

Nghiên cứu tạo dòng lạc năng suất và mang gen/QTL chịu hạn triển vọng

Trần Duy Việt*, Phan Thị Thanh, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Thị Ngừ

Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ

Ngày nhận bài 16/1/2023; ngày chuyển phản biện 18/1/2023; ngày nhận phản biện 10/2/2023; ngày chấp nhận đăng 15/2/2023

Tóm tắt:

Trong xu thế biến đổi khí hậu toàn cầu, đặc biệt là vấn đề hạn hán xảy ra ngày càng nghiêm trọng, diện tích và sản lượng lạc có xu hướng giảm dần theo thời gian, việc chọn tạo các dòng lạc mang gen/QTL chịu hạn với ngưỡng năng suất khá cao được coi là một trong những giải pháp hiệu quả và có tính chiến lược. Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp đánh giá ngoài đồng ruộng và phân tích sàng lọc gen chịu hạn, 6 giống lạc (TK10, Chùm Nghệ An, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14) đã được chọn ra từ tập đoàn dòng/giống lạc có sẵn tại Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam làm vật liệu khởi đầu để lai tạo phục vụ cho việc chọn dòng có các đặc tính mong muốn. Với 5 tổ hợp lai tạo (giống Chùm Nghệ An làm cây mẹ; các giống làm bố gồm: TK10, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14), nghiên cứu đã chọn lọc được 15 dòng lạc ưu tú thế hệ F_3 có năng suất đạt trên 29 tạ/ha, trong đó có 5 dòng F_{3-6} , F_{3-12} (Chùm Nghệ An \times L23), F_{3-9} , F_{3-10} (Chùm Nghệ An \times Sen Nghệ An) và F_{3-13} (Chùm Nghệ An \times L14) mang locus quy định tính chịu hạn thông qua kỹ thuật điện di. Đáng chú ý là cả 5 dòng này đều có khả năng phục hồi cao trong môi trường hạn nhân tạo (lần lượt là 92,8-94,6, 84,4-88,4 và 80,0-83,4%), mức suy giảm năng suất trung bình (30,56-34,10%), tương ứng với khả năng chịu hạn khá ở mức điểm 3 ($G=21-40\%$).

Từ khóa: cây lạc, chịu hạn, mang gen/QTL.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) là một loại cây lấy dầu đem lại giá trị kinh tế cao và là cây họ đậu cải tạo đất. Theo P. Janila và cs (2016) [1], diện tích lạc trên thế giới chiếm 25,44 triệu ha, sản lượng 45,22 triệu tấn. Trung Quốc, Ấn Độ, Mỹ và Nigeria là các quốc gia dẫn đầu về sản xuất lạc. Khoảng 67% tổng diện tích lạc trên thế giới được trồng tại các vùng ít mưa và hạn hán, một trong những yếu tố chính ảnh hưởng đến năng suất lạc [2] và có thể khắc phục một phần bằng cách phát triển các giống lạc có khả năng thích ứng tốt hơn trong các điều kiện hạn chế nước tưới [3].

Cơ chế của tính thích ứng với điều kiện hạn hán ở lạc chủ yếu dựa vào khả năng tránh hạn của cây và tránh các thời điểm hạn hán nặng [4]. Trong khi đó, tính chịu hạn là một tính trạng phức tạp và được quyết định bởi phức hợp các gen. Do đó, chọn lọc dựa trên tính chịu hạn là công việc phức tạp và khó khăn [5]. Với cây lạc được trồng trong điều kiện bán khô hạn với đặc điểm chính là mưa trong thời gian ngắn, mưa thất thường và thời gian hạn hán kéo dài thì tính chịu hạn chủ động của cây càng trở nên quan trọng [3]. Việc chọn tạo các giống lạc chịu hạn bằng phương pháp lai truyền thống thường tốn thời gian và công sức do đây là tính trạng số lượng cũng như những khó khăn trong quá trình chọn lọc [6]. Những tiến bộ trong giải trình tự gen và nghiên cứu bản chất di truyền của các tính trạng đã phát triển phương pháp chọn lọc dựa vào chỉ thị phân tử (MAS) và được ứng dụng trên nhiều loài cây trồng cho nhiều tính trạng. Mặc dù một số locus liên quan đến tính chịu hạn trên lạc đã được xác định trong một số nghiên cứu trên thế giới, tuy nhiên có rất ít các nghiên cứu tập trung vào việc phát triển các chỉ thị phân tử để ứng dụng phương pháp MAS do các locus

quy định tính chịu hạn chỉ quyết định một phần nhỏ trong kiểu hình chịu hạn và đóng góp một phần nhỏ vào tính trạng năng suất.

Các tỉnh vùng Bắc Trung Bộ nước ta là vùng có diện tích gieo trồng lạc lớn, với diện tích hơn 55 nghìn ha (chiếm 25% so với cả nước), trong đó các tỉnh có diện tích trồng lạc lớn là Thanh Hóa hơn 10,5 nghìn ha, Nghệ An khoảng 15 nghìn ha, Hà Tĩnh khoảng 13,5 nghìn ha (theo Niên giám thống kê 2020), mặc dù cây lạc đã và đang có vị trí quan trọng trong sản xuất nông nghiệp, đặc biệt ở những vùng trồng lúa bị thiếu nước nhưng việc thiếu bộ giống tốt, năng suất cao, thích ứng với hạn hán do biến đổi khí hậu gây ra đang là vấn đề cần giải quyết kịp thời. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “Nghiên cứu tạo dòng lạc năng suất và chịu hạn triển vọng” nhằm sớm bổ sung nguồn thực liệu đáp ứng được yêu cầu của sản xuất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Thí nghiệm sử dụng các tập đoàn dòng/giống lạc do các đơn vị thành viên của Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam lai tạo, đột biến, nhập nội làm vật liệu khởi đầu, trong đó các giống Chùm Nghệ An, L20, TK10, L14, Sen Nghệ An và L23 được chọn lọc từ tập đoàn giống lạc hiện có tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ thông qua đánh giá và sàng lọc mang locus quy định tính trạng chịu hạn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng giống lạc Chùm Nghệ An làm mẹ (là giống có số lượng hoa ra nhiều, tập trung, phân cành sớm, số quả nhiều, vỏ mỏng...). Các giống lạc phổ biến đang được sử dụng làm các cây bố gồm: TK10, Sen Nghệ An (Sen Thắt), L20, L23 và L14 (là những giống có thân, tán gọn, năng suất, bộ rễ phát triển...).

*Tác giả liên hệ: Email: vietbtb@gmail.com

A study on creating highly yielded and drought-tolerant QTL gene-possessed lines of peanut

Duy Viet Tran*, Thi Thanh Phan,
Thi Nhan Nguyen, Thi Ngu Nguyen

Agricultural Science Institute of Northern Central Vietnam (ASINCV)

Received 16 January 2023; revised 10 February 2023; accepted 15 February 2023

Abstract:

In the trend of global climate changes and heavily occurring drought, particularly resulting in decreased productivity and cultivated areas of peanut production, the breeding and screening of highly yielded and drought-tolerant QTL gene-possessed peanut lines is considered a strategic and effective solution. In this study, the on-field assessment in combination with drought-tolerant gene screening was implemented and 6 peanut cultivars named TK10, Chum Nghe An, Sen Nghe An, L20, L23, and L14 were regarded as hybrid parents for the crossing-breeding program. Of 5 cross-breeding combinations (Chum Nghe An played the role of mother; 5 others were the fathers) 15 elite peanut lines of the F₃ generation with high yield (over 29 quintals/ha) and 5 of them coded F₃₋₆, F₃₋₁₂ (Chum Nghe An × L23), F₃₋₉, F₃₋₁₀ (Chum Nghe An × Sen Nghe An), and F₃₋₁₃ (Chum Nghe An × L14) possessed the locus for drought tolerance determined by electrophoresis technology. It is also particularly mentioned that all these lines had a good recovery (92.8-94.6, 84.4-88.4, and 80.0-83.4%, respectively), average productivity loss (30.56-34.10%), and good drought tolerance (point 3: G=21-40%).

Keywords: drought tolerance, gene carrier/QTL, peanuts.

Classification number: 4.6

Các chỉ thị phân tử SSR (Simple sequence repeats) liên kết với các locus quy định tính chịu hạn trên lạc được sử dụng để xác định tính đa hình giữa các cặp bố mẹ dùng trong lai tạo và các chỉ thị phân tử SSR trội đa hình được dùng để thử nghiệm trên thế hệ F₃ của các cặp lai.

Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm đánh giá, chọn lọc vật liệu khởi đầu từ tập đoàn dòng/giống lạc tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ (thành phố Vinh, tỉnh Nghệ An). Các dòng/giống được bố trí thí nghiệm gieo tuần tự không lặp lại, mỗi dòng/giống gieo 10 m², với mật độ 30 hạt/m², bón phân với lượng: 40 kg N, 100 kg P₂O₅, 80 kg K₂O/ha (theo Quy chuẩn QCVN 01-57:2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác, sử dụng của giống lạc [7]). Đánh giá đặc điểm nông học, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất sử dụng phương pháp chuẩn của Viện Tài nguyên Di truyền Thực vật Quốc tế và Quy chuẩn QCVN 01-57:2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lạc [7].

Các dòng/giống có các tính trạng mong muốn sau khi đã chọn lọc sơ bộ được lấy mẫu lá (lá bánh tẻ) ở giai đoạn sau ra hoa để tách chiết DNA: Cắt nhỏ khoảng 50 mg mẫu lá tươi và cho vào ống eppendorf 1,5 ml; thêm 450 µl dung dịch đệm tách chiết CTAB có chứa 2-mercaptoethanol và nghiền nhuyễn mẫu; đặt ống eppendorf chứa mẫu ở nhiệt độ 65°C trong 60 phút; ly tâm nhanh và bổ sung thêm 200 µl Amonium acetate 7,5 M và đảo đều; đặt ống eppendorf ở điều kiện nhiệt độ 4°C trong 60 phút; ly tâm nhanh và thêm vào mỗi ống 300 µl Chloroform và đảo đều 10 lần; ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút; tách lấy phần dịch trong phía trên (khoảng 500 µl) và chuyển sang ống eppendorf mới; thêm lượng tương đương iso-propanol-2 để lạnh (khoảng 500 µl), đảo nhẹ; ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút; loại bỏ phần dịch trong phía trên, giữ lại phần DNA kết tủa ở đáy ống; thêm 500 µl Ethanol 70% và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút; loại bỏ dịch trong và lặp lại bước trên; loại bỏ dịch trong, để DNA khô tự nhiên trong khoảng 15 phút; thêm 50 µl dịch đệm TE 0,1x hoặc nước cất; để DNA tan từ từ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

Sử dụng 9 chỉ thị phân tử SSR liên kết với các locus quy định tính chịu hạn trên lạc để xác định tính đa hình giữa các cặp bố mẹ dùng trong lai tạo. Giống lạc được dùng làm mẹ là giống Chum Nghe An, trong khi các giống được dùng làm cây bố gồm có L14, L20, L23, TK10, Sen Thất. Kích thước sản phẩm PCR ước lượng (dựa trên thang chuẩn 100 bp). Mỗi chỉ thị phân tử SSR được thử nghiệm trên DNA của bố/mẹ (bảng 1). Trong mỗi phản ứng PCR dung tích 50 µl có chứa các thành phần gồm: 15 µl dung dịch ADN tách chiết từ lá lạc, 5 µl dung dịch môi xuôi (nồng độ 2 µM), 5 µl dung dịch môi ngược (nồng độ 2 µM) và 25 µl dung dịch MyTaq Mix 2X (Bioline, Anh). Các thao tác thêm từng loại hóa chất vào phản ứng PCR được thực hiện trong điều kiện lạnh bằng cách đặt các ống eppendorf trong nước đá.

Bảng 1. Các chỉ thị phân tử SSR liên kết với locus quy định tính chịu hạn.

Marker	Primer name	Sequence
Marker 1	TC1A02_F	5' GCAATTTGCACATTATCCGA 3'
	TC1A02_R	5' CATGTTCCGGTTTCAAGTCTCAA 3'
Marker 2	TC3A12_F	5' GCCCATATCAAGCTCCAAAA 3'
	TC3A12_R	5' TAGCCAGCGAAGGACTCAAT 3'
Marker 3	TC3H07_F	5' CAATGGGAGGCAAATCAAGT 3'
	TC3H07_R	5' GCCAAATGGTTCCTTCTCAA 3'
Marker 4	TC4D02_F	5' AAGTTGTTCCCGTTGCACTC 3'
	TC4D02_R	5' AAAACACCATAAGGTGAATCAA 3'
Marker 5	TC4E10_F	5' ACGTCATCTCCCTCTCTCT 3'
	TC4E10_R	5' CCATTTTCTCCTCGAACCAA 3'
Marker 6	TC9F10_F	5' ATCACAATCACAGCTCCAACA 3'
	TC9F10_R	5' GGCAAGTCTAATCTCTTTCCA 3'
Marker 7	TC11A04_F	5' ACTCTGCATGGATGGCTACAG 3'
	TC11A04_R	5' CATGTTCCGGTTTCAAGTCTCAA 3'
Marker 8	R12D06_F	5' AACACCTCAAATCCCTATCTCT 3'
	R12D06_R	5' AAAACGCGCTGGAGTTC 3'
Marker 9	RN0x614_F	5' CAGAACAAGCCACAACAAGAAG 3'
	RN0x614_R	5' TTCAAGTCCAAGCACCTAAC 3'

Sau khi đã xác định được vật liệu khởi đầu tiến hành thí nghiệm lai hữu tính (lai đơn) để tạo ra các tổ hợp lai. Tiến hành phát triển quần thể lai và chọn dòng lạc ưu tú từ lai tạo bằng phương pháp phá hệ. Bắt đầu chọn lọc ở thế hệ F₂. Cây F₂ được trồng thưa (mật độ 20-25 cây/m²) để có thể quan sát từng cây riêng biệt và tạo ra lượng hạt lớn. Chọn lọc ở F₂ chủ yếu dựa vào đánh giá trực quan, thường là những tính trạng có hệ số di truyền cao như: chiều cao cây, thời gian chín, kiểu cây, dạng hạt... [8, 9].

Gieo hạt thu được từ cây F₂ thành hàng ở vụ sau (mật độ 20-25 cây/m²). Đánh giá trực quan các dòng F₃ thông qua các tính trạng dễ quan sát. Chọn các cá thể tốt nhất trong các dòng tốt nhất. Đánh giá các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng theo Quy chuẩn QCVN 01-57:2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lạc [7].

Sử dụng các chỉ thị phân tử trội được dùng để xác định kiểu gen của các con lai thế hệ F₃ từ các cặp lai. Những con lai có khả năng tạo band trên gel điện di được xác định mang kiểu gen giống với kiểu gen của cây mẹ và kiểu gen giống với kiểu gen của giống dùng làm bố. Các sản phẩm từ phản ứng PCR được dùng để chạy điện di trên gel Agarose 2% ở hiệu điện thế 100 V trong 30 phút. Đệm TAE 1x được dùng để chuẩn bị bản gel và là dung dịch đệm trong máy điện di. Sản phẩm Redsafe được dùng để nhuộm bản gel thay thế cho Ethidium Bromide. Sản phẩm sau điện di được quan sát dưới máy chiếu tia UV ở bước sóng 350 nm.

Đánh giá khả năng chịu hạn bằng các thí nghiệm trong chậu nhựa (đường kính 40 cm và chiều cao 50 cm) bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 3 chậu, mỗi chậu trồng 7 cây. Thời điểm đánh giá: sau khi mọc mầm 10 ngày (giai đoạn cây con), khi cây ra hoa 20% (giai đoạn cây ra hoa) và cuối ra hoa - hình thành quả. Gây hạn nhân tạo 3, 5 và 7 ngày, đối chứng không gây hạn được tưới nước nhằm duy trì ẩm độ đất 70-80% (sử dụng máy đo ẩm độ cầm tay để xác định). Để đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng lạc tiến hành đánh giá khả năng phục hồi và mức suy giảm năng suất sau khi gây hạn 3, 5 và 7 ngày [9, 10].

- Đánh giá khả năng chịu hạn theo tỷ lệ cây phục hồi sau khi gây hạn [11]. Sau khi gây hạn với các thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày, tiến hành tưới nước để xác định khả năng phục hồi của cây theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ cây phục hồi} = \frac{\text{Số cây phục hồi}}{\text{Tổng số cây}} \times 100\%$$

Mức độ phục hồi: cấp 1: 10-20%; cấp 2: 20-40%; cấp 3: 40-60%; cấp 4: 60-80%; cấp 5: 80-100%.

- Đánh giá khả năng chịu hạn dựa vào mức suy giảm năng suất (G) theo thang điểm sau: điểm 1: chịu hạn kém khi G>80%; điểm 2: chịu hạn yếu khi G=61-80%; điểm 3: chịu hạn trung bình khi G=41-60%; điểm 4: chịu hạn khá khi G=21-40%; điểm 5: chịu hạn tốt khi G<21%. Công thức tính mức suy giảm năng suất G như sau:

$$G = 100 - (M_2/M_1) \times 100$$

trong đó: M₁ là năng suất hạt tính trên 1 chậu trong điều kiện không gây hạn nhân tạo; M₂ là năng suất hạt tính trên 1 chậu trong điều kiện gây hạn nhân tạo.

Số liệu giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD) được tính bằng phần mềm bảng Excel.

Kết quả và bàn luận

Đặc điểm nông sinh học và chọn lọc vật liệu khởi đầu

Vụ xuân năm 2020, đã tiến hành đánh giá, chọn lọc và duy trì các giống lạc làm bố mẹ để trì duy nguồn gen phục vụ công tác lai tạo và bổ sung nguồn vật liệu cho công tác chọn tạo giống lạc mới (bảng 2).

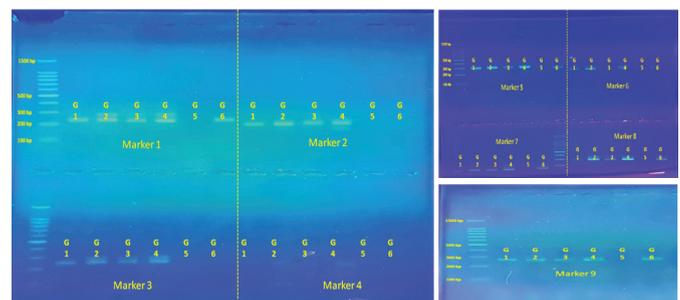
Bảng 2. Một số đặc điểm nông sinh học chính của các giống lạc làm nguồn vật liệu khởi đầu cho tạo dòng lạc theo hướng năng suất và chịu hạn.

TT	Tên giống	Hình thái	Màu sắc lá	Số quả chác/cây	Năng suất (tấn/ha)
1	TK10	Thân đứng, lá dài	Xanh	10,7	3,79
2	Chùm Nghệ An	Thấp cây, thân nửa đứng, cành nhiều	Xanh nhạt	11,8	3,21
3	Sen Nghệ An	Thân nửa đứng	Xanh nhạt	10,6	3,84
4	L20	Thân nửa đứng	Xanh nhạt	10,8	3,89
5	L23	Thân đứng, tán gọn	Xanh đậm	10,6	3,80
6	L14	Thân đứng	Xanh đậm	10,7	3,85

Sau khi đánh giá đặc điểm nông học, bước đầu đã chọn được các dòng/giống lạc có các tính trạng mong muốn. Sử dụng 9 chỉ thị phân tử SSR liên kết với các locus quy định tính chịu hạn trên các dòng có đặc điểm mong muốn để xác định tính đa hình giữa các cặp bố mẹ dùng trong lai tạo: TK10, Chùm Nghệ An, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14. Mỗi chỉ thị phân tử SSR được thử nghiệm trên DNA của giống lạc Chùm Nghệ An (cây mẹ) và các giống lạc được dùng làm bố. Kích thước sản phẩm PCR ước lượng (dựa trên thang chuẩn 100 bp) của các chỉ thị phân tử được trình bày ở bảng 3 và hình 1.

Bảng 3. Kích thước sản phẩm PCR của các chỉ thị phân tử SSR.

TT	Tên chỉ thị	Số mẫu giống có xuất hiện băng vạch	Số lượng band	Kích thước (bp)
1	TC1A02	5	1	~240
2	TC3A12	4	1	~200
3	TC3H07	4	1	~250
4	TC4D02	0	0	-
5	TC4E10	5	1	~300
6	TC9F10	4	1	~275
7	TC11A04	5	1	~90
8	R12D06	4	1	~200
9	RN0x614	5	1	~275



Hình 1. Các chỉ thị phân tử SSR được thử nghiệm trên các giống bố mẹ.

Kết quả cho thấy, hầu hết các chi thị phân tử SSR đều có khả năng nhân band trên các giống lạc làm bố/mẹ dùng để lai tạo, trừ chi thị số 4 (TC4DO2), nghĩa là 8 chi thị phân tử 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 và 9 đều có thể được dùng làm chi thị trội để xác định kiểu gen của các con lai của dòng mẹ (Chùm Nghệ An) và dòng bố (L23). Tương tự, các chi thị số 2 (TC3A12) và 3 (TC3H07) không có khả năng nhân band từ giống L14 (dùng làm cây bố) và có thể dùng làm chi thị trội để xác định kiểu gen của con lai giữa Chùm Nghệ An × L14. Marker số 6 (TC9F10) nhân band từ giống mẹ nhưng không có khả năng nhân band từ giống lạc TK10 được dùng làm bố nên có thể được dùng để xác định kiểu gen của các con lai từ cặp lai Chùm Nghệ An × Sen Nghệ An.

Tạo vật liệu khởi đầu theo hướng năng suất và chịu hạn

Từ kết quả đánh giá nguồn giống bố mẹ trước đó bằng phương pháp lai hữu tính (lai đơn), nghiên cứu đã sử dụng giống Chùm Nghệ An làm cây mẹ và các giống TK10, Sen Nghệ An, L20, L23 và L14 làm cây bố (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả thực hiện lai tạo vật liệu khởi đầu.

TT	Tổ hợp lai (Bố/mẹ)	Thời gian lai (ngày)	Tổng số hoa lai (hoa)	Số quả lai thu hoạch (quả)	Tỷ lệ đậu quả lai (%)
1	Sen Nghệ An × Chùm Nghệ An	8	161	53	33,1
2	L23 × Chùm Nghệ An	10	164	44	27,1
3	TK10 × Chùm Nghệ An	9	151	49	32,6
4	L20 × Chùm Nghệ An	7	155	61	39,4
5	L14 × Chùm Nghệ An	7	156	59	38,1

Kết quả bảng 4 cho thấy, trong thời gian lai tạo 7-10 ngày liên tục (giai đoạn ra hoa rộ) các tổ hợp lai có số hoa lai 151-164 hoa, số quả lai thu hoạch 44-61, với tỷ lệ đậu quả dao động 27,1-39,4%. Đây là nguồn vật liệu phục vụ công tác chọn lọc dòng/giống lạc có năng suất cao, có khả năng chịu hạn. Như vậy, tỷ lệ lai thành công không những phụ thuộc vào thao tác lai mà có thể còn phụ thuộc vào khả năng kết hợp giữa các giống được chọn làm bố mẹ.

Phát triển quần thể lai và chọn lọc dòng ưu tú theo hướng năng suất, chịu hạn

Tiến hành phát triển quần thể lai ở 2 vụ tiếp theo từ 446 hạt lai của 5 quần thể lai được gieo riêng với mật độ 25 cây/m², sau đó loại bỏ cây không phải là cây lai, cây không mong muốn, cây nhiễm bệnh; thu được 158 cá thể F₁ để gieo và chọn lọc tiếp ở thế hệ F₂ ở vụ sau, từ 158 cá thể F₁ thu được, tiếp tục gieo và bắt đầu chọn lọc ở thế hệ F₂. Cây F₂ được trồng thưa (mật độ 25 cây/m²) để có thể quan sát từng cây riêng biệt và tạo ra lượng hạt lớn, dựa vào đánh giá trực quan, thường là những tính trạng có hệ số di truyền cao, như: chiều cao cây, thời gian chín, kiểu cây, dạng hạt, tính kháng bệnh... Kết quả đã chọn lọc được 83 cá thể F₂ và thu hạt riêng từng cây.

Vụ xuân 2022, tiến hành gieo 83 cá thể F₂ của 5 quần thể lai gieo thành hàng tuần tự không lặp lại (dòng F₃) mỗi hàng 25 cây. Qua theo dõi, chọn lọc, đánh giá về đặc điểm nông sinh học đã chọn được 15 dòng lạc triển vọng, tiến hành thu hoạch, phân tích các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của 15 dòng lạc kết quả thu được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của các con lai thế hệ F₃.

TT	Cặp lai		Tên dòng	Số quả chắc/cây (quả)	Khối lượng 100 quả (g)	Khối lượng 100 hạt (g)	Tỷ lệ hạt/quả (%)	Năng suất thực thu (tạ/ha)
	Mẹ	Bố						
1	Chùm Nghệ An	Sen Nghệ An	F ₃₋₃	9,5	130,5	53,6	61,1	29,4
			F ₃₋₈	8,5	139,3	54,5	64,1	28,3
			F ₃₋₉	9,3	133,3	52,6	63,5	28,1
			F ₃₋₁₀	9,2	131,8	51,4	63,7	30,2
2	Chùm Nghệ An	L23	F ₃₋₄	9,2	139,1	53,2	63,6	30,1
			F ₃₋₆	9,5	132,5	52,5	65,5	29,1
			F ₃₋₁₂	7,9	136,4	53,3	62,5	28,3
			F ₃₋₂	9,5	130,5	50,0	64,4	31,2
3	Chùm Nghệ An	L20	F ₃₋₁₅	7,9	138,3	52,6	61,9	29,6
			F ₃₋₁₄	9,8	139,9	55,2	59,9	30,0
			F ₃₋₁	8,9	133,9	55,7	64,2	29,6
			F ₃₋₁₁	7,9	133,2	53,2	65,8	28,6
5	Chùm Nghệ An	L14	F ₃₋₃	7,9	133,4	52,5	62,9	28,2
			F ₃₋₁₃	8,2	136,4	53,0	65,2	28,5
			F ₃₋₇	9,8	132,3	51,3	64,0	30,9
			Trung bình	8,75	134,72	53,03	63,69	29,27
SD				0,81	3,24	1,54	1,67	1,12

Kết quả chọn lọc, đánh giá, phân tích xử lý về năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất 15 dòng lạc thế hệ F₃ (bảng 5) cho thấy, số quả chắc/cây của 15 dòng lạc dao động 7,9-9,8, dòng F₃₋₇ và F₃₋₁₄ có số quả chắc cao nhất là 9,8 quả/cây, trung bình số quả chắc/cây của 15 dòng là 8,75 quả; khối lượng 100 quả của 15 dòng được chọn dao động 130,5-139,9 g, cao nhất là dòng F₃₋₄ đạt 139,9 g, thấp nhất là dòng F₃₋₅ chỉ đạt 130,5 g. Khối lượng 100 hạt cao nhất là dòng F₃₋₁ đạt 55,7 g, thấp nhất là dòng F₃₋₂ chỉ đạt 50,0 g. Năng suất thực thu của các dòng đạt 28,1-31,2 tạ/ha, trung bình năng suất các dòng đạt trên 29 tạ/ha.

Các chi thị phân tử trội được dùng để xác định gen liên quan đến tính trạng chịu hạn của các con lai từ các cặp lai L14 × Chùm Nghệ An (F₃₋₃, F₃₋₇, F₃₋₁₃), L23 × Chùm Nghệ An (F₃₋₄, F₃₋₆, F₃₋₁₂) và Sen Nghệ An × Chùm Nghệ An (F₃₋₅, F₃₋₈, F₃₋₉, F₃₋₁₀). Những con lai có khả năng tạo band trên gel điện di được xác định mang kiểu gen giống với kiểu gen của giống Chùm Nghệ An (cây mẹ), trong khi các con lai không có khả năng tạo band được xác định mang kiểu gen giống với kiểu gen của giống dùng làm bố. Không có chi thị phân tử SSR nào cho kết quả đa hình giữa giống Chùm Nghệ An, TK10 và L20 nên chúng tôi không tiến hành phân tích kiểu gen trên các con lai từ các cặp lai TK10 × Chùm Nghệ An và L20 × Chùm Nghệ An.

Bảng 6. Kết quả xác định gen liên quan đến tính trạng chịu hạn của các con lai thế hệ F₃.

Chi thị / Con lai	Marker							
	1	2	3	5	6	7	8	9
F ₃₋₂	-	-	-	-	M	-	-	-
F ₃₋₃	-	M	M	-	-	-	-	-
F ₃₋₄	M	M	M	M	M	M	M	M
F ₃₋₆	B	B	B	B	B	B	B	B
F ₃₋₇	-	M	M	-	-	-	-	-
F ₃₋₈	-	-	-	-	M	-	-	-
F ₃₋₉	-	-	-	-	B	-	-	-
F ₃₋₁₀	-	-	-	-	B	-	-	-
F ₃₋₁₂	B	M	M	M	M	M	M	B
F ₃₋₁₃	-	B	B	-	-	-	-	-

M: kiểu gen giống với cây làm mẹ (Chùm Nghệ An); B: kiểu gen giống với cây làm bố (L23, L14, Sen Nghệ An).

Kết quả bảng 6 cho thấy, dòng F_{3-2} , F_{3-3} , F_{3-4} , F_{3-7} và F_{3-8} mang kiểu gen tương đồng với kiểu gen của giống Chùm Nghệ An (cây mẹ) và nhiều khả năng không có các locus quy định tính chịu hạn. Trong khi đó, dòng F_{3-6} có kiểu gen giống với kiểu gen của các giống được dùng làm cây bố và có khả năng mang nhiều locus quy định tính chịu hạn. Các dòng F_{3-9} và F_{3-10} có khả năng mang locus liên kết với chỉ thị phân tử số 6 (TC9F10) quy định tính chịu hạn. Tương tự, dòng F_{3-13} có khả năng mang các locus quy định tính chịu hạn được thể hiện qua các chỉ thị phân tử số 2 (TC3A12) và 3 (TC3H07). Các con lai F_{3-6} , F_{3-9} , F_{3-10} , F_{3-12} và F_{3-13} có kiểu gen giống với kiểu gen tại các vị trí liên kết với các chỉ thị phân tử được thử nghiệm. Như vậy, các con lai này có khả năng mang locus quy định tính chịu hạn, trong đó con lai F_{3-6} có khả năng mang nhiều locus khác nhau liên quan đến tính chịu hạn.

Chọn lọc, đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng lạc mới tạo trong điều kiện nhân tạo

Năm 2022, tại nhà lưới Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn của 5 dòng lạc đã được đánh giá về năng suất và mang locus quy định tính chịu hạn trong điều kiện nhân tạo là thế hệ F_3 của cây mẹ (Chùm Nghệ An) và các cây bố (L23, Sen Nghệ An, L14). Các dòng được bố trí trong các chậu nhựa có đường kính 40 cm và cao 50 cm, để trong nhà lưới có mái che màng mỏng trong suốt (tránh mưa) và đã đổ giá thể (đất + phân bón + vôi trộn đều) gieo theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn, 3 lần nhắc lại, 3 chậu/lần nhắc, mỗi chậu 7 cây, sau đó tỉa bỏ để lại 5 cây. Bố trí 3 chậu đối chứng/dòng. Các chậu đối chứng không gây hạn được tưới nước nhằm duy trì ẩm độ đất đạt 70-80%. Sau khi gây hạn nhân tạo tiến hành đánh giá và tính toán theo chỉ số khả năng phục hồi của các dòng ở các giai đoạn (bảng 7).

Bảng 7. Khả năng phục hồi của các dòng lạc trong điều kiện nhân tạo.

TT	Tên dòng	Tỷ lệ phục hồi			Trung bình
		Sau 3 ngày (%)	Sau 5 ngày (%)	Sau 7 ngày (%)	
1	F_{3-6}	93,7	85,4	82,4	87,2
2	F_{3-9}	93,7	86,5	80,0	86,7
3	F_{3-10}	94,5	88,4	83,4	88,8
4	F_{3-12}	94,6	85,4	81,2	87,0
5	F_{3-13}	92,8	84,4	82,4	86,5

Kết quả bảng 7 cho thấy, các dòng đều có khả năng phục hồi 92,8-94,6, 84,4-88,4 và 80,0-83,4%, tương ứng thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày. Dòng lạc F_{3-10} có tỷ lệ phục hồi cao nhất trong thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày ở các giai đoạn cây con, ra hoa, hình thành quả lần lượt là 94,5, 88,4 và 83,4%.

Sau khi gây hạn xong tiến hành chăm sóc, theo dõi đánh giá và thu hoạch để riêng từng chậu. Qua phân tích, xử lý mẫu sau thu hoạch và tính toán theo chỉ số suy giảm năng suất của các dòng khi gây hạn 3, 5 và 7 ngày thu được kết quả ở bảng 8.

Bảng 8. Mức suy giảm năng suất của các dòng lạc.

TT	Tên dòng	Mức suy giảm năng suất (%)			Trung bình
		Gây hạn 3 ngày	Gây hạn 5 ngày	Gây hạn 7 ngày	
1	F_{3-6}	19,79	32,15	50,36	34,10
2	F_{3-9}	18,72	32,40	51,14	34,09
3	F_{3-10}	18,69	29,52	49,84	32,68
4	F_{3-12}	16,96	28,59	46,58	30,56
5	F_{3-13}	18,37	31,26	50,11	33,25

Các dòng lạc tham gia thí nghiệm đều có mức suy giảm năng suất tăng dần theo thời gian gây hạn lần trước 16,96-19,79, 28,59-32,4 và 46,58%-51,14%, tương ứng với thời gian gây hạn 3, 5 và 7 ngày. Cả 5 dòng F_{3-6} , F_{3-12} (Chùm Nghệ An × L23), F_{3-9} , F_{3-10} (Chùm Nghệ An × Sen Nghệ An) và F_{3-13} (Chùm Nghệ An × L14) tham gia thí nghiệm đều có mức suy giảm năng suất trung bình 30,56-34,10%, đều có khả năng chịu hạn khá, điểm 3 (G=21-40%), trong đó dòng F_{3-12} có mức suy giảm năng suất thấp nhất (30,56%) (bảng 8).

Kết luận

Kết quả đánh giá, lai tạo 6 vật liệu khởi đầu (giống chùm Nghệ An làm cây mẹ, các giống làm bố gồm: TK10, Sen Nghệ An, L20, L23, L14) đã thu được 5 tổ hợp lai, tổng số 446 hạt lai. Thông qua đánh giá đặc điểm nông sinh học của các quần thể lai đã thu được 158 cá thể F_1 và 83 cá thể F_2 . Từ 83 cá thể F_2 tiến hành đánh giá, chọn lọc được 15 dòng lạc mới thế hệ F_3 : F_{3-5} , F_{3-8} , F_{3-9} , F_{3-10} (Chùm Nghệ An × Sen Nghệ An); F_{3-4} , F_{3-6} , F_{3-12} (Chùm Nghệ An × L23); F_{3-1} , F_{3-11} (Chùm Nghệ An × TK10); F_{3-2} , F_{3-14} , F_{3-15} (Chùm Nghệ An × L20) và F_{3-3} , F_{3-7} , F_{3-13} (Chùm Nghệ An × L14) năng suất đạt trên 29 tạ/ha và sàng lọc thu được 5 dòng F_{3-6} , F_{3-9} , F_{3-10} , F_{3-12} và F_{3-13} mang locus quy định tính chịu hạn. Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn trong điều kiện nhân tạo của 5 dòng F_{3-6} , F_{3-9} , F_{3-10} , F_{3-12} và F_{3-13} cho thấy cả 5 dòng đều có khả năng phục hồi tốt: 92,8-94,6, 84,4-88,4 và 80,0-83,4%, đồng thời có mức suy giảm năng suất trung bình 30,56-34,10%, tương ứng với khả năng chịu hạn khá, điểm 3 (G=21-40%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. Janila, M.T. Variath, M.K. Pandey, et al. (2016), "Genomic tools in groundnut breeding program: Status and perspectives", *Frontiers in Plant Science*, 7, DOI: 10.3389/fpls.2016.00289.

[2] J. Smartt (1994), *The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement*, Springer Science & Business Media, 734pp, DOI: 10.1007/978-94-011-0733-4.

[3] K. Ravi, V. Vadez, S. Isobe, et al. (2011), "Identification of several small main-effect QTLs and a large number of epistatic QTLs for drought tolerance related traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.)", *Theoretical and Applied Genetics*, 122(6), pp.1119-1132, DOI: 10.1007/s00122-010-1517-0.

[4] J. Zhang, H. Zheng, A. Aarti, et al. (2001), "Locating genomic regions associated with components of drought resistance in rice: Comparative mapping within and across species", *Theoretical and Applied Genetics*, 103(1), pp.19-29, DOI: 10.1007/s001220000534.

[5] N.C. Collins, F. Tardieu, R. Tuberosa (2008), "Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand?", *Plant Physiology*, 147(2), pp.469-486, DOI: 10.1104/pp.108.118117.

[6] J.M. Ribaut, C. Jiang, D. Gonzalez-de-Leon, et al. (1997), "Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies", *Theoretical and Applied Genetics*, 94, pp.887-896, DOI: 10.1007/s001220050492.

[7] Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2011), *QCVN 01-57: 2011/BNNPTNT Về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lạc*.

[8] Vũ Đình Hòa, Nguyễn Văn Liết, Nguyễn Văn Hoan (2005), *Giáo trình chọn giống cây trồng*, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, 172tr.

[9] Phạm Thị Mai, Đồng Thị Kim Cúc, Nguyễn Văn Quang và cs (2017), "Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn trong điều kiện nhân tạo của một số dòng/giống lạc làm vật liệu phục vụ công tác chọn tạo giống", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 23(12), tr.21-25.

[10] Hồ Huy Cường (2017), *Báo cáo tổng kết đề tài Nghiên cứu chọn tạo và phát triển giống lạc, đậu tương chịu hạn, ngăn ngừa cho vùng Duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên*, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ.

[11] Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998), *Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 267tr.