhiễm.

Phun đều dung dịch chứa bào tử nấm lên cây lúa bằng bình tích áp nhằm tạo ra những “giọt sương” bám trên lá mạ vào lúc trời râm mát (tiến hành vào buổi chiều - khoảng từ 16 – 17 giờ nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho bào tử nấm đạo ôn nảy mầm, phát triển và hình thành sợi nấm phát triển vào bên trong mô lá.

Sau lây nhiễm 7 ngày tiến hành kiểm tra sự xâm nhiễm của nấm bệnh đối với lúa.



- *Đánh giá phản ứng bệnh đạo ôn của lúa:* Phản ứng với bệnh đạo ôn của các giống lúa được đánh giá theo thang điểm của IRRI (SES, 2002):

- *Điểm 0:* Không có vết bệnh;
- *Điểm 1:* Vết bệnh hình kim châm, màu nâu ở giữa;
- *Điểm 2:* Vết bệnh nhỏ, xung quanh có viền nâu, hầu hết lá phía dưới có vết bệnh;
- *Điểm 3:* Dạng vết bệnh như điểm 2, nhưng xuất hiện nhiều ở các lá phía trên;
- *Điểm 4:* Vết bệnh điển hình, diện tích vết bệnh <4% diện tích lá;
- *Điểm 5:* Vết bệnh điển hình, diện tích vết bệnh khoảng 4-10% diện tích lá;
- *Điểm 6:* Vết bệnh điển hình, diện tích vết bệnh khoảng 11-25% diện tích lá;
- *Điểm 7:* Vết bệnh điển hình, diện tích vết bệnh khoảng 26-50% diện tích lá;
- *Điểm 8:* Vết bệnh điển hình, diện tích vết bệnh khoảng 51-75% diện tích lá;
- *Điểm 9:* Diện tích vết bệnh > 75% diện tích lá.

Cách tính tỷ lệ bệnh (TLB)

$$TLB (\%) = \frac{A}{B} \times 100$$

Trong đó: A: Số lượng cá thể bị bệnh

B: Số lượng cá thể điều tra



Chỉ số bệnh (CSB): được tính theo công thức Townsend Heuberger

$$\text{CSB (\%)} = \frac{\sum(a.b)}{N.T} \times 100$$

Trong đó:        a: Số lượng cá thể bị bệnh  
                  b: Trị số cấp bệnh tương ứng  
                  N: Tổng số cá thể điều tra  
                  T: Trị số cấp bệnh cao nhất

Theo quy phạm khảo nghiệm giống, kết hợp với tính toán xác định chỉ số bệnh, tỷ lệ bệnh cho phép ta đánh giá mức độ kháng/nhiễm của một giống lúa.

#### 1.3.4. Lập bản đồ gen kháng đạo ôn ở lúa

Tạo quần thể  $F_2$  và  $F_3$  từ các tổ hợp lai giữa dòng lúa DT7 (có năng suất, chất lượng tốt) và hai giống lúa C101 LAC (mang gen Pi-1) và Moroberekan (mang gen Pi-5).

Sử dụng chỉ thị phân tử để xác định đa hình giữa các giống bố mẹ. Các chỉ thị cho đa hình giữa các giống bố mẹ được sử dụng để tiến hành nhận dạng ADN ở các cá thể  $F_2$ . Trên cơ sở nhận dạng ADN ở  $F_2$  sẽ được sử dụng để xây dựng bản đồ gen kháng đạo ôn.

Các dòng lúa  $F_3$  được sử dụng để đánh giá phản ứng bệnh của từng dòng; dữ liệu về phản ứng bệnh của từng dòng được sử dụng kết hợp với dữ liệu kiểu gen của  $F_2$  để xây dựng bản đồ gen kháng đạo ôn.

Dữ liệu kiểu gen ở  $F_2$  và kiểu hình ở  $F_3$  sẽ được sử dụng kết





hợp để xây dựng bản đồ gen kháng đạo ôn sử dụng phần mềm MAPMAKER/EXP 3.0 và MAPMAKER/QTL 1.1.

### 1.3.5. Nhận dạng ADN của các giống lúa

- *Tách chiết ADN của các giống lúa*

- Lấy khoảng 1-2g lá mạ (2 tuần tuổi) nghiền với nitơ lỏng trong ống eppendorf thành dạng bột mịn;
- Thêm 1ml dịch chiết (0,1M Tris-Cl, pH8; 0,05M EDTA; 0,5M NaCl; 0,01M  $\beta$ -mercaptoethanol) và 50 $\mu$ l 10% SDS;
- Ủ 30 phút ở 65oC, lắc nhẹ. Ly tâm với tốc độ 13.000v/p trong 20 phút;
- Thu lấy dịch lỏng ở phía trên cho vào ống eppendorf mới và thêm vào đó một thể tích tương ứng isopropanol, lắc nhẹ;
- Ủ trong tủ đá 10-30 phút;
- Ly tâm với tốc độ 13.000v/p trong 10 phút;
- Bỏ pha dung dịch, thêm vào 400 $\mu$ l TE để hoà tan kết tủa DNA;
- Thêm 1 $\mu$ l Rnase (10mg/ $\mu$ l);
- Ủ mẫu ở 37oC trong 2h;
- Thêm 400 $\mu$ l đệm CTAB (0,2M Tris-Cl, pH7,5; 0,05M EDTA; 2M NaCl; 2%(w/v) CTAB);
- Ủ ở 65oC trong 15 phút. Trong khi ủ thỉnh thoảng lắc nhẹ;
- Thêm 800 $\mu$ l Chloroform/Isoamyl alcohol tỷ lệ 24/1 và lắc đều thành dạng sữa;
- Tiếp tục ly tâm với tốc độ 13.000v/p trong 5phút;
- Chuyển phần dịch phía trên sang ống eppendorf mới, thêm 1,4ml ethanol 96% và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút;
- Ly tâm với tốc độ 13.000v/p trong 10 phút, loại phần dịch và thêm vào 400 $\mu$ l ethanol 70%;



- Ly tâm với tốc độ 13.000v/p trong 5 phút, loại bỏ ethanol, cho vào máy quay khô;
- Hoà tan ADN trong 200µl H<sub>2</sub>O (hoặc TE);
- Bảo quản ở nhiệt độ -20oC để sử dụng dần.

*- Phương pháp PCR sử dụng môi SSR*

ADN của các giống lúa được tiến hành nhận dạng sử dụng môi SSR theo phương pháp của McCouch (2002), quá trình được tiến hành như sau:

*+ Thành phần một phản ứng PCR:*

TT	Thành phần	Thể tích 01 phản ứng (µl)
1	Dream Taq™ Green buffer (20mM)	1,0
2	dNTP mix (2,5mM)	0,8
3	Primer (F) (25ng/µl)	0,2
4	Primer (R) (25ng/µl)	0,2
5	Dream Taq™ DNA polymeraza (5u/ml)	0,05
6	ADN (20ng/µl)	2
7	Nước	5,75
<b>Tổng thể tích phản ứng</b>		<b>10</b>

*+ Chu trình nhiệt của PCR:* Chu trình nhiệt của PCR được đặt như sau: (1) 94°C trong 5 phút; (2) 94°C trong 1 phút, 55°C - 58°C “tùy môi” trong 45 giây, 72°C trong 2 phút, lặp lại (2) 35 lần; (3) 72°C trong 15 phút sau đó đặt ở 4°C.

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 3% ở 80V/50 phút. Nhuộm gel bằng Ethidium bromide 0,5 µg/ml trong 30 phút sau đó soi chụp gel để ghi nhận kết quả.



### 1.3.6. Phương pháp chọn tạo giống lúa mang gen kháng đạo ôn bằng chỉ thị phân tử

Chọn tạo giống nhờ chỉ thị phân tử MAS (marker assisted selection) là phương pháp kết hợp giữa truyền thống với công nghệ sinh học hiện đại. Để triển khai hướng chọn tạo giống này cần xác định được giống lúa mang gen quy định đặc tính mong muốn và đã xác định được chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen đó để làm giống cho gen. Sử dụng phương pháp lai trở lại để đạt được thể hệ lai cần thiết cho chọn dòng lúa mong muốn (Nguyễn Quang Thạch và cs., 2005).

- Quy tụ gen kháng đạo ôn vào lúa:

Lai giữa dòng lúa DT7 với hai giống lúa C101 LAC và Moroberekan sau đó thu hoạch hạt  $F_1$ .

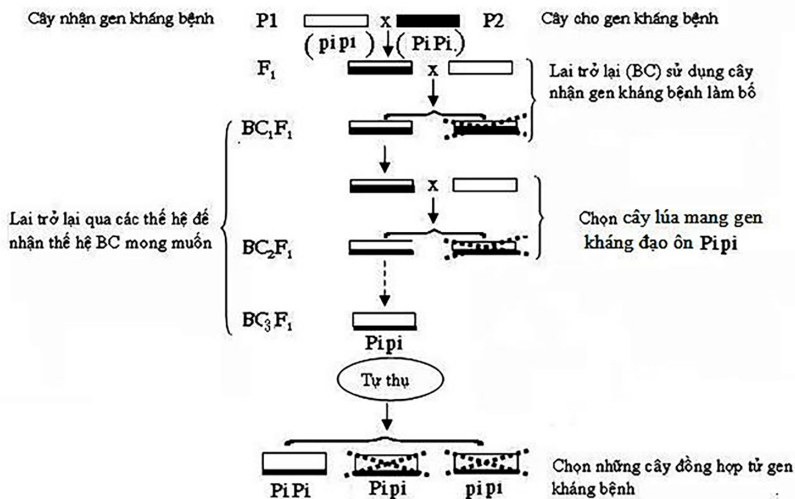
Cây  $F_1$  được sử dụng cho lai trở lại với dòng lúa DT7 để thu lấy hạt  $BC_1F_1$ . Sử dụng chỉ thị phân tử để xác định các cá thể mang gen kháng đạo ôn. Các cá thể mang gen, sẽ được sử dụng cho các lần lai tiếp theo.

Lai cây  $BC_1F_1$  với dòng lúa DT7, thu hoạch hạt  $BC_2F_1$ , sử dụng chỉ thị phân tử để xác định các cá thể mang gen kháng đạo ôn. Các cá thể mang gen, sẽ được sử dụng cho lần lai tiếp theo.

Lai cây  $BC_2F_1$  với dòng lúa DT7; thu hạt  $BC_3F_1$ , sử dụng chỉ thị phân tử để xác định các cá thể mang gen kháng đạo ôn. Các cá thể mang gen, sẽ được sử dụng cho lần lai tiếp theo.

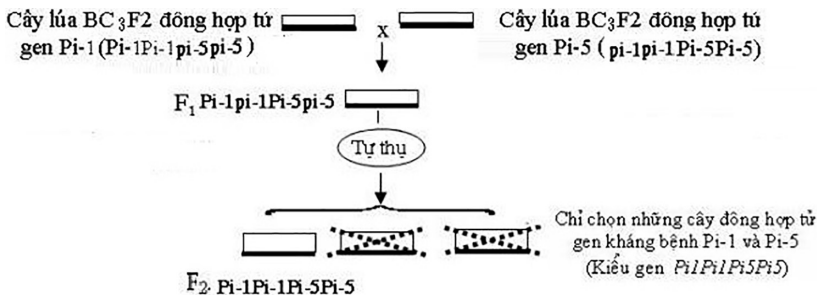
Tiến hành tự thụ các hạt  $BC_3F_1$  để thu lấy hạt  $BC_3F_2$ , sử dụng chỉ thị phân tử PCR để chọn lựa các cá thể mang gen kháng đạo ôn ở dạng đồng hợp tử gen kháng.





Hình 10. Sơ đồ lai quy tự và lựa chọn cây lúa mang gen kháng đạo ôn bằng chỉ thị phân tử. P1 là giống nhận gen kháng; P2 là giống cho gen kháng đạo ôn; pi pi và PiPi là dạng đồng hợp tử lặn và trội về kiểu gen kháng đạo ôn.

Thực hiện phép lai giữa cây  $BC_3F_2$  (mang gen kháng Pi-1) và cây  $BC_3F_2$  (mang gen kháng Pi-5) thu lấy hạt  $F_1$ . Lấy hạt  $F_1$  (mang cả 02 gen kháng Pi-1 và Pi-5) tự thụ và thu lấy hạt  $F_2$  (Hình 11). Sử dụng chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng để chọn những cây lúa mang gen (Pi-1 và Pi-5) ở dạng đồng hợp tử.



Hình 11. Sơ đồ lai quy tự 2 gen kháng (Pi-1 & Pi-5) vào cùng một cá thể



Xác định lại các dòng lúa kháng bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo ở thế hệ cuối chọn lọc. Tiến hành đánh giá các đặc điểm nông học để chọn lựa dòng lúa mang 02 gen kháng (Pi-1&Pi-5) và có năng suất, chất lượng cao phục vụ cho sản xuất.

- *Phương pháp đánh giá đặc điểm nông sinh học của các giống lúa:* Các tính trạng của dòng lúa chọn tạo mới được đánh giá theo quy trình của IRRI (SES, 2002).

## 2. Kết quả nghiên cứu

### 2.1. Xác định các chủng nấm đạo ôn

#### 2.1.1. Thu thập và phân lập nấm đạo ôn

- *Thu thập các mẫu nấm đạo ôn*

Đạo ôn là một trong những loại bệnh gây hại nghiêm trọng nhất đối với sản xuất lúa ở nước ta trên các vùng sinh thái nông nghiệp khác nhau. Tuy nhiên mức độ gây hại của bệnh lại rất khác nhau giữa các vùng sinh thái. Trong đó vùng đồng bằng sông Hồng, bắc Trung bộ và nam Trung bộ mức độ gây hại của bệnh cao hơn các vùng Tây Bắc và Đông Bắc. Do đặc điểm về tập quán canh tác, sử dụng giống lúa rất khác nhau trong các điều kiện sinh thái khác nhau.v.v. nên giữa các vùng có sự đa dạng, khác biệt của nấm bệnh. Điều này cũng giải thích tại sao đồng bằng sông Hồng, bắc Trung bộ, nam Trung bộ nấm bệnh lại trầm trọng hơn các vùng khác.





**1. Vùng Tây bắc (TB)** gồm các tỉnh: Lai Châu, Điện Biên, Sơn La và Hoà Bình

**2. Vùng Đông bắc (ĐB)** gồm các tỉnh: Cao Bằng, Lạng Sơn, Bắc Cạn, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Bắc Giang, Lào Cai, Yên Bái, Hà Giang, Tuyên Quang và Phú Thọ

**3. Vùng Đồng bằng sông Hồng (ĐBSH)** gồm các tỉnh: Hải Phòng, Hải Dương, Bắc Ninh, Hưng Yên, Hà Nội, Hà Tây, Thái Bình, Nam Định, Hà Nam, Ninh Bình và Vĩnh Phúc.

**4. Vùng Bắc trung bộ (BTB)** gồm các tỉnh: Thanh Hoá, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên - Huế.

**5. Vùng Nam trung bộ (NTB)** gồm các tỉnh: Quảng Nam, Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên và Khánh Hoà.

**6. Vùng Tây nguyên (TN)** gồm các tỉnh: Lâm Đồng, Đắk Nông, Đắk Lắk, Gia Lai và Kon Tum.

**7. Vùng Đông nam bộ (ĐNB)** gồm các tỉnh: Đồng Nai, Bình Dương, Bình Phước, Tây Ninh, Thành phố Hồ Chí Minh, Ninh Thuận và Bình Thuận.

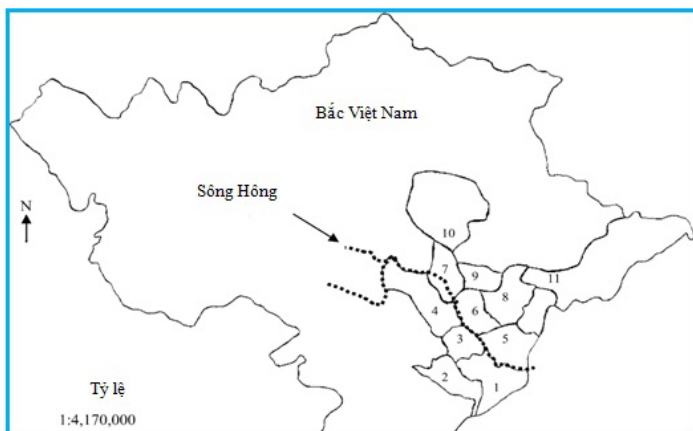
**8. Vùng Tây nam bộ (TNB)** gồm các tỉnh: Long An, Bến Tre, Đồng Tháp, Sóc Trăng, Vĩnh Long, Cần Thơ, Hậu Giang, Tiền Giang, Bạc Liêu, Cà Mau, Kiên Giang, An Giang và Trà Vinh.

Hình 12. Bản đồ 8 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam

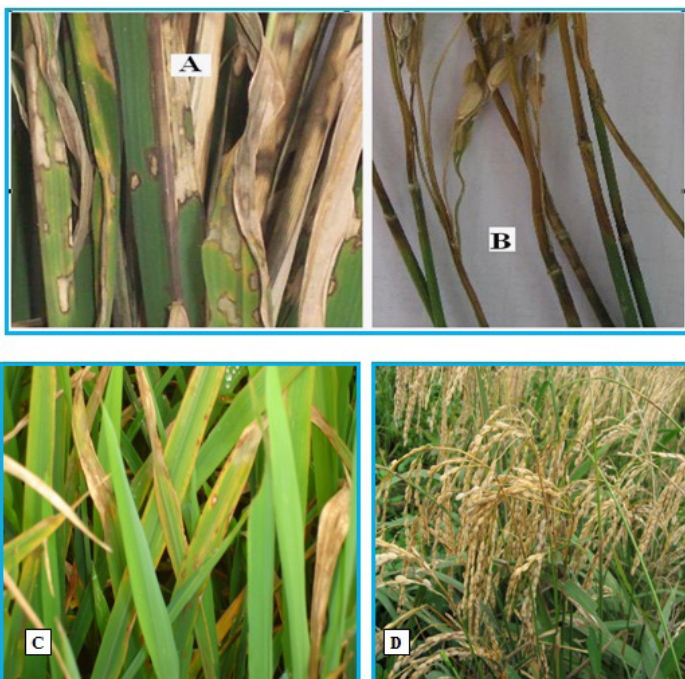
Trong quá trình thu thập, chúng tôi đã tập trung thu ở các vùng có tính chất đại diện như: vùng Tây bắc (TB), vùng Đông bắc (ĐB), vùng Đồng bằng sông Hồng (ĐBSH), vùng Bắc trung bộ (BTB) và vùng Nam trung bộ (NTB) gồm các tỉnh: Sơn La, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Bắc Ninh, Bắc Giang, Hà Nội, Hà Nam, Thái Bình, Hưng Yên, Hải Dương, Hải Phòng, Thanh Hoá, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Huế, Phú Yên (Hình 12 & 13).



## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN



Hình 13. Sơ đồ các tỉnh ở phía Bắc được thu thập mẫu nấm bệnh



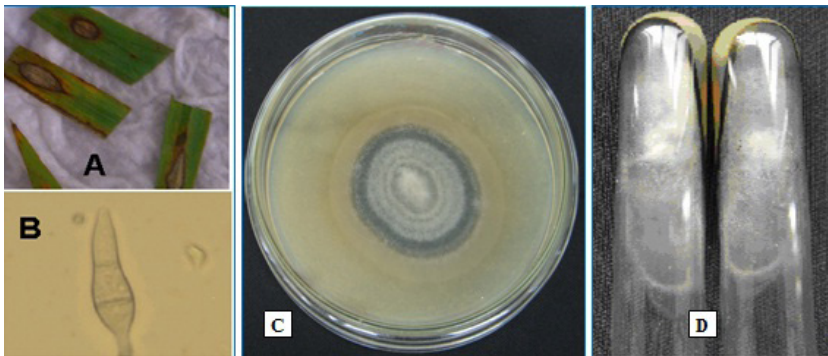
Hình 14. Hình ảnh các giống lúa bị nhiễm bệnh được thu mẫu nấm đạo ôn. Trong đó: A là hình ảnh vết bệnh trên lá, B là hình ảnh vết bệnh trên cổ bông.



Việc thu thập các mẫu nấm bệnh được tiến hành vào vụ Đông Xuân, từ tháng 3 đến tháng 4 tại các vùng thường xuyên có bệnh xuất hiện ở mức trầm trọng (hình 13). Kết quả đã thu được 364 mẫu bệnh trên các giống lúa nhiễm bệnh có cấp độ điểm lớn hơn 4, mỗi giống lúa thu 5 mẫu bệnh trên các phần lá, cổ bông.v.v. của cây lúa bị nhiễm (hình 14). Mỗi mẫu bệnh có kích thước khoảng 5cm và được đựng trong các ống nghiệm riêng biệt, ghi ngày tháng năm và địa điểm thu mẫu.

*- Phân lập các mẫu đạo ôn:*

Từ 364 mẫu bệnh được thu, đã tiến hành phân lập theo phương pháp bào tử đơn nấm và thu được 335 mẫu nấm bệnh để nuôi cấy trên môi trường PDA (hình 15; 16). Các mẫu nấm phân lập được đều có độ thuần là 100% thể hiện qua thông số kiểm tra độ thuần và không bị tạp nhiễm vi khuẩn hoặc các loại nấm khác (hình 15), bào tử đơn nấm phát triển tốt và đồng dạng.

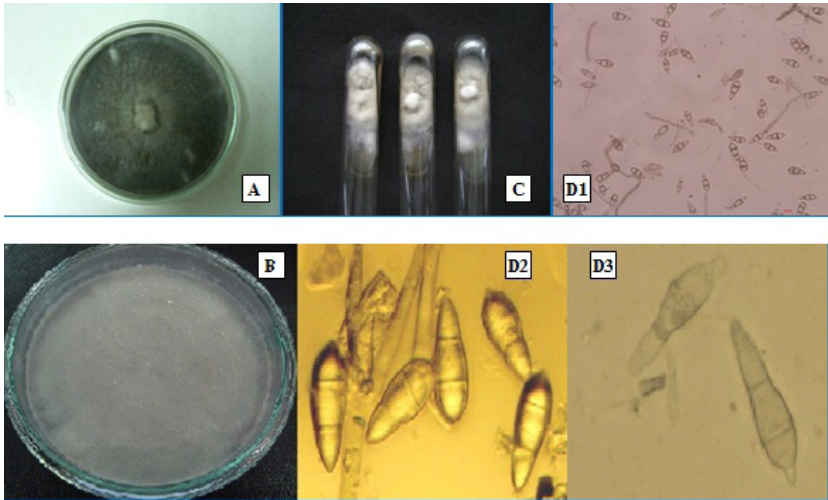


Hình 15. Các mẫu nấm được phân lập từ lá lúa bị bệnh

Trong đó: A. mẫu lá lúa của giống CR203 bị bệnh; B. bào tử đơn nấm; C, D. mẫu được nuôi cấy trên môi trường PDA.







Hình 16. Hình ảnh kiểm tra độ thuần của nấm

Trong đó: A, B. nấm phát triển đồng dạng trên đĩa petri; C. nấm phát triển đồng dạng trong ống nghiệm; D1, D2, D3. Mẫu nấm gồm các bào tử thuần, không bị tạp nhiễm.

### 2.1.2. Phân tích xác định các chủng nấm bằng chỉ thị phân tử

- *Nhận dạng ADN của nấm đạo ôn:*

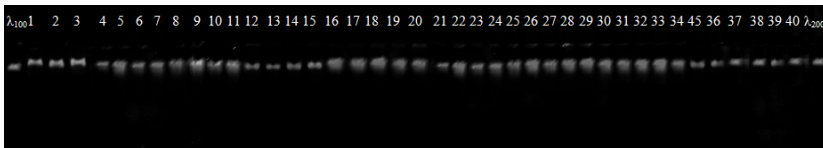
Tiến hành cấy chuyển nấm trong ống giữ giống (giống gốc) ra đĩa môi trường PDA có bổ sung acid lactic 20% nuôi trong tủ ấm 25°C -28°C để nấm phát triển bình thường (khoảng 4-7 ngày). Dùng que cấy lấy miếng thạch khoảng 0,5 x 0,5cm có nấm phát triển trên đĩa nuôi cho vào bình tam giác (hoặc ống nghiệm) có môi trường nuôi lắc. Đặt vào máy lắc, nuôi lắc 150v/p ở 28°C trong 4-7 ngày thu sinh khối (hình 17).



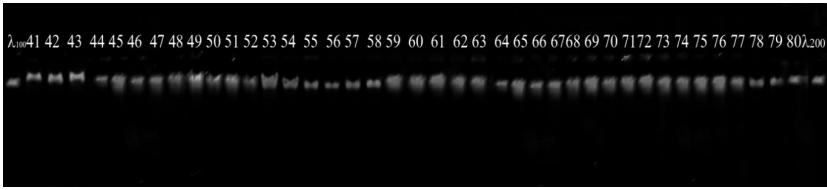


Hình 17. Sinh khối nấm được nuôi lắc sau 4-7 ngày

Kết quả tách chiết ADN của các mẫu nấm bệnh được tiến hành theo phương pháp của IRRI (1999) và được kiểm tra qua điện di trên agarose 1% ảnh điện di cho thấy các băng ADN sáng, rõ nét, không bị đứt gãy, nồng độ cao, đủ tiêu chuẩn để tiến hành những thí nghiệm tiếp theo (hình 18). Từ 335 mẫu nấm bệnh đạo ôn, sau khi tách chiết ADN, đã thu được 81 mẫu ADN.

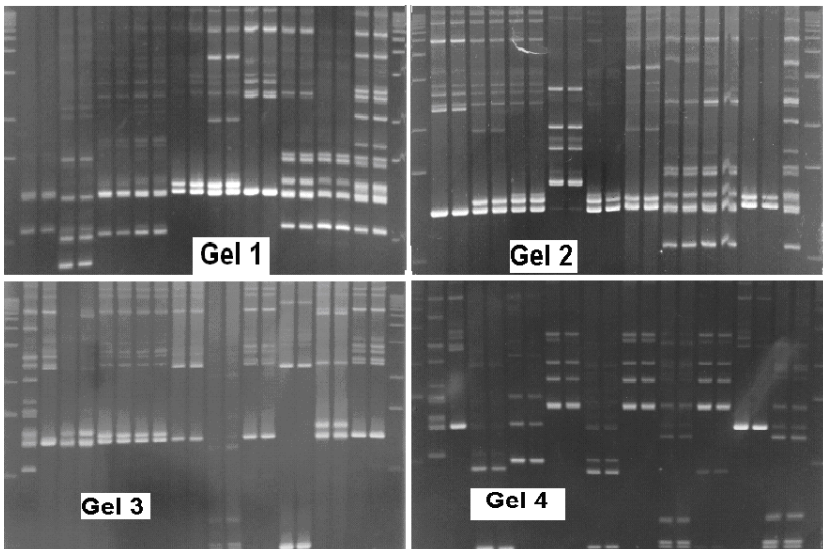


## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN



Hình 18. Ảnh điện di kiểm tra kết quả tách chiết ADN của các mẫu nấm bệnh. Trong đó:  $\lambda_{100}$ : Lamda 100;  $\lambda_{200}$ : Lamda 200; 1-80: ADN của các mẫu nấm đạo ôn

Kết quả nhận dạng ADN của các mẫu nấm đạo ôn đã được tạo ra bởi sử dụng kỹ thuật Pot2 rep-PCR (hình 19). Số lượng băng ADN được tạo ra qua sử dụng kỹ thuật này đối với mỗi mẫu nấm đạo ôn vào khoảng từ 10 đến 25 băng, kích thước các băng có phạm vi từ 500bp tới > 20kb. Kết quả nhận dạng ADN của 81 mẫu nấm bệnh cho thấy có nhiều mẫu có cùng kiểu gen (hình 19)



Hình 19. Hình ảnh nhận dạng ADN của nấm đạo ôn sử dụng mỗi MG1 và MG2



- Phân tích đa dạng di truyền và xác định các chủng nấm đạo ôn

Qua phân tích đã xác định được 23 kiểu gen (haplotype) nấm khác nhau từ 81 mẫu nấm; mỗi một kiểu gen này được xem như một chủng nấm và như vậy đã xác định được 23 chủng (haplotype) nấm. Các chủng nấm được đặt tên từ H1 đến H23 (bảng 1).

Tần số xuất hiện các chủng được tính bằng công thức:

$$A = \frac{B}{\sum \text{isolates}} \times 100$$

Trong đó A: Tần số xuất hiện của một chủng nấm, B: Số mẫu có cùng kiểu gen, Isolates: mẫu nấm

Phân tích cho thấy tần số của các chủng có phạm vi từ 0,01 đến 0,14 (bảng 1); trong đó có 13 chủng có tần số < 0,5 và 10 chủng có tần số > 0,5. Có 4 chủng: H4, H6, H7 và H14 có tần số  $\geq 0,10$  và tương ứng là: 0,14; 0,11; 0,10 và 0,10. Xem xét tần số của các chủng nấm cho thấy mặc dù số lượng chủng là khá đa dạng (23 chủng) tuy vậy chỉ có một số chủng (4 chủng có tần số cao hơn hẳn và trong số 4 chủng đó thì chủng H4 có tần số vượt trội. Kết quả nghiên cứu cho thấy quần thể nấm thu thập tuy đa dạng nhưng chỉ có một vài chủng đóng vai trò chính và có lẽ chúng là những chủng gây bệnh chủ yếu của quần thể nấm và là đại diện để sử dụng trong nghiên cứu xác định các gen kháng ở miền Bắc Việt Nam.



**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

**Bảng 1.** Sự phân bố của các chủng nấm trên cây chủ và các vùng sinh thái

Chủng nấm	Tên mẫu đã thu	Địa điểm thu mẫu	Tần số của chủng	Vùng sinh thái nông nghiệp	Tên giống lúa đã thu mẫu bệnh
H1	S1	Ngọc Thanh - Thị xã Phúc Yên - Vĩnh Phúc	0,05	ĐBSH	Khang dân 18
	S250	Thanh Thủy – Hương Thủy – Huế		BTB	Nếp Đà Nẵng
	S278	Cò Nòi – Mai Sơn – Sơn La		TB	Lúa nương
	S331	Trí Quả - Thuận Thành – Bắc Ninh		ĐB	Q5
H2	S2	Ngọc Thanh – Thị xã Phúc Yên - Vĩnh Phúc	0,01	ĐBSH	Khang dân 18
H3	S6	Trung Mỹ - Bình Xuyên – Vĩnh Phúc	0,02	ĐBSH	Tê thơm
	S8	Trung Mỹ - Bình Xuyên – Vĩnh Phúc		ĐBSH	Tê thơm
H4	S10	Trung Mỹ - Bình Xuyên – Vĩnh Phúc (10)	0,14	ĐBSH	Tê thơm
	S38	Thụy Hưng - Thái Thụy – Thái Bình		ĐBSH	Quảng tế
	S88	Đồng Thanh – Kim Động – Hưng Yên		ĐBSH	CR203
	S107	Vĩnh Bảo – Hải Phòng		ĐBSH	Nếp
	S118	Tân Ninh – Triệu Sơn – Thanh Hóa		BTB	Khang dân 18
	S212	Võ Ninh – Quảng Ninh - Quảng Bình		BTB	VN10
	S218	Sen Thủy – Lệ Thủy – Quảng Bình		BTB	Lúa ngắn ngày
	S229	Vĩnh Chấp – Vĩnh Linh – Quảng Trị		BTB	HT 1
	S232	Vĩnh Chấp – Vĩnh Linh – Quảng Trị		BTB	HT 1
	S284	Cát Đông – Kim Bài – Thanh Oai – Hà Tây		ĐBSH	Khang dân Đột biến
S317	Thôn Trầm – Lai Xá – Hải Dương	ĐBSH	Tê thơm		



Chủng nám	Tên mẫu đã thu	Địa điểm thu mẫu	Tần số của chủng	Vùng sinh thái nông nghiệp	Tên giống lúa đã thu mẫu bệnh
H5	S11	Lý Nhân – Hà Nam	0,04	ĐBSH	CR203
	S67	Thụy Văn - Thái Thụy – Thái Bình		ĐBSH	Tám thơm
	S100	Như Quỳnh - Văn Lâm – Hưng Yên		ĐBSH	Khang dân 18
H6	S16	Lý Nhân – Hà Nam	0,11	ĐBSH	Q5
	S103	Như Quỳnh - Văn Lâm – Hưng Yên		ĐBSH	Khang dân 18
	S110	Vĩnh Bảo – Hải Phòng		ĐBSH	Nếp
	S115	Tân Ninh – Triệu Sơn – Thanh Hóa		BTB	Khang dân 18
	S120	Đồng Lợi – Triệu Sơn – Thanh Hóa		BTB	Q5
	S178	Thạch Kim - Thạch Hà – Hà Tĩnh		BTB	Nếp
	S233	Vĩnh Chấp – Vĩnh Linh – Quảng Trị		BTB	HT 1
	S245	Sư Lộ Thượng – Phú Hồ - Phú Vang – Huế		BTB	IR52
	S268	Hòa An – Phú Hòa – Phú Yên		NTB	ML2002-2
H7	S22	Kim Bảng – Hà Nam	0,10	ĐBSH	Khang dân 18
	S56	Thụy Sơn - Thái Thụy – Thái Bình		ĐBSH	D ưu 527
	S200	Bắc Nghĩa – Đông Hới – Quảng Bình		BTB	Lúa ngắn ngày
	S208	Võ Ninh – Quảng Ninh - Quảng Bình		BTB	VN10
	S253	Thanh Thủy – Hương Thủy – Huế		BTB	Nếp Đà Nẵng
	S257	Cung Sơn – Sơn Hòa – Phú Yên		NTB	Ma Lâm 68
	S265	Hòa An – Phú Hòa – Phú Yên		NTB	ML2002-2
	S271	Mường Chùm – Mường Là – Sơn La		TB	Nếp nương



**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

<b>Chủng nám</b>	<b>Tên mẫu đã thu</b>	<b>Địa điểm thu mẫu</b>	<b>Tần số của chủng</b>	<b>Vùng sinh thái nông nghiệp</b>	<b>Tên giống lúa đã thu mẫu bệnh</b>
H8	S25	Kim Bảng – Hà Nam	0,01	ĐBSH	Khang dân 18
H9	S30	Đông Hoàng – Đông Hung – Thái Bình	0,07	ĐBSH	Hương thơm
	S62	Thụy Sơn - Thái Thụy – Thái Bình		ĐBSH	Bắc thơm
	S316	Thôn Trầm – Lai Xá – Hải Dương		ĐBSH	Tê thơm
	S319	Phù Trầm – Từ Sơn – Bắc Ninh		ĐB	Lúa nếp thơm
	S324	Hoàn Sơn – Tiên Du – Bắc Ninh		ĐB	Nhị ưu 838
	S27	Hương Vinh – Gia Bình - Bắc Ninh		ĐB	Khang dân Đột biến
H10	S93	Toàn Thắng – Kim Động – Hưng Yên	0,05	ĐBSH	HT1
	S128	Hưng Châu – Hưng Nguyên – Nghệ An		BTB	Lúa lai
	S133	Hưng Thắng – Hưng Nguyên – Nghệ An		BTB	Khải phong số 1
	S190	Xóm 4 – Sơn Ninh – Hương Sơn – Hà Tĩnh		BTB	Khang dân 18
H11	S96	Toàn Thắng – Kim Động – Hưng Yên	0,06	ĐBSH	HT1
	S108	Vĩnh Bảo – Hải Phòng		ĐBSH	Nếp
	S109	Vĩnh Bảo – Hải Phòng		ĐBSH	Nếp
	S223	Trường Thủy – Lệ Thủy – Quảng Bình		BTB	Lúa ngắn ngày
	S280	Cò Nòi – Mai Sơn – Sơn La		ĐB	Lúa nương



Chủng năm	Tên mẫu đã thu	Địa điểm thu mẫu	Tần số của chủng	Vùng sinh thái nông nghiệp	Tên giống lúa đã thu mẫu bệnh
H12	S111	Vĩnh Bảo – Hải Phòng	0,06	ĐBSH	Nếp
	S136	Hưng Thắng – Hưng Nguyên – Nghệ An		BTB	Nhị ưu
	S185	Xóm 10 – Sơn Hòa – Hương Sơn – Hà Tĩnh		BTB	Khải phong số 1
	S195	Sơn Diệm – Hương Sơn – Hà Tĩnh		BTB	IR1820
	S230	Vĩnh Chấp – Vĩnh Linh – Quảng Trị		BTB	HT 1
H13	S116	Tân Ninh – Triệu Sơn – Thanh Hóa	0,01	BTB	Khang dân 18
H14	S121	Đồng Lợi – Triệu Sơn – Thanh Hóa	0,10	BTB	Q5
	S231	Vĩnh Chấp – Vĩnh Linh – Quảng Trị		BTB	HT 1
	S294	Thanh Mai – Kim Bài – Hà Tây		ĐBSH	Nếp
	S299	Trầm Lộng - Ứng Hòa – Hà Tây		ĐBSH	Nếp 415
	S304	Quảng Phú Cầu - Ứng Hòa – Hà Tây		ĐBSH	Lúa lai
	S311	Quý Dương – Tân Trường – Hải Dương		ĐBSH	Nếp
	S314	Thôn Trầm – Lai Xá – Hải Dương		ĐBSH	Tê thơm
	S329	Trí Quả – Thuận Thành – Bắc Ninh		ĐB	Q5
H15	S124	Hưng Châu – Hưng Nguyên – Nghệ An	0,05	BTB	IR1820
	S255	Cùng Sơn – Sơn Hòa – Phú Yên		NTB	Ma Lâm 68
	S273	Mường Chùm – Mường La – Sơn La		TB	Nếp nương
	S276	Cò Nòi – Mai Sơn – Sơn La		TB	Lúa nương





**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

<b>Chủng nám</b>	<b>Tên mẫu đã thu</b>	<b>Địa điểm thu mẫu</b>	<b>Tần số của chủng</b>	<b>Vùng sinh thái nông nghiệp</b>	<b>Tên giống lúa đã thu mẫu bệnh</b>
H16	S131	Hưng Châu – Hưng Nguyên – Nghệ An	0,01	BTB	Xi
H17	S173	Xuân Trường – Nghi Xuân – Hà Tĩnh	0,01	BTB	Nếp 415
H18	S235	Phú Hồ - Phú Vang – Huế	0,01	BTB	Khang dân 18
H19	S240	Phú Hồ - Phú Vang – Huế	0,01	BTB	IR64
H20	S260	An Phú – Tuy Hòa – Phú Yên	0,01	NTB	ML2002-2
H21	S289	Bình Đà – Thanh Oai – Hà Tây	0,02	ĐBSH	CR203
	S309	Quý Dương – Tân Trường – Hải Dương		ĐBSH	Nếp
H22	S327	Hoàn Sơn – Tiên Du – Bắc Ninh	0,01	ĐBSH	Nhị ưu 838
H23	S334	Hương Vinh – Gia Bình - Bắc Ninh	0,01	ĐBSH	Khang dân Đột biến



Kết quả phân tích sự đa dạng cho thấy các chủng nấm có quan hệ di truyền với mức độ tương đồng từ 48% đến 93%. Tuy nhiên ở phạm vi tương đồng như vậy, các chủng nấm thể hiện sự khá đa dạng về nguồn gen (hình 20). Từ sự đa dạng về nguồn gen đã cho thấy sự đa dạng về độc tính và khả năng gây bệnh của các chủng nấm.

Nghiên cứu sự phân bố của các chủng nấm trong các vùng sinh thái (bảng 1) cho thấy các chủng H6, H11, H14 phân bố ở 3 vùng, chủng 7 phân bố ở 4 vùng. Chủng H4 có tần số cao nhất nhưng chủ yếu phân bố và gây bệnh ở hai vùng ĐBSH và BTB. Sự phân bố của các chủng trong các vùng cho thấy khả năng phân bố và gây bệnh ở các vùng của mỗi chủng. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy ở mỗi vùng đều có những chủng chính và là chủng đại diện của quần thể nấm; chẳng hạn ở vùng ĐBSH và BTB có chủng H4; ở vùng TB, ĐBSH, BTB và NTB có chủng số H7.

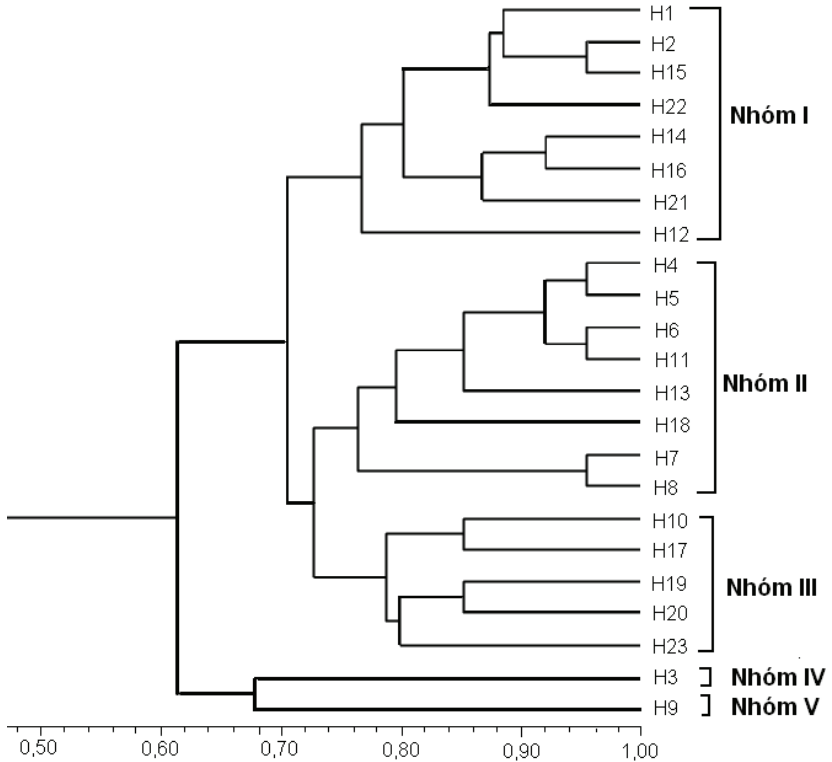
Trên cơ sở sự đa dạng kiểu gen của các chủng nấm, nghiên cứu đã phân tích xác định nhóm nấm nhằm xác định được những chủng đại diện làm vật liệu cho lây nhiễm đánh giá tính kháng bệnh của lúa. Từ phân tích xác định mức độ tương đồng từ 75% đến 100%; sự đa dạng của 23 chủng nấm phân thành 5 nhóm (hình 20, bảng 2) trong đó có 3 nhóm chính và hai nhóm nhỏ. Nhóm 1 gồm các chủng: H1, H2, H15, H22, H14, H16, H21, H12; nhóm 2 gồm các chủng: H4, H5, H6, H11, H13, H18, H7, H8; nhóm 3 gồm các chủng: H10, H17, H19, H20, H23; nhóm 4 gồm chủng: H3; nhóm 5 gồm chủng H9.

Xét tần số của các nhóm nấm cho thấy nhóm II có tần số cao nhất là: 0,48; nhóm I có tần số cao xếp thứ 2 là: 0,32. trong khi đó nhóm IV và V có tần số  $\leq 0,10$  (bảng 3). Qua phân tích tần số nhóm cho thấy có thể nhóm I và II là các nhóm chính đóng vai



PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN

trò quyết định dịch bệnh; hai nhóm này cũng có sự phân bố ở 5 vùng sinh thái nông nghiệp gồm: TB, ĐB, ĐBSH, BTB và NTB.



Hình 20. Cây quan hệ di truyền của các chủng nấm đạo ôn





**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

**Bảng 3.** Sự phân bố của các nhóm năm trong các vùng sinh thái nông nghiệp

Nhóm	Chủng năm	Tần số của chủng	Tần số nhóm	Vùng phân bố
I	H1	0,06	0,48	Đồng bằng sông Hồng, Bắc Trung Bộ, Tây Bắc,
	H2	0,01		
	H15	0,04		
	H22	0,03		
	H14	0,10		
	H16	0,01		
	H21	0,02		
	H12	0,06		
II	H4	0,13	0,48	Tây Bắc, Đông Bắc, Đồng Bằng Sông Hồng, Bắc Trung Bộ, Nam Trung Bộ.
	H5	0,03		
	H6	0,10		
	H11	0,06		
	H13	0,01		
	H18	0,01		
	H7	0,09		
	H8	0,01		
III	H10	0,04	0,10	Đông Bắc, Đồng Bằng Sông Hồng, Bắc Trung Bộ, Nam Trung Bộ.
	H17	0,01		
	H19	0,01		
	H20	0,01		
	H23	0,02		
IV	H3	0,02	0,02	Đồng Bằng Sông Hồng
V	H9	0,09	0,07	Đông Bắc, Đồng Bằng Sông Hồng



Từ kết quả phân tích sự khác biệt di truyền, tần số, phân bố của các chủng và nhóm nấm bệnh đã cho thấy 9 chủng nấm: H1; H4; H6; H7; H9; H10; H11; H12 và H14 là những chủng chính có thể được sử dụng làm vật liệu để lây nhiễm đánh giá xác định sự kháng bệnh của các giống lúa phục vụ công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh cho các vùng sinh thái nông nghiệp khác nhau.

## 2.2. Xác định các gen kháng đạo ôn ở lúa

### 2.2.1. Đánh giá tính kháng đạo ôn của các giống lúa

Nghiên cứu đã sử dụng 23 chủng nấm đạo ôn thu thập ở 5 vùng sinh thái nông nghiệp khác nhau như: Tây Bắc, Đông Bắc, đồng bằng sông Hồng, bắc Trung Bộ và nam Trung Bộ để lây nhiễm lên các giống lúa mang gen kháng đạo ôn do IRRI cung cấp và các giống lúa đang trồng phổ biến nhằm xác định và chọn lọc ra các giống lúa (các gen) có khả năng kháng với các chủng nấm. Đối với thí nghiệm trong nhà lưới được tiến hành trên các cây lúa ở tuổi mạ 21 ngày; đối với thí nghiệm sử dụng ống nghiệm được tiến hành khi lúa đạt 14 – 21 ngày tuổi, cây lúa có 3-5 lá (hình 21).

Sau khi được phun dung dịch bào tử nấm, các cây lúa được giữ trong điều kiện ẩm (90 - 100%) thường xuyên và nhiệt độ thích hợp (25-30°C), để bệnh phát triển trong 7 ngày. Mức độ kháng bệnh của các giống lúa được đánh giá theo thang điểm chuẩn của IRRI (SES, 1996; 2002); những giống được xem là kháng có điểm đánh giá  $\leq 4$ , những giống được xem là nhiễm bệnh có điểm đánh giá từ  $> 4$ .

Kết quả đánh giá được tổng kết và thể hiện trong bảng 4; qua kết quả này đã cho thấy các giống đối chứng nhiễm là:



Co39 và CR203 đã bị nhiễm với đa số các chủng nấm; giống Co39 nhiễm với 21 chủng, giống CR203 nhiễm với 16 chủng trên tổng số 23 chủng được sử dụng để lây nhiễm, tỷ lệ kháng tương ứng của hai giống là 9% và 30%. Các giống đối chứng kháng Moroberekan (giống của IRRI) và giống Tẻ tếp (có nguồn gốc Việt Nam) kháng với đa số các chủng nấm, tương ứng là 18 (tỷ lệ kháng 78%) và 19 (tỷ lệ kháng là 82%) chủng trên tổng số 23 chủng sử dụng để lây nhiễm.

Trong số các giống lúa mang gen do IRRI cung cấp, giống C101LAC mang gen Pi-1 có khả năng kháng rộng nhất, kháng được 19 trong số 23 chủng nấm, tỷ lệ kháng là 82%; tiếp đó giống Moroberekan mang gen Pi-5 kháng được 18 (tỷ lệ kháng là 78%) trên 23 chủng nấm. Hai giống lúa C101PKT và C104PKT mang gen Pi-4 và Pi-3 có khả năng kháng tương ứng với 15 và 14 chủng trên 23 chủng, tỷ lệ kháng tương ứng là 65% và 60%.



Hình 21. Hình ảnh các giống lúa trước khi lây nhiễm bệnh





Hình 22. Hình ảnh lấy nhiễm đạo ôn trên các giống lúa

Các giống lúa: CR203; Khang dân 18; Q5; DT5; DT7 phần lớn bị nhiễm với các chủng nấm, tỷ lệ kháng của chúng với các chủng nấm <50%. Các giống lúa này cần được cải tạo chuyển gen kháng vào chúng.

### 2.2.2. Xác định gen kháng đạo ôn ở lúa

Qua thí nghiệm lấy nhiễm để xác định các gen kháng ở trên, chúng tôi thấy rằng gen Pi-1; Pi-5; Pi-3; Pi-ta/Pi-4 (lần lượt có trong các giống lúa: C101LAC, Moroberekan, C104PKT, C101PKT) đều kháng tốt với các chủng nấm ở các vùng sinh thái nông nghiệp miền Bắc, tỷ lệ kháng với các chủng nấm của chúng trên 60%. Các gen kháng nói trên sẽ được sử dụng để quy tụ vào giống lúa để cải tạo tính kháng của chúng.

Qua kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh của các gen đối với nấm đạo ôn thu thập ở miền Bắc Việt Nam; chúng tôi đã chọn hai gen Pi-1 và gen Pi-5 có khả năng kháng bệnh tốt nhất (tương ứng là 82% & 78%) để sử dụng lai quy tụ vào dòng lúa DT7. Hai gen Pi-1 và Pi-5 tương ứng nằm trên 2 nhiễm sắc thể số 11 và 9.





## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN

**Bảng 4.** Kết quả lây nhiễm các chủng nấm đạo ôn lên các giống lúa

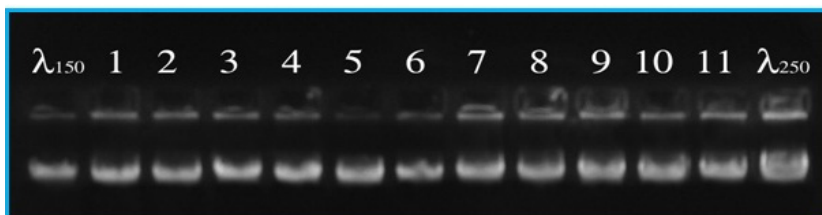
Chủng nấm	Giống lúa												Tỷ lệ R/S
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	
H1	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	6/6
H2	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	6/6
H3	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	8/4
H4	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	3/9
H5	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	5/7
H6	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	5/7
H7	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	6/6
H8	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	8/4
H9	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	7/5
H10	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	5/7
H11	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	4/8
H12	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	3/9
H13	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	8/4
H14	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	3/9
H15	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	6/6
H16	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10/2
H17	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	6/6
H18	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	6/6
H19	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	7/5
H20	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	5/7
H21	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	3/9
H22	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	8/4
H23	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	8/4
Tỷ lệ R/S	19/4	15/8	14/9	12/11	18/5	19/4	2/21	7/16	5/18	7/16	10/13	9/14	
	82%	65%	60%	52%	78%	82%	9%	30%	22%	30%	43%	39%	



**Ghi chú:** K1: C101LAC (Pi-1); K2: C101PKT (Pi-ta/Pi-4); K3: C104PKT (Pi-3); K4: C101A51 (Pi-2); K5: Moroberekan (Pi-5); K6: Tẻ tếp; K7: CO39; K8: CR203; K9: KD 18; K10: Q5; K11: DT5; K12: DT7; R: Kháng bệnh; S: Nhiễm bệnh. Từ H1 - H23 là ký hiệu các chủng nấm đạo ôn.

Thông qua kết quả phân tích và đánh giá, chúng tôi đã xác định được 3 gen kháng hiệu quả với các chủng nấm đạo ôn được thu thập là: Pi-1; Pi-ta/Pi-4 và Pi-5; các gen kháng này có mặt tương ứng trong các giống lúa C101LAC (Pi-1); C101PKT (Pi-ta/Pi-4) và Moroberekan (Pi-5).

ADN của các giống lúa trên đã được tách chiết để sử dụng cho các phản ứng PCR. Quy trình này đã được điều chỉnh nhằm đáp ứng những yêu cầu của nghiên cứu như: đảm bảo độ tinh sạch và nguyên vẹn, nồng độ của ADN tổng số thu được; quy trình đơn giản; không đòi hỏi thiết bị, hóa chất đặc biệt và thời gian tách chiết một mẫu ADN ngắn.

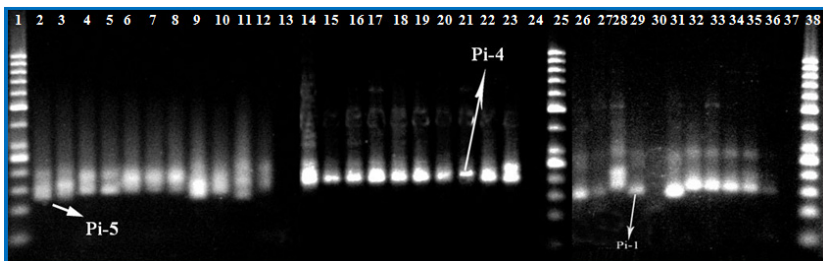


Hình 23. Hình ảnh ADN tổng số của các giống lúa nghiên cứu

Trong đó:  $\lambda_{150}$ ,  $\lambda_{250}$ : mẫu chuẩn Lamda 150 và 250; 1: là giống C101LAC; 2 là giống C101PKT; 3 là giống C104PKT; 4 là giống C101A51; 5 là giống Moroberekan; 6 là giống Tẻ tếp; 7 là giống CO39; 8 là giống CR203; 9 là giống KD 18; 10 là giống Q5; 11: là giống DT7.



Kết quả tách chiết đã thu được ADN nguyên vẹn, không lẫn tạp và có nồng độ khá cao, từ 50 đến hơn 150 ng/μl, hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu cho phản ứng nhân gen PCR (hình 23). Sau khi kiểm tra, các mẫu ADN tổng số được pha loãng ở nồng độ 25~50 ng/μl làm khuôn cho phản ứng PCR. Kết quả phân tích sự có mặt của các gen Pi-1, Pi-ta/Pi-4 và Pi-5 được chỉ ra trong các ảnh điện di sử dụng các mồi SSR-PCR là RM1233, YL15/154 và JJ113-T3 (hình 24).



Hình 24. Ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của gen kháng Pi-1, Pi-ta/Pi-4 và Pi-5 với các mồi RM1233, YL15/154 và JJ113-T3. Trong đó: 2 là giống Moroberekan; 21 là giống C101PKT; 29 là giống C101LAC; 13, 24, 37 là mẫu đối chứng âm; còn lại là các giống lúa nghiên cứu.

## 2.3. Kết quả chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn

### 2.3.1. Lai quy tụ gen kháng bệnh đạo ôn vào lúa

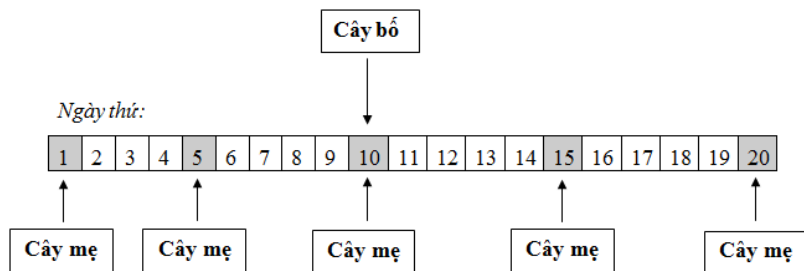
- Quy tụ gen kháng đạo ôn (Pi-1, Pi-5) vào các giống lúa

Mục tiêu của quy tụ gen là đưa gen kháng vào các giống lúa có năng suất và phẩm chất tốt để nâng cao khả năng kháng bệnh và đồng thời không làm mất đi những đặc tính quý của giống. Để đạt được mục tiêu nói trên, phương pháp lai trở lại sẽ giúp đưa trở lại dần những đặc tính quý của cây vào các thế hệ con cháu; tuy nhiên muốn lựa chọn những cây mang gen ở các thế hệ, chúng ta phải sử dụng chỉ thị phân tử liên kết với gen để chọn lựa những cây mang gen kháng; những cây mang gen kháng sau đó được sử dụng phát triển cho các thế hệ tiếp theo.



+ Kỹ thuật lai tạo

Các giống lúa sử dụng cho lai được tiến hành gieo, cấy thành nhiều đợt. Trong đó, cây mẹ sẽ được gieo trước, cùng và sau cây bố ở các thời điểm khác nhau, tương ứng 5 và 10 ngày (do các giống có thời gian sinh trưởng khác nhau, hình 25).



Hình 25. Sơ đồ bố trí ngày gieo các giống lúa để lai

Trong đó, các giống lúa cho gen kháng đạo ôn (gen Pi-1 và Pi-5) được dùng làm cây bố; các giống lúa có đặc điểm nông sinh học tốt (có năng suất cao, phẩm chất tốt, đang được gieo trồng phổ biến ngoài sản xuất.v.v.) được dùng làm cây mẹ ở thế hệ lai  $F_1$ .

Khi cây bố, mẹ đã có hoa tiến hành chọn những hoa phát triển tốt có thể tạo nên hạt lai phát triển một cách bình thường; mỗi bông lúa chỉ chọn từ 20-25 hoa ở phần giữa của bông; sử dụng kỹ thuật khử đực bằng panh và kéo, chọn thời điểm khử đực thích hợp, có thể tiến hành khử đực trước 1-5 ngày rồi thụ phấn - khử đực vào lúc chiều mát; tiến hành thụ phấn vào khoảng thời gian từ 9:00-12:00h sáng (tốt nhất là từ 10-12 giờ), nếu gặp hôm trời râm mát có thể tiến hành lai tạo muộn hơn; có thể tiến hành lai bằng cách dũ phấn lên cây mẹ đã được khử đực (cầm cả bông lúa của cây bố dũ phấn lên cây mẹ) hoặc tiến



hành dùng panh gấp nhị đực của cây bố vào từng hoa lúa của cây mẹ (đã khử đực) sau đó dùng bao giấy can chụp lên những bông lúa vừa đực thụ phấn để bao cách ly.

+ Quy tụ gen kháng Pi-1; Pi-5 vào các giống lúa

Nghiên cứu đã tiến hành thực hiện các cặp lai quy tụ, chuyển gen kháng (Pi-1 & Pi-5) vào các giống lúa (Bảng 5) BT7, CR203, KD 18, Q5 và DT7 để chọn các dòng lúa mang gen kháng đạo ôn.

\* Đặc nông sinh học của một số giống lúa nghiên cứu:

*Giống Q5*: là giống lúa thuần nhập nội từ Trung Quốc năm 1993, được trồng phổ biến ở phía Bắc, theo điều tra năm 2000, tổng diện tích Q5 đạt 350.000 ha. Q5 là giống lúa cảm ôn, ở trà xuân muộn có thời gian sinh trưởng 135-140 ngày, ở trà mùa sớm có thời gian sinh trưởng 110-115 ngày; chiều cao cây 90-95 cm, khả năng đẻ nhánh khá, phiến lá cứng, góc lá hẹp, gợn lá, trổ gợn. Hạt bầu, màu vàng sáng, khối lượng nghìn hạt từ 25-26 gram. Chất lượng gạo ở mức độ trung bình, năng suất trung bình đạt 45-50 tạ/ha, cao có thể đạt 60-65 tạ/ha; khả năng chống đổ khá, nhiễm nhẹ một số loại bệnh hại chính.





Hình 26. Hình ảnh một số giống lúa được sử dụng trong lai tạo

**Giống Khang dân 18 (KD 18):** là giống lúa thuần Trung Quốc nhập nội vào Việt Nam từ vụ mùa 1996 và được nhiều địa phương khảo nghiệm trồng thử. KD 18 là giống phổ biến nhất ở phía Bắc và miền Trung, theo kết quả điều tra năm 2000, diện tích KD đạt 48.000 ha. KD 18 là giống lúa ngắn ngày, thời gian sinh trưởng vụ Xuân 130-135 ngày, vụ Mùa 105-110 ngày; chiều cao cây đạt 95-100 cm, phiến lá cứng, rộng, gọn khóm, màu xanh vàng. Khả năng đẻ nhánh ở mức độ trung bình-kém. Hạt thon, nhỏ, màu vàng đẹp, khối lượng nghìn hạt trung bình



đạt từ 19,5-20 gram. Chất lượng gạo tốt, năng suất trung bình đạt 40-45 tạ/ha, cao có thể đạt 55-60 tạ/ha. Khả năng chống đổ ở mức độ trung bình, nhiễm một số bệnh như khô vằn, đạo ôn từ mức độ nhẹ đến trung bình. KD là giống lúa có khả năng thích ứng rộng.

*Giống Bắc thơm số 7 (BT7):* là giống lúa thuần Trung Quốc nhập nội vào Việt Nam từ năm 1992. Hiện nay là một trong những giống lúa có chất lượng gạo cao, được gieo trồng phổ biến ở phía Bắc; đặc biệt ở khu vực sông Hồng. BT7 có thể gieo cấy được cả hai vụ trong năm; vụ Xuân muộn có thời gian sinh trưởng 135-140 ngày, vụ Mùa sớm có thời gian sinh trưởng từ 115-120 ngày. Chiều cao cây trung bình đạt 90-95 cm, khả năng đẻ nhánh khá, thời gian trổ kéo dài, hạt thon nhỏ, màu vàng sẫm, khối lượng nghìn hạt đạt từ 19-20 gram, cơm mềm, thơm. Năng suất trung bình đạt 35-40 tạ/ha, cao có thể đạt 45-50 tạ/ha. BT7 có khả năng chống đổ ở mức độ trung bình; bị nhiễm rầy nâu, đạo ôn, khô vằn từ nhẹ đến trung bình, nhiễm bạc lá ở vụ Mùa.

*Giống lúa CR203:* là giống có chiều cao từ 95 - 100cm, có thời gian sinh trưởng 150 - 160 ngày vào vụ Xuân chính vụ, 120 - 130 ngày vào vụ Xuân muộn và 115 - 120 ngày vào vụ Mùa. Năng suất vào khoảng 50 - 65 tạ/ha. CR203 là giống nhiễm đạo ôn nặng khi được lây nhiễm với các chủng nấm bệnh hoặc trong điều kiện có dịch bệnh phát triển.

*Giống lúa DT7:* được chọn tạo ra qua đột biến giống lúa Bắc thơm 7 bằng phóng xạ tia gama Cobalt 60 ( $^{60}\text{Co}$ ) và được chọn lọc qua một số thế hệ. Dòng lúa DT7 gieo cấy được cả 2 vụ/năm. Vụ xuân có thời gian sinh trưởng 125-130 ngày. Vụ mùa



có thời gian sinh trưởng 115-120 ngày. Chiều cao cây trung bình 120-130cm; chịu thâm canh trung bình, khả năng chống chịu một số sâu bệnh tốt; tuy nhiên bị nhiễm bệnh đạo ôn (bảng 4). Năng suất trung bình của dòng lúa DT7 đạt 60-65 tạ/ha. Gạo trong, cơm mềm thơm nhẹ do kế thừa được chất lượng của giống lúa Bắc thơm số 7.

**Bảng 5.** Các cặp lai giữa giống lúa cho và nhận gen kháng đạo ôn

Giống lúa	BT7 (♀)	CR203 (♀)	KD 18 (♀)	Q5 (♀)	DT7 (♀)
C101LAC (♂)	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>
Moroberekan BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>

*\*Lai quy tụ gen kháng Pi-1 và Pi-5 vào dòng lúa DT7*

Định hướng của đề tài là quy tụ gen kháng đạo ôn vào các giống lúa có đặc tính nông sinh học tốt (có năng suất cao, chất lượng tốt.v.v). Do đó, trong nghiên cứu này sau khi xác định được gen hai gen Pi-1 và Pi-5 kháng hiệu quả với các chủng nấm đạo ôn được phân lập ở phía Bắc, đề tài đã tiến hành lai quy tụ chúng vào dòng lúa DT7, quy trình lai quy tụ được thể hiện ở sơ đồ hình 10 và hình 11.

Chúng tôi đã tiến hành lai quy tụ gen kháng Pi-1 và Pi-5 vào dòng lúa DT7 tới thế hệ BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>; quá trình lai đưa hai gen vào dòng lúa DT7 được tiến hành theo hai phép lai riêng rẽ. Ở thế hệ lai F<sub>1</sub> do tất cả các cây lai có cùng kiểu gen nên chọn ngẫu nhiên một số cây có khả năng sinh trưởng phát triển tốt để sử dụng làm cây mẹ trong phép lai ở thế hệ lai tiếp theo. Từ thế hệ BC<sub>1</sub> trở đi cây nhận gen ban đầu (dòng lúa DT7) được sử dụng làm bố trong phép lai để đưa (lai) dần và làm tăng “hàm lượng kiểu gen” của nó vào các thế hệ tiếp theo. Qua phương pháp lai quy tụ và lựa chọn như vậy, đề tài đã chọn được những cây lúa BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> vừa mang gen kháng đạo ôn Pi-1 và Pi-5 vừa có “hàm lượng kiểu gen” ưu tú





của dòng lúa DT7 chiếm đa số (theo lý thuyết nó chiếm khoảng 93,75% ở thế hệ  $BC_3F_1$ ).

\* Lai quy tụ cả hai gen kháng (Pi-1, Pi-5) vào cùng một giống lúa:

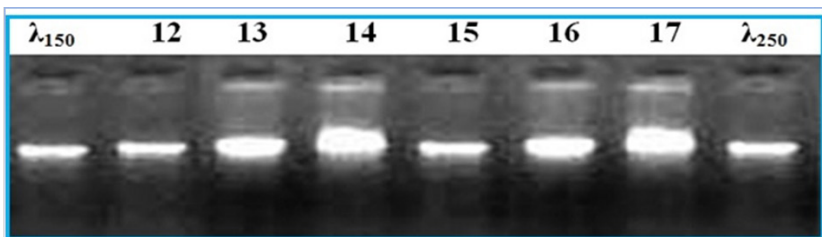
Sau khi đồng thời quy tụ và chọn lọc được thế hệ cây lai  $BC_3F_1$  qua quy tụ 2 gen kháng đạo ôn Pi-1 và Pi-5. Tới thế hệ  $BC_3F_1$  chúng tôi cho chúng tự thụ để thu thế hệ  $BC_3F_2$ .

Khi đã có được các cá thể  $BC_3F_2$  mang gen Pi-5 và gen Pi-1 ở dạng đồng hợp tử. Chúng tôi đã tiến hành lai tạo đưa 2 gen Pi-1 và Pi-5 vào cùng một cá thể, sau khi được thế hệ  $F_1$  cho chúng tự thụ để được thế hệ  $F_2$ .

Kết quả đề tài đã xác định được 25 cá thể mang hai gen kháng (Pi-1&Pi-5) ở dạng đồng hợp tử.

### 2.3.2. Sử dụng chỉ thị phân tử để chọn các cây lúa mang gen kháng đạo ôn

Đề tài đã tiến hành tách chiết và thu được các mẫu ADN tổng số của các thế hệ BC và con lai khác nhau. Kết quả tách chiết ADN của các thế hệ BC và con lai thu được ADN nguyên vẹn, không lẫn tạp và có nồng độ khá cao, từ 50 đến hơn 150 ng/ $\mu$ l, hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu cho phản ứng nhân gen PCR (hình 27).



Hình 27. Hình ảnh ADN tổng số của các cá thể BC và con lai

Trong đó:  $\lambda_{150}$ ,  $\lambda_{250}$ : Lamda 150 và 250; 12-17: Các cá thể BC và con lai.



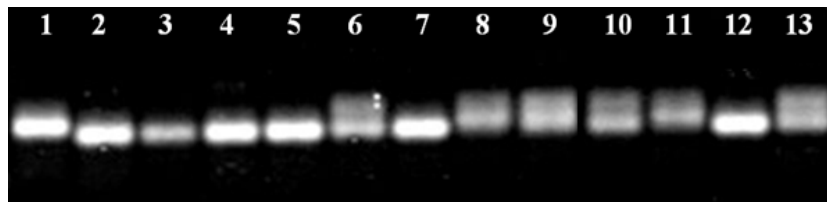
Sau khi kiểm tra, các mẫu ADN tổng số được pha loãng ở nồng độ 25~50 ng/μl làm khuôn cho phản ứng PCR nhận dạng ADN.

Khi “hàm lượng gen” của dòng lúa DT7 tăng lên thì khả năng các gen kháng sẽ bị mất (do bị đẩy ra ngoài trong quá trình lai). Vì vậy, ở mỗi thế hệ BC chúng tôi đã sử dụng chỉ thị JJ113-T3 để chọn cây lúa mang gen Pi-5 và chỉ thị RM1233 để chọn cây lúa mang gen Pi-1.

*\* Đối với cặp lai DT7 x C101LAC:*

Tiến hành lai trở lại (BC) giữa con lai F<sub>1</sub> (của cặp lai giữa dòng DT7 và giống C101LAC) với dòng DT7, kết quả thu được thế hệ lai thứ nhất. Tiến hành tách chiết ADN, sử dụng chỉ thị phân tử RM1233 để chọn những cá thể mang gen Pi-1 (hình 28).

Những cây lúa có kiểu gen kháng đạo ôn dị hợp tử được lựa chọn làm vật liệu để thực hiện các phép lai hồi quy tiếp theo.

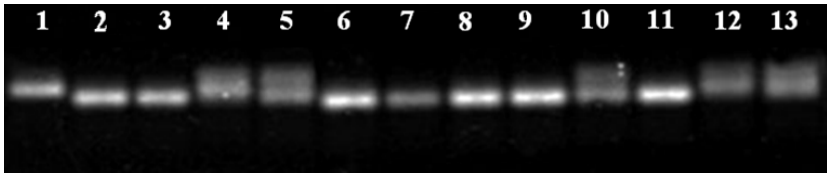


Hình 28. Hình ảnh sử dụng chỉ thị phân tử RM1233 để chọn lựa cây lúa mang gen kháng Pi-1. Trong đó: 1. Giống C101LAC; 2. Dòng DT7; 3 - 14. Các cá thể BC1F1.

Theo kết quả trên ảnh điện di trên hình 28; các cây lúa được đánh số thứ tự 6, 8, 9, 10, 11, 13 sẽ được lựa chọn do có kiểu gen kháng Pi-1 dị hợp tử. Tiến hành lai để thu thế hệ tiếp theo.

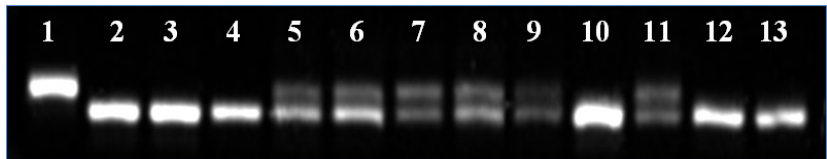


## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN



Hình 29. Hình ảnh sử dụng chỉ thị phân tử RM1233 để chọn lựa cây lúa mang gen kháng Pi-1. Trong đó: 1 là giống C101LAC; 2 là dòng DT7; 3-13 là các cá thể BC2F1.

Theo kết quả trên ảnh điện di hình 29; các cây lúa được đánh số thứ tự 4, 5, 10, 12 và 13 (các số thứ tự ở hình 29 không tương ứng với hình 28) sẽ được lựa chọn do có kiểu gen kháng Pi-1 dị hợp tử. Tiến hành lai để thu thế hệ tiếp theo.



Hình 30. Hình ảnh sử dụng chỉ thị phân tử RM1233 để chọn lựa cây lúa mang gen kháng Pi-1. Trong đó: 1 là giống C101LAC; 2 là dòng DT7; 3-13 là các cá thể BC3F1.

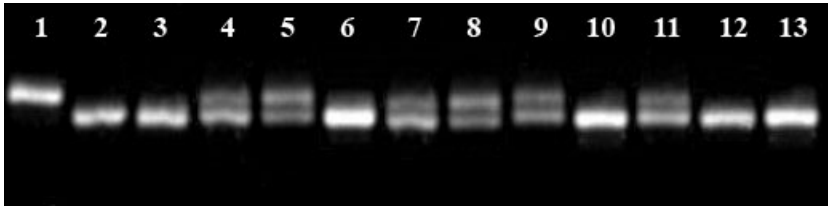
Theo kết quả trên ảnh điện di hình 30; các cây lúa được đánh số thứ tự 5, 6, 7, 8, 9 và 11 (các số thứ tự ở hình 30 không tương ứng với hình 29) sẽ được lựa chọn do có kiểu gen kháng Pi-1 dị hợp tử. Qua kết quả nghiên cứu, đã chọn tạo được 25 cây lúa mang gen Pi-1.

### \* Đối với cặp lai DT7 x Moroberekan

Tiến hành lai trở lại (BC) giữa con lai  $F_1$  (của cặp lai giữa dòng DT7 x giống Moroberekan) với dòng DT7, kết quả thu được thế hệ lai thứ nhất. Tiến hành tách chiết ADN, sử dụng chỉ thị phân tử JJ113-T3 để chọn những cá thể mang gen Pi-5 (hình 31).

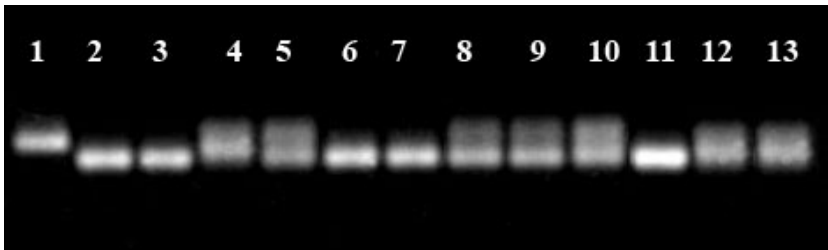


Những cây lúa có kiểu gen kháng đạo ôn dị hợp tử được lựa chọn làm vật liệu để thực hiện các phép lai hồi quy tiếp theo.



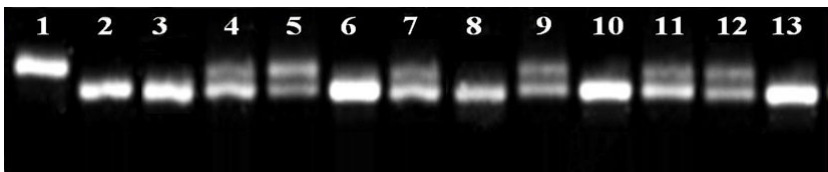
Hình 31. Hình ảnh sử dụng chỉ thị phân tử JJ113-T3 để chọn lựa cây lúa mang gen kháng Pi-5. Trong đó: 1. Giống Moroberekan; 2. Dòng DT7; 3-13. Các dòng lúa BC1F1.

Theo kết quả trên ảnh điện di hình 31; các cây lúa được đánh số thứ tự 4, 5, 7, 8, 9 và 11 sẽ được lựa chọn do có kiểu gen kháng Pi-5 dị hợp tử để sử dụng cho lai tạo tiếp theo.



Hình 32. Hình ảnh sử dụng chỉ thị phân tử JJ113-T3 để chọn lựa cây lúa mang gen kháng Pi-5. Trong đó: 1 là giống Moroberekan; 2 là dòng DT7; 3-13 là các dòng lúa BC2F1.

Theo kết quả trên ảnh điện di hình 32; các cây lúa được đánh số thứ tự 4, 5, 8, 9, 10, 12 và 13 (các số thứ tự ở hình 32 không tương ứng với hình 31) sẽ được lựa chọn do có kiểu gen kháng Pi-5 dị hợp tử để tiến hành lai tạo tiếp theo.



Hình 33. Hình ảnh sử dụng chỉ thị phân tử JJ113-T3 để chọn lựa cây lúa mang gen kháng Pi-5. Trong đó: 1 là giống Moroberekan; 2 là dòng DT7; 3-13 là các dòng lúa BC3F1.



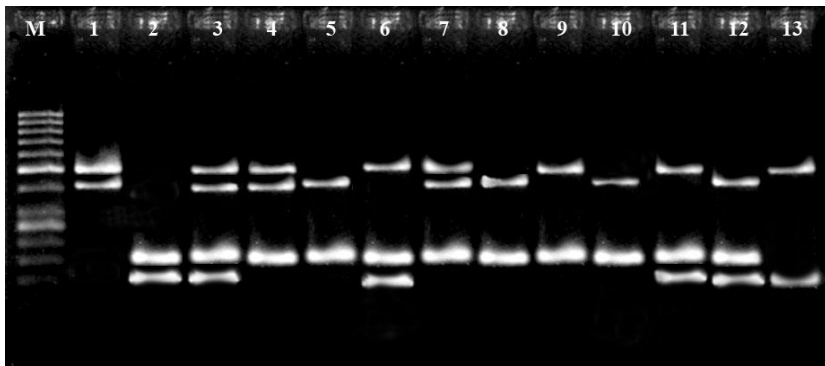
## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN

Theo kết quả trên ảnh điện di hình 33; các cây lúa được đánh số thứ tự 4, 5, 7, 9, 11 và 12 (các số thứ tự ở hình 33 không tương ứng với hình 32) sẽ được lựa chọn do có kiểu gen kháng Pi-5 dị hợp tử. Qua kết quả nghiên cứu, đã chọn tạo được 25 cây lúa mang gen Pi-5.

*\*Sử dụng chỉ thị phân tử để chọn cây lúa mang cả hai gen kháng*

Sau khi nhận được hạt  $F_1$  của tổ hợp lai giữa cá thể mang gen Pi-1 và gen Pi-5, tiến hành cho tự thụ để thu các hạt  $F_2$ . Sử dụng đồng thời 2 mỗi PCR gồm: RM1233 và JJ113-T3 (gen Pi-1 được xác định bởi mỗi RM1233, kích thước băng ADN là 175bp; gen Pi-5 được xác định bởi mỗi JJ113-T3, kích thước băng ADN 484bp) để xác định các cây lúa mang gen Pi-1 và Pi-5 kháng đạo ôn ở dạng đồng hợp tử gen kháng.

Kết quả đã xác định và chọn những cá thể mang hai gen kháng (Pi-1&Pi-5) ở dạng đồng hợp tử (hình 34), các cá thể này được chăm sóc để phát triển thành một dòng lúa.



Hình 34. Hình ảnh sử dụng hai chỉ thị phân tử RM1233 và JJ113-T3 để chọn lựa cây lúa mang 2 gen Pi-1&Pi-5. Trong đó: 1 là giống Moroberekan; 2 là giống C101LAC; 3-12 là các cây lúa  $F_2$ .

Tiến hành lựa chọn những cá thể mang hai gen kháng (Pi-1&Pi-5) ở dạng đồng hợp tử để thu hạt phục vụ cho các thí



nghiệm tiếp theo.

Sau khi xác định sự có mặt của gen kháng trong giống lúa; chúng tôi đã tiến hành đánh giá tính kháng cũng như các đặc tính nông sinh học tiến tới lựa chọn dòng lúa ưu tú.

## 2.4. Đánh giá và tuyển chọn giống lúa kháng đạo ôn

### 2.4.1. Đánh giá tính kháng đạo ôn

Trong nghiên cứu đã sử dụng phương pháp đánh giá tính kháng đạo ôn của IRRI (IRRI, 2002). Sau khi được phun dịch bào tử nấm, các cây lúa được giữ trong điều kiện ẩm từ 90-100% và nhiệt độ từ 25-30°C trong vòng 7 ngày để bệnh phát triển. Những giống được xem là kháng có điểm đánh giá  $\leq 4$ , những giống được xem là nhiễm có điểm đánh giá  $>4$ .

Kết quả đánh giá đã cho thấy, các giống đối chứng nhiễm là: giống Co39 nhiễm 14 trên 23 chủng, tỷ lệ nhiễm 61%; giống CR203 nhiễm 15 trên 23 chủng, tỷ lệ nhiễm 65%; các giống: C1010LAC và Moroberekan kháng đa số với các chủng nấm, tương ứng là 87% và 83%. Các dòng lúa mang 02 gen kháng có phạm vi kháng từ 52-87%; trong đó các dòng: số 7, số 9, số 13, số 15 và số 17 kháng với đa số các chủng nấm và tỷ lệ kháng tương ứng là: 87%, 78%, 87% và 78% (bảng 6).



## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ỒN

**Bảng 6:** Dữ liệu kháng đạo ôn của các giống lúa

Chủng năm	Giống lúa																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
H1	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
H2	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
H3	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R
H4	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S
H5	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
H6	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R
H7	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R
H8	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R
H9	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R
H10	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R
H11	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
H12	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S
H13	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R
H14	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R
H15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R
H16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H17	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H18	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R
H19	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
H20	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
H21	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
H22	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H23	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
R2S	167	158	1310	149	158	167	203	1211	185	176	176	167	185	149	203	149	185	1310	1211	185	914	815	203	194
%	70	65	56	61	65	70	87	52	78	74	74	70	78	65	87	61	78	56	52	65	40	31	87	83

Trong đó: từ 1-20 là các giống lúa mang O2 gen kháng (P1-1&P1-5); 21 là giống C039; 22 là giống CR203; 23 là giống C101LAC  
(P1-1); 24 là giống Moroberekan (P1-5). R: Kháng bệnh; S: Nhiễm bệnh. Từ H1-H23 là các chủng năm đạo ôn.



### 2.4.2. Đánh giá một số đặc điểm nông học chính của các dòng lúa

Thông qua kết quả đánh giá đặc điểm nông sinh học và các yếu tố cấu thành năng suất, đề tài đã lựa chọn được một số dòng lúa có tiềm năng năng suất cao như các dòng: số 7, số 9, số 15, số 16, số 17, số 19 và số 20 đạt trên 55 tạ/ha. Đặc biệt là dòng số 15, đạt 57,4 tạ/ha và có thời gian sinh trưởng từ 110 - 125 ngày.



Hình 35. Hình ảnh dạng hình cây mạ và cây lúa của dòng lúa NB-01

Nghiên cứu đã lựa chọn dòng 15 để tiếp tục đánh giá và đặt tên cho dòng lúa này là NB-01. Qua đánh giá cho thấy đặc điểm nông học của dòng lúa này là:

Cây cao trung bình 115 - 120 cm, dạng hình cây gọn, lá dòng đứng có chiều dài trung bình từ 24-26 cm, rộng 1,3-1,6 cm, màu xanh nhạt, đẻ nhánh khá số bông/khóm đạt 6-8 bông/khóm, chịu thâm canh trung bình, khả năng chống chịu sâu bệnh tốt hơn Bắc Thơm 7,  $P_{1000}$  hạt  $\approx$  22 gram, bông to, dài, trong đó tổng số hạt đạt từ 245-280 hạt/bông, có những bông số hạt lên tới 400-480 hạt/bông, số hạt chắc đạt 200 - 250 hạt/bông. Màu sắc vỏ trấu, do kế thừa được chất lượng của giống Bắc thơm 7 nên có màu nâu nhạt, hạt gạo trong, cơm mềm, thơm nhẹ; năng suất trung bình 55-60 tạ/ha, thâm canh cao có thể đạt 70 tạ/ha (bảng





**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

7, hình 35 và hình 36). Đây là dòng lúa cảm ôn, có thể gieo cấy được cả 2 vụ/năm và có thời gian sinh trưởng: vụ Xuân: 120 - 125 ngày và vụ Mùa: 110 - 115 ngày.

**Bảng 7.** Tính trạng nông học chính của các dòng lúa mang gen kháng đạo ôn

Dòng lúa	Tính trạng						
	Chiều dài lá đòng (cm)	Chiều rộng lá đòng (cm)	Chiều cao cây (cm)	Số bông /khóm	Chiều dài bông (cm)	TGST (ngày)	NSLT (tạ/ha)
1	32,0	2,0	96,6	6-8	27,6	104-110	43,2
2	31,5	2,3	91,0	5-9	28,0	90-95	44,5
3	34,0	2,5	108,0	4-7	25,0	108-115	45,6
4	38,0	2,3	97,2	6-8	27,0	100-105	44,1
5	37,2	2,5	96,6	4-7	27,6	98-105	47,4
6	36,0	2,5	97,2	5-9	27,2	100-107	43,5
7	38,7	3,1	137,0	4-6	24,0	140-145	59,7
8	25,7	2,5	101,5	4-6	28,5	100-105	50,4
9	34,6	2,3	132,5	5-8	32,0	132-136	55,5
10	39,0	2,5	124,7	4-8	29,7	120-125	54,2
11	33,5	2,3	105,2	5-8	24,2	108-115	50,1
12	28,0	2,4	101,0	3-7	25,0	110-117	52,7
13	44,2	2,8	119,0	5-7	28,0	111-118	50,5
14	33,0	2,2	87,0	6-9	20,5	100-109	42,3
15	37,2	2,4	114,5	6-9	28,5	110-125	57,4
16	41,0	2,7	128,3	4-6	28,8	130-135	56,5
17	40,6	2,4	115,5	6-7	25,5	110-120	55,7
18	36,0	2,3	103,5	6-8	24,0	104-115	53,7
19	38,5	2,2	119,9	4-6	27,4	120-125	56,7
20	42,2	2,4	126,0	6-9	28,0	135-143	57,3





Hình 36. Một số hình ảnh của dòng lúa NB-01 trên đồng ruộng

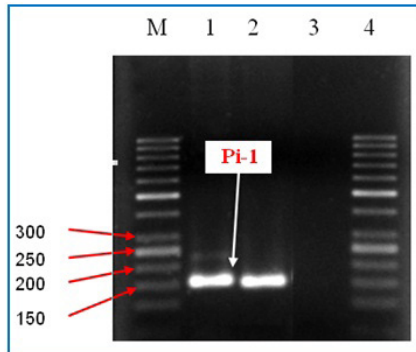


Hình 37. Một số hình ảnh của dòng lúa NB-01 trên đồng ruộng

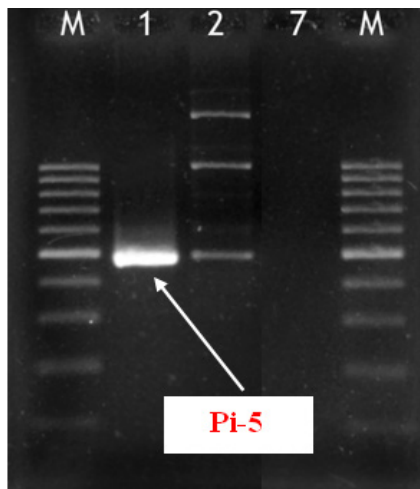


### 2.4.3. Kiểm tra sự có mặt của gen kháng Pi-1&Pi-5 trong dòng lúa NB-01

Mặc dù đã được phát triển từ những dòng lúa mang gen kháng đạo ôn; tuy vậy trong nghiên cứu này chúng tôi vẫn tiến hành kiểm tra sự có mặt của các gen kháng Pi-1 và Pi-5 của dòng lúa NB0-1.



Hình 38. Ảnh điện di xác định gen Pi-1 sử dụng môi RM1233. Trong đó các cột M: là Marker; 1: là dòng lúa NB-01; 2: là giống lúa C101LAC; 3: là mẫu đối chứng âm.



Hình 39. Ảnh điện di xác định gen Pi-5 sử dụng môi JJ113-T3. Trong đó các cột M: là Marker; 1: là dòng lúa NB-01; 2: là giống lúa Moroberekan; 3: là mẫu đối chứng âm.



Qua phân tích sự có mặt của gen bằng chỉ thị SSR cho thấy dòng lúa NB-01 mang cả hai gen kháng Pi-1 và Pi-5 vì kết quả PCR cho thấy alen Pi-1 khi sử dụng mỗi RM1233 và alen Pi-5 khi sử dụng mỗi JJ113-T3 (mỗi RM1233 liên kết với gen Pi-1 và mỗi JJ113-T3 liên kết với gen kháng Pi-5).

#### 2.4.4. Kết quả khảo nghiệm và sản xuất thử

Nghiên cứu tiến hành đánh giá các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực thu của dòng lúa NB-01 tại trạm Khảo nghiệm giống Cây trồng và Phân bón Văn Lâm, tỉnh Hưng Yên.

Khảo nghiệm được tiến hành thành theo Quy phạm quốc gia. Mạ được được sử dụng cấy trong ô thí nghiệm là: 720m<sup>2</sup> với 2 phương pháp: cấy 1 dảnh trong diện tích 360m<sup>2</sup> và 2 dảnh trong diện tích 360m<sup>2</sup>; mật độ cấy 45 cây/m<sup>2</sup> và mức phân bón là 5kg đạm + 15 kg phân lân + 6 kg Kali.

Về điều kiện thời tiết trong khi thí nghiệm: thời tiết sau cấy nắng ấm tạo điều kiện cho cây lúa bén rễ hồi xanh, sinh trưởng và phát triển tốt. Trong thời kỳ đẻ nhánh và vươn lóng, lúa chịu ảnh hưởng của đợt rét nên phát triển chậm lại. Trong giai đoạn phân hóa đòng, lúa chịu ảnh hưởng của đợt gió mùa đông bắc mạnh, gây ra hiện tượng rách đầu lá dẫn đến đầu lá lúa khô tóp lại. Trong giai đoạn lúa chín, do ảnh hưởng của thời tiết bất thuận (mưa gió lớn và kéo dài) đã làm cho một phần diện tích khảo nghiệm bị đổ với mức độ khác nhau nên ảnh hưởng lớn đến độ mẩy của hạt thóc và làm cho tỷ lệ lép tăng cao. Chính vì những yếu tố bất lợi nói trên đã gây ảnh hưởng lớn đến năng suất thực thu của dòng lúa NB-01.



## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN

**Bảng 8:** Ảnh hưởng của phương pháp cấy tới các yếu tố cấu thành năng suất

TT	Chỉ tiêu đánh giá	Phương pháp cấy	
		Cây 1 dảnh/ khóm	Cây 2 dảnh/ khóm
1	Chiều dài lá đòng (cm)	30,8	39,5
2	Chiều rộng lá đòng (cm)	2,4	2,3
3	Số bông hữu hiệu/khóm (bông)	4,45	6,45
4	Số hạt/bông (hạt)	229	206
5	Khối lượng nghìn hạt (gram)	22,88	22,88
6	Năng suất lý thuyết (tạ/ha)	6,77	8,20
7	Tỷ lệ hạt lép (%)	34	39
8	Khối lượng tươi*	238,9	250,4
9	Tỷ lệ hao hụt (%)	20,5%	20,5%
10	Khối lượng khô (kg/sào)	189,93	199,07
11	Năng suất (tạ/ha)	5,28	5,23

Nguồn: Trạm Khảo nghiệm giống Cây trồng và Phân bón Văn Lâm, Hưng Yên.

Quá trình khảo nghiệm đã cho thấy: dòng lúa NB-01 có sức sống mạ khỏe, sinh trưởng và phát triển tốt. Độ thuần đồng ruộng cao; chiều cao cây trung bình 104,3cm; trổ đều và tập trung, giai đoạn này lúa trổ đến 80% diễn ra trong 3 ngày; có khả năng sinh trưởng phát triển tốt, đẻ nhánh trung bình; bông to, dài, hạt nhỏ, dài, vỏ trấu màu nâu nhạt; khối lượng nghìn hạt trung bình đạt 22,8 gram; khả năng chống đổ ở mức khá, có dạng hình cây gọn, lá đòng đứng, màu xanh; có khả năng chống chịu sâu bệnh hại tốt hơn so với giống Bắc thơm 7.



Thí nghiệm cho thấy tỷ lệ lép của dòng lúa NB-01 là khá cao; nguyên nhân là do thời tiết và ảnh hưởng của phân bón đến tỷ lệ chắc của hạt. Chính vì vậy; cần phải tiến hành thí nghiệm nhằm tìm ra công thức bón phân thích hợp nhất.

***\*Ảnh hưởng của mật độ cấy, các mức phân bón đến năng suất của dòng lúa NB-01***

Khảo nghiệm gồm 2 yếu tố bố trí theo kiểu Split-plot với 3 lần nhắc lại. Tổng số ô thí nghiệm 36 ô, diện tích mỗi ô thí nghiệm 15 m<sup>2</sup> (3m x 5m).

- Yếu tố chính: phân bón gồm 4 mức:

+ P<sub>1</sub>: 64N + 67P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 83 K<sub>2</sub>O      + P<sub>3</sub>: 64N + 67P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 117 K<sub>2</sub>O

+ P<sub>2</sub>: 64N + 67P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 K<sub>2</sub>O      + P<sub>4</sub>: 64N + 67P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 133 K<sub>2</sub>O

- Yếu tố phụ: mật độ cấy gồm 3 mức:

M1: 35 khóm/m<sup>2</sup>, M2: 45 khóm/m<sup>2</sup>, M3: 55 khóm/m<sup>2</sup>.

Các chỉ tiêu được quan sát và đánh giá trong khảo nghiệm được tiến hành theo Quy phạm khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng giống lúa 10 TCN 558-2002.

Điều kiện thời tiết trong quá trình thí nghiệm: sau cấy nhiệt độ trong ngày thích hợp và có lượng mưa lớn nên tạo điều kiện cho cây lúa bén rễ hồi xanh nhanh, sinh trưởng và phát triển tốt. Giai đoạn lúa đẻ nhánh có nhiều ngày mưa xen kẽ giúp cây lúa đẻ nhánh thuận lợi. Khi lúa phân hóa đồng gập cơn bão số 3 nên làm cho giống lúa tham gia khảo nghiệm bị rách và gãy lá.



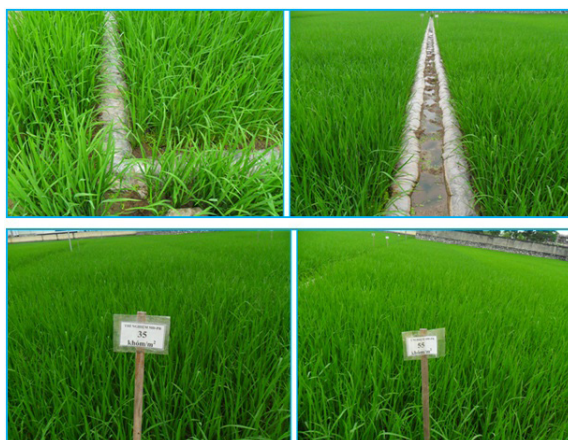
## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN

**Bảng 9:** Năng suất thực thu của dòng lúa NB-01 ở các mật độ cấy và mức phân bón khác nhau (tạ/ha).

Mật độ	Mức phân	Nhắc lại 1	Nhắc lại 2	Nhắc lại 3
M <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	40,5	44,3	42,8
	P <sub>2</sub>	40,9	44,6	48,1
	P <sub>3</sub>	48,9	45,4	41,4
	P <sub>4</sub>	43,9	46,5	49,2
M <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	50,0	49,0	46,5
	P <sub>2</sub>	49,4	53,4	46,9
	P <sub>3</sub>	49,5	48,1	54,0
	P <sub>4</sub>	54,2	57,2	48,2
M <sub>3</sub>	P <sub>1</sub>	52,2	56,0	53,8
	P <sub>2</sub>	61,2	54,0	57,9
	P <sub>3</sub>	62,8	56,8	59,8
	P <sub>4</sub>	69,3	64,8	64,3

Nguồn: Trạm Khảo nghiệm giống Cây trồng và Phân bón Văn Lâm, Hưng Yên

Qua theo dõi và đánh giá chúng tôi nhận thấy: dòng lúa NB-01 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt, chống chịu sâu bệnh khá, đẻ nhánh ở mức độ trung bình.



**Hình 40.** Hình ảnh khảo nghiệm mật độ cấy và các mức phân bón khác nhau



**Bảng 10:** Ảnh hưởng của mật độ cấy và mức phân bón khác nhau đến các yếu tố cấu thành năng suất của dòng lúa NB-01

Mật độ	Mức phân	Số bông/m <sup>2</sup>	Số hạt/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	KL1000 hạt (gram)
M <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	185,5	190,8	77,9	22,3
	P <sub>2</sub>	182,0	198,7	77,3	22,4
	P <sub>3</sub>	178,5	200,6	80,0	22,5
	P <sub>4</sub>	178,5	190,8	85,7	22,5
M <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	216,0	190,3	73,8	22,4
	P <sub>2</sub>	220,5	185,6	76,1	22,3
	P <sub>3</sub>	225,0	180,3	76,9	22,4
	P <sub>4</sub>	229,5	178,6	78,6	22,6
M <sub>3</sub>	P <sub>1</sub>	258,5	175,6	72,5	22,3
	P <sub>2</sub>	264,0	174,6	74,3	22,4
	P <sub>3</sub>	275,0	170,1	75,4	22,5
	P <sub>4</sub>	280,5	175,6	77,2	22,5

Chiều cao cây trung bình 134,6 cm; thời gian sinh trưởng của giống trong vụ mùa dao động từ 112 - 115 ngày; loại hình bông dài, hạt thon dài, xếp hạt thưa. Số hạt/bông từ 170 - 200 hạt.





## PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN

**Bảng 11:** Ảnh hưởng của mật độ cấy và các mức phân bón khác nhau đến năng suất thực thu của dòng NB-01

Mức phân	Mật độ cấy			Trung bình (tạ/ha)
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	
P <sub>1</sub>	42,5	48,5	54,0	48,3
P <sub>2</sub>	44,5	49,9	57,7	50,7
P <sub>3</sub>	45,2	50,5	59,8	51,8
P <sub>4</sub>	46,5	53,2	66,1	55,3
Trung bình	44,7	50,5	59,4	
LSD <sub>0,05</sub> (MĐC)	3,9			
LSD <sub>0,05</sub> (PB)	3,1			
LSD <sub>0,05</sub>	5,4			
CV (%)	6,1			

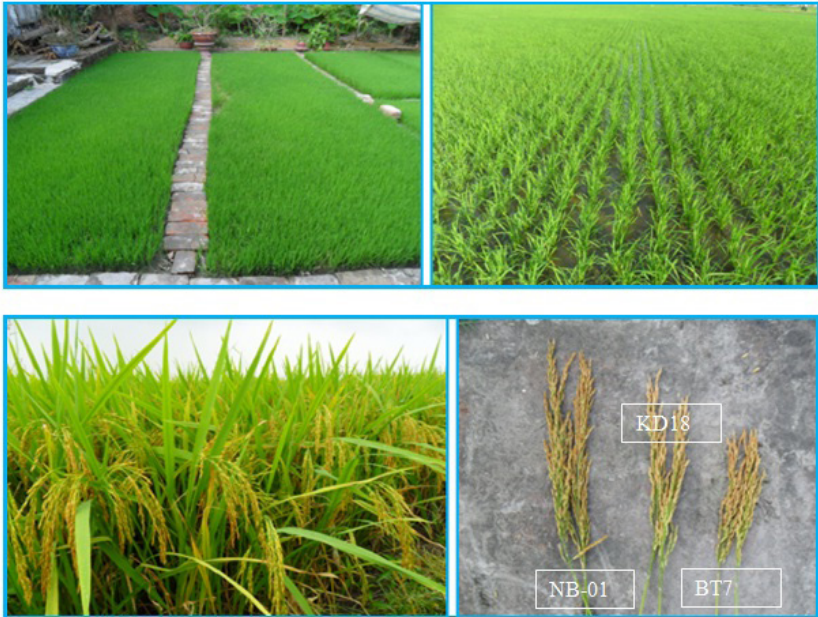
Tỷ lệ hạt chắc tăng khi liều lượng phân bón tăng; năng suất thực thu của giống cao nhất khi cấy 55 khóm<sup>2</sup> kết hợp với bón lượng phân 64N + 67P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 133 K<sub>2</sub>O/ha đạt 66 tạ/ha và sai khác có ý nghĩa với các công thức khác ở mức độ tin cậy 95% .

Dòng lúa NB-01 đã được tiến hành khảo nghiệm sản xuất thử ở một số nơi như: Hà Nội; Hưng Yên; Bắc Ninh; Thái Bình.v.v.

**Bảng 12:** Đặc điểm nông học của dòng lúa NB-01

TT	Giống lúa	Số khóm/m <sup>2</sup>	Số bông/khóm	Số hạt/bông	Tỷ lệ lép (%)	P <sub>1000</sub>	NSTT (tạ/ha)
1	NB-01	40-45	6-9	200-240	10%	21,84	60-65
2	Bắc thơm 7	40-45	4-6	170-190	10%	19,7	55-57





Hình 41. Một số hình ảnh về khảo nghiệm đồng lúa NB-01

Kết quả đánh giá bước đầu cho thấy: dòng lúa NB-01 có chất lượng tốt; độ thuần cao; khả năng sinh trưởng và phát triển tốt cả ở 2 vụ trong năm; phát triển tốt trên đất vàn và vàn hơi trũng; là giống trổ tập trung, bông to, dài, có tiềm năng năng suất cao trung bình đạt từ 60 – 65 tạ/ha (ở Hà Nội đạt ~70 tạ/ha; Bắc Ninh đạt 64 tạ/ha; Thái Bình đạt 65 tạ/ha.v.v.), có chất lượng tốt, có khả năng chống chịu với một số loại sâu bệnh chính (đạo ôn, khô vằn, bạc lá.v.v.) tốt hơn so với giống Bắc thơm 7.

### 3.3.3.5. Kết quả khảo nghiệm Quốc gia

Dòng lúa NB-01 đã được khảo nghiệm Quốc gia; kết quả cho thấy đây là dòng lúa có triển vọng, chất lượng và có tiềm năng năng suất cao.



**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

**Bảng 13:** Đặc điểm sinh trưởng của dòng NB-01

TT	Tên giống	Sức sống của mạ (điểm)	Độ dài giai đoạn trổ (điểm)	Độ thoát cổ bông (điểm)	Độ cứng cây (điểm)	Độ tàn lá (điểm)	Chiều cao cây (cm)	Thời gian sinh trưởng (ngày)
1	Bắc Thơm số 7 (đ/c)	5	5	3	1	5	91	135
2	NB-01	5	5	1	1	5	101	136
1	Hương Việt 3	5	5	3	3	5	99	137
2	BT13	5	5	3	3	5	87	130
3	PC26	1	5	1	1	1	97	128
4	P9	5	5	3	1	5	97	132
5	P16	5	5	1	3	5	102	134
6	Nam Định 5	5	5	3	1	5	90	131
7	TQ08	5	5	1	1	5	89	130
8	HDT2	5	5	1	1	5	95	132
9	HDT8	5	5	1	1	5	1	1
10	NC1	5	5	3	3	5	99	133
11	NC2	5	5	5	3	5	85	133
12	Hương thơm số 1 (đ/c)	5	5	1	3	5	98	133
13	NC3	5	5	3	1	5	99	133
14	NC4	5	5	5	1	5	99	132
15	LT25	5	5	1	3	5	98	133
16	BT09	5	5	3	3	5	89	132
17	VS1	5	5	1	1	5	82	134
18	Gia lộc 1	5	5	3	1	5	83	135



TT	Tên giống	Sức sống của mạ (điểm)	Độ dài giai đoạn trổ (điểm)	Độ thoát cổ bông (điểm)	Độ cứng cây (điểm)	Độ tàn lá (điểm)	Chiều cao cây (cm)	Thời gian sinh trưởng (ngày)
19	Gia lộc 2	5	5	3	1	5	93	134
20	Gia lộc 3	5	5	3	3	5	99	138
21	IR1 352 (d/c)	5	5	1	3	5	87	131
22	SH100	5	5	1	3	5	102	130
23	ĐT52	5	5	3	3	5	89	132
24	NTL1	5	5	3	3	5	81	133
25	Nếp thơm Triều tiên	5	5	1	5	5	119	133
26	TL90 (d/c)	5	5	1	5	5	102	133

Nguồn: Trung tâm KKN giống và sản phẩm Cây trồng Quốc gia

Qua kết quả khảo nghiệm cho thấy, dòng lúa NB-01 có thời gian sinh trưởng là 136 ngày, tương đương với hai giống đối chứng là Bắc thơm 7 và Hương thơm số 1. Có chiều cao cây trung bình là 101 cm, là giống có sức sống mạ ở mức trung bình (đạt điểm 5), trổ tập trung (đạt điểm 5) và thoát cổ bông (đạt điểm 1).



**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

**Bảng 14:** Độ thuần đồng ruộng và yếu tố cấu thành năng suất của giống NB-01

TT	Tên giống	Độ thuần (điểm)	Số bông/khóm	Số hạt/bông	Tỷ lệ lép (%)	Khối lượng nghìn hạt (g)
1	Bắc Thơm số 7 (đ/c)	1	5,6	124	11,6	18,4
2	NB-01	1	5,3	157	25,9	21,6
3	Hương Việt 3	5	4,9	119	21,8	25,0
4	BT13	5	5,2	160	16,0	21,0
5	PC26	5	4,7	128	12,4	18,9
6	P9	3	5,3	138	11,9	21,0
7	P16	1	5,5	131	16,1	25,8
8	Nam Định 5	5	5,0	127	114,2	23,6
9	TQ08	5	5,3	146	13,3	22,1
10	HDT2	5	5,3	118	13,1	24,2
11	HDT8	5	5,5	121	12,0	23,6
12	NC1	5	5,4	139	20,0	20,9
13	NC2	5	6,7	110	17,3	19,5
14	Hương thơm số 1 (đ/c)	1	4,9	126	12,3	23,1
15	NC3	1	4,5	180	12,3	21,0
16	NC4	5	5,3	135	12,3	21,3
17	LT25	5	4,6	128	11,1	23,4
18	BT09	5	5,5	126	14,6	23,2
19	VS1	1	5,3	135	14,4	22,4
20	Gia lộc 1	5	5,9	92	13,9	25,3
21	Gia lộc 2	5	4,4	158	14,2	22,9
22	Gia lộc 3	5	5,3	143	17,5	24,3
23	IRI 352 (đ/c)	5	5,5	118	11,8	25,9



TT	Tên giống	Độ thuần (điểm)	Số bông/khóm	Số hạt/bông	Tỷ lệ lép (%)	Khối lượng nghìn hạt (g)
24	SH100	5	5,1	136	13,2	24,0
25	ĐT52	1	5,5	135	9,9	25,9
26	NTL1	5	5,1	103	15,2	31,7
27	Nếp thơm Triều tiên	5	5,5	111	12,8	26,9
28	TL90 (đ/c)	5	5,9	95	12,7	27,1

Nguồn: Trung tâm KKN giống và sản phẩm Cây trồng Quốc gia

Khả năng đẻ nhánh của giống NB-01 trung bình đạt 5,3 bông/khóm. Số hạt trung bình đạt 157 hạt/bông cao hơn đối chứng là Bắc thơm số 7 và Hương thơm số 1.

**Bảng 15:** Mức độ kháng sâu, bệnh của dòng lúa NB-01

Đơn vị tính: điểm

TT	Tên giống	Bệnh đạo ôn	Bệnh bạc lá	Bệnh khô vằn	Rầy nâu	Sâu đục thân	Sâu cuốn lá
1	Bắc Thơm số 7 (đ/c)	1-3	1	0-1	1-3	0-1	1-3
2	NB-01	1-2	0	3-5	0-1	0-1	1-3
3	Hương Việt 3	2-3	0	1-3	0-3	0-1	0-1
4	BT13	2-3	0	1-3	0-1	0-1	0-1
5	PC26	0-1	0	1-5	1-3	0-1	0-3
6	P9	2-3	0	1-5	1-3	0-1	1-3
7	P16	2-3	0	1-5	0-1	0-1	0-1
8	Nam Định 5	2-3	0	1-3	1-3	0-1	1-3
9	TQ08	2-3	0	1-3	1-3	0-1	0-1
10	HDT2	1-2	0	1-3	1-3	0-1	1-3
11	HDT8	1-2	0	1-3	1-3	0-1	0-1



**PHẦN II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG  
PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG ĐẠO ÔN**

TT	Tên giống	Bệnh đạo ôn	Bệnh bạc lá	Bệnh khô vằn	Rầy nâu	Sâu đục thân	Sâu cuốn lá
12	NC1	2-3	0	1-3	1-3	0-1	1-3
13	NC2	1-2	0	1-5	1-5	0-1	1-3
14	Hương thơm số 1 (đ/c)	1-2	1	1-5	1-3	0-1	0-1
15	NC3	1-2	0-1	1-5	0-1	0-1	1-3
16	NC4	1-2	0	1-3	1-3	0-1	0-1
17	LT25	1-2	0	3-5	1-3	0-1	0-1
18	BT09	1-2	0	1-3	3-5	0-1	0-1
19	VS1	1-2	0	1-3	1-1	0-1	1-3
20	Gia lộc 1	1-2	0	0-1	1-1	0-1	0-1
21	Gia lộc 2	1-2	0	0-1	1-1	0-1	1
22	Gia lộc 3	2-3	0	1-3	1-1	0-1	1-3
23	IRI 352 (đ/c)	1-2	0	1-3	1-3	0-1	1-3
24	SH100	1-2	1	1-3	1-3	0-1	0-1
25	ĐT52	2-3	0	1-3	1-3	0-1	1-3
26	NTL1	2-3	0	5-7	0-1	0-3	1-3
27	Nếp thơm Triều tiên	0-1	0	1-5	3-5	0-1	1-3
28	TL90 (đ/c)	2-3	0	3-5	3-5	0-3	0-1

*Nguồn: Trung tâm KKN giống và sản phẩm Cây trồng Quốc gia*

Về mức độ nhiễm sâu, bệnh hại: dòng lúa NB-01 có sức chống chịu khá với một số loại bệnh hại như: bạc lá, khô vằn.v.v. đặc biệt chống chịu bệnh đạo ôn ở mức điểm 1-2 (bảng 15).



**Bảng 16:** Năng suất thực thu của giống NB-01 (Đơn vị tính: tạ/ha)

Tên giống	Địa điểm khảo nghiệm								Trung Bình
	Hưng Yên	Hải Dương	Hải Phòng	Thái Bình	Thanh Hóa	Hà Tĩnh	Vĩnh Phúc	Tuyên Quang	
Bắc Thơm số 7 (đ/c)	47,5	52,1	49,5	42	46,5	38,3	51,7	52,4	47,5
<b>NB-01</b>	<b>55,5</b>	<b>52,5</b>	<b>49,3</b>	<b>47,6</b>	<b>45,3</b>	<b>52,0</b>	<b>50,7</b>	<b>65,9</b>	<b>52,4</b>
Hương Việt 3	40,2	53,2	43,0	42,0	48,0	22,3*	62,0	51,4	48,5
BT13	61,7	55,7	55,1	57,1	57,4	44,4	57,7	63,6	56,6
PC26	47,0	58,2	-	37,8	55,8	37,2	58	67,5	51,6
P9	52,8	51,7	53,8	41,3	51,1	49,0	55,7	55,4	51,3
P16	58,4	56,7	59,0	53,6	66,9	43,2	67,3	66,6	59,0
Nam Định 5	60,0	45,6	44,0	46,9	57,1	49,4	58,3	64,9	53,3
TQ08	53,8	54,1	64,9	60,3	57,0	51,6	61,3	68,9	59,0
HDT2	52,8	54,5	61,2	40,7	54,6	46,8	63,0	70,0	55,4
HDT8	60,7	54,7	57,5	44,5	53,9	4,4	63,0	71,8	56,9
NC1	47,0	52,2	53,6	44,3	52,8	23,5*	50,7	56,7	51,0
NC2	44,2	50,3	47,8	48,7	43,4	31,1*	32,0	68,1	45,7
<b>Hương thơm số 1 (đ/c)</b>	<b>49,8</b>	<b>52,3</b>	<b>50,9</b>	<b>42,4</b>	<b>54,0</b>	<b>31,0*</b>	<b>56,3</b>	<b>64,9</b>	<b>52,9</b>
NC3	46,5	58,0	53,1	55,8	57,8	56,3	63,7	64,2	57,0
NC4	50,3	54,8	55,9	44,6	57,6	43,4	63,0	58,8	53,6
LT25	52,6	47,1	53,3	42,1	53,2	45,5	63,7	60,3	52,2
BT09	45,1	53,0	40,9	48,2	58,7	49,8	63,7	55,1	51,8
VS1	51,7	51,4	52,7	-	50,4	46,5	64,3	62,6	54,2
Gia lộc 1	50,0	53,1	49,5	-	32,0*	40,8	40,7	61,4	49,3
Gia lộc 2	58,2	56,3	53,6	-	49,1	48,2	60,7	64,3	55,8
Gia lộc 3	54,5	58,6	63,6	-	58,0	61,6	65,3	63,7	60,8
CV%	4,1	3,5	5,2	6,2	3,3	4,4	3,0	4,9	
LSD 0,05	3,48	3,04	4,51	4,78	2,87	3,19	2,9	5,06	

Nguồn: Trung tâm KKN giống và Sản phẩm cây trồng Quốc gia





Qua kết quả đánh giá về năng suất thực thu cho thấy giống lúa NB-01 rất có tiềm năng cho sản xuất đã được nhiều địa phương trong cả nước gieo trồng và có nhận xét, đánh giá: Giống lúa NB-01 là giống cảm ôn, gieo cấy 2 vụ/năm. Thời gian sinh trưởng; vụ xuân muộn: 130 – 135 ngày; vụ mùa sớm 105-107 ngày, chiều cao cây từ 115-118 cm. Bông to để nhánh khỏe, chống đổ và chống chịu sâu bệnh tốt đặc biệt là giống có khả năng kháng bệnh đạo ôn; hạn chế bạc lá và rầy nâu. Chất lượng gạo ngon, cơm mềm và có mùi thơm nhẹ. Năng suất cao trung bình đạt từ 60-75 tạ/ha. Thâm canh tốt có thể đạt trên 80 tạ/ha. Giống lúa NB - 01 có khả năng thích ứng rộng trên nhiều chân đất, vùn cao, vùn và vùn trũng.

Vì là giống lúa có chất lượng, năng suất cao và đặc biệt là kháng bệnh đạo ôn rất tốt nên giống lúa NB-01 đã được công nhận đặc cách là giống Chính thức và hiện đang được gieo trồng hàng nghìn ha trong cả nước. Cũng vì là giống lúa có nhiều đặc tính tốt, đem lại hiệu suất cao nên các tác giả của giống đã vinh dự được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn trao tặng giải thưởng “**Bông lúa vàng Việt Nam**” theo quyết định số 4139/QĐ-BNN-TCCB ngày 20 tháng 10 năm 2015.



Hình 42. Sản xuất phát triển giống lúa NB-01 trên đồng ruộng



## CHƯƠNG 6. ĐẤT NHIỄM MẶN VÀ DI TRUYỀN TÍNH CHỊU MẶN Ở LÚA

### 1. Khái niệm đất nhiễm mặn

Tất cả các loại đất trồng trọt đều chứa nhiều loại muối tan nhất định; trong số đó có những loại đóng vai trò là nguồn cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng. Khi nồng độ của một loại muối trong đất vượt quá ngưỡng cho phép sẽ gây ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Mức độ thiệt hại là rất khác nhau và tùy thuộc vào từng loại giống cây trồng, thời gian sinh trưởng, các yếu tố môi trường, phương thức canh tác và tính chất đất của từng vùng nhiễm mặn. Khi trong thành phần của đất có chứa các loại muối ảnh hưởng đến cây trồng thì đất đó được gọi là đất nhiễm mặn.

Đất nhiễm mặn được xem là một trong những loại đất có vấn đề và cần được quan tâm xử lý. Tính chất vật lý và hóa học của đất nhiễm mặn rất đa dạng, khả năng biến thiên của đất tùy thuộc vào nguồn gốc phát sinh của hiện tượng mặn, pH đất, hàm lượng chất hữu cơ trong đất, chế độ thủy văn và nhiệt độ (Akbar và Ponnampereuma, 1982). Do đó, người ta rất khó định nghĩa đất nhiễm mặn một cách chính xác và đầy đủ:

Theo Hội khoa học Đất của Mỹ (SSSA, 1979), đất mặn là đất có độ dẫn điện (EC) lớn hơn 2dS/m mà không kể đến hai giá trị khác là tỷ lệ hấp thu Sodium (SAR) và pH. Tuy nhiên, hầu hết các định nghĩa khác đều chấp nhận đất mặn là đất có độ dẫn điện (EC) từ 4dS/m trở lên ở 25°C, phần trăm sodium trao đổi kém hơn 15 lần và pH nhỏ hơn 8,5 lần so với các loại đất thông thường (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2003);



Theo FAO (2000) thì đất nhiễm mặn là đất chứa nhiều muối hòa tan (khoảng từ 1- 1,5% hoặc nhiều hơn); những loại muối tan thường gặp trong đất là:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ .v.v. Những loại muối này có nguồn gốc khác nhau (từ lục địa, từ biển, từ sinh vật học.v.v.). Trong quá trình phong hóa đá, những muối này bị hòa tan di chuyển tập trung ở những dạng địa hình trũng không có khả năng thoát nước. Ở những vùng nhiệt đới mưa nhiều như ở Việt Nam, sự phong hóa đá xảy ra mạnh mẽ, kể cả những loại muối khó tan như  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ .v.v. cũng bị hòa tan và rửa trôi ra sông ra biển.

Theo Lê Huy Bá (2007) thì đất mặn là đất có nồng độ muối hòa tan > 0,3%, trong đó, anion  $\text{Cl}^-$  > 0,15% và cation  $\text{Na}^+$  có hàm lượng trên 10mEq/10gr; sau 24 giờ bị ngập nước, hiện tượng mặn hóa sẽ xảy ra và được biểu hiện trên bề mặt. Các loại đất này có nồng độ các loại muối gây hại cho cây trồng, vi sinh vật và động vật sống trong môi trường đất.

Đất mặn khá phổ biến ở những vùng sa mạc và cận sa mạc, muối tích tụ và mao dẫn lên đất mặt, chảy tràn trên mặt đất theo kiểu rửa trôi. Đất mặn có thể phát triển ở vùng nóng ẩm hoặc cận nóng ẩm trên thế giới trong điều kiện thích hợp như vùng ven biển, mặn do nước biển xâm nhập khi triều cường, lũ lụt, mặn do nước thấm theo chiều đứng hay chiều ngang từ thủy cấp bị nhiễm mặn.

Hiện nay, diện tích đất nhiễm mặn chiếm khoảng 6,5% diện tích đất toàn thế giới (Sankar và cs., 2011); chỉ riêng châu Á khoảng 21,5 triệu ha (Nazar và cs., 2011). Đất bị nhiễm mặn ở các đại lục như châu Âu và Bắc Mỹ hầu như không có khả năng trồng trọt. Ở châu Á, hơn 80% đất bị ảnh hưởng của mặn có



khả năng trồng trọt và đã được khai thác cho sản xuất nông nghiệp. Ở châu Phi và Nam Mỹ, có khoảng 30% đất bị nhiễm mặn có khả năng trồng trọt.

## 2. Phân loại đất nhiễm mặn

Nguyên nhân phát sinh mặn do nhiều yếu tố: vùng ven biển hoặc vùng cửa sông do nước biển xâm thực vào mùa khô; mặn bên trong đất do mao dẫn từ tầng dưới lên có thể do phá rừng, không có tán che phủ.

Nguyên nhân dẫn đến đất bị nhiễm mặn là:

- *Nhiễm mặn do các loại muối như:*  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MgCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ . v.v. đây là các muối kim loại kiềm và kiềm thổ có gốc axit là những anion như:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  trong đó anion  $\text{Cl}^-$  là quan trọng nhất;

**Bảng 17:** Tính chất của các loại đất nhiễm mặn theo

Loại đất	Độ dẫn điện EC, ở 25°C	% dung lượng cation $\text{Na}^+$ trao đổi
Đất mặn ( $\text{pH} > 5,5$ ; $[\text{Cl}^-] = 0,05 - 0,25\%$ )	> 4	< 15
Đất mặn kiềm	> 4	> 15
Đất không mặn kiềm	< 4	< 15

- *Nhiễm mặn do kiềm:* quá trình này tích lũy nhiều kim loại chủ yếu là kim loại kiềm và kiềm thổ, có thể là các loại cation  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  trong đó vai trò của cation  $\text{Na}^+$  là quan trọng nhất.

\* Theo Akbar và Ponnampereuma, 1980

Dựa vào nguồn gốc phát sinh của đất nhiễm mặn, Yoshida (1981) đã phân loại đất nhiễm mặn thành 02 dạng chính là: đất



mặn vùng duyên hải và đất mặn khu vực nội địa. Trong đó, đất mặn duyên hải có ở những vùng ven biển, tính mặn này do sự tràn ngập của nước biển và nước thường có pH thấp. Đất mặn ven biển thường có tổng số muối tan > 0,5% (tương đương với hơn 0,15% Cl) và nếu đạt mức độ mặn trung bình là 0,25% (tương đương với 0,05 Cl). Đất mặn nội địa có ở những vùng khô và nửa khô, tính mặn ở đây do nước dẫn thủy hoặc nước ngầm. Sự bốc hơi cao dẫn đến muối tập trung cao ở vùng rãnh và đất có pH cao (Yoshida, 1981).

Dựa vào độ dẫn điện của dung dịch đất và tỷ lệ muối tan, FAO-UNESCO đã phân loại đất mặn thành 04 dạng là: i) Đất mặn sú, vẹt, đước; ii) Đất mặn nhiều; iii) Đất mặn trung bình và ít; iv) Đất mặn kiềm.

Dựa vào quá trình phát sinh, tính chất vật lý, tính chất hóa học, tính chất sinh vật học đất mặn được chia ra thành 03 loại chính là: i) Đất Solonchat hay còn được gọi là đất kiềm trắng, được hình thành do quá trình trầm tích mặn và có hàm lượng muối cao (1-1,5%), có khi hình thành một lớp trắng xóa trên mặt đất. Trên đất solonchat hầu như không có loại cây trồng nào có khả năng sinh trưởng và phát triển được, đất có phản ứng trung tính hoặc kiềm yếu; ii) Đất Solonet hay đất kiềm đen được hình thành do quá trình thoát mặn, nghĩa là khi đất solonet bị thau rửa một cách tự nhiên hoặc nhân tạo đặc biệt là trong trường hợp đất mặn xô đa ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), đất có phản ứng kiềm và rất kiềm (pH 8-12); iii) Đất Solot được hình thành do sự gột rửa đất solonet một cách mãnh liệt, trong quá trình  $\text{Na}^+$  trên keo đất được thay đổi bằng  $\text{H}^+$ , đất có tính chua.

Dựa vào nồng độ muối hoà tan với tỷ lệ clo trong đó, Hội



Khoa học Đất Việt Nam chia đất mặn thành bốn loại: đất rất mặn (tỷ lệ muối hòa tan  $>1,0$ ; nồng độ  $\text{Cl}^-$  khoảng 0,15%-0,25%); đất mặn nhiều (tỷ lệ muối hòa tan từ 0,5-1,0; nồng độ  $\text{Cl}^-$  khoảng 0,15%-0,25%); đất mặn trung bình (tỷ lệ muối hòa tan từ 0,25; nồng độ  $\text{Cl}^-$  khoảng 0,05%-0,15%); đất mặn ít (tỷ lệ muối hòa tan từ  $<0,25$ ; nồng độ  $\text{Cl}^-$   $<0,05\%$ ).

### 3. Các vùng đất nhiễm mặn ở Việt Nam

Ở Việt Nam, nguồn gốc phát sinh đất nhiễm mặn chủ yếu là do nước biển xâm lấn, gây nhiễm mặn, đất mặn chiếm phần diện tích tương đối lớn khoảng 2 triệu ha, chiếm khoảng 6% diện tích đất tự nhiên; đặc biệt là ở các vùng ven biển làm ảnh hưởng xấu đến việc canh tác, năng suất cây trồng. Các vùng nhiễm mặn tập trung chủ yếu ở hai khu vực là đồng bằng sông Hồng (ĐBSH) và đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Ảnh hưởng của nước biển ở vùng cửa sông và đất liền ở ĐBSH chỉ khoảng 15km, nhưng ở vùng ĐBSCL có thể xâm nhập tới 40-50 km.

#### 3.1. Đồng bằng sông Cửu Long

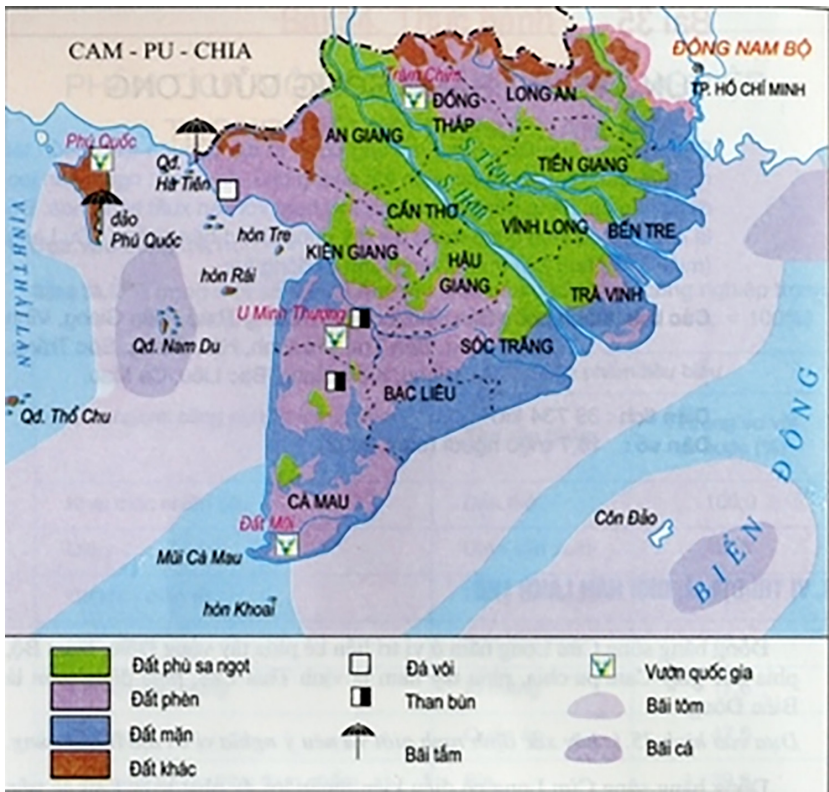
ĐBSCL nằm trong lưu vực sông Mê Kông có chiều dài 4.200 km, chảy qua 6 nước là Trung Quốc, Myanmar, Thái Lan, Lào, Campuchia, Việt Nam và có diện tích lưu vực 795.000 km<sup>2</sup>, trong đó vùng chảy qua nước ta có diện tích là 49.367 km<sup>2</sup>. ĐBSCL là phần cuối cùng của Châu thổ sông Mê Kông, bao gồm 13 tỉnh, thành phố là: Long An, Tiền Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Trà Vinh, Hậu Giang, Sóc Trăng, Bến Tre, An Giang, Kiên Giang, Bạc Liêu, Cà Mau và thành phố Cần Thơ, với tổng diện tích tự nhiên của ĐBSCL khoảng 3,96 triệu ha, chiếm 5% diện tích toàn lưu vực sông Mê Kông và chiếm khoảng 12% diện tích cả nước. Trong đó diện tích đất sản xuất nông nghiệp là 2,9 triệu ha, đất



sản xuất lâm nghiệp là 430.770 ha, đất khác chiếm 277.000 ha và đất chuyên dùng khoảng 262.682 ha (Lê Sâm, 2003).

Đất đai trong vùng ĐBSCL, được chia thành các nhóm sau: i) Đất phù sa được phân bố chủ yếu ở vùng ven và giữa hệ thống sông Tiền và sông Hậu, diện tích 1,2 triệu ha chiếm 29,7% diện tích đất tự nhiên toàn vùng và khoảng 1/3 diện tích đất phù sa của cả nước; nhóm đất này có độ phì cao và cân đối, thích hợp đối với nhiều loại cây trồng như: lúa, cây ăn quả, cây màu, cây công nghiệp ngắn ngày; ii) Nhóm đất phèn được phân bố ở vùng Đồng Tháp Mười và Hà Tiên, vùng trũng trung tâm bán đảo Cà Mau với tổng diện tích 1,2 triệu ha chiếm 40% diện tích toàn vùng; đất có hàm lượng độc tố cao, tính chất cơ lý yếu, nứt nẻ nhanh; iii) Nhóm đất xám có diện tích trên 134.000 ha chiếm 3,4% diện tích toàn vùng và phân bố chủ yếu dọc biên giới Campuchia, trên các bậc thềm phù sa cổ vùng Đồng Tháp Mười; đất nhẹ,ơi xốp, độ phì thấp, độc tố bình thường; iv) Ngoài ra còn có các nhóm đất khác như đất cát giồng, than bùn, đất đỏ vàng, đất xói mòn.v.v. chiếm diện tích không đáng kể khoảng 0,9% diện tích toàn vùng. Nhìn chung đất đai ở đây rất thuận lợi cho phát triển nông nghiệp, thích hợp trồng lúa, dứa, mía, dứa, cây ăn quả (theo Thông tin nông nghiệp Việt Nam, 2013).





Hình 43. Bản đồ đồ tự nhiên vùng đồng bằng sông Cửu Long.  
 Nguồn: <http://ldsgk.net/DL9B35H35.1.htm>

Đây là vùng có nhiệt độ trung bình hàng năm trên 28°C, số giờ nắng trung bình là 6 giờ/ngày, năng lượng bức xạ đạt 80kcal/cm<sup>2</sup>. Lượng mưa trung bình hàng năm toàn vùng là 1.500 - 1.800mm và phân bố không đều theo thời gian và không gian; lượng mưa tập trung chủ yếu vào tháng 5 đến tháng 10 và chiếm khoảng 90% lượng mưa cả năm, lượng mưa rất ít vào mùa khô (tháng 11 đến tháng 4 năm sau). Thủy triều có ảnh hưởng rất lớn đến toàn bộ ĐBSCL, mùa khô nước mặn tràn sâu vào trong đất liền. Các vùng lúa ven biển ĐBSCL đều bị nhiễm mặn.



Mức độ ảnh hưởng của mặn tùy thuộc vào sự xâm nhập mặn của nước biển và tùy vào mùa trong năm, cao điểm vào tháng 3 và tháng 4; đây là các tháng có lượng mưa tương đối thấp (Nguyễn Ngọc Anh, 2005). Hiện nay, ĐBSCL có khoảng 1,8 - 2,1 triệu ha đất tự nhiên chịu ảnh hưởng của mặn và tập trung chủ yếu ở các tỉnh Cà Mau, Bạc Liêu, Kiên Giang, Trà Vinh.v.v. đây là diện tích đất nhiễm mặn kết hợp với bị nhiễm phèn và ngập nước.

Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2001), đồng bằng sông Cửu Long được chia ra làm 6 vùng chính là: vùng ven biển giữa sông Tiền và sông Hậu; vùng Đồng Tháp Mười; vùng Tây sông Hậu; vùng Tứ giác Long Xuyên, vùng Bán đảo Cà Mau và vùng ven biển đông. Trong đó, khu vực bị nhiễm mặn nhiều nhất là vùng bán đảo Cà Mau và vùng ven biển Đông. Đối với vùng bán đảo Cà Mau có diện tích tự nhiên là 946.000ha; diện tích đang sử dụng trong sản xuất nông nghiệp là 676.000ha, bao gồm các loại đất chính như: đất mặn, đất phèn chua. Yếu tố chính ảnh hưởng đến sản xuất của vùng là hiện tượng thiếu nước ngọt và ảnh hưởng của mặn. Hiện nay, sản xuất trong vùng đang diễn ra theo một số mô hình như: một đến hai vụ lúa trong năm, nuôi thủy sản, rừng ngập mặn, một vụ lúa và một vụ tôm, rừng-tôm. Đối với vùng ven biển Đông có diện tích tự nhiên là 1.073.000ha, diện tích đang sử dụng là 844.000ha, gồm các loại đất phù sa, đất mặn và đất cát. Một trong những yếu tố chính ảnh hưởng đến tình hình sản xuất nông nghiệp của vùng là tình trạng thiếu nước ngọt và ảnh hưởng của mặn. Hiện nay, trong vùng đang có một số mô hình sản xuất như sau: một đến hai vụ lúa trong năm, nuôi trồng thủy sản, trồng dừa, cây ăn quả, một vụ lúa và một vụ tôm, rừng - tôm.



### 3.2. Đồng bằng sông Hồng

ĐBSH là một vùng đất rộng lớn nằm quanh khu vực hạ lưu sông Hồng thuộc miền Bắc Việt Nam gồm 11 tỉnh là: Vĩnh Phúc, Hà Nội, Bắc Ninh, Hà Nam, Hưng Yên, Hải Dương, Hải Phòng, Thái Bình, Nam Định, Ninh Bình, Quảng Ninh; diện tích vùng đồng bằng sông Hồng là: 21.061,5km<sup>2</sup>, chiếm 7,1 % diện tích của cả nước (theo Thông tin nông nghiệp Việt Nam).

Diện tích đất trong vùng chủ yếu là đất phù sa được bồi đắp bởi hệ thống sông Hồng và sông Thái Bình. Hiện nay, trong vùng có trên 103 triệu ha đất được sử dụng cho nông nghiệp, chiếm 82,48% diện tích đất tự nhiên và 5,5% diện tích đất sử dụng của cả nước. Đất trong vùng rất thích hợp cho thâm canh lúa nước, trồng màu và các cây công nghiệp ngắn ngày. Diện tích đất trồng cây lương thực đạt 1.242.900ha. Bên cạnh đó, khả năng mở rộng diện tích sản xuất của vùng vẫn còn khoảng 137.000 ha. Quá trình mở rộng diện tích gắn liền với quá trình chinh phục biển thông qua sự bồi tụ và thực hiện các biện pháp khai khẩn lấn biển theo phương thức “lúa lấn cỏ, cỏ lấn sục, sục lấn biển” (theo Thông tin nông nghiệp Việt Nam).

Các vùng lúa nhiễm mặn ở ĐBSH thuộc các tỉnh: Thái Bình, Hải Phòng, Nam Định, Ninh Bình, Quảng Ninh. Trong đó, một số vùng ven biển thuộc Hải Phòng bị nhiễm mặn khoảng 20.000 ha ở cả hai dạng nhiễm mặn tiềm tàng và nhiễm mặn xâm nhiễm từ 0,3-0,5%, chủ yếu tập trung tạo các huyện: Kiến Thụy, Tiên Lãng, Thủy Nguyên, Vĩnh Bảo; tỉnh Thái Bình có khoảng 18.000 ha nhiễm mặn chủ yếu ở các huyện Thái Thụy, Tiền Hải, Kiến Xương; tỉnh Nam Định có khoảng 10.000 ha chủ yếu ở các huyện Nghĩa Hưng, Xuân Trường, Giao Thủy (Nguyễn Tấn Hình và cs., 2006).



### PHẦN III. KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU MẶN BẰNG CHỈ THỊ PHẦN TỬ



Hình 44. Bản đồ tự nhiên vùng đồng bằng sông Hồng.

Nguồn: <http://ldsgk.net/DL9B20H20.1.htm>



## 4. Cơ chế di truyền tính chịu mặn ở lúa

### 4.1. Cơ chế chịu mặn ở lúa

Mặn đã ảnh hưởng đến sản xuất lúa với những mức độ thiệt hại khác nhau ở từng giai đoạn sinh trưởng, phát triển khác của nó. Cơ chế chịu mặn ở lúa được biết qua nhiều công trình nghiên cứu của các tác giả như: Lã Tuấn Nghĩa và cs., 2012; Linh và cs., 2012.v.v.

Một số nghiên cứu cho thấy tính chống chịu mặn xảy ra ở giai đoạn hạt nảy mầm, sau đó lại trở nên nhiễm mặn trong giai đoạn mạ, rồi lại trở nên chống chịu trong giai đoạn sinh trưởng, sau đó lại bị nhiễm mặn trong thời kỳ thụ phấn và cuối cùng thể hiện khả năng chống chịu trong thời kỳ hạt chín. Tuy nhiên, một vài nghiên cứu cho thấy ở giai đoạn trổ lúa không bị ảnh hưởng do mặn (Kaddah và cs., 1975). Qua những nghiên cứu kể trên đã cho thấy tính phức tạp về cơ chế chịu mặn của lúa; bởi vậy mà người ta phải chia ra nhiều giai đoạn phát triển để nghiên cứu một cách đầy đủ về cơ chế chống chịu mặn của chúng.

Thiệt hại do mặn thể hiện trước hết là giảm diện tích lá. Trong điều kiện thiệt hại nhẹ, trọng lượng khô có xu hướng tăng lên trong một thời gian, sau đó giảm nghiêm trọng do suy giảm diện tích lá. Trong điều kiện thiệt hại nặng hơn, trọng lượng khô của chồi và rễ suy giảm tương ứng với mức độ thiệt hại. Ở giai đoạn mạ, lá già hơn sẽ mất khả năng sống sót sớm hơn lá non (Akita, 1986).

Thiệt hại do mặn được gây ra bởi sự mất cân bằng áp suất thẩm thấu và sự tích tụ nhiều ion Cl<sup>-</sup> (Iwaki và cs., 1953; Ota và Yasue, 1958; Shimose, 1963; Tagawa và Ishizaki, 1963, Murty và



Janardha, 1971). Những nghiên cứu gần đây cho thấy, nguyên nhân gây tổn hại đến cây lúa trong môi trường mặn là do tích lũy nhiều cation  $\text{Na}^+$  và cation này trực tiếp gây độc trên cây trồng, làm cho anion  $\text{Cl}^-$  trở thành ion trơ nên phổ chống chịu của cây tương đối rộng (Yeo và Flower, 1999). Như vậy, sự tổn hại của cây lúa ở môi trường mặn là do cây hấp thu quá nhiều cation  $\text{Na}^+$  và anion  $\text{Cl}^-$ . Thiệt hại do mặn còn được ghi nhận bởi hiện tượng hấp thu một lượng dư thừa sodium và độc tính của sodium làm cho clor trở thành anion trơ, có tác dụng bất lợi với một phổ rộng về nồng độ (Clarkson và Hanson, 1980).

Ảnh hưởng của cation  $\text{Na}^+$  là phá vỡ và cản trở vai trò sinh học của tế bào chất. Sự mất cân bằng giữa tỷ lệ nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  cũng là một trong những yếu tố làm hạn chế năng suất của cây trồng. Cation  $\text{K}^+$  đóng một vai trò quan trọng làm kích hoạt enzyme và đóng mở khí khổng tương ứng với tính chống chịu mặn của cây trồng, thông qua hiện tượng tích lũy lượng kali trong chồi và thân. Tuy nhiên, việc khám phá ra cơ chế cùng những tổn hại trên cây lúa do mặn gây ra là rất phức tạp, ngay cả dưới những điều kiện ngoại cảnh có khả năng kiểm soát.

Yeo và Flower (1984) đã tổng kết cơ chế chống chịu mặn ở cây lúa theo từng nội dung như sau: i) Hiện tượng ngăn chặn muối (cây không hấp thu một lượng muối dư thừa nhờ hiện tượng hấp thu có chọn lọc); ii) Hiện tượng tái hấp thu (cây hấp thu một lượng muối thừa nhưng được tái hấp thu trong mô libe, ion  $\text{Na}^+$  không chuyển vị đến chồi thân); iii) Chuyển vị từ rễ đến chồi (tính trạng chống chịu mặn được phối hợp với một mức độ cao về điện phân ở rễ lúa và mức độ thấp về điện phân ở chồi, làm cho sự chuyển vị  $\text{Na}^+$  trở nên ít hơn từ rễ đến chồi); iv) Hiện tượng ngăn cách từ lá đến lá (lượng muối dư thừa được



chuyển từ lá non sang lá già, muối được định vị tại lá già không có chức năng, không thể chuyển ngược lại được); v) Chống chịu ở mô (cây hấp thu muối và được ngăn cách trong các không bào của lá, làm giảm ảnh hưởng độc hại của muối đối với hoạt động sinh trưởng của cây); vi) Ảnh hưởng pha loãng (cây hấp thu muối nhưng sẽ làm loãng nồng độ muối nhờ tăng cường tốc độ phát triển nhanh và gia tăng hàm lượng nước trong chồi). Tất cả những cơ chế này đều nhằm làm giảm nồng độ của  $\text{Na}^+$  trong các mô chức năng, do đó làm giảm tỉ lệ giữa nồng độ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong chồi ( $<1$ ). Tỉ lệ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong chồi được xem như là chỉ tiêu chọn lọc giống lúa chống chịu mặn.

Với cơ chế điều chỉnh hàm lượng muối đi vào trong chồi, thông qua sự hấp thu một cách chọn lọc và có hiệu quả đối với hàm lượng ion  $\text{K}^+$ ; cùng với khả năng hấp thu với hàm lượng lớn có ý nghĩa ion  $\text{Na}^+$ , sau đó được hấp thu lại trong nhựa xylem trong những phần của đầu rễ hoặc chồi và sau đó được dự trữ hoặc chuyển lại trở vào đất (Yeo và Flower, 1984). Theo Aslam và cs. (1993), khi cây lúa được đặt trong dung dịch  $\text{NaCl}$ , hàm lượng sodium, canxi, kẽm, photpho và clorit đều gia tăng, trong khi hàm lượng kali và mangan đều giảm trong nhựa của chồi. Khả năng chống chịu mặn của cây lúa cao hay thấp có quan hệ với hiệu quả ngăn chặn cation  $\text{Na}^+$  và anion  $\text{Cl}^-$  vào cây. Khi tiến hành so sánh cơ chế hấp thu chọn lọc ion  $\text{K}^+$  của cây lúa cho thấy, có sự khác nhau lớn về khả năng hấp thu ion  $\text{K}^+$  trong môi trường có nồng độ  $100\text{mol}/\text{m}^3$   $\text{NaCl}$  giữa các giống lúa khác nhau (Akbar và cs., 1986).

Tỷ lệ giữa nồng độ  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  hay đúng hơn là hàm lượng  $\text{K}^+$  trong dịch chồi lúa xác định khả năng chống chịu mặn của chúng. Ngoài ra, trong một số nghiên cứu các tác giả còn nhận



thấy hàm lượng kẽm trong chồi có vai trò quan trọng liên quan đến khả năng chống chịu mặn của cây lúa. Khi trong chồi của các giống lúa có hàm lượng kẽm cao, thì các giống lúa có khả năng chống chịu mặn tốt. Điều này đã được Muhammed và cs. (2008) chứng minh thông qua nghiên cứu về ảnh hưởng của hàm lượng kẽm đến khả năng chống chịu mặn ở giống lúa KS282 (có khả năng chống chịu mặn tốt) và giống IR28 (giống lúa mặn cảm với mặn). Kết quả nghiên cứu cho thấy, giống KS282 có nồng độ kẽm trong chồi cao hơn rất nhiều so với giống IR28 (Muhammed và cs., 2008). Theo Aslam và cs. (1993), vai trò của kẽm tham gia vào tính chống chịu mặn, có thể là do kẽm làm gia tăng hàm lượng đạm trong chồi. Điều này dẫn tới việc sinh trưởng nhanh hơn và năng suất lúa cao hơn trong điều kiện mặn. Vì vậy, ở những giống chống chịu mặn tốt có liên quan đến hiệu quả ngăn chặn các cation  $\text{Na}^+$  và anion  $\text{Cl}^-$  (Aslam và cs., 1993).

Khi nghiên cứu về mối tương quan giữa số lượng muối được đi vào rễ cây lúa với nồng độ muối trên chồi. Kết quả cho thấy, mối tương quan này được xác định bởi mối quan hệ giữa tốc độ sinh trưởng của chồi với sự di chuyển thực của những ion ngoài rễ. Giá trị này là số lượng thực của những ion được di chuyển tới chồi trên đơn vị trọng lượng của rễ trong một đơn vị thời gian. Ví dụ ở giống lúa Pokkali (giống chống chịu mặn), hàm lượng Na ở chồi trung bình thấp hơn của giống IR22 (giống nhiễm mặn). Bởi vì hàm lượng Na ở chồi của giống lúa Pokkali được pha loãng do sự sinh trưởng dinh dưỡng nhanh của nó. Với cơ chế này, cây hấp thu muối nhưng sẽ làm loãng muối nhờ tăng cường tốc độ phát triển nhanh và gia tăng hàm lượng nước trong chồi (Flower và cs., 1988).



Mỗi một giống lúa đều có một hoặc hai cơ chế nêu trên. Phản ứng của cây trồng đối với tình trạng chống chịu mặn là vô cùng phức tạp thông qua hiện tượng tổng hợp từ những yếu tố riêng lẻ; phản ứng tốt nhất làm gia tăng tính chống chịu mặn phải gắn liền với việc tối ưu hóa nhiều đặc điểm sinh lý, có tính chất độc lập tương đối với nhau. Do vậy, mục tiêu của chúng ta là phối hợp tất cả những cơ chế sinh lý ấy vào trong giống lúa cải tiến tính chống chịu mặn (Yeo và Flower, 1984).

## 4.2. Di truyền tính chịu mặn ở lúa

Phân tích di truyền cho thấy tính chống chịu mặn ở lúa được quy định bởi gen cộng tính và gen không cộng tính (Mashra và cs., 1990; Gregorio và Senadhira, 1993; Lee, 1995). Trong nghiên cứu di truyền tính chịu mặn ở lúa các chỉ số như tỷ lệ giữa nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ở trong chồi, tính trạng này được kiểm soát bởi hoạt động của cả hai nhóm gen cộng tính và không cộng tính. Tính trạng giữa nồng độ ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  thấp còn thể hiện ảnh hưởng rất có ý nghĩa và hệ số di truyền thấp ở mức 19,18% (Gregorio và Senadhira, 1993). Từ đó, các tác giả đề nghị khi tiến hành phép lai tạo quần thể con lai phải thật lớn và việc tuyển chọn nên được thực hiện ở các thế hệ sau cùng ở điều kiện mặn được kiểm soát chặt chẽ, giảm thiểu thấp nhất ảnh hưởng của môi trường.

Trong điều kiện mặn, số lượng hạt chắc trên bông có giá trị đóng góp trực tiếp và lớn nhất đến năng suất lúa (Bùi Chí Bửu và cs., 1988); số hạt chắc trên bông và tỉ lệ hạt lép là hai thông số quan trọng trong nghiên cứu của di truyền và chọn lọc trong điều kiện mặn. Nguyễn Thị Lang và cs. (1994) khi nghiên cứu di truyền về chiều cao cây của giống lúa nước trồng ở vùng ven biển của Việt Nam cho thấy có ít nhất 5 nhóm gen điều khiển





tính trạng này.

Bản đồ di truyền phân tử với mật độ cao số lượng chỉ thị phân tử phủ trên toàn bộ bộ nhiễm sắc thể trong hệ gen cây lúa là điều kiện tốt giúp chúng ta nghiên cứu tính trạng di truyền số lượng phức tạp, xác định vị trí của các gen/QTL trên nhiễm sắc thể. Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang (2007) đã sử dụng quần thể RIL gồm 108 dòng từ tổ hợp lai giữa hai giống lúa Tenasai 2 và CB để phân tích lập bản đồ QTL tính chịu mặn của cây lúa. Kết quả nghiên cứu đã thiết lập được bản đồ liên kết di truyền của các chỉ thị phân tử có tổng chiều dài là 2.345,5cM, khoảng cách trung bình giữa hai chỉ thị phân tử là 21,68cM. Những chỉ thị phân tử liên kết với locus quy định tính chịu mặn cơ bản định vị trên nhiễm sắc thể 1, 2, 3, 9, 11 của lúa.



## CHƯƠNG 7. KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU MẶN

### 1. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

#### 1.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu gồm 200 giống lúa được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên thực vật, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm và Viện nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI). Trong đó có một số giống lúa được sử dụng chủ yếu trong nghiên cứu gồm giống: Pokkali, Chành trụi, Khang dân 18, M6 và P6; các giống lúa nào có một số đặc điểm nông học chính như sau:

- Giống lúa Pokkali: là giống lúa chứa gen chịu mặn Saltol1 có khả năng chịu mặn tốt, điểm đánh giá chịu mặn là 1. Trong nghiên cứu này giống lúa Pokkali được sử dụng để khai thác gen kháng mặn Saltol1 trong chọn tạo giống.

- Giống lúa Chành trụi: là giống địa phương, qua đánh giá khả năng chịu mặn cho thấy giống này có khả năng chịu mặn rất cao với điểm đánh giá là 3. Trong nghiên cứu này, giống lúa Chành trụi được sử dụng để lập bản đồ gen liên quan đến tính chịu mặn;

- Giống lúa Khang dân 18: là giống lúa đang được sử dụng trong sản xuất và có khả năng chịu mặn kém, có điểm đánh giá là 8. Trong nghiên cứu này, giống lúa Khang dân 18 được sử dụng để lai tạo, trong việc lập bản đồ gen chịu mặn;

- Giống lúa chịu mặn M6: Là giống lúa chịu mặn có thời gian sinh trưởng: 125-130 ngày trong vụ mùa và 155-160 ngày trong vụ xuân, dạng hình thấp cây, năng suất 50-55tạ/ha. Trong nghiên cứu này, giống lúa M6 được sử dụng để làm đối chứng trong chọn tạo giống lúa chịu mặn;



- Giống lúa P6: là giống có chất lượng cao, thời gian sinh trưởng (TGST) trong vụ mùa 115-120 ngày, vụ xuân 135-140 ngày; năng suất đạt 65-70 tạ/ha vào vụ xuân và 58-63 tạ/ha vào vụ mùa; chất lượng gạo tốt, hạt gạo dài (6,8mm), cơm mềm, đậm ăn ngon, hàm lượng protein khoảng 10,5%, amylose 21%. Trong nghiên cứu này, giống lúa P6 được sử dụng để chọn tạo giống lúa chịu mặn có chất lượng tốt.

## 1.2. Nội dung nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu bao gồm:

- Đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa;
- Xác định gen chịu mặn ở lúa;
- Xác định chỉ thị liên kết với gen chịu mặn ở lúa;
- Lai quy tụ gen chịu mặn vào lúa;
- Sử dụng chỉ thị ADN để lựa chọn những cây lúa mang gen chịu mặn;
- Đánh giá và tuyển chọn dòng lúa chịu mặn.

## 1.3. Phương pháp nghiên cứu

### 1.3.1. Đánh giá khả năng chịu mặn của lúa

- *Đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm*

Thí nghiệm đánh giá khả năng chống chịu mặn của các giống lúa được tiến hành theo phương pháp của IRRI (SES, 2002):

Hạt lúa nảy mầm, được gieo lên khay lưới inox (hoặc khay xếp có đan lưới); khay được đặt lên hộp có chứa 5 lít nước và để trong bóng tối. Sau 24 giờ, nước trong hộp được thay bằng dung dịch dinh dưỡng Yoshida. Dung dịch dinh dưỡng Yoshida trong hộp được thay 2 ngày/lần và điều chỉnh pH trong khoảng 5,6 - 5,8 (bằng cách sử dụng NaOH & HCl).



Khi mạ được 20 ngày tuổi, lúc đó cây mạ có 3-4 lá hoàn thiện và lá ra sau cùng dài khoảng 1-2 cm được xử lý mặn với nồng độ 0,6% NaCl (EC=12ds/m). Sau khoảng 10 ngày xử lý mặn (khi giống đối chứng bị chết) tiến hành đánh giá xác định điểm chịu mặn theo tiêu chuẩn đánh giá của IRRI (SES, 2002).

*- Đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa trên đồng ruộng*

Thí nghiệm đánh giá khả năng chống chịu mặn của các giống lúa trên đồng ruộng được tiến hành theo phương pháp của IRRI (SES, 2002):

Thiết kế các ô thí nghiệm có kích thước 1x3m, bờ cao 20cm; mặt bằng phẳng, lót tấm nilon phía dưới để chống nước thấm ra ngoài. Trên bề mặt nilon đổ lớp cát dày khoảng 10cm, khử tạp chất trong cát 2 ngày bằng dung dịch HCl loãng (nồng độ 0,5M) và sau đó rửa sạch bằng nước máy; bón lót toàn bộ 0,15kg phân NPK (tỷ lệ 16-16-8) trong nền cát.

Các giống lúa được cấy thành hàng (30 hạt/hàng và 5 hàng/giống) và khi mạ được hai tuần tuổi (cây có 3 - 4 lá) bắt đầu xử lý mặn bằng nước có muối; với hai nồng độ là: 0,3% NaCl (EC = 6dS/m) và 0,5% NaCl (EC = 10dS/m) ở pH = 5. Thay nước muối thường xuyên 2 ngày/lần, đảm bảo pH không thay đổi. Sau 10 ngày xử lý mặn, đánh giá tính chống chịu mặn.

Đánh giá đặc điểm và sinh lý, sinh hóa của các giống lúa được tiến hành theo phương pháp của Saeed Saeedipour (2011) với các chỉ tiêu như: chiều cao cây (seedling height, viết tắt là SH), khối lượng chồi tươi (shoot fresh weight, viết tắt là SFW), khối lượng chồi khô (shoot dry weight, viết tắt là SDW), nồng độ Na<sup>+</sup> trong chồi mạ (shoot Na ion concentration, viết tắt là SN), nồng độ K<sup>+</sup> trong chồi mạ (shoot K ion concentration,



viết tắt là SK), tỷ lệ giữa nồng độ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong chồi mạ (shoot Na ion/K ion ratio, viết tắt là SNK), nồng độ  $\text{Na}^+$  trong rễ mạ (root Na ion concentration, viết tắt là NR), nồng độ  $\text{K}^+$  trong rễ mạ (root K ion concentration, viết tắt là KR), tỷ lệ giữa nồng độ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong rễ mạ (root Na ion/K ion concentration, viết tắt là RNK).

Phương pháp tiến hành: gieo 20 hạt lúa của mỗi dòng  $F_3$  lên khay lưới inox (hoặc khay xốp có đan lưới) đặt trên hộp có chứa 5 lít nước, để trong bóng tối. Sau 24 giờ, nước trong hộp được thay bằng dung dịch dinh dưỡng Yoshida. Dung dịch dinh dưỡng Yoshida trong hộp được thay 2 ngày/lần và điều chỉnh pH ở mức 5,6 - 5,8 bằng cách sử dụng NaOH & HCl. Sau 7 ngày xử lý mặn với nồng độ 0,6%, tiến hành thu rễ và chồi ở các dòng  $F_3$ , sau đó rửa sạch để xác định khối lượng chồi tươi, chồi khô (sấy chồi ở  $70^\circ\text{C}$ ) và rễ tươi, khô (sấy rễ ở  $70^\circ\text{C}$ ). Nghiền các mẫu chồi/rễ khô thành bột mịn, lấy khoảng 10mg mỗi mẫu cho vào ống nghiệm có chứa 10ml 0,1N axit acetic; sau đó, đun nóng ống nghiệm trong cốc nước ở  $90^\circ\text{C}$  trong 2 giờ; các mẫu được làm lạnh ở nhiệt độ phòng và để qua đêm, sau đó lọc bằng giấy lọc; mẫu được pha loãng 10 lần và tiến hành đo nồng độ Natri và Kali bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS 3100, Perkin Elmer, USA).

Nghiên cứu cơ chế chống chịu mặn của lúa cho thấy khi cây lúa bị nhiễm mặn thì hàm lượng  $\text{Na}^+$  trong các mô chức năng bị giảm dẫn đến làm giảm tỷ lệ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong chồi và rễ. Do đó, tỷ lệ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong chồi và rễ có tính chất quyết định đến khả năng chịu mặn của lúa (Zhu, 2001).

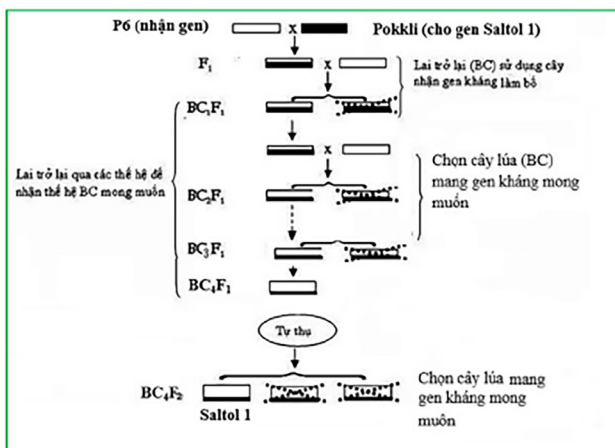
### 1.3.2. Lai quy tụ gen chịu mặn vào giống lúa

Như đã trình bày trong các phần ở trên, lai quy tụ gen



là biện pháp đưa một hoặc nhiều gen quý thông qua lai tạo vào một giống cây trồng nhằm cải tạo chúng trở nên có nhiều đặc tính mong muốn hơn; để quy tụ gen, người ta thường sử dụng phương pháp lai trở lại (backcross, viết tắt là: BC). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phương pháp lai BC như sau:

Thực hiện phép lai giữa giống P6 với giống Pokkali, thu lấy hạt  $F_1$ . Tại thế hệ con lai  $F_1$ , chúng tôi đã chọn ngẫu nhiên một số cây có khả năng sinh trưởng tốt (do tất cả các cá thể đều có cùng kiểu gen) và sử dụng làm cây mẹ để lai trở lại với giống P6 (sử dụng làm cây bố) kết quả tạo được thế hệ lai trở lại lần thứ nhất  $BC_1F_1$ ; sử dụng chỉ thị phân tử RM8094 chọn những cá thể  $BC_1F_1$  mang gen Saltol1 để lai với giống P6 (giống P6 làm bố). Tiếp tục các bước nói trên chúng tôi đã thu được các cá thể con lai  $BC_4F_1$ . Tại thế hệ  $BC_4F_1$ , chúng tôi tiến hành cho các cây  $BC_4F_1$  tự thụ để thụ để thu lấy hạt  $BC_4F_2$ , sử dụng chỉ thị phân tử liên kết để xác định cá thể mang gen Saltol1 ở dạng đồng hợp tử mong muốn (hình 45).



Hình 45. Sơ đồ chọn tạo lúa mang gen Saltol 1



### 1.3.3. Đánh giá đặc điểm nông sinh học của các giống lúa

Sau khi lựa chọn được 100 cá thể lúa  $BC_4F_2$  mang gen chịu mặn Saltol1, chúng tôi tiến hành phát triển thành 100 dòng lúa (thế hệ  $BC_4F_3$ ) khác nhau (bằng cách cho các cây  $BC_4F_2$  tự thụ và thu lấy hạt  $BC_4F_3$ ) để phục vụ các nghiên cứu, đánh giá tiếp theo:

*Đối với các dòng lúa mang gen chịu mặn Saltol1:*

Tiến hành đánh giá năng suất, chất lượng và khả năng chịu mặn của các dòng lúa theo phương pháp của IRRI (SES, 2002). Mỗi ô thí nghiệm có kích thước là  $10m^2$  ( $2 \times 5m$ ) và được đắp bờ cao 20cm (có lót nilon để chống thấm nước ra ngoài) trên bề mặt bằng phẳng. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần nhắc lại và được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên; giống lúa M6 được sử dụng làm giống đối chứng. Các dòng lúa được cấy một danh với mật độ là 45-50 khóm/ $m^2$ ; sử dụng 0,5kg phân NPK (tỷ lệ 16-16-8) để bón lót và bón thúc; thường xuyên duy trì mực nước nông theo chiều cao cây lúa.

Thông qua việc đánh giá các đặc điểm nông học chính, yếu tố cấu thành năng suất, chất lượng và khả năng chịu mặn của các dòng lúa để lựa chọn các dòng lúa triển vọng: có năng suất, chất lượng cao và khả năng chống chịu mặn tốt. Các dòng triển vọng sẽ tiếp tục được gieo cấy và tiến hành các nghiên cứu, đánh giá tiếp theo.

*Đối với các dòng lúa triển vọng:*

Quy trình khảo nghiệm tác giả được tiến hành theo Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa (QCVN 01-55: 2011/BNNPTNT): mỗi ô thí nghiệm có kích thước là  $360m^2$ , thí nghiệm được tiến hành với 3 lần nhắc lại và được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên; giống lúa M6 và P6 được sử dụng làm giống đối chứng. Các dòng lúa



được tiến hành cấy với mật độ là 45-50 khóm/m<sup>2</sup>, cấy 1 dảnh; sử dụng 18kg phân NPK (tỷ lệ 16-16-8) để bón lót và bón thúc; thường xuyên duy trì mực nước nông theo chiều cao cây lúa. Các đặc điểm nông học chính như: yếu tố cấu thành năng suất, chất lượng, khả năng chịu mặn.v.v. của các dòng lúa được đánh giá theo phương pháp của IRRI (SES, 2002).

Thông qua việc khảo nghiệm tác giả và đánh giá một số đặc điểm nông học chính như: các yếu tố cấu thành năng suất, chất lượng, khả năng chịu mặn, tính ổn định và khả năng thích ứng với các điều kiện sinh thái ở các vùng bị nhiễm mặn khác nhau thuộc đồng bằng sông Hồng của các dòng lúa triển vọng để tiến tới công nhận giống và mở rộng sản xuất.

### 1.3.4. Nhận dạng ADN của lúa

#### *i) Tách chiết ADN của các giống lúa*

ADN tổng số của các giống lúa được tách chiết dựa theo quy trình của Keb-Llanes (2002); quá trình tách chiết, gồm các bước cụ thể như sau:

- Cắt từ 1-2 g lá mạ cho vào cối chày sứ nghiền với nitơ lỏng thành dạng bột mịn sau đó cho vào ống eppendorf 2ml;
- Cho 800µl 2% CTAB (có bổ sung 0.5% Natri bisulfite), trộn đều bằng vortex, ủ 65 0C trong 10 phút;
- Cho 800µl Chloroform : isoamyl alcohol (tỷ lệ 24:1), lắc đều trong 20 phút ở nhiệt độ phòng;
- Ly tâm 12000v/p trong 10 phút;
- Hút dịch nổi bên trên cho vào ống eppendorf mới;
- Cho 470µl isopropanol, lắc nhẹ, để lạnh -20 0C khoảng 1-2 giờ;
- Ly tâm 12000v/p trong 10 phút. Thu rửa, rửa bằng 800µl cồn 70%;
- Để và để khô hoàn toàn, sau đó cho 100µl TE vào;





- Cho 2 µl RNase (10mg/ ml) ủ 37 0C trong 30 phút;
- Cho 1/10 thể tích 3M sodium acetat (20µl);
- Cho 400µl cồn tuyệt đối, để tủ lạnh -20oC (60 phút);
- Ly tâm 12000v/p trong 5phút, sau đó loại bỏ pha nước thu vủa, rửa vủa bằng EtOH, để khô;
- Cho 100µl TE vào, để tan hoàn toàn, bảo quản -4 0C.

Mẫu ADN tổng số của các giống lúa được kiểm tra thông qua điện di trên gel 1% agarose sau đó nhuộm trong dung dịch EtBr 0,5ng/ml và chụp trên máy Molecular Imager FX. Độ nguyên vẹn của ADN được đánh giá qua hình ảnh điện di, độ tinh sạch và nồng độ các mẫu ADN được xác định thông qua phương pháp đo chỉ số OD của các mẫu.

*ii) Nhận dạng ADN của các giống lúa*

ADN của các giống lúa được tiến hành nhận dạng sử dụng mỗi SSR theo phương pháp của McCouch (2002), quá trình được tiến hành như sau:

- Thành phần một phản ứng PCR:

TT	Thành phần	Thể tích 01 phản ứng (µl)
1	Dream Taq™ Green buffer (20mM)	1,0
2	dNTP mix (2,5mM)	0,8
3	Primer (F) (25ng/µl)	0,2
4	Primer (R) (25ng/µl)	0,2
5	Dream Taq™ DNA polymeraza (5u/µl)	0,05
6	ADN (50ng/µl)	1
7	Nước	6,75
<b>Tổng thể tích phản ứng</b>		<b>10</b>



- Chu trình nhiệt của PCR:

94°C trong 5 phút; (94°C trong 1 phút, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 2 phút) lặp lại 35 lần; 72°C trong 15 phút sau đó đặt ở 4°C.

- Điện di và ghi nhận kết quả sản phẩm PCR:

Sản phẩm PCR được điện di trên gel 8% polyacrylamide ở điều kiện 80V trong 120 phút. Sau khi điện di, bản gel polyacrylamide được nhuộm 10 phút trong dung dịch EtBr (nồng độ 0,5 ng/ml), sau đó được chụp bằng máy MultiDoc-It của hãng UVP.

### 1.3.5. Xác định cây lúa mang gen chịu mặn

Trong nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp lai trở lại để chọn tạo giống lúa chịu mặn và có chất lượng, năng suất cao; ở mỗi thế hệ lai, chỉ thị phân tử RM8094 được sử dụng để chọn những cá thể mang gen Saltol1; sau đó những cá thể mang gen Saltol1 được tiến hành lai trở lại với giống lúa P6 để tạo các thế hệ lai tiếp theo.

### 1.3.6. Phân tích và xử lý số liệu

- *Phân tích số liệu*

Các chương trình, phần mềm như: exell, IRRISTAT 5.0, Statistix 10.0, NTSYS 2.1X được sử dụng để xử lý và phân tích số liệu.

- *Phân tích đa dạng di truyền*

Kết quả nhận dạng ADN được chuyển thành bảng dữ liệu nhị phân theo nguyên tắc: tại mỗi vị trí alen, nếu mẫu có băng ADN thì được mã là 1, nếu không có băng ADN mã là 0. Phần mềm NTSYS pc 2.1X được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền của các giống lúa dựa trên nhận dạng ADN sử dụng mỗi SSR.



## 2. Kết quả nghiên cứu

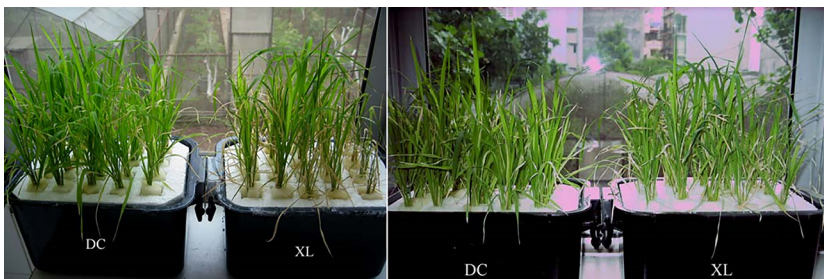
### 2.1. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa

#### 2.1.1. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm

Sử dụng phương pháp của IRRI (SES, 2002) để đánh giá khả năng chống chịu mặn của 200 giống lúa trong điều kiện thí nghiệm với các chỉ tiêu theo dõi như: thời gian sống sót (ngày), chiều dài rễ (cm), chiều dài thân (cm), khối lượng rễ khô (mg), khối lượng thân khô (mg). Khi mạ đã có 3 lá hoàn thiện và lá thứ 4 dài khoảng 1-2 cm được xử lý mặn trong môi trường dinh dưỡng Yoshida có muối NaCl với độ dẫn điện EC lần lượt là 6dS/m và 16dS/m.



Hình 46. Hình ảnh cây mạ trước khi xử lý mặn trong môi trường Yoshida



Hình 47. Hình ảnh cây mạ sau khi xử lý mặn trong môi trường Yoshida có bổ sung muối NaCl. Trong đó: DC - là đối chứng; XL - là xử lý mặn.



### *i) Thời gian sống sót của cây mạ*

Kết quả ghi nhận thời gian sống sót của các giống lúa trong môi trường EC= 16dS/m cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh (cặp Duncan) ở mức 5%. Thời gian sống sót dài nhất, đặc biệt là dài hơn giống đối chứng Pokkali (21 ngày) có 3 giống, đó là Chành trụi (sống sót 27 ngày), Nếp cúc (sống sót 25 ngày), Cườm dạng 2 (sống sót 22 ngày). Có 19 giống có thời gian sống sót tương đương với Pokkali là Nước mặn, Lúa su dạng 1, Lúa ven, Quảng trắng, Hom râu 1, Hom râu 2, Cườm dạng 1, Ngoi tía, Lúa Chăm biển, Mành ré, Chiêm cũ, Bầu, Ổn, IRAT 109, D100, CO39, D8, IR 51337-2B-9-2B-2-2, M16. Có 45 giống có thời gian sống sót gần bằng Pokkali. Các giống còn lại (133 giống) có thời gian sống sót thấp. Giống chuẩn nhiệm IR29 sống sót được 8 ngày trong môi trường muối 16dS/m. Từ kết quả thực nghiệm chúng tôi thấy nồng độ muối càng cao thì thời gian sống sót của các giống càng thấp và ngược lại. Ở trong môi trường dinh dưỡng, tất cả các giống lúa đều sống sót sau 35 ngày, nhưng ở môi trường dinh dưỡng có NaCl với EC=6dS/m, thời gian sống sót trung bình của các giống là 28,79 ngày và ở môi trường dinh dưỡng có NaCl với EC = 16dS/m, thời gian sống sót trung bình của các dòng/giống là 12,85 ngày.

### *ii) Chiều dài rễ mạ*

Chiều dài rễ trung bình của các giống lúa được sử dụng trong thí nghiệm xử lý mặn là 8,85cm. Giống đối chứng Pokkali có chiều dài rễ là 9,87cm, có 73 giống lúa có chiều dài tương đương với giống Pokkali (khác biệt không có ý nghĩa thống kê), ngoài ra các giống Tám thơm, Chiêm bắc, CO39, Japonica Hàn Quốc, MTL, Tam nông, H2, OM6073, Tẻ thơm Lào Cai, Amoro có chiều dài rễ khá.



*iii) Chiều cao cây mạ*

Các giống trong môi trường xử lý mặn cho thấy sự khác nhau rõ rệt về chiều cao cây mạ khi so sánh (cặp Duncan) ở mức ý nghĩa 5%. Ở điều kiện môi trường có EC=16dS/m, kết quả cho thấy các giống lúa thí nghiệm đa số có chiều cao cây mạ từ 17-21cm, chiều cao trung bình của các giống lúa là 18,87cm. Trong đó các giống lúa có chiều cao vượt trội, cao hơn giống đối chứng Pokkali (21,67cm) và khác biệt có ý nghĩa khi phân tích thống kê là Chiêm rong, Anapurna, TL6, BB64, IR72, D14, IR51337-2B-9-2B-2-2, IR82523, D2, BM9603, Vandana; các giống lúa có chiều cao tương đương giống đối chứng Pokkali (không khác nhau về mặt thống kê) là Háu trắng, Ré trắng, GZ-1368, Nghi hương, Suferchin, Irac 23, D10, N18; còn lại là các giống lúa có chiều cao cây mạ thấp hơn đối chứng (khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê).

*iv) Khối lượng mạ khô*

Khi phân tích phương sai kết quả xác định khối lượng mạ khô của các giống nghiên cứu ở mức ý nghĩa 5%, khối lượng trung bình của các giống là 92,43mg. Giống chuẩn kháng Pokkali có khối lượng cao nhất (131,45mg), khác biệt rất có ý nghĩa với giống chuẩn nhiễm IR29 có khối lượng là 59,34 mg. Một số giống có khối lượng tương đối cao, gần bằng với Pokkali là AC5, Irac 18, ĐS Đà Loan, Nếp cúc, Cườm dạng 2, Cườm dạng 1, IR352, IR3R, Quảng trắng, Bắc thơm 7, NB01, CR203, DT5, Hương cốm.

*v) Khối lượng rễ khô*

Kết quả ghi nhận khối lượng rễ khô của các giống lúa thí nghiệm cho thấy có sự khác biệt khi phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 5%; khối lượng rễ khô trung bình là 27,03mg. Giống Pokkali có khối lượng rễ khô cao (39,12mg), khác biệt rất có ý



nghĩa với các giống còn lại trong thí nghiệm, duy chỉ có giống Chành trụi có khối lượng rễ khô cao hơn giống đối chứng (40,34mg). Với 78 giống lúa có khối lượng rễ khô tương đối cao, gần bằng giống Pokkali; giống nhiễm IR29 có khối lượng rễ khô là 25,79mg; 3 giống là Nếp quắn, Ven đỏ, Tám dự có khối lượng rễ khô thấp nhất (20,03mg).

#### *vi) Đánh giá khả năng chịu mặn*

Sau khi tiến hành xử lý mặn nhân tạo, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng chống chịu mặn của lúa ở các mốc thời gian là: 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày sau xử lý. Kết quả ban đầu cho thấy, cây mạ trong môi trường dinh dưỡng có chứa muối NaCl với nồng độ 6dS/m, bắt đầu bị ảnh hưởng và mức độ tăng dần theo thời gian. Sau 7 ngày xử lý mặn mới có 26 giống lúa bị ảnh hưởng nhiễm mặn ở mức điểm 3, đến 14 ngày sau khi xử lý mặn cây mạ bị ảnh hưởng ở mức điểm 3 đến điểm 5. Sau 21 ngày xử lý mặn đa số các giống lúa vẫn sống và bị ảnh hưởng chủ yếu ở cấp 5-7. Nhưng trong môi trường dinh dưỡng có nồng độ  $EC_{NaCl}=16dS/m$  thì sau 7 ngày tất cả các giống đều bị ảnh hưởng bởi mặn, giống chuẩn nhiễm IR29 có biểu hiện ở mức điểm 7, giống Pokkali có biểu hiện ở mức điểm 3, đa số các giống lúa khác bị ảnh hưởng ở mức từ điểm 5 đến điểm 7. Sau 14 ngày xử lý mặn thì giống nhiễm IR29 biểu hiện ở mức điểm 9 (bắt đầu có những cây bị chết), ở thời điểm này giống Pokkali biểu hiện ở mức điểm 5 cùng với 19 giống có biểu hiện tương đương là: giống Nước mặn, Lúa su dạng 1, Lúa ven, Quảng trắng, Hom râu 1, Hom râu 2, Cườm dạng 1, Chiêm rong, Lúa Chăm biển, Mành ré, Chiêm cũ, Bầu, Ổn, IRAT 109, D100, CO39, D8, IR 51337-2B-9-2B-2-2, M16; bên cạnh đó có 4 giống biểu hiện mức chống chịu cao như: Chành trụi, Cườm dạng 2, Ngoi tía, Nếp cúc. Sau 21 ngày xử lý mặn chỉ còn 11 giống lúa sống sót với vài cây bị nhiễm ở mức điểm 7; chỉ có Chành trụi, Cườm

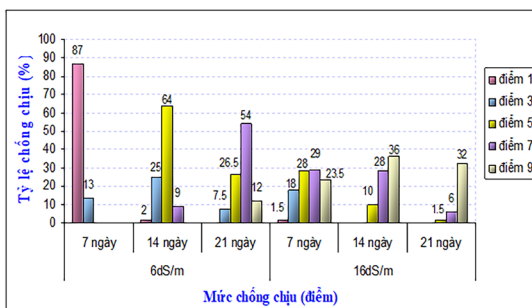


dạng 2, Nếp cúc, Ngoi tía là nhẹ hơn ở mức điểm 5. Như vậy sau khi giống nhiễm IR29 bị chết thì chỉ có 4 giống lúa biểu hiện chống chịu mặn (ở mức điểm 3), 20 giống biểu hiện mức ở độ chống chịu mặn trung bình (ở mức điểm 5), 55 giống biểu hiện mức độ nhiễm mặn kém (mức điểm 7) (hình 46, 47).

Sau 21 ngày đánh giá, kết quả cho thấy:

- Trong môi trường dinh dưỡng (có  $EC_{NaCl}=6dS/m$ ), cây mạ bị ảnh hưởng do mặn với mức độ ảnh hưởng tăng dần theo thời gian; đa số các giống lúa nghiên cứu vẫn sống (chủ yếu ở điểm 5-7);

- Trong môi trường dinh dưỡng Yoshida chứa muối ( $EC_{NaCl}=16dS/m$ ); sau 14 ngày giống nhiễm mặn IR29 bị chết (ở mức điểm 9), giống chịu mặn Pokkali và 19 giống nghiên cứu như: Nước mặn, Lúa su dạng 1.v.v. biểu hiện chịu mặn ở mức <5 điểm; sau 21 chỉ còn 04 giống như: Chành trụi, Cườm dạng 2, Nếp cúc, Ngoi tía có biểu hiện chịu mặn ở mức <5 điểm. Sau khi giống nhiễm IR29 bị chết (ở mức điểm 9), có 04 giống biểu hiện tính chịu mặn cao đó là: Chành trụi, Cườm dạng 2, Nếp Cúc, Ngoi tía (mức chịu mặn  $\leq 3$  điểm); 20 giống chịu mặn trung bình (mức chịu mặn < 5 điểm), còn lại là biểu hiện nhiễm mặn từ mức độ trung bình đến cao (ở mức chịu mặn >5 điểm).



Hình 48. Đồ thị biểu diễn khả năng chịu mặn của các giống lúa nghiên cứu trong dung dịch dinh dưỡng có bổ sung thêm muối NaCl (với các nồng độ  $EC = 6dS/m$  và  $EC = 16dS/m$ ).



### 2.1.2. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa trên đồng ruộng

Thí nghiệm được thiết kế với các ô có kích thước 1x3m, mặt bằng phẳng, lót tấm nilon phía dưới để chống nước thấm ra ngoài và tạo thành bờ cao 20 cm. Trên bề mặt nilon, đổ lớp cát dày khoảng 10cm. Khử tạp chất trong cát 2 ngày bằng dung dịch HCl loãng (nồng độ 0,5M), sau đó rửa sạch bằng nước máy; bón phân N-P-K (80 - 40 - 30) cho nền cát; quy trình đánh giá mặn được tiến hành như sau:

Các giống được gieo thành hàng, 30 hạt/hàng, 5 hàng/giống. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 công thức (ở các nồng độ 0dS/m, 6dS/m, 10dS/m) và 3 lần nhắc lại. Mức độ chống chịu mặn của các giống lúa được đánh giá sau 10 ngày, 16 ngày và 22 ngày sau xử lý theo phương pháp của IRRI (SES, 2002). Kết quả đánh giá cho thấy:

- Trong điều kiện 0dS/m (không bổ sung thêm muối), cây mạ tăng trưởng bình thường không có biểu hiện bị nhiễm mặn;

- Trong môi trường có bổ sung thêm 0,3% muối NaCl (độ dẫn điện EC= 6dS/m), cây mạ bắt đầu bị ảnh hưởng do mặn và mức độ bị ảnh hưởng cũng tăng dần theo thời gian. Sau 10 ngày xử lý mặn ngoài tự nhiên với nồng độ 0,3% NaCl, hầu hết các giống chưa bị ảnh hưởng mặn, bao gồm các giống Khang dân 18, Bắc thơm 7, CR203, Q5, DT7, P6 AC5, P13, IR28, Tám thơm, N2, D18, IR84675-7-3-2-B-B, IR84675-25-7-3-B-B, IR84675-58-4-1-B-B, IR84677-51-1-B, IR84677-25-7-3-B-B, IR84678-25-5-B, IR58427-5B-15, IR65833-4B-17-1-3, IR68652-3B-20-3, IR68652-3B-30-2, IR72048-B-16-2-3-3, IR72049-B-R-22-3-1-1, IR72046-B-R-8-3-1-2, CRS28, Nona Bokra, IR61919-3B-18-3, IR71897-3R-1-1-2IR59418-7B-21-3, IR77674-B-20-1-2-1-3-6-4-





AJY1, IR74099-AC7, IR74095-AC45, IR74095 - AC64 và IR29 ảnh hưởng ở điểm 3; sau 16 ngày cây mạ bị ảnh hưởng chủ yếu ở điểm 3-5. Sau 22 ngày đa số các giống vẫn sống và bị ảnh hưởng chủ yếu ở mức điểm 5-7;

- Trong môi trường có bổ sung thêm 0,5% muối NaCl (độ dẫn điện EC = 10dS/m) thì sau 10 ngày, giống chuẩn nhiễm IR29 biểu hiện ở mức điểm 5, giống chuẩn kháng Pokkali biểu hiện ở mức điểm 3, đa số các giống khác bị nhiễm ở mức từ điểm 5 đến điểm 7. Sau 16 ngày xử lý IR29 bị chết, Pokkali biểu hiện ở điểm 5 cùng với 38 giống có biểu hiện tương đương là các giống Nước mặn Huế, Nước mặn, Háu trắng, Lúa su dạng 1, Lúa ven, Tẻ chăm, Quảng trắng, Nước mặn Quảng trị, Hom râu 1, Hom râu 2, Cườm dạng 1, Chiêm rong, Ngoi tía, Lúa chăm biển, Ré trắng, Mạnh ré, Chiêm cũ, Bầu, CM6, Tẻ tếp, Ôn, P6, Nghi hương, Tám dự, D100, IR65, IR71677, IR Sub1, IR64-21, Swarna, Swarna Sub1, Nr1, CO39, Japonica Hàn Quốc, IR82355-5-1-3, D8, H2, IR51499-2B-29-2B-22. Đặc biệt có 3 giống biểu hiện chống chịu cao là Nếp cúc, Cườm dạng 2, Hành trụi, có điểm đánh giá là 3. Số giống sống sau 22 ngày sau khi xử lý mặn là 31 giống, nhưng khả năng sinh trưởng đã bị giảm, ở mỗi giống chỉ còn lại vài cây bị nhiễm ở điểm 7. Giống Hành trụi, Cườm dạng 2 và Nếp Cúc vẫn còn khả năng chống chịu mặn ở mức trung bình (điểm chống chịu mặn < 5).

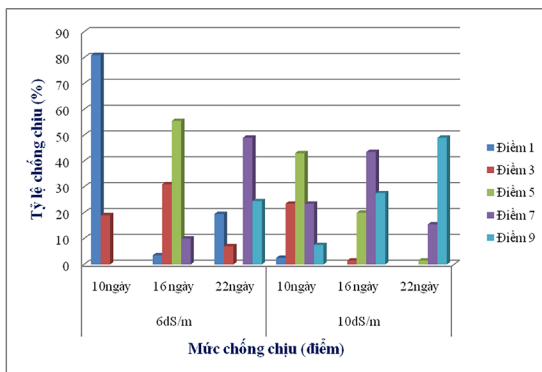
- Sau 22 ngày đánh giá, kết quả cho thấy:

+ Đối với môi trường bổ sung 0,3% muối NaCl đa số các giống lúa vẫn sống và bị ảnh hưởng chủ yếu ở mức từ điểm 5 đến điểm 7;

+ Đối với môi trường bổ sung 0,5% muối NaCl hầu hết các giống lúa đều bị chết, còn 31 giống biểu hiện nhiễm ở mức điểm 7 (tuy nhiên khả năng sinh trưởng đã bị giảm, ở mỗi giống



chỉ còn lại vài cây; 03 giống Chành trụi, Cườm dạng 2 và Nếp Cúc vẫn còn khả năng chống chịu mặn ở mức trung bình, điểm chống chịu < điểm 5. Kết quả sau khi giống chuẩn nhiễm IR29 bị chết, có 3 giống biểu hiện mức chống chịu cao là: Chành trụi, Cườm dạng 2, Nếp cúc, 40 giống biểu hiện chống chịu mặn ở mức trung bình (mức chịu mặn điểm 5), 87 giống tăng trưởng bị ngưng hoàn toàn, hầu hết lá bị khô, một vài chồi bị chết (có điểm đánh giá là 7).



Hình 49. Đồ thị thể hiện mức chịu mặn của các giống lúa trong điều kiện ngoài đồng ruộng có xử lý NaCl.

Thông qua đánh giá khả năng chống chịu mặn của 200 giống lúa nghiên cứu (trong điều kiện phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng), đã xác định được 03 giống lúa có khả năng chịu mặn cao là: Chành trụi, Cườm dạng 2 và Nếp cúc, các giống này có điểm chịu mặn < điểm 3.

## 2.2. Kết quả xác định chỉ thị phân tử liên kết với gen chịu mặn

Để xác định được chỉ thị phân tử liên kết với các gen/QTL quy định tính chịu mặn phục vụ công tác chọn tạo giống lúa bằng chỉ thị phân tử. Nghiên cứu đã tiếp cận và thực hiện theo



hướng sử dụng các chỉ thị liên kết với gen Saltol1 đã xác định và công bố trong giống lúa Pokkali để từ đó xác định chỉ thị phân tử liên kết thích hợp nhằm ứng dụng chúng cho chọn tạo giống lúa chịu mặn phục vụ sản xuất.

Các chỉ thị phân tử mặc dù đã được xác định liên kết với các tính trạng của cây trồng; tuy vậy khi sử dụng chúng trong công tác chọn tạo giống, người ta thường tiến hành xác định lại sự liên kết của chúng với tính trạng trong quần thể đang sử dụng. Sau khi xác định, nếu chỉ thị phân tử đó vẫn liên kết chặt (<5cM) với gen quy định tính trạng trong quần thể nghiên cứu thì chỉ thị đó sẽ được sử dụng trong các bước chọn giống tiếp theo. Trong nghiên cứu này đã tiến hành xác định nhằm tìm ra chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen chịu mặn Saltol1 phục vụ cho công tác chọn giống tiếp theo. Nghiên cứu đã được tiến hành như sau:

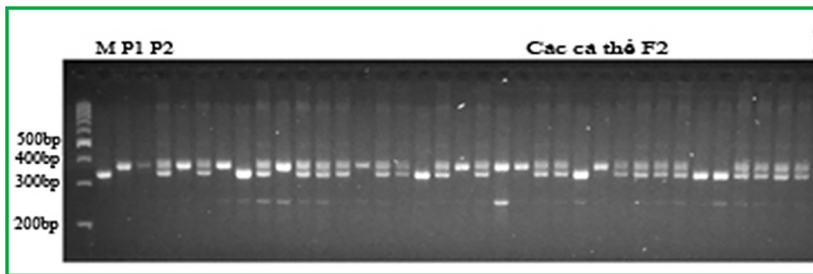
Lai giống Pokkali (mang gen Saltol 1) với giống P6 để tạo quần thể  $F_2$  và  $F_3$ . Sử dụng các dòng  $F_3$  để đánh giá tính chịu mặn và các cá thể  $F_2$  để tiến hành nhận dạng ADN.



Hình 50. Hình ảnh đánh giá khả năng chịu mặn của các dòng  $F_3$  thuộc tổ hợp lai giữa giống Pokkali và giống P6 ở nồng độ 0,6% NaCl.



Đánh giá tính chịu mặn của các dòng lúa  $F_3$  trong điều kiện  $EC_{NaCl} = 12dS/m$  (độ mặn 0,6% NaCl). Đề tài đã chủ động lựa chọn 120 dòng lúa  $F_3$  trong số các dòng đã được đánh giá khả năng chịu mặn với: 30 dòng có điểm đánh giá  $< 3$ , ký hiệu là R (đồng hợp tử chịu mặn); 60 dòng có điểm đánh giá từ 3 đến 7, ký hiệu là R-S (dị hợp tử chịu mặn) và 30 dòng có điểm đánh giá  $> 7$  (đồng hợp tử không chịu mặn) để phục vụ cho phân tích xác định chỉ thị liên kết.



Hình 51. Hình ảnh nhận dạng ADN các cây lúa  $F_2$  của tổ hợp lai giữa giống Pokkali và P6 sử dụng cặp mồi SSR (RM8094).

Thông qua các kết quả nghiên cứu đã được công bố (Mohammadi và Nejad, 2008; Lang và cs., 2008; Islam, 2011) đề tài đã lựa chọn các chỉ thị phân tử liên kết với QTL Saltol1 (có khoảng cách liên kết  $< 3cM$ ) trên nhiễm sắc thể số 1 để sàng lọc chọn ra những chỉ thị có liên kết chặt nhất. Qua sử dụng 12 chỉ thị gồm: RM1287, RM8094, RM3412, RM10745, RM10764, RM10772, RM493, RM140, RM10665, RM10825, RM28 và RM9 phân tích trên các cá thể  $F_2$  là nguồn gốc để tạo dòng  $F_3$  (hình 24). Kết quả phân tích cho thấy có 02 và 01 cá thể xảy ra tái tổ hợp trong số 120 cá thể  $F_2$ , tương ứng đối với chỉ thị RM10825 và RM8094 (bảng 18). Tính toán liên kết cho thấy chỉ thị RM10825 cách gen Saltol1 là 1,6 cM; chỉ thị RM8094 cách gen Saltol1 là 0,8 cM.



**Bảng 18:** Liên kết giữa chỉ thị phân tử và gen chịu mặn Saltol 1

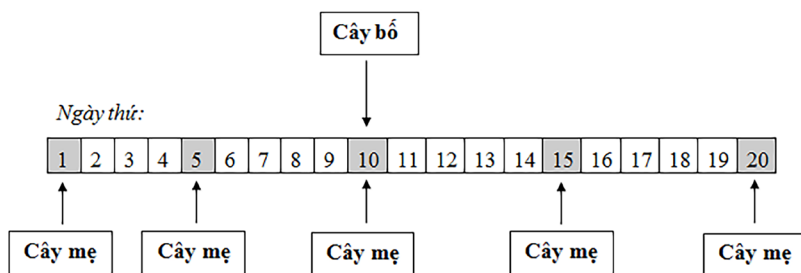
Chỉ tiêu theo dõi		Tỷ lệ phân ly			Số cá thể tái tổ hợp	Khoảng cách liên kết với gen
		R*	R-S*	S*		
Kiểu hình		30	60	30		
Kiểu gen	RM10825	28	62	30	2	1,6 cM
	RM8094	30	61	29	1	0,8 cM

\*: R: đồng hợp tử chịu mặn, R-S: di hợp tử; S đồng hợp tử không chịu mặn.

## 2.3. Tuyển chọn giống lúa chịu mặn

### 2.3.1. Lai chuyển gen chịu mặn vào lúa

Trong phép lai trở lại, giống lúa P6 (giống lúa nhận gen, được sử dụng làm mẹ) sẽ được gieo trước và sau giống lúa Pokkali (giống lúa cho gen kháng mặn Saltol1, được sử dụng làm bố) ở các thời điểm khác nhau theo sơ đồ hình 52.



Hình 52. Sơ đồ bố trí cây các giống lúa

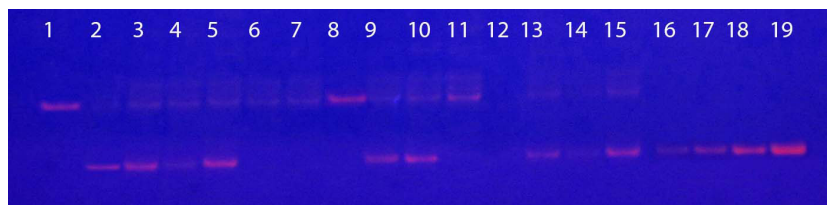
Khi cây lúa bố, mẹ chuẩn bị nở hoa tiến hành chọn khoảng 20-25 hạt ở phần giữa của bông. Quá trình khử đục được tiến hành vào chiều hôm trước và quá trình thụ phấn diễn ra vào sáng hôm sau từ 9 giờ đến 12 giờ (nếu gặp hôm trời râm mát có thể tiến hành lai tạo muộn hơn) bằng cách rũ hạt phấn của cây bố lên cây mẹ đã được khử đục (cầm cả bông lúa của cây bố



rũ phấn lên cây mẹ) sau đó dùng giấy can (đã được tạo thành bao) chụp lên những bông lúa vừa được thụ phấn để bao cách ly, thu lấy hạt  $F_1$  để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ở thế hệ con lai  $F_1$  do tất cả các cây đều có cùng kiểu gen (dạng dị hợp tử) nên chọn ngẫu nhiên một số cây có khả năng sinh trưởng tốt và sử dụng làm cây mẹ để lai trở lại (backcross) với giống P6 (làm bố), kết quả thu được thế hệ lai trở lại lần thứ nhất ( $BC_1F_1$ ), thu lấy hạt  $BC_1F_1$ . Trong quá trình lai trở lại khi “hàm lượng gen” của giống P6 trong các con lai tăng lên qua các thế hệ thì có khả năng xảy ra hiện tượng bị mất (bị đẩy ra ngoài) gen chịu mặn Saltol1. Vì vậy, ở mỗi thế hệ chúng tôi sử dụng chỉ thị RM8094 liên kết chặt với gen chịu mặn Saltol1 ở khoảng cách 0,8cM để tiến hành chọn lựa những cây lúa mang gen chịu mặn Saltol1.

Đối với thế hệ  $BC_1F_1$ , chúng tôi tiến hành gieo giống P6, Pokkali và các cá thể  $BC_1F_1$  (đã được đánh số theo thứ tự: 3, 4.v.v.) đồng thời tách chiết ADN của giống lúa P6, Pokkali và các cá thể con lai, sử dụng chỉ thị phân tử RM8094 để chọn những cá thể  $BC_1F_1$  mang gen Saltol1, điện di và kiểm tra sản phẩm.

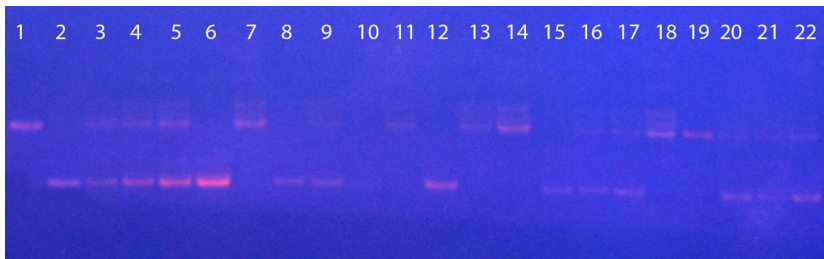


Hình 53. Sử dụng chỉ thị phân tử RM8094 để chọn lựa cây lúa mang gen chịu mặn Saltol1. Trong đó: 1. Giống P6; 2. Giống Pokkali; 3-19. Các cá thể  $BC_1F_1$ .

Theo hình ảnh điện di nhận dạng bố, mẹ và các cá thể con lai  $BC_1F_1$  thông qua sử dụng chỉ thị RM8094, chúng tôi tiến



hành lựa chọn các cây lúa có kiểu gen di hợp tử (hình 53 là các cây số: 3, 4, 5, 9, 10, 13 và 15) để chăm sóc và thực hiện phép lai hồi quy ở thế hệ tiếp theo với giống P6.



Hình 54. Sử dụng chỉ thị phân tử RM8094 để chọn lựa cây lúa mang gen chịu mặn Saltol1. Trong đó: 1. Giống P6; 2. Giống Pokkali; 3-22. Các cá thể BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>.

Tiến hành tương tự, chúng tôi đã thu các cây lúa (cá thể) BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (hình 54); BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (hình 55) và BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> (hình 56).

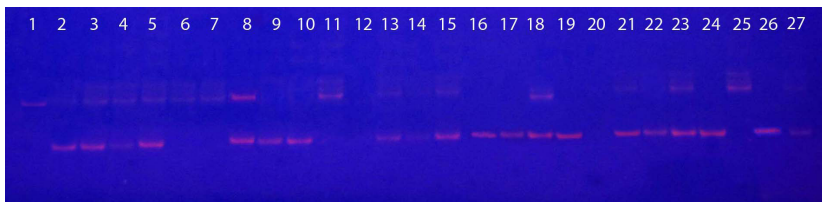


Hình 55. Sử dụng chỉ thị phân tử RM8094 để chọn lựa cây lúa mang gen chịu mặn Saltol1. Trong đó: 1. Giống P6; 2. Giống Pokkali; 3-23. Các cá thể BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>.



Hình 56. Sử dụng chỉ thị phân tử RM8094 để chọn lựa cây lúa mang gen chịu mặn Saltol1. Trong đó: 1. Giống P6; 2. Giống Pokkali; 3-22. Các cá thể BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>.





**Hình 57.** Sử dụng chỉ thị phân tử RM8094 để chọn lựa cây lúa mang gen chịu mặn Saltol1 ở dạng đồng hợp tử. Trong đó: 1. Giống P6; 2. Giống Pokkali; 3-27. Các cá thể BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub>.

Đến thế hệ BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>, chúng tôi cho các cá thể đã được lựa chọn mang gen chịu mặn Saltol1 tự thụ để thu lấy hạt BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub>. Tại thế hệ BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub>, chúng tôi sử dụng chỉ thị RM8094 để lựa chọn các cá thể BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> ở dạng đồng hợp tử gen chịu mặn (có vị trí băng ADN trùng với vị trí băng ADN của giống Pokkali). Theo kết quả được ghi nhận ở hình 32, chúng tôi đã lựa chọn các cá thể: 9, 10, 14, 16, 17, 19, 22, 24, 26 và 27.

Cuối cùng, chúng tôi đã lựa chọn ra 100 cá thể BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> mang gen chịu mặn Saltol1 ở dạng đồng hợp tử, để phát triển thành 100 dòng lúa được đặt tên theo thứ tự từ M1 đến M100 phục vụ cho chọn dòng lúa ưu tú.

### 2.3.2. Tuyển chọn giống lúa chịu mặn

#### *i) Đánh giá khả năng chịu mặn của các dòng lúa*

Thí nghiệm đánh giá khả năng chống chịu mặn của các dòng lúa được tiến hành theo phương pháp của IRRI (SES, 2002):

Mỗi ô thí nghiệm có kích thước là 10m<sup>2</sup> (2x5m) và được đắp bờ cao 20cm (có lót tấm nilon để chống thấm nước ra ngoài) trên bề mặt bằng phẳng. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần nhắc lại và được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (hình 58); giống lúa M6 được sử dụng làm giống đối chứng; thí nghiệm đánh giá khả năng chịu mặn của các dòng lúa được tiến hành vào vụ Mùa tại thị trấn Cồn Thoi, Kim Sơn, Ninh Bình.







Hình 58. Thí nghiệm đánh giá khả năng chịu mặn của các dòng lúa tại: Côn Thoi, Kim Sơn, Ninh Bình.



Các dòng lúa được tiến hành cấy với mật độ 45-50 khóm/ $m^2$ , cấy 1 dảnh với chế độ canh tác như sau:

- *Bón phân*: sử dụng 0,5kg phân NPK (tỷ lệ 16-16-8) để bón, trong đó lượng phân dùng để bón lót là 0,3kg và bón thúc là 0,2kg (giai đoạn cây lúa làm đòng);

- *Tưới nước*: thường xuyên duy trì mực nước nông (độ mặn trong nước được duy trì ở mức 5‰ tương đương EC = 10dS/m) theo chiều cao cây lúa (2 đến 5cm) trong mỗi ô thí nghiệm từ lúc cấy đến kết thúc đẻ nhánh, sau đẻ nhánh tiến hành rút nước và phơi ruộng trong 10 ngày để tránh đẻ nhánh vô hiệu, khi lúa có đòng đưa nước trở lại và giữ ở mức nước 5-7cm cho đến khi lúa đổ đuôi thì tháo cạn. Thông qua đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa đối chứng, chúng tôi đã thu được kết quả: các dòng lúa đều có khả năng chịu mặn tốt, điểm chống chịu mặn dao động từ điểm 1 đến điểm 3, tương đương với khả năng chống chịu mặn của giống đối chứng M6.

*ii) Đánh giá một số đặc điểm nông sinh học chính của các dòng lúa*

Song song với việc đánh giá khả năng chịu mặn, chúng đã tiến hành đánh giá một số đặc điểm nông sinh học chính của các dòng lúa trong điều kiện mặn tự nhiên theo phương pháp của IRRI (SES, 2002).

Mỗi ô thí nghiệm có kích thước là  $10m^2$  (2x5m) và được đắp bờ cao 20cm (có lót nilon để chống thấm nước ra ngoài) trên bề mặt bằng phẳng. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần nhắc lại và được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên; giống lúa M6 được sử dụng làm giống đối chứng; thí nghiệm đánh giá đặc điểm nông sinh học của các dòng lúa được tiến hành vào vụ Mùa tại thị trấn Cồn Thoi, Kim Sơn, Ninh Bình.



Các dòng lúa được tiến hành cấy với mật độ 45-50 khóm/ $m^2$ , cấy 1 dảnh với chế độ canh tác như sau:

- *Bón phân*: sử dụng 0,5kg phân NPK (tỷ lệ 16-16-8) để bón, trong đó lượng phân dùng để bón lót là 0,3kg và bón thúc là 0,2kg (giai đoạn cây lúa làm đòng);

- *Tưới nước*: thường xuyên duy trì mực nước nông theo chiều cao cây lúa (2 đến 5cm) trong mỗi ô thí nghiệm từ lúc cấy đến kết thúc đẻ nhánh, sau đẻ nhánh tiến hành rút nước và phơi ruộng trong 10 ngày để tránh đẻ nhánh vô hiệu, khi lúa có đòng đưa nước trở lại và giữ ở mức nước 5-7cm cho đến khi lúa đổ đui thì tháo cạn.

### 2.3.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và độ thuần đồng ruộng của các dòng lúa

Đối với khả năng sinh trưởng, phát triển của của dòng lúa; trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá các chỉ tiêu như: sức sống cây mạ, độ dài giai đoạn trổ, độ thoát cổ bông, độ tàn lá, độ cứng cây, chiều cao cây và thời gian sinh trưởng. Thông qua đánh giá, chúng tôi đã thu được một số kết quả như sau:

- *Sức sống của cây mạ*: đây là chỉ tiêu được tiến hành đánh giá vào giai đoạn thứ 2 của cây lúa. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sức sống của các dòng lúa hầu hết ở mức điểm 5 (cây sinh trưởng trung bình, hầu hết có một dảnh) và tương đương với giống đối chứng M6 (điểm chịu mặn là 5).

- *Độ dài giai đoạn trổ của các dòng lúa*: chỉ tiêu này được đánh giá ở giai đoạn 6 của cây lúa, qua đánh giá cho thấy hầu hết các dòng lúa có điểm đánh giá mặn ở mức điểm 5, lúa trổ trung bình từ 4 đến 7 ngày và cũng tương tự như giống đối chứng M6.



- *Độ thoát cổ bông của các dòng lúa*: chỉ tiêu này dao động từ điểm 1 (thoát tốt) đến điểm 3 (thoát trung bình). Tuy nhiên, chỉ có một số ít dòng lúa có độ thoát cổ bông ở mức trung bình tương tự giống đối chứng M6.

- *Độ tàn lá của các dòng lúa*: dao động từ điểm 1 (lá vẫn giữ được màu xanh tự nhiên, lá tàn muộn và chậm) đến điểm 5 (lá bị biến vàng, lá tàn ở mức trung bình). Trong đó, đa phần các dòng có độ tàn lá ở mức điểm 1 tương tự như giống đối chứng M6.

- *Độ cứng cây*: đa phần các dòng lúa có độ cứng cây ở mức điểm 3 (cứng trung bình, cây không bị nghiêng), chỉ có một số dòng có độ cứng cây tương đương với giống đối chứng M6 ở mức điểm 5 (cứng trung bình, cây bị nghiêng) là các dòng: M4, M15, M17, M24, M32, M39, M46, M53, M60, M61, M68, M69, M70, M71, M78, M85, M92, M93 và M94.

- *Chiều cao cây của các dòng lúa*: dao động từ 90,2cm (dòng M70) đến 118,5cm (dòng M49). Từ kết quả trên chúng tôi, chiều cao cây của các dòng đều thuộc nhóm bán lùn (<110cm) đến cao trung bình (dao động từ 110-130cm). Trong đó, có 39 dòng lúa có chiều cao ở mức trung bình tương đương với giống đối chứng M6 (110-130cm), chiếm 39% tổng số dòng tiến hành thí nghiệm; còn lại 69 dòng lúa có chiều cao thuộc nhóm bán lùn (<110cm), chiếm 69% tổng số dòng tiến hành thí nghiệm.

- *Thời gian sinh trưởng của các dòng lúa*: các dòng lúa có thời gian sinh trưởng vụ Mùa dao động từ 124 ngày (dòng M44) đến 146 ngày (dòng M75), giống đối chứng M6 có thời gian sinh trưởng là 150 ngày. Kết quả trên cho thấy, các dòng lúa nghiên cứu đều có thời gian sinh trưởng ngắn hơn giống đối chứng M6.

- *Đối với chỉ tiêu về độ thuần đồng ruộng*: quá trình đánh



giá được tiến hành từ giai đoạn 6 đến giai đoạn 9 của cây lúa. Thông qua kết quả đánh giá chúng tôi nhận thấy, các dòng lúa đều có độ thuần đồng ruộng ở mức trung bình (điểm 3, số lượng cây khác dạng chiếm từ 0,3%-0,5%) và thấp hơn so với giống đối chứng M6 (điểm 1, độ thuần ở mức cao, số lượng cây khác dạng <0,3%). Chúng tôi tiếp tục lựa chọn những cá thể có độ thuần tốt nhất (có sự đồng đều cao) của mỗi dòng để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

#### 2.3.4. Đánh giá năng suất của các dòng lúa

Để chọn lựa được các giống lúa mới có tiềm năng năng suất cao, việc đánh giá các yếu tố cấu thành năng suất là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá các yếu tố cấu thành năng suất như: số bông/khóm, số hạt chắc/bông, tỷ lệ hạt lép và khối lượng nghìn hạt. Thông qua đánh giá, chúng tôi đã thu được một số kết quả như sau:

- Về số bông/khóm: dao động từ 2,5 bông/khóm (dòng M17) đến 8,5 bông/khóm (dòng M15). Trong đó có 10 dòng có số bông/khóm bằng hoặc lớn hơn giống đối chứng M6 (6,8 bông/khóm) bao gồm: dòng M4 (7 bông/khóm), dòng M15 (8,5 bông/khóm), dòng M53 (7,5 bông/khóm), dòng M66 (7 bông/khóm), dòng M67 (7 bông/khóm), dòng M73 (7 bông/khóm), M83 (7 bông/khóm), dòng M84 (7 bông/khóm), dòng M87 (7 bông/khóm) và dòng M91 (7,5 bông/khóm).

- Số hạt chắc/bông của các dòng lúa: dao động từ 94 hạt chắc/bông (dòng M3 và dòng M23) đến 145 hạt chắc/bông (dòng M15), trung bình đạt 119,2 hạt chắc/bông; trong đó có 87 dòng lúa có tỷ lệ số hạt chắc/bông cao hơn so với giống đối chứng M6 (số hạt chắc/bông là 110 hạt/bông).

- Tỷ lệ hạt lép của các dòng lúa: dao động từ 6% (dòng M3



và dòng M78) đến 15% (dòng M20 và dòng M29). Trong đó, tỷ lệ hạt lép của các dòng lúa phần lớn nằm trong khoảng từ 9% đến 12%, không có sự sai khác nhiều về tỷ lệ hạt lép so với giống đối chứng M6 (10%);

- *Khối lượng nghìn hạt của các dòng lúa*: dao động từ 22,05g (dòng M12 và dòng M19) đến 24,5g (dòng M69). Trong đó, 54 dòng lúa có khối lượng nghìn hạt lớn hơn hoặc bằng so với giống đối chứng M6 (22,6g), chiếm 54% số lượng dòng lúa thí nghiệm; có 46 dòng lúa có khối lượng nghìn hạt nhỏ hơn giống đối chứng M6, chiếm 46% số lượng dòng lúa thí nghiệm.

Thông qua kết quả đánh giá về năng suất của các dòng lúa chúng tôi nhận thấy: năng suất thực thu của các dòng lúa có sự sai khác khá lớn, dao động từ 27,5 tạ/ha (dòng M7) đến 65,35 tạ/ha (dòng M15). Trong đó có 13 dòng có năng suất thực thu bằng hoặc cao hơn so với giống đối chứng M6 (55,5 tạ/ha), bao gồm: dòng M4 (62,35 tạ/ha), dòng M15 (65,35 tạ/ha), dòng M28 (56,35 tạ/ha), dòng M46 (55,5 tạ/ha), dòng M48 (60,3 tạ/ha), dòng M52 (59,1 tạ/ha), dòng M56 (56,5 tạ/ha), dòng M57 (56,8 tạ/ha), dòng M60 (60,8 tạ/ha), dòng M65 (56,6 tạ/ha), dòng M72 (56,4 tạ/ha), dòng M91 (56,6 tạ/ha) và dòng M98 (56,4 tạ/ha); dòng M4 và M15 là các dòng có năng suất thực thu cao nhất, tương ứng là 62,35 tạ/ha và 65,35 tạ/ha.

### 2.3.5. Đánh giá khả năng chống chịu sâu, bệnh hại chính của các dòng lúa

Cùng với việc đánh giá một số đặc tính nông sinh học chính của các dòng lúa, chúng tôi còn tiến hành đánh giá khả năng chống chịu một số loại sâu, bệnh hại chính ở điều kiện tự nhiên trên đồng ruộng. Kết quả đánh giá bước đầu cho thấy, các dòng lúa đều có khả năng chống chịu sâu bệnh hại như: đạo

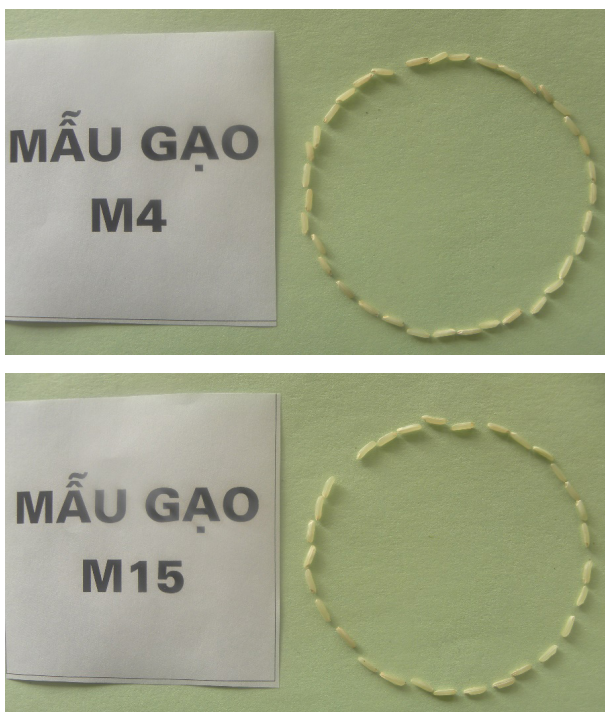


ôn, bạc lá, rầy nâu, sâu đục thân với điểm đánh giá dao động từ điểm 0 đến điểm 3; đối với bệnh khô vằn, điểm đánh giá dao động từ điểm 1 đến điểm 3.

### 2.3.6. Đánh giá chất lượng của các dòng lúa

Thông qua kết quả đánh giá một số chỉ tiêu liên quan đến chất lượng gạo, chúng tôi đã thu được một số kết quả như sau:

- Về tỷ lệ gạo lật của các dòng lúa: dao động từ 71,1% (dòng M55) đến 76,5% (bao gồm các dòng: M1, M5, M8, M16, M23, M31, M46, M50, M53, M56, M61, M68, M76, M83, M86, M91 và M95). Từ kết quả trên chúng tôi thấy, tỷ lệ gạo lật của các dòng không có sự sai khác nhiều so giống đối chứng M6 (72,5%).



Hình 59. Hình dạng hạt gạo của dòng lúa M4 và M15



- Về tỷ lệ gạo xát của các dòng lúa: dao động từ 62% đến 69,4%, và không có sự sai khác nhiều so với giống đối chứng M6 (65,5%).

- Về tỷ lệ gạo nguyên: đạt trên 70%, chiều dài hạt gạo dao động từ 5,7 đến 6,5mm đều lớn hơn đối chứng là giống M6. Đây là những chỉ tiêu rất quan trọng có thể hướng tới thị trường gạo xuất khẩu khi sản xuất trên diện tích lớn.

- Hàm lượng amylose, protein và độ bạc bụng: kết quả phân tích cho thấy hàm lượng amylose thấp dưới 20%; hàm lượng protein khá cao (>9%), đặc biệt trong đó có 02 dòng là M4 và M15 có hàm lượng protein trong hạt gạo lên tới 10,15% và 10,29%; độ bạc bụng của các dòng lúa đều thấp hơn đối chứng.

- Về chất lượng cơm của các dòng lúa: đa số các dòng lúa có mùi thơm vừa, hạt gạo trong, bóng, cơm mềm, ăn ngon hơn giống đối chứng M6; đặc biệt 02 dòng lúa M4 và M15 có các đặc tính về: mùi thơm, độ mềm, độ dính, độ trắng, độ bóng và ăn ngon hơn các dòng lúa khác.

Thông qua đánh giá khả năng chịu mặn, một số đặc điểm nông sinh học chính của các dòng lúa chúng tôi đã lựa chọn được 02 dòng lúa (M4 và M15) phù hợp với những tiêu chí đề ra: có khả năng chống chịu mặn tốt (điểm chống chịu mặn đạt mức điểm 1), có năng suất cao và có chất lượng tốt. Các dòng lúa này tiếp tục được nhân lên để đánh giá ở các giai đoạn tiếp theo.







Hình 60. Hình ảnh khảo nghiệm sản xuất dòng lúa triển vọng M15



Hình 61. Hình ảnh khảo nghiệm sản xuất dòng lúa triển vọng M4



## 2.3.7. Kết quả khảo nghiệm các dòng lúa

### 2.3.7.1. Kết quả khảo nghiệm tác giả các dòng lúa

Quy trình khảo nghiệm tác giả được tiến hành theo Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia (QCVN 01-55: 2011/BNNPTNT):

Mỗi ô thí nghiệm có kích thước là 360m<sup>2</sup>, thí nghiệm được tiến hành với 3 lần nhắc lại và được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên; giống lúa M6 và P6 được sử dụng làm giống đối chứng; đánh giá được tiến hành vào vụ Xuân và vụ Mùa tại Ninh Bình, Thái Bình, Nam Định, Hải Phòng, Quảng Ninh.

Các dòng lúa được tiến hành cấy với mật độ 45-50 khóm/m<sup>2</sup>, cấy 1 dảnh với chế độ canh tác như sau:

- *Bón phân*: sử dụng 18kg phân NPK (tỷ lệ 16-16-8) để bón, trong đó lượng phân dùng để bón lót là 11kg và bón thúc là 7kg (giai đoạn cây lúa làm đòng).

- *Tưới nước*: thường xuyên duy trì mực nước nông theo chiều cao cây lúa (2 đến 5cm) từ lúc cấy đến kết thúc đẻ nhánh, sau đẻ nhánh tiến hành rút nước và phơi ruộng trong 10 ngày để tránh đẻ nhánh vô hiệu, khi lúa có đòng đưa nước trở lại và giữ ở mức nước 5-7cm cho đến khi lúa đổ đuôi thì tháo cạn.

Thông qua quá trình khảo nghiệm chúng tôi thấy, dòng lúa M4 và M15 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện mặn có thể lên tới 6‰; có độ thuần đồng ruộng ở mức cao (dòng M4 có mức điểm 1) đến trung bình (dòng M15 có mức điểm 3); có năng suất cao: dòng M4 đạt ~ 6,2 tấn/ha và dòng M15 đạt ~ 6,5 tấn/ha; có chất lượng tốt: hạt thon dài, hàm lượng amylose <22% (dòng M4 là 19,4% và dòng M15 là 19,2%), hàm lượng protein >10% (dòng M4 là 10,15% và dòng M15 là 10,29%), có mùi thơm, ăn ngon; thời gian sinh trưởng:



**PHẦN III. KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU MẶN  
BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ**

dòng M4, vụ Xuân là 137 ngày, vụ Mùa là 125 ngày và dòng M15, vụ Xuân là 143 ngày, vụ Mùa là 131 ngày.

**Bảng 19:** Bảng tổng hợp các đặc điểm hình thái, nông học và khả năng chịu mặn của dòng lúa triển vọng M4, M15.

TT	Chỉ tiêu theo dõi	Dòng lúa M4	Dòng lúa M15	Giống lúa M6 (đ/c)	Giống lúa P6 (đ/c)
1	Khả năng chịu mặn (%)	5	5	4	Nhiễm mặn
2	Sức sống mạ (điểm)	5	5	5	5
3	Khả năng chống chịu sâu bệnh hại:				
	- Đạo ôn;	1	1	1	1
	- Bạc lá;	1	1	5	3
	- Khô vằn;	3	3	3	5
- Rầy nâu.	1	1	1	1	
4	Dạng hình cây	Trung gian	Trung gian	Trung gian	Trung gian
5	Dạng lá	To, dài	To, dài	To, ngắn	To, dài
6	Màu sắc lá	Xanh nhạt	Xanh đậm	Xanh nhạt	Xanh đậm
7	Chiều dài bông (cm)	26,5	27,7	25,5	26,2
8	Độ thuần đồng ruộng (điểm)	1	3	1	1
9	Số danh hữu hiệu/khóm	7	8	6	7
10	Góc lá đồng (điểm)	3	3	3	3
11	Dài lá đồng (cm)	24,4	28,5	22,5	25,2
12	Rộng lá đồng (cm)	1,2	1,6	1,6	1,5
13	Cao cây (cm)	110	115	110	97
14	Khả năng trở thoát (điểm)	1	1	1	1
15	Dạng hạt	Thon dài	Thon dài	Dạng bầu	Thon



TT	Chỉ tiêu theo dõi	Dòng lúa M4	Dòng lúa M15	Giống lúa M6 (đ/c)	Giống lúa P6 (đ/c)
16	Màu hạt	Vàng sáng	Vàng sáng	Vàng sáng	Vàng sáng
17	Số hạt chắc/ bông (hạt)	138	145	140	142
18	Tỉ lệ lép (%)	8,7	8,7	9,3	9,7
19	Khối lượng nghìn hạt (gam)	22,7	24,3	23,6	24,3
20	Năng suất thực thu (tấn/ha)	6,2	6,5	5,6	6,5
21	Thời gian sinh trưởng (ngày):				
	- Vụ Xuân;	137	143	160	132
	- Vụ Mùa	128	131	126	117
22	Hàm lượng amylose (%)	19,4	19,2	21,7	19,5
23	Hàm lượng protein (%)	10,15	10,29	9,39	10,5
24	Mùi (điểm)	3	3	1	1
25	Độ ngon (điểm)	4	4	3	4

\*Thí nghiệm được tiến hành tại Quảng Ninh, Nam Định, Thái Bình, Hải Phòng, Ninh Bình, Hà Nội vụ Xuân và Mùa

### 2.3.7.2. Kết quả khảo nghiệm Quốc gia

Cùng với việc khảo nghiệm tác giả, các dòng lúa M4 và M15 đã được gửi khảo nghiệm Quốc gia (khảo nghiệm VCU) vào vụ Xuân và vụ Mùa. Kết quả khảo nghiệm cho thấy:

- *Thời gian sinh trưởng của các giống*: trung bình từ 135-160 ngày, trong đó giống M4 có thời gian sinh trưởng ngắn nhất (135 ngày), giống đối chứng M6 có thời gian sinh trưởng là 160 ngày, giống M15 và giống đối chứng BT7 có thời gian sinh trưởng là 140 ngày. Do đầu vụ nồng độ muối cao lên thời gian sinh trưởng tại điểm thí nghiệm kéo dài hơn 4-5 ngày so với



điều kiện bình thường.

- *Về chiều cao cây*: chiều cao trung bình của các giống lúa dao động từ 92,8-115,3cm, trong đó giống lúa có chiều cao lớn nhất là giống đối chứng M6 (115,3cm) và thấp nhất là giống Bắc thơm 7 (92,8cm); 02 giống khảo nghiệm M4 và M15 có chiều cao lần lượt là 105,2cm và 115,2cm.

- *Về sức sống của mạ, độ dài giai đoạn trổ và độ tàn lá của các giống lúa*: kết quả cho thấy đều có điểm đánh giá ở mức trung bình.

- *Về độ cứng*: độ cứng cây của các giống lúa đều nằm trong khoảng từ điểm 1 đến điểm 3 và đều có khả năng chống đổ tốt hơn giống đối chứng M6.

- *Độ thuần đồng ruộng*: các giống nhìn chung có độ thuần đồng ruộng từ khá đến trung bình (điểm 1-5).

- *Về năng suất của các giống lúa*: kết quả cho thấy 02 giống lúa M4 và M15 đều cho năng suất cao hơn giống đối chứng M6. Trong đó, giống M15 có năng suất 58,0tạ/ha, giống M4 có năng suất là 56,0tạ/ha; giống đối chứng Bắc thơm 7 có năng suất là 37,8tạ/ha.

Thông qua các kết quả phân tích, đánh giá chúng tôi có nhận xét sau: các giống lúa có nhiều đặc điểm nông học tốt, có triển vọng và cho năng suất cao đạt từ 56,0-58,0tạ/ha và cao hơn đối chứng tại hầu hết các điểm khảo nghiệm; các giống có tỷ lệ gạo nguyên cao > 71%, giống đối chứng M6 là 69,4%; các giống có hàm lượng protein cao hơn đối chứng, giống M4 có hàm lượng protein là 9,59%, gạo trắng, cơm dẻo, dính hơn đối chứng; đặc biệt giống M15 có mùi thơm nhẹ.



Từ kết quả khảo nghiệm tác giả và khảo nghiệm Quốc gia cho thấy: M4 và M15 là những dòng lúa có năng suất cao (dòng M4 đạt ~ 6,2 tấn/ha và dòng M15 đạt ~ 6,5 tấn/ha) và có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện mặn từ 3-6‰; đặc biệt hai dòng này có chất lượng tốt: hạt thon dài, hàm lượng amylose và protein của hai giống tương ứng là 19,4% và 19,2%, 10,15% và 10,29%; gạo có mùi thơm và ăn ngon.

**Bảng 20:** Bảng tổng hợp kết quả khảo nghiệm Quốc gia dòng lúa M4 và M15

TT	Chỉ tiêu theo dõi	Dòng lúa M4	Dòng lúa M15	Giống lúa M6 (đ/c)	Giống lúa BT7 (đ/c)
1	Khả năng chịu mặn (điểm)	3	3	3	7
2	Khả năng chống chịu bệnh hại chính (điểm): - Đạo ôn; - Bạc lá;	1	1	1	1
		1	1	1	3
3	Chiều cao cây (cm)	105,2	115,2	115,3	92,8
4	Độ thuần đồng ruộng (điểm)	1	3	1	1
5	Năng suất thực thu (tạ/ha)	56,0	58,0	55,4	37,8
6	Thời gian sinh trưởng (ngày): - Vụ Xuân;	135	140	160	140
7	Hàm lượng amylose (%)	18,32	20,23	22,04	-
8	Hàm lượng protein (%)	9,51	9,06	8,43	-

\* Nguồn: Trung tâm KKN giống, sản phẩm Cây trồng Quốc gia.



# TÀI LIỆU THAM KHẢO

## Tiếng Việt

1. Bùi Bá Bồng và Nguyễn Duy Bảy (1999), Nghiên cứu biến dị sô-ma trên giống lúa Một Bụi và Khao Dawk Mali 105, Kết quả nghiên cứu khoa học Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, 1977-1999, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội: trg. 23-30.
2. Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, (2003), Cơ sở di truyền tính chống chịu đối với thiệt hại do môi trường của cây lúa, Nhà xuất bản Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.
3. Nguyễn Thị Lang, Trịnh Thị Luy, Bùi Thị Dương Khuyên và Bùi Chí Bửu (2008), "Nghiên cứu di truyền và chọn tạo giống lúa kháng bệnh đạo ôn và bạc lá", Omonrice 16, Viện lúa Đồng bằng Sông Cửu Long.
4. Nguyễn Tấn Hình và cộng sự (2006), Nghiên cứu chọn tạo giống lúa và biện pháp kỹ thuật canh tác lúa cho những vùng có điều kiện khó khăn, Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật đề tài, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm.
5. Lã Tuấn Nghĩa, Phạm Thị Thúy, Lê Anh, Lê Như Kiều (2008), Ứng dụng công nghệ chỉ thị phân tử trong xác định đa dạng di truyền nòi năm đạo ôn hại lúa ở các tỉnh miền Bắc và miền Trung Việt Nam, Tạp chí Nông nghiệp & PTNT số 4: trg. 13-18.
6. Lã Tuấn Nghĩa (2005), Đa dạng di truyền quần thể năm đạo ôn ở Miền Bắc và Miền Trung Việt Nam, Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn, số 21: trg. 23-28.
7. Lã Tuấn Nghĩa (2011), Ứng dụng phương pháp chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa kháng bệnh đạo ôn, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 2-3: trg: 13-16.
8. Lã Tuấn Nghĩa (2011), Kết quả chọn tạo giống lúa kháng bệnh đạo ôn năng suất cao, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 12: trg. 59-64.
9. Lã Tuấn Nghĩa (2012), Nghiên cứu lập bản đồ QTL tính kháng đạo ôn ở lúa, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 2: trg. 9-13.
10. Lã Tuấn Nghĩa (2012), Nghiên cứu đa dạng di truyền và mối liên kết giữa kiểu gen RGA với tính kháng bệnh đạo ôn, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 4: trg. 10-15.
11. Lã Tuấn Nghĩa và Lê Thị Thu Trang (2012), Nghiên cứu khả năng chịu mặn và đa dạng di truyền của một số giống lúa địa phương Việt Nam, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 12: trg. 19-26.
12. Lã Tuấn Nghĩa, Nguyễn Kiến Quốc và Nguyễn Thị Khánh Vân (2012), Nghiên cứu đánh giá tính kháng đạo ôn, đa dạng di truyền và xác định alen kháng đạo ôn ở một số giống lúa, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 12: trg. 37-42.

13. Lã Tuấn Nghĩa, Hoàng Thị Huệ, Lê Thị Thu Trang, Phạm Thị Thùy Dương, Đàm Thị Thu Hà, Đỗ Hà Thu, Chu Thị Mây (2017). Nghiên cứu đa dạng các giống lúa địa phương tỉnh Quảng Nam dựa trên chỉ tiêu chất lượng và chỉ thị phân tử SSR. Tạp chí Khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam, số 8, tr 7-11.
14. Lê Hùng Lĩnh, Lê Huy Hàm, Nguyễn Thúy Kiều Tiên, Lê Minh Hà, Chu Đức Hà, Khuất Thị Mai Lương (2020), Kết quả chọn tạo giống lúa chịu mặn SHPT 15 bằng phương pháp chọn dòng cá thể sử dụng chỉ thị phân tử. Tạp chí Khoa học và công nghệ Đại học Thái nguyên, số 225(08): trg 6-11.
15. Nguyễn Kiến Quốc, Hoàng Thị Huệ và Lã Tuấn Nghĩa, (2014), Lập bản đồ QTL tính kháng mặn ở lúa, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 22/2014.
16. Hồ Viết Thế, Thomson M. và Ismail (2015), Lập bản đồ các tính trạng số lượng liên quan đến khả năng kháng mặn của lúa ở giai đoạn mạ, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Vol. 40 (2): trg. 44-51.
17. Nguyễn Nghĩa Thìn và Đặng Thị Sy (1998), "Hệ thống học thực vật", Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, tr. 23-53.
18. Lã Tuấn Nghĩa (2012), Nghiên cứu khả năng chịu mặn của các giống lúa, Tạp chí Nông nghiệp và PTNT số 20: trg. 10-14.
19. Phạm Thiên Thành, Dương Thị Thường, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Thu, Dương Xuân Tú, Phan Thị Thanh, (2018). Khảo sát nguồn gen kháng bệnh đạo ôn trên một số giống lúa bằng chỉ thị ADN. Tạp chí khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, số 8(90)/2018: Tr 37 – 43.
20. Phạm Thiên Thành, Tăng Thi Diệp, Tống Thị Huyền, Đỗ Thị Hương, Nguyễn Trí Hoàn, Dương Xuân Tú, Nguyễn Thị Thu, Phan Thị Thanh, (2019). Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử ADN chọn tạo giống lúa kháng bệnh đạo ôn. Nông nghiệp và phát triển nông thôn – Kỳ 1 – Tháng 8/2019 (số 15): tr 11 – 16.
21. Phan Hữu Tôn (2016). Khảo sát khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn, rầy nâu của 4 giống lúa phục tráng: Nếp Đèo Đàng, Tề Pude, Blechâu và khẩu dao. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2016, tập 14:551-559
22. Trần Hữu Phúc, Vũ Anh PHáp, Nguyễn Lam Minh, Trần Thị Xuân Mai và Phạm Văn Mịch (2018). Nhận diện và đánh giá tính chống chịu mặn của các giống lúa mùa dựa trên dấu phân tử SSR (Simple sequence repeats). Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ, tập 54, số 6B (2018):82-89
23. Nguyễn Trọng Phước, Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2021). Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống lúa chống chịu mặn (*Oryza sativa*. L). Nông nghiệp và phát triển nông thôn – Kì 1 – tháng 3/2021: tr 3-9.



## Tiếng Anh

24. Chen X.W., Li S.G., Xu J.C., Zhai W.X., Ling Z. and Ma B.T. (2013), Identification of Two Blast Resistance Genes in a Rice Variety, *Digu*, *Phytopathology* 152: pp. 77–85;
25. Duong, Trung, Khoa, Vuong, Huong, Trung, Chen, La Tuan Nghia, Toan and Khanh, (2015), Molecular diversity of NBS-LRR disease resistance gene (RGAs) in Vietnamese rice varieties, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* Vol.16: 52-61.
26. F.J. Rohlf, (2001), "NYSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate analysis System", Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York.
27. Faivre-Rampant O., Bruschi G., Abbruscato P., Cavigiolo S., Picco A.M., Borgo L., Lupotto E. and Pifanelli P. (2011), Assessment of genetic diversity in Italian rice germplasm related to agronomic traits and blast resistance (*Magnaporthe oryzae*), *Mol. Breeding* 27, pp.233-246;
28. G. Mohamadi-Nejad, Arzani A., Rezai A.M., Singh R.K. and Gregorio G.B., (2008), Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the salt0 QTL, *African Journal Biotechnology* Vol. 7 (6): pp. 730-736.
29. Hoang Thi Hue, La Tuan Nghia, Hoang Tuyet Minh, La Hoang Anh, Le Thi Thu Trang, Tran Dang Khanh.,(2018). Evaluation of genetic diversity of local-colored rice landraces using SSR markers. *International Letters of Natural Sciences.*;67.
30. Ishihara, Yuriko, Shinichi, Kaworu, La Tuan Nghia, Keiko, Taketo, Fumihiko and Shinzo, (2014), Quantitative trait locus analysis of resistance to panicle blast in the rice cultivar Miyazakimochi, *SpringerOpen Journal*, Vol7: 2-11.
31. International Rice Research Institute, 1996. Standard evaluation system for rice (SES), IRRI, Los Bãnos, Philippines:44-70.
32. K. Ghomi, Rabiei B., Sabcuri H. and Sabouri A., (2013), Mapping QTLs for traits related to salinity tolerance at seedling stage of rice (*Oryza sativa* L.), *OMICS a Journal of Integrative Biology*, Vol. 17 (No.5): pp. 242-251.
33. K. Su-Chen, Chieh-Wei K., Yann-Rong L. and Yong-Pei W., (2013), Marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Taiwan Agricultural research* 62 (2): pp. 137-156.
34. Keb-Llanes., et al., (2002), Plant DNA Extraction protocol, *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: pp. 299a-299e.
35. L.H. Linh, Linh T.H., Xuan T.D., Ham L.H., Ismail A.M. and Khanh T.D., (2012), Molecular breeding to improve salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) in the Red river delta of Vietnam, *International Journal of Plant Genomics*: pp. 1-9.

36. La Hoang Anh, Nguyen Kien Quoc, Hoang Thi Hue and La Tuan Nghia, (2014), Identification of QTLs tolerance to salinity in rice (*Oryza sativa* L.), *International Journal of Development Research*, vol.4: 2113-2118.
37. La Hoang Anh, Hoang Thi Hue, Nguyen Kien Quoc, La Tuan Nghia, Khuat Huu TRung, Tran Trung TN, Trang DH, Tran Dang Xuan TD, Tran Dang Khanh (2016). Effect of salt on growth of rice landraces in Vietnam. *International Letters of Natural Sciences.*;59.
38. M.H.M. Ammar, Singh, K.R., Singh, A.K., Mohapatra, T., Sharma, T.R. and Shingh N.K., (2007), Mapping QTLs for salinity tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.), *African Crop Science Conference Proceeding Vol. 8*: pp. 617-620.
39. M.R. Islam, Salam, M.A., Hassan L., Collard B.C.Y. singh R.K. and Gregorio G.B., (2011), QTL mapping for salinity tolerance at seedling stage in rice, *Emir.J.Food Agric.: 23* (2): pp. 137-146.
40. McCouch, L. Teytelman, Y. Xu, B.K. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, Yano M., Fjellstrom R., DeClerck G., Schneider D., Cartinhour S., Ware D., 2 and Stein L., (2002), Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.), *DNA Research*, 9, pp. 199-207
41. Nguyen Thi Lang, Nguyen Trong Phuoc, Pham Thi Thu Ha, Bui Chi Buu, 2017b. Identifying QTLs Associated and Marker Assisted Selection for Salinity Tolerance at the Seedling, Vegetative and Reproductive Stages in Rice (*Oryza Sativa* L.). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*. Vol-2, Issue-6. <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.6.20>. ISSN: 2456- 1878.
42. Qing-Hua, P., Zhen-Di, H., Takatoshi, T., Ling, W., (2003), "Fine mapping of the blast resistance gene Pi-15, Linked to Pi-1, on rice chromosome 9", *Acta Botanica Sinica*, 45 (7): 871-877.
43. Standard Evaluation System for rice (SES), *International Rice Research Institute - IRRI* (2002), Metro Manila, Philippines
44. Manojkumar HB, Deepak CA, Harinikumar KM, Rajanna MP, Chethana B. Molecular profiling of blast resistance genes and evaluation of leaf and neck blast disease reaction in rice. *J Genet.* 2020;99:52. PMID: 32661205.
45. Teerasan, W., Moonsap, P., Longya, A., Damchuay, K., Ito, S., Tasanasuwan, P., . . . Jantasuriyarat, C. (2022). Rice blast resistance gene profiling of Thai, Japanese and international rice varieties using gene-specific markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 20(1), 22-28. doi:10.1017/S1479262122000089

46. Sudarsanam, Vijay & Prasad, M. & Rambabu, Ratnala & Madhavi, K. & Phaneendra, Bhaskara & Kumar, Vipparla & Sundaram, Raman & Satya, A. & Sheshu madhav, Maganti & Vellaichamy, Prakasam. (2019). Marker-Assisted Introgression of Pi-1 Gene Conferring Resistance to Rice Blast Pathogen *Pyricularia oryzae* in the Background of Samba Mahsuri. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 8. 2133-2146. 10.20546/ijcmas.2019.801.223.
47. Islam, Mirza & Gupta, Rigyan & Islam, Md. (2019). Assessment of rice genotypes for salt stress at seedling and reproductive stage by using phenotypic and molecular markers. 176-183.
48. Rasheed A, Li H, Nawaz M, Mahmood A, Hassan MU, Shah AN, Hussain F, Azmat S, Gillani SFA, Majeed Y, Qari SH and Wu Z (2022) Molecular tools, potential frontiers for enhancing salinity tolerance in rice: A critical review and future prospective. *Front. Plant Sci.* 13:966749. doi: 10.3389/fpls.2022.966749
49. Le, T. D., Gathignol, F., Vu, H. T., Nguyen, K. L., Tran, L. H., Vu, H. T. T., et al. (2021). Genome-wide association mapping of salinity tolerance at the seedling stage in a panel of Vietnamese landraces reveals new valuable QTLs for salinity stress tolerance breeding in rice. *Plan. Theory* 10:1088. doi: 10.3390/plants10061088
50. Yadav, A.K., Kumar, A., Grover, N. *et al.* Marker aided introgression of 'Saltol', a major QTL for seedling stage salinity tolerance into an elite Basmati rice variety 'Pusa Basmati 1509'. *Sci Rep* 10, 13877 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70664-0>
51. Wu J., Menchu B., Zhuang J., Zheng K. and Hei L., (2004), Tagging blast resistance gene Pi1 in rice (*Oryza sativa*) using candidate resistance genes. *Rice science* 11(5-6): pp. 251-254.

**Trang  
Xi  
nhê  
NXB**