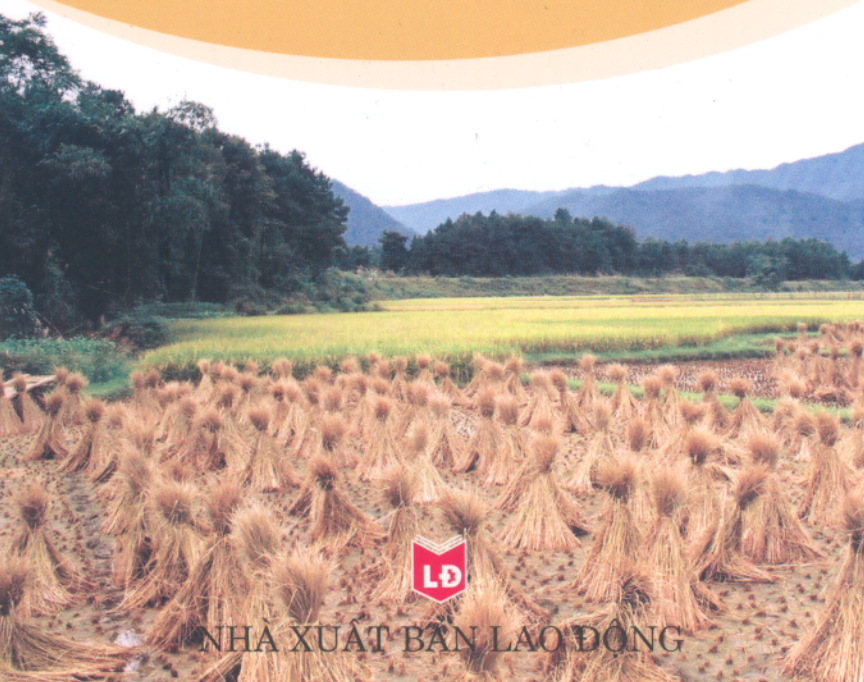


TỦ SÁCH KHUYẾN NÔNG PHỤC VỤ NGƯỜI LAO ĐỘNG

Ứng dụng công nghệ TRONG SẢN XUẤT LÚA



NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG

TỦ SÁCH KHUYẾN NÔNG PHỤC VỤ NGƯỜI LAO ĐỘNG
CHU THỊ THƠM, PHAN THỊ LÀI, NGUYỄN VĂN TỐ
(Biên soạn)

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TRONG SẢN XUẤT LÚA

NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG
HÀ NỘI - 2006

LỜI NÓI ĐẦU

Những năm gần đây, các ứng dụng của công nghệ, đặc biệt là công nghệ sinh học vào đời sống phát triển rất mạnh trên thế giới và đưa lại nhiều kết quả khả quan.

Việc áp dụng công nghệ vào sản xuất lúa ở Việt Nam, đặc biệt là tạo ra cây lúa lai bắt đầu từ những năm 1980 cùng với việc tạo ra những giống lúa có tính thích ứng chống chịu sâu bệnh tốt, có phẩm chất và năng suất cao đang ngày càng thu hút được sự quan tâm của nhà nông.

Cuốn "Ứng dụng công nghệ trong sản xuất lúa" giới thiệu một số công nghệ sinh học ứng dụng trên thế giới và Việt Nam, thông qua việc sản xuất lúa lai nhằm giúp nhà nông nắm được kiến thức cần thiết để tăng năng suất cây trồng, thu lợi nhuận cao.

CÁC TÁC GIẢ

I. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TRONG SẢN XUẤT NÔNG NGHIỆP

A. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ

1. Ứng dụng công nghệ gene

Công nghệ gene và công nghệ sinh học là một trong những cuộc cách mạng kỹ thuật lớn hiện nay trong nông nghiệp thế giới. Việc cải thiện mùa màng có thể dựa vào nhiều biện pháp tạo ra những đặc tính mới mong muốn qua việc đưa các nguyên liệu di truyền vào tế bào cây trồng bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN.

Ngay từ năm 1973, các nhà khoa học Mỹ đã sáng lập ra kỹ thuật tổ chức gene, nhờ đó mà có thể cải tạo tính đặc thù của sinh vật. Các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu công nghệ sinh học để chuyển đổi gene nhằm tạo ra những cây trồng cho năng suất cao.

Công nghệ gene cho phép các nhà sinh học lấy

gene từ một tế bào này cấy vào một tế bào khác, thậm chí có thể trao đổi giữa gene của cây cỏ và thú vật với nhau. Khi cấy được vào trong một tế bào mới, gene có thể làm biến đổi chức năng của tế bào, thay đổi cách làm việc của tế bào, hoặc thay đổi bản chất của các chất hóa học nào mà tế bào tiết ra.

Ngày nay, công nghệ gene đã giúp cho việc chuyển gene ưu việt vào việc tạo giống mới trong nông nghiệp được thực hiện một cách dễ dàng và nhanh chóng hơn. Người ta không phải đi tìm gene trên cùng một loại cây mà có thể lấy gene đó từ động vật. Chẳng hạn, lấy gene từ một loài cá dẹt giúp cho cây chịu được khí hậu lạnh. Đó là chưa kể bằng kỹ thuật gene, người ta có thể ghép nhiều gene mong muốn một lúc, tiết kiệm rất nhiều thời gian mà năng suất lại được nâng cao rất nhiều.

Hàng năm nông dân trên thế giới thất thoát tới 40% hoa màu vì sâu bọ và cỏ dại. Vì vậy, người ta đang nghiên cứu đưa gene chống sâu bệnh và cỏ dại vào cây trồng. Người ta cũng đã nghiên cứu thành công việc ghép các gene tăng sức đề kháng của cây, như tạo ra nhiều chất ức chế sự tiêu hoá của sâu bọ.

Với việc chuyển gene protein capsid (những kháng thể của cây), người ta có thể tạo ra được những cây chuyển gene có thể chống được các virus. Bây giờ người ta có thể thực hiện được việc ghép hệ thống miễn dịch cho cây. Việc miễn dịch hoá cây trồng bằng cách phát động sớm cơ chế phòng của cây đã đã được thử nghiệm trong trồng trọt. Ba công ty hàng đầu trên thế giới cạnh tranh nhau trong lĩnh vực này. Hãng Dupont de Nemours đã thực hiện việc tạo giống thuốc lá chuyển gene, hãng công nghệ sinh học Morgen - Hà Lan chuyển gene chống virus vào khoai tây và hãng Cibagiagy thì triển khai các dẫn suất của axit dichloro-isonicotinic.

Một trong những vũ khí quan trọng đã được sử dụng là súng bắn gene. Người ta có thể tiến hành công nghệ gene bằng chuyển gene gián tiếp thông qua vector, nhưng cũng có thể chuyển gene trực tiếp bằng súng bắn gene (gene gun). Súng này bắn ra những viên đạn nhỏ được phết những gene kháng bệnh hay kháng kí sinh, hay những gene mang những đặc tính mong muốn.

Những gene này được cố định bằng phương pháp hoá học trên những viên đạn tí xíu bằng vàng.

Dưới lực chạm, đạn xuyên vào cây, càng vào sâu tốc độ càng lớn. Đó là phương pháp chuyển gene nhanh vào cây để tạo cây chứa gene có sức đề kháng. Người ta hy vọng trong tương lai sẽ nã lia lĩa đạn vào những cánh đồng để trị bệnh cho cây trồng. Khi dùng phương pháp chuyển gene đề kháng cho cây trồng, phải chú ý là cây trồng không thể kéo dài sự đề kháng tổng lực vì tốn quá nhiều năng lượng làm cây kiệt sức mà phải nghiên cứu đến các tác động hữu ích từng đợt cho cây trồng dưới dạng phun vào thời điểm thích hợp.

Cách tiến hành:

a) Đưa gene vào thực vật

Việc cải tiến bộ gene tế bào thực vật qua cách đưa nguyên liệu di truyền ngoại lai vào bằng con đường tái tổ hợp ADN hiện nay đang mở ra nhiều triển vọng tốt đẹp.

*** Cách 1:** Chuyển gene trực tiếp, như dùng:

- Phương pháp hoá học polyethyleneglycol
- Phương pháp ngâm hạt phấn vào dung dịch ADN
- Phương pháp vi tiêm gene
- Phương pháp bắn gene ...

* **Cách 2:** Chuyển gene gián tiếp qua sử dụng các vector - đặc biệt là vector plasmid pBI 121- được dùng nhiều nhất trong kỹ thuật gene thực vật hiện nay bởi vì plasmid này được kết cấu gọn nhẹ chứa sẵn một gene khởi đầu promoter mạnh nhất. Cho đến nay đó là CaMV 35S- gene kết thúc NOS và gene đánh dấu tốt GUSA.

Plasmid này được gắn thêm các gene lạ có đặc tính mong muốn rồi đưa vào vi khuẩn thông dụng hay dùng trong thực vật là *Agrobacterium tumefaciens* để đưa vào thực vật.

b) Đưa gene ngoại lai vào:

Đầu tiên người ta đưa ADN ngoại lai vào tế bào thực vật: ADN được đánh dấu phóng xạ rồi đưa vào hạt phấn, chồi non, các tế bào nuôi cấy protoplast hay nhân tế bào được tách ra. Các kết quả thu được rất khó giải thích bởi vì ADN ngoại lai dễ nhạy cảm với tiêu hoá của enzym nuclease vật chủ. Phải đưa ADN vào lysosom, sau đó dung hợp vào protoplast để làm giảm tác dụng tấn công của nuclease tế bào chủ. Những plasmid đó có thể là một hệ thống duy nhất của sự chuyển gene. Chúng sao chép một cách tự quản trong ty lạp thể. Plasmid cũng được tìm thấy trong nhiều vi khuẩn.

Những plasmid đó được liên kết với vi khuẩn bệnh lý và được dùng để kiểm tra sự sinh bệnh của một số tác nhân gây bệnh cây trồng.

c) *Chuyển gene thực vật:*

Agrobacterium gồm có các loại *A. tumefaciens* và *A. Rhizogenes*. *Agrobacterium tumefaciens* là vi khuẩn đất gram âm hình que. Vi khuẩn này có họ *Rhizobiaceae*, có khả năng gây u ở thực vật. Nó là một plasmid dài khoảng 120-150Kb, có tính chất gây u nên được gọi là plasmid Ti.

Vai trò của plasmid Ti của *Agrobacterium tumefaciens* trong sự hình thành khối u ngày nay đã được sử dụng phổ biến để chuyển gene thực vật.

Còn lại vi khuẩn *Agrobacterium Rhizogenes* lại có plasmid có khả năng gây bệnh rễ tóc (hairy root) và gọi là plasmid Ri.

Đối với các loại cây trồng, người ta có thể tạo ra giống mới có những đặc tính mong muốn qua việc chuyển gene. Các gene đó có thể từ một cây không có quan hệ họ hàng hoặc từ động vật, côn trùng, nấm men hoặc từ các vi sinh vật. Các cây được nhận gene bằng nhiều cách khác nhau nhưng gần đây nhờ hệ thống vi khuẩn *Agrobacterium* bởi hệ

thống vi khuẩn này có một đặc tính sẵn có trong tự nhiên là chuyển được gene từ chúng vào cây thông qua một phần ADN gọi là ADN-T của plasmid Ti hoặc Ri. Chính ADN-T của vi khuẩn được gắn vào bộ gene của thực vật sẽ làm xuất hiện khối u hoặc rễ tóc vì chúng chứa oncogen. Nhưng nếu phần ADN-T bị cắt thì plasmid Ti này vẫn giữ nguyên khả năng chuyển gen lạ vào thực vật. Do đó, plasmid Ti hiện nay trở thành một công cụ sắc bén được sử dụng rộng rãi trong việc chuyển gene lạ không theo đặc tính gây u vào các cây trồng.

Việc chuyển gene lạ được tiến hành tuần tự theo những bước sau:

1. Tách plasmid Ti từ vi khuẩn *A. Tumer-faciens*.
2. Cắt bỏ phần ADN-T của plasmid đi
3. Chuẩn bị gene lạ chứa tính di truyền mong muốn, ví dụ chuẩn bị gene độc tố của *Bacillus thuringiensis* để tiêu diệt sâu bọ hại cây trồng.
4. Chuẩn bị gene đánh dấu để theo dõi việc chuyển gene lạ vào thực vật có thành công hay không. Chẳng hạn:

- Gene mã hóa cho một enzym có phản ứng màu mà ở thực vật ít có gene mã hoá enzym beta

glucoronidase gọi tắt là GUS.A - tạo màu xanh da trời đặc trưng với cơ chất 5-bromo-4-Chloro 3-indolyl, -D galac-topyanoside được ký hiệu là X-gluc.

- Đôi khi người ta còn phải sử dụng khả năng đánh dấu của gene mã hoá luciferase- một enzym của đom đóm phát sáng trong bóng tối ở các mô được chuyển gene.

- Cũng có khi sử dụng gene kháng sinh Kanamycin- một chất ức chế sự sinh trưởng ở thực vật.

5. Gắn chỗ gene lạ và đánh dấu vào plasmid Ti thay thế vào chỗ ADN-T đã cắt bỏ rồi đưa vào vi khuẩn *Agrobacterium*.

6. Chuẩn bị tế bào vật chủ tiếp nhận vi khuẩn *Agrobacterium* chứa plasmid ci gene lạ - như chuẩn bị các protoplast từ các thể mô, các đĩa lá.

7. Nuôi cấy chung vật chủ với vi khuẩn *A.tumefaciens* chứa plasmid Ti gắn gene lạ một thời gian vài ngày ở nhiệt độ và ánh sáng thích hợp.

8. Loại bỏ vi khuẩn bằng dùng các kháng sinh đặc hiệu như carbenicilin.

9. Chuyển nguyên liệu thực vật vào môi trường

nuôi cấy tế bào và mô tái sinh có thêm những chất kích thích sinh trưởng như 2,4 D; auxin ...

10. Cây tái sinh được nuôi trong vườn ươm và cuối cùng trồng ra đất.

11. Theo dõi các đặc tính của gene lạ biểu hiện ở cây trồng.

Bên cạnh những tiến bộ vừa qua trong việc sử dụng plasmid Ti để làm biến đổi di truyền thực vật bậc cao, có một vấn đề cần phải đặt ra trước khi sự biến đổi có thể được áp dụng rộng rãi để cải thiện giống cây trồng, đó là:

Khả năng để sinh ra những cây từ những tế bào được biến đổi di truyền cần phải được mở rộng một vài mùa.

Cây chủ của vi khuẩn *Agrobacterium* có thể làm hạn chế sự biến đổi trong nhiều vụ thu hoạch.

Muốn chuyển gene thành công cần phải phân tích mở rộng bộ gene thực vật, biết rõ tổ chức phân tử của gene đưa vào và mối liên quan giữa nó với tổ chức cấu trúc di truyền và điều hoà di truyền.

Đối với sự chuyển gene thực vật, virus thực vật chứa ADN cũng được coi là vector. Loại virus khảm

thực vật của hoa súp lơ là một ví dụ. Đó là một vector có thể dùng để chuyển gene vì ADN ngoại lai có thể chuyển vào thực vật qua sự lây nhiễm lá bởi virus. Thêm vào đó, CaMV có thể nhân lên trong bào tương một cách không phụ thuộc và như vậy loại trừ khả năng gây ra trở ngại cho các chức phận của tế bào chủ.

Tuy là sử dụng cả virus khảm hoa xúp lơ vào làm vector chuyển gene, song phổ biến hơn cả vẫn là dùng hệ vi khuẩn *Agrobacterium*. Hệ này đã được hàng trăm cơ sở công nghiệp và phòng thí nghiệm trên thế giới sử dụng. Chỉ ở Monsanto có hơn 45 nghìn dòng thực vật chuyển gene tự do đã được sản xuất theo kiểu này.

Mặc dù phương pháp đó đơn giản và chính xác song nhiều loài thực vật quan trọng đối với mùa màng như lúa, ngô, lúa mì vẫn không phải là cây chủ tự nhiên đối với *Agrobacterium* và như vậy hoàn toàn không biến dạng theo kiểu này được. Do đó, người ta tính đến sự phát triển theo một hệ thống khác - chẳng hạn như ADN ngoại lai và protoplast thực vật. Song hệ thống protoplast cũng có những đặc điểm - thường yếu ớt và tạo ra cây cần cỗi do đưa ADN được ít nên khả năng lai tạo

rất thấp và mặt khác lại không được nguyên vẹn, phải phá màng và thành tế bào để lai ghép.

Biện pháp đơn giản hơn là tiêm ADN ngoại lai trực tiếp vào tế bào. Song tiêm trực tiếp như vậy không có hiệu quả vì:

Kim nhỏ dễ gãy và tắc.

Tỷ lệ ADN ngoại lai tổ hợp vào bộ gene tế bào chủ rất thấp.

Tiêm khoảng 10 000 tế bào mới hy vọng được một tế bào có gene mới.

Để nâng cao hiệu quả tổ hợp gene, Joh Sanford ở trường Đại học tổng hợp Cornell đã đề nghị dùng biện pháp bắn phá liên tục các nguyên liệu gene vào các tế bào thực vật. Tác giả đã dùng viên đạn có đường kính 1-2 μ m và phủ ADN ngoại lai. Làm tăng nhanh dần tốc độ (gia tốc), những viên đạn kim loại này xuyên vào thành tế bào nguyên liệu và phân tán ADN trong tế bào tương.

Năm 1987 người ta cải tiến bằng viên đạn bạch kim để đánh phá tế bào thực vật. Về sau, các nhà nghiên cứu đã dùng súng bắn với những viên đạn bằng vàng và được đẩy đi bởi sự bốc hơi của giọt nước. Tất cả các loại súng bắn gene đó được dùng

để tạo ra những cây trồng có đặc tính mới mong muốn. Hiện nay người ta dùng súng bắn gene để cải tạo cây lúa mì.

Công nghệ gene cũng có khả năng tạo ra những thức ăn khoẻ mạnh. Các gene đối với những protein có phẩm chất dinh dưỡng siêu đẳng được tách ra, rồi có khả năng gài những gene đó vào cây trồng. Cây này có thể sản xuất ra những chất hoá học đặc biệt như tinh bột, phục vụ công nghiệp, các enzym. Tuy nhiên, việc làm này vẫn còn vài hạn chế, đó là:

Công nghệ gene chỉ cải tiến một số điểm liên quan tới sự biểu hiện không quá 3-5 gene.

Một vài cây trồng không thích ứng với những phương pháp chuyển gene hiện hành và đôi khi sự tách rời gene có ích để chuyển cũng gặp những khó khăn.

Tóm lại, áp dụng công nghệ gene trong trồng trọt, trên thế giới đã đạt được một số thành tựu sau:

G.Glili đã dùng vi khuẩn E.Coli để chiết xuất lấy enzym làm nhiệm vụ tổng hợp lysine, sau đó đưa vào khoai tây và thuốc lá. Kết quả mức lysine

trong khoai tây tăng ở củ 5 lần, ở lá là 4 lần và ở thân 3 lần. Bằng cách này người ta đang lần lượt thao tác gene tới cả 9 loại axit amin khác - loại axit amin cần thiết phải cung cấp đủ thức ăn. Do đó loại khoai tây này trở nên hết sức quý giá.

Ở Mỹ cũng thành công khi tạo ra những quả cà chua chín mọng mọc trên các cành nho. Cà chua loại này ít bị thối hỏng, quả to và chất lượng không thua kém cà chua thường.

Ngày nay người ta dùng kỹ thuật sinh học để tạo bông có màu sắc tự nhiên.

Ở Pháp, người ta cũng tạo được cây cải bắp to cao hơn người bằng thao tác di truyền.

Trong 20-30 năm lại đây, kỹ thuật gene và công nghệ sinh học đang làm đổi mới nền nông nghiệp trên toàn thế giới. Với kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào, phương pháp chọn lọc dòng xoma, kỹ thuật dung hợp protoplast và đặc biệt sử dụng công nghệ gene trong tái tổ hợp ADN, người ta đã đưa vào cây trồng những nguyên liệu di truyền mới, những gene có ích để làm thay đổi cơ bản những loại cây trồng, tạo ra một loạt các giống mới có năng suất cao hứa hẹn những mùa màng tốt đẹp.

2. Tạo giống để chống các bệnh về virus

Tạo giống để chống các bệnh về virus tức là tăng sức đối kháng của cây trồng với virus.

Mùa màng khi bị nhiễm virus hầu hết là giảm thu hoạch, sinh ra thất thoát hoặc tai họa. Trước kia người ta chỉ có cách vệ sinh trang trại tốt, trồng trọt luân canh, diệt cỏ dại và dùng thuốc trừ sâu để giảm bớt tác nhân trung gian truyền virus.

Gần đây, trên cơ sở hiểu biết về di truyền trong kháng virus cây trồng, người ta thấy rằng sự lây nhiễm cho thực vật với dòng ôn hoà của virus đã bảo vệ nó khỏi sự nhiễm trùng tiếp theo của dòng độc. Rõ ràng sự nhân lên của dòng virus ôn hoà ngăn cản dòng độc lây nhiễm. Các nhà nghiên cứu đã áp dụng sự "bảo vệ chéo" đó để che chở cho cà chua trồng trong vườn chống lại sự lây nhiễm một số virus.

Một nhà nghiên cứu người Mỹ Roger Beachy ở trường Đại học tổng hợp Washington và Stephen Roger ở Monsanto đã áp dụng công nghệ gene cấu trúc nên một vector gene để đưa vào cây thuốc lá và cây cà chua một protein phủ mặt ngoài của virus khảm thuốc lá. Cây trồng biến đổi như thế đã

được tiêm một lượng lớn virus. Những cây đó đã được đối kháng rất mạnh mẽ với nhiễm trùng và như vậy xác định giả thuyết ban đầu của Beachy là đúng - đó là do một thành phần đơn giản của virus có thể sử dụng để bảo vệ được sự tấn công của virus.

Sau đó người ta nhận thấy, sự biểu hiện của protein phủ mặt ngoài virus khảm thuốc lá chỉ có tác dụng đối kháng được với những dòng virus khảm thuốc lá và một vài dòng khác liên quan chặt chẽ đến virus đó mà thôi.

Trên cơ sở đó, cho đến bây giờ các nhà nghiên cứu đã tạo ra được hàng tá vector gene để phòng chống các bệnh virus khác nhau của cây.

Ngoài các phương pháp trên, người ta còn có phương pháp tạo giống cây trồng sạch bệnh bằng nuôi cấy mô từ tế bào mô phân sinh ở đỉnh chồi vì mô này không bao giờ lây nhiễm virus

3. Tạo giống để chống côn trùng sâu bọ

Sự đề kháng chống côn trùng phá hoại cây trồng cũng là một trong những mục tiêu quan trọng đối với công nghệ gene, đặc biệt là những cây như bông, khoai tây, ngô.

Người ta đã dùng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* sản xuất ra protein chống côn trùng. Vi khuẩn này đã làm chết hàng loạt sâu tơ, sâu róm.

Các chế phẩm *Bacillus thuringiensis* đặc biệt hiệu quả với các côn trùng thuộc loại bướm - những loài này gây thiệt hại lớn cho mùa màng.

Cơ chế hoạt động phân tử của protein *Bacillus thuringiensis* như sau:

Protein *Bacillus thuringiensis* liên kết với những receptor đặc biệt được khu trú trên màng ruột của những côn trùng gây hại. Sự liên kết đó gây cản trở cho dòng vận chuyển ion vào trong tế bào biểu mô ruột và như vậy làm mất khả năng ăn uống dinh dưỡng của côn trùng. Những thuốc trừ sâu thiên nhiên này không gây độc hại cho người và động vật, thậm chí cả với các loại côn trùng khác. Mặt khác tính chất có ích của thuốc trừ sâu *Bacillus thuringiensis* thường bị hạn chế vì dễ dàng bị rửa sạch khỏi cây, nhưng hiệu quả của chúng trên đồng ruộng lại thường kéo dài.

Giữa năm 1980, công nghệ gene của một vài hãng lớn như hãng hệ thống gene thực vật ở Belgium, hãng di truyền nông nghiệp ở Middleton v.v...

đã thành công trong việc tách rời các gene vi khuẩn mã hoá các protein thuốc trừ sâu. Họ đã dùng súng có *Agrobacterium tumefaciens* được gắn những gene tách nối trên để bắn vào khoai tây, cà chua và bông. Lúc đầu những gene này biểu hiện nghèo nàn. Những protein *Bacillus thuringensis* được cây trồng sản xuất ra chỉ giết những côn trùng phòng thí nghiệm nhạy cảm.

Các nhà khoa học Monsanto như David Fichhoff và Frédrick Perlak đã cải tiến. Họ xem xét kỹ lại gene vi khuẩn nguyên thủy để bắt chước chặt chẽ hơn đoạn ADN thực vật. Một sự cải tiến nhỏ đã làm tăng lên sự kiểm tra côn trùng một cách mạnh mẽ. Hai năm thử nghiệm trên đồng ruộng đã xác định rằng sự có mặt của các gene *Bacillus thuringensis* đó trong cây bông đã kiểm tra một cách hiệu quả tất cả những hư hại của đại bộ phận các loài bướm sâu bao gồm cả các nang trứng của chúng. Những cây bông thực hiện công nghệ gene đó đã làm giảm hẳn việc sử dụng thuốc trừ sâu từ 40-60%.

Các nhà khoa học đã sàng lọc một cách mở rộng đối với những dòng *Bacillus thuringensis* tự nhiên. Những dòng đó có hiệu quả trên các côn trùng khác

hơn là loài bướm. Họ đã chọn được một dòng dẫn ra một gene - gene đó có hiệu quả chống lại các loài gián cánh cứng khoai tây Colorado. Mùa xuân năm 1991, Russet Burbank đã ghép gene kiểm tra loài bướm cánh cứng này trên khoai tây có thể miễn dịch đặc biệt với loài cánh cứng này.

Bacillus thuringensis có thể còn một số gene khác kiểm tra sự hư hại của thực vật. Các nhà khoa học ở tổ hợp Mycogen San Diego đã phát hiện một gene *Bacillus thuringensis* chống giun tròn ký sinh thực vật và một gene chống muỗi. Hiện nay các nhà khoa học đang cố gắng sản xuất protein trừ muỗi (mosquytocidal protein) ở tảo để sử dụng chống sống rét.

Tính đặc hiệu của protein *Bacillus thuringensis* và sự khu trú của nó trong các mô nói trên khiến các protein này chỉ chống lại côn trùng tấn công. Protein khu trú nội bào này chắc chắn không bị rửa sạch và thuộc loại thuốc trừ sâu an toàn nhất.

4. Tạo giống cây thích hợp với các loại thuốc trừ cỏ dại

Bên cạnh đề kháng virus, côn trùng, sâu hại, cây trồng còn phải chống chọi với cả các loại cỏ dại. Cỏ

dại cạnh tranh độ ẩm, thức ăn, ánh sáng với cây trồng và làm giảm năng suất mùa màng có khi lên tới 70%.

Trước đây người ta phối hợp thuốc diệt cỏ với trồng tỉa cẩn thận để hạn chế cỏ dại. Người ta đã tạo ra những cây trồng có thể sản xuất ra thuốc trừ cỏ dại với phổ rộng đơn giản và an toàn cho môi trường. Sử dụng được công nghệ này vào cây trồng sẽ làm cho nông nghiệp giảm được một lượng lớn thuốc trừ cỏ dại.

Có 3 hướng công nghệ để tạo ra thuốc trừ cỏ dại:

Các nhà nghiên cứu ở Monsanto và Calgene đã tiến hành công việc trên những cây để dung thứ Glyphostae - một thành phần hoạt động của thuốc trừ cỏ dại tên là Roundup. Roundup là thành phần của phổ rộng có thể kiểm tra cỏ dại to lá và cỏ dại mọc dày.

Cơ chế phân tử của Roundup diệt cỏ dại chính là ở chỗ nó ức chế hoạt động của enzym tổng hợp EPSH - enzym này tham gia trong việc sản xuất axit amin thơm cần cho sự lớn lên của cỏ dại.

Các nhà khoa học đặc biệt thích Roundup bởi nó là một trong những thuốc trừ cỏ dại hấp dẫn.

Nó không ảnh hưởng tới động vật, bởi động vật không tiến hành tổng hợp axit amin thơm. Hơn nữa, Roundup lại thoái hoá nhanh chóng trong môi trường để trở thành thành phần tự nhiên, vô hại.

Năm 1983 các nhóm đứng đầu là Luca gene và David Stallker của Calgenne cũng như Rogers và Ganesh Kishore của Monsanto đã tách được gene của enzym tổng hợp EPSH từ vi khuẩn và cây trồng. Họ cũng đã so sánh các gene đó trong việc sản xuất ra các protein - những protein khử được tính nhạy với Roundup.

Sau đó các nhà nghiên cứu đã cấu trúc những gene đã sản xuất ra lượng các protein đó lớn hơn trong cây trồng, rồi họ đưa vào cà chua, đậu, bông, cây cải dầu và một số cây khác. Những thử nghiệm đã được tiến hành trong 3 năm qua ở Mỹ, Canada và châu Âu cho thấy cây trồng đã có thể dung thứ xử trí bằng Roundup ở mức kiểm soát được cỏ dại một cách có hiệu quả.

Các nhà nghiên cứu ở Dupont đã dùng kỹ thuật nghiên cứu tương tự để tiến hành công nghệ gene hoá những cây trồng có thể dung thứ loại thuốc diệt cỏ sunfonylurea.

Các nhà khoa học ở hệ thống di truyền thực vật và hãng Hoechst - Đức đã có một hướng tìm kiếm khác về dung thứ thuốc diệt cỏ. Từ vi khuẩn *Streptomyces higroscopicus* họ đã tách ra một gene để enzym đó ức chế thuốc diệt cỏ được gọi là Basta. Basta làm ảnh hưởng tới con đường của enzym tổng hợp glutamine trong cỏ dại và can thiệp vào sự lớn lên của chúng. Những cây trồng trong đó có gene làm ức chế Basta trước khi gây hại có thể xảy ra. Những thử nghiệm trên đồng ruộng được tiến hành trên những cây trồng dùng thứ Basta chứng tỏ hiệu quả của công nghệ này.

5. Tạo giống cây có quả ít bị hư hại.

Trong lĩnh vực bảo vệ quả ít hư hại, công nghệ gene cũng đang phát huy tác dụng.

Chẳng hạn, các nhà nghiên cứu đã xác định và tách được một số gene đóng vai trò trong sinh tổng hợp Ethylene - một phân tử liên quan đến sự chín của hoa quả.

Sự hư hỏng được kéo chậm lại cho phép có thể thu hái muộn đi, có khi cải thiện được mùi vị tốt hơn và thậm chí cải thiện được cả phẩm chất dinh dưỡng của quả hái.

Để tăng nguồn thu hoạch quả, các nhà nghiên cứu đã phát triển hai phương pháp di truyền sau:

- Một là, gài đoạn dịch mã antisen kiên kết ARN thông tin (messenger) để tắt gene. Athanasios thoelosis ở Canifornia và Don Grierson - trường đại học tổng hợp Nottingham đã chứng minh rằng, sự làm nhũn quả của cây cà chua với những gene antisen chống lại sự làm nhũn.

- Thứ hai, một nghiên cứu khác của nhà khoa học ở Monsato là Kishore và Harry Kille, đưa một gene vào cây cà chua. Gene này làm cà chua sản xuất ra một loại enzym làm thoái hoá thành phần tiền chất hình thành ethylens và như vậy sẽ làm cà chua chậm chín và không hư hỏng.

Gần đây các nhà khoa học Mỹ đã nghiên cứu kỹ thuật gene để bảo quản quả khỏi bị thối. Theo kỹ thuật này, người ta cấy vào cây một gene vi khuẩn. Nó sẽ sản sinh ra một chất gọi là Chitinase tiêu diệt các tế bào nấm. Họ đã thu được kết quả quan trọng trong việc đưa gene Chitinase vào cây cà chua, khoai tây, rau diếp và các giống cây tương tự. Song chưa làm được đối với lúa, lúa mì, ngô và các cây có hạt khác.

Trong khi chờ đợi về công nghệ gene trong bảo vệ giống cây trồng thành công để đưa vào ứng dụng rộng rãi, một số nước đang đẩy mạnh những biện pháp sinh học thay thế dần các thuốc trừ sâu hoá học. Chẳng hạn:

- Ở nước ta và một số nước đang có biện pháp nuôi ong mắt đỏ để diệt sâu đay.

- Ấn Độ dùng hạt cây sầu dầu để diệt gần 200 loại sâu hại bởi vì trong trong hạt sầu dầu có loại dầu chứa chất Azadirachtin có tác dụng diệt côn trùng mạnh. Gần đây các nhà khoa học Ấn Độ đang chuẩn bị xây dựng nhà máy sản xuất với công suất 20 tấn hạt sầu dầu/ngày.

- Người Pháp đã dùng phương pháp di truyền học nuôi chọn những ấu trùng bọ rùa. Mỗi con bọ rùa này mỗi ngày có thể ăn hết 100 con rệp hại quả. Người ta gọi đó là những con bọ dọn vườn.

- Dùng bọ cánh cứng để tiêu diệt cỏ dại (cỏ Leafy Spurpe). Người Mỹ ước tính 7 năm tới loại cỏ này mọc đầy khoảng 2 triệu ha đất trồng ở Bắc Mỹ, Canada và sẽ làm tổn thất hơn 100 triệu đôla mỗi năm.

- Ở Đức hàng ngàn ha rừng sồi bị một loài nhện

tàn phá trong mùa đâm chồi nảy lộc. Người ta nhanh chóng diệt nhện độc bằng phương pháp vi sinh. Thuốc này mang tên *Bacillus thuringiensis*. Người ta dùng máy phun thuốc này lên ngọn cây. Khi côn trùng ăn vào cùng với chồi non, lá non thì tác dụng đầu tiên là làm cho chúng không còn muốn ăn nữa và sau đó sẽ làm chúng thủng bụng và chết.

- Cũng trong thời gian gần đây, người Mỹ đã nghiên cứu tạo ra một loại virus dùng để "săn đuổi và giết chết" các loài sâu và côn trùng độc hại. Một trong những loại virus này có tên là Polyeder. Người ta đã thí nghiệm thả chúng vào rừng và kết quả là 7 ha thí nghiệm sạch bóng nhện độc. Loại virus này thích ứng với từng loại sâu bệnh nhằm thay thế các loại hoá chất trừ sâu.

- Ở nước ta có phòng thí nghiệm đã nuôi sâu xanh rồi cho trộn thức ăn với virus, tức là chiếm khoảng 30% trọng lượng khô của con sâu. Khi sâu chết được gấp riêng ra và cho nghiền nát để lấy nước dịch. Đây là loại thuốc trừ sâu vi sinh diệt sâu xanh.

- Nấm *Boveroa* được dùng để trừ sâu róm thông.

- Nấm Metthirum cũng đang được nghiên cứu trừ rầy nâu hại lúa.

- Virus NPV - virus đa diện nhân (nuclear polyhedrosis virus) và GV (Graluclar virus) đang được sử dụng vào diệt sâu bọ...

B. ỨNG DỤNG CÁC BIỆN PHÁP KỸ THUẬT CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀO CẢI TẠO GIỐNG

1. Nuôi cấy mô tế bào.

Kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật gồm nhiều giai đoạn và các bước tiến hành. Song có mấy nguyên tắc cơ bản:

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy có đủ thành phần cần thiết và nhiều loại, cũng như phải chọn đúng môi trường cho từng loại mô, tế bào và thay đổi theo từng thời kỳ phát triển và phân hoá của mô.

Chẳng hạn, môi trường nuôi cấy protoplast phải chuẩn bị và chọn lựa khác với môi trường nuôi cấy mô sẹo; môi trường tạo rễ, tạo mầm phải khác với môi trường duy trì mô ở trạng thái mô sẹo...

Điều kiện vô trùng phải được đảm bảo tuyệt đối kể từ khi chuẩn bị môi trường cho đến khi xử lý mô.

Vì vậy, cần phải có buồng vô trùng và tủ cấy vô trùng Lamine cũng như các thao tác dụng cụ đều phải tuân theo nguyên tắc vô trùng triệt để.

Chọn lọc mô cấy phải có đủ điều kiện để phát triển mạnh và phải đủ khả năng để tạo thành mô sẹo trong môi trường chứa chất dinh dưỡng thích hợp. Thường người ta chọn mô phân sinh ngọn hay chồi nách.

Điều kiện xử lý mô cũng phải thích hợp.

Tuy các mô trên cùng một cây mang cùng một lượng thông tin di truyền như nhau nhưng cho các mô sẹo phát triển hoàn toàn khác nhau trong khả năng tái sinh chồi, phát triển rễ hay thành cây hoàn chỉnh là do xử lý chất sinh trưởng, nhiệt độ và ánh sáng khác nhau...

Thực ra phương pháp nuôi cấy mô và tế bào thực vật là phương pháp nhân giống lý tưởng không chỉ do đòi hỏi ít diện tích, nhanh mà còn giữ nguyên được tính ưu việt của giống ban đầu.

Người ta thành công trong kỹ thuật này qua việc thử nghiệm trên cây phong lan. Sau đó nó được sử dụng cho đến nay. Những chồi cần cỗi được cấy trong môi trường thích hợp sẽ phát triển nhiều chồi

nụ mới bằng cách hình thành những chồi nách lá, những chồi đó được tách ra và được trồng trong vườn. Bằng cách này một số lượng lớn các cây trồng đã được nhân lên. Các cây cảnh trang trí, cây thu hoạch theo mùa như cây măng tây, dưa, dâu tây, củ cải đường và thậm chí cả cây gỗ tẻch, bạch đàn cũng được áp dụng để nhanh chóng được thương mại hoá bằng con đường này.

Skoog và Miller đã quan sát thấy rằng, sử dụng những chất điều hoà sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy có thể phát động sự lớn lên của tế bào một cách nhanh chóng và không biệt hoá cũng như sự lớn lên của các chồi cây hay các cây con có rễ. Phương pháp này đã thử và có giá trị trong thân cây tùng, bách và cây củ một lá mầm.

Một hướng khác của kỹ thuật này là tạo ra phôi xoma với cà rốt. Phôi sẽ trải qua tất cả các giai đoạn phát triển bào thai của một hợp tử nhưng tạo thành từ các tế bào xoma chứ không phải là sản phẩm hoà hợp của hai giao tử đực cái.

Sự nuôi cấy phôi của tế bào xoma có một số tiến bộ:

Phôi phát triển cả hai hướng đem đến cả rễ, chồi và phát triển thành cây toàn vẹn ngay từ đầu.

Nuôi cấy phôi có thể tạo ra một lượng lớn các cây hơn cả con đường nuôi cấy mô.

Khi lớn lên trong môi trường nước thì phôi tách ra thành những phôi khác, do đó không cần nhiều thiết bị. Hàng ngàn phôi được phát triển trong bình nuôi cấy thất cổ và cũng có tốc độ sinh trưởng nhanh không kém tốc độ sinh trưởng khi nuôi cấy sinh vật.

Ngoài cà rốt, cần tây, những cây khác như cây đậu, chanh, cà phê, chà là, kê... cũng được nuôi cấy phôi tế bào xôma. Sự chín phôi tế bào xôma có thể được cải biến bằng những chất điều hoà sinh trưởng, đặc biệt dùng axít abscisic và thay đổi môi trường.

Công nghệ hiện nay hoàn toàn cho phép nhân lên những phôi xôma cho một số lượng lớn các loài cây thu hoạch quan trọng.

Một vài cây trồng đã được tái sinh thành công bằng nuôi cấy mô và nuôi cấy phôi xôma.

Để tiến hành tạo giống cây sạch bệnh virus bằng kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào, người ta thường dùng mô phân sinh ở đỉnh chồi. Mô phân sinh ở đỉnh chồi chứa những tế bào sinh trưởng và được

bao trong một lớp vỏ cutin. Sự hình thành mới các cơ quan của thực vật bắt đầu trong các mô phân sinh ở đỉnh chồi này. Các mô đó phân hoá ngay từ đầu của phôi và giữ lại trong suốt quá trình sống của cây. Mô phân sinh là vùng khoẻ mạnh nhất của cây vì người ta thấy rằng quá trình sinh tổng hợp ADN của virus thực vật không xảy ra được ở vùng này - do một cơ chế gì hiện nay chưa rõ, thậm chí cả cây bị bệnh virus nhưng phần này vẫn không bị nhiễm virus. Vì mô phân sinh có các tế bào phôi nên khi nuôi cấy tạo nên chai sẹo (callus). Dùng các chất sinh trưởng khác nhau như giberillin, auxin, citokinin ... để kích thích khối tế bào không phân hoá này đâm chồi, từ đó hình thành nên những cây con khoẻ mạnh không bị virus. Bằng cách đó người ta đã sản xuất ra dâu tây, khoai tây và nhiều cây cảnh khác sạch bệnh virus.

Ngày nay người ta còn sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật để sản xuất hạt nhân. Như chúng ta đã biết tế bào thực vật có đặc trưng là không chỉ trở thành tế bào sinh dưỡng mà còn trở thành tế bào phôi mầm chỉ cần điều khiển chúng bằng các chất kích thích sinh trưởng thích hợp. Do vậy người ta cho vào bình dung dịch dinh

duỡng có chất kích thích nhất định thì tế bào thường có thể trở thành tế bào phôi. Các tế bào phôi trong bình đó sẽ sinh sản rất nhiều và tụ hợp lại như phôi. Các phôi này được bao bọc bởi một chất keo - gồm hỗn hợp các chất dinh dưỡng và gọi đó là các hạt nhân nhân tạo. Khi gieo các hạt này xuống đất sẽ mọc thành cây bình thường.

Việc sản xuất các hạt nhân tạo như thế rất cần thiết trong nông nghiệp, bởi trong cải tạo giống nhiều khi tạo ra được giống có năng suất cao và chống chịu giỏi nhưng lại không có hạt hoặc rất ít hạt để có thể gieo trồng lại. Bằng phương pháp nói trên, người ta có thể sản xuất hạt nhân tạo từ các tế bào bình thường của cây với một lượng lớn trong các nồi lên men.

Khi còn trong các bình nuôi cấy lên men rất tiện lợi cho người ta xử lý các mô để làm sạch hết virus, tạo ra các hạt sạch bệnh.

Người ta cũng có thể đưa vào vỏ hạt nhân tạo các loại vi khuẩn cố định đạm, khi cây trưởng thành, vi khuẩn này sẽ lấy nitơ từ không khí để cung cấp một phần đạm cho cây đó.

Cũng bằng cách tương tự như trên, người ta đưa một lượng thuốc trừ sâu hoặc trừ cỏ dại vào

vỏ hạt nhân để bảo vệ cây khỏi bị sâu và cỏ dại phá hoại.

Ngoài ra, hạt nhân tạo cũng là đối tượng dễ dàng để nạp các gene lạ và để tạo ra giống mới có đặc tính mong muốn.

Chọn lọc dòng xôma

Xôma là tên gọi các tế bào thân thể, nó có khác với tế bào sinh dục.

Chúng ta biết rằng, từ các tế bào xôma có thể tạo nên bất kỳ bộ phận nào của cây. Đó là đặc điểm toàn năng của tế bào thực vật. Từ mô sẹo có thể khôi phục lại một bộ phận nào đó rễ, thân, lá hoặc tạo thành một cây hoàn chỉnh đều dựa trên đặc điểm toàn năng này. Có điều mô sẹo được cấy đi cấy lại nhiều lần thường xảy ra những biến đổi di truyền. Những cây lớn lên từ các tế bào biến đổi ấy cho hạt. Những hạt này mọc thành cây cho những đặc tính quý mà ta đang mong muốn. Như vậy chính lúc này những cây đó sẽ là nguồn ban đầu để nhân lên và những thế hệ sau được tạo ra gọi là các dòng xôma. Phương pháp tạo giống kiểu này gọi là phương pháp chọn dòng xôma.

Cơ sở khoa học của phương pháp chọn lọc đó là

hiện tượng biến dị xôma - tức là biến đổi di truyền không phải ở tế bào sinh dục mà là tế bào thân thể của cây. Sự biến đổi này có thể có ba cách:

Biến đổi nhiễm sắc thể kiểu đa bội thể (polyloid) như cà chua, đậu, sinh vật cảnh.

Biến đổi nhiễm sắc thể kiểu thêm bớt một vài nhiễm sắc thể trong bộ nhiễm sắc thể tế bào.

Biến đổi kiểu đột biến ở một số gene nhất định ở các nhiễm sắc thể hoặc gene của ty thể hoặc lục lạp.

Các dạng biến đổi là:

Sự biến dị tự nhiên rất thấp thường chỉ một tế bào trong hàng triệu tế bào.

Bằng biện pháp chọn lọc cổ điển (sau lai ghép và đột biến) thì khó có được sự phối hợp giữa cái cũ và cái mới.

Biến đổi dòng tế bào xôma, đặc biệt là từ những tế bào mô sẹo trong nuôi cấy thì tần số xảy ra rất nhiều.

Khoai tây được tái sinh từ mô sẹo lá đã được thử nghiệm, trong đó có 13 biến dị gene đơn giản đã được phát hiện trong 230 cây khoai tây tái sinh. Tỷ lệ biến đổi dòng xôma ở đây là 1/18 có nghĩa là cứ

18 cây tái sinh thì có một cây biến dị. Tỷ lệ biến dị này thật quá lớn.

Một số biến dị gene đơn giản xảy ra ở cà chua cũng được xác định và một trong những biến dị nằm ở nhiễm sắc thể 10 trong bản đồ gene.

Nhờ phương pháp chọn lọc dòng xôma này người ta đã tạo nên được giống lúa vừa chín sớm vừa có dạng hạt dài nhằm vừa tăng năng suất thu hoạch lại vừa tạo được chất xanh làm thức ăn cho trâu bò.

Với những nghiên cứu về cây mía phương pháp chọn lọc dòng xôma này đã tạo được giống mía chống được một số bệnh virus như bệnh Fiji, nấm lông, bệnh than và bệnh đốt mắt.

Các nhà nghiên cứu cũng đã thực nghiệm chống bệnh tàn lụi trên cây cà chua bằng phương pháp chọn lọc dòng xôma.

Có những nghiên cứu chống virus khảm thuốc lá trên cây thuốc lá cũng bằng phương pháp này.

Những biến thể dòng xôma cũng đã phát hiện cho ta những quả to, nhỏ khác nhau. Do đó mà các nhà khoa học đã áp dụng nó vào cây ăn quả như bưởi, cam, để thu những đặc tính quý.

Tóm lại, trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật,

người ta đã thừa nhận có sự biến đổi di truyền. Sự biến đổi như vậy có thể có ích đối với tiến bộ mùa màng. Trong quá trình nghiên cứu cơ sở di truyền của sự biến đổi các tế bào thực vật nuôi cấy, người ta đã thấy rằng, công nghệ nuôi cấy tế bào cho chúng ta một lợi thế quan trọng để làm thay đổi giống cây trồng theo hướng có lợi. Đó là những biến đổi dòng xôma và phương pháp chọn lọc dòng xôma giúp tạo ra nhiều những giống mới đặc tính ưu việt.

3. Dung hợp các tế bào trần

Photoplast là tế bào trần, có màng sinh chất bao quanh, còn vỏ cellulose đã bị tiêu huỷ bởi enzym cellulose hay drilselase. Photoplast có khả năng dung hợp với nhau để tạo thành cá thể lai vô tính dưới tác dụng của một tác nhân hoá học hay vật lý để làm các màng kết dính lại với nhau và gây ra sự vận chuyển của các đại phân tử ADN, các protein, các bào tử từ tế bào nọ sang tế bào kia.

Dung hợp là quá trình hợp nhất hai protoplast lại làm một. Các tế bào thực vật có khả năng dung hợp dưới dạng protoplast. Hai protoplast dung hợp lại có thể sinh ra một cây con hoàn chỉnh với dấu

hiệu di truyền của hai tế bào hợp lại. Nhưng quá trình này là quá trình lai vô tính (somatic hybridization). Trong nông nghiệp hiện đại, nhờ phương pháp lai vô tính này mà người ta cải tiến được nhanh chóng bộ máy di truyền tế bào nhằm tạo ra những giống mới để nâng cao năng suất cây trồng.

Sử dụng kỹ thuật protoplast người ta đã lai tạo giữa cây trồng với các cây hoang dại để đề kháng một số trạng thái của môi trường bất thuận như tạo ra những giống cây chịu hạn cao hay những giống cây chịu rét giỏi, cũng như những giống chống chịu được sâu bệnh, phèn, mặn...

Kỹ thuật nuôi cấy và dung hợp protoplast đến nay không những đã thực hiện được tốt đối với cây hai lá mầm - mà ngay cây có một lá mầm như cây lúa cũng đang được nghiên cứu áp dụng.

Giai đoạn tách và nuôi cấy protoplast:

Ở giai đoạn này người ta có thể tách tế bào để xử lý tạo thành protoplast từ tất cả các thành phần của cây như rễ, thân, lá, nốt sần rễ, lá mầm, hạt phấn, mô sẹo...nhưng hay dùng hơn cả là từ mô lá. Giai đoạn này gồm các bước sau:

+ Bước 1: Xử lý mẫu cho sạch và vô trùng bằng cồn 70°, sau đó bằng hypoclorit canxi, cuối cùng bằng nước vô trùng.

+ Bước 2: Cắt mẫu. Mẫu được cắt nhỏ thành mảnh 0,5 x 2 cm hoặc thành sợi.

+ Bước 3: Xử lý mẫu bằng enzym. Sử dụng các enzym hỗn hợp như pectinase cellulose Onozuka R10 trong manitol pH = 5,8 ở một thời gian trong điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tối ưu.

+ Bước 4: Tách làm sạch protoplast bằng phương pháp lọc và ly tâm.

Các bước chung tiến hành là như vậy, song chi tiết mỗi loài cây đòi hỏi một loại enzym để tách tế bào protoplast, nồng độ enzym cũng như nồng độ các chất gây có nguyên sinh chất khác nhau để có lượng tế bào protoplast cao nhất.

Giai đoạn dung hợp protoplast gồm một số phương pháp:

Phương pháp sử dụng tác nhân hóa học: đó là sử dụng polymer, chất polyethylene glycol (PEG). Chất này gây ra kết dính hai protoplast và tạo điều kiện để các phân tử ADN cũng như các thành phần khác dễ đi qua màng.

Phương pháp sử dụng tác nhân vật lý: đó là dùng các xung điện (electroporation) để tạo những lỗ nhỏ của màng, tạo điều kiện cho các phân tử đi qua. Thực chất những vấn đề chính của kỹ thuật dung hợp protoplast là việc phân biệt các thể lai ấy thông qua:

Hoặc bằng mắt thường.

Hoặc bằng dùng gene đánh dấu.

Hoặc bằng môi trường chọn lọc.

Hoặc dùng phản ứng màu enzym.

Hoặc dùng protoplast từ các loại mô khác nhau.

Hoặc được nhuộm bằng các chất phát huỳnh quang...

Ngày nay người ta sử dụng kỹ thuật dung hợp protoplast để tạo nhiều những cây lai mới. Chẳng hạn:

Người ta đã tạo ra được cây lai từ khoai tây trồng và khoai tây hoang dại. Gene cây hoang dại giúp cây trồng tính kháng các bệnh virus.

Dùng kỹ thuật dung hợp protoplast người ta có thể lai những cây có quan hệ họ hàng xa với nhau. Gần đây các nhà khoa học đã thành công trong việc lai tạo cây cà chua với cây khoai tây và đã tạo ra

được giống cây mới cho chùm quả là những chùm cà chua mọng nước và rẽ là chùm củ khoai tây.

Cũng bằng cách này người ta đã tạo ra được cây lai của cà rốt và rau mùi, cam, chanh.

Đến nay đã có hơn 70 loài cây khác nhau được sinh ra theo kiểu như vậy.

Khi sử dụng protoplast, người ta còn tạo ra được giống lai giữa tế bào thực vật và vi khuẩn. Sự dung hợp giữa tế bào tảo lam - vừa có đặc tính quang hợp vừa có đặc tính cố định đạm - với tế bào trần thực vật làm kích thích sự phát triển của chúng.

Cũng với kỹ thuật trên, người ta còn có thể dung hợp được tế bào xôma với tế bào sinh dục (hạt phấn) để tạo ra những cây lai giữa các họ với nhau.

Tóm lại, kỹ thuật dung hợp protoplast hiện tại đang mở ra một khả năng rộng lớn trong việc tạo ra những đặc tính tốt có thể tập hợp được nhiều đặc tính tốt từ các cây khác nhau.

4. Tăng năng suất cây trồng bằng chất điều hoà Cytokinin.

Cytokinin tác động lên sự phát triển thực vật, lên sự phản ứng của thực vật tới các stress môi trường khác nhau và lên quá trình sinh lý quan

trọng của cây trồng. Những tiến bộ về hiểu biết chuyển hoá các cytokinin, đồng thời với sự tìm ra được những gene cytokinin thuần hoá có thể đem lại mùa màng bội thu thông qua việc biến đổi biểu hiện các cytokinin trong các mô thực vật.

Ngược lại với các tế bào động vật, các tế bào thân (xôma) thực vật có tiềm năng - dưới điều kiện nào đó có khả năng hình thành một cây hoàn toàn. Tính chất này cho phép tạo ra sự tiến bộ trong công nghệ thực vật, bởi nhờ đó thực vật có khả năng được tái sinh từ những tế bào thân bị biến tính hay tế bào sinh sản đơn bội, khai thác sự khác nhau của dòng tế bào thân của các mô thực vật và phát triển các kỹ thuật di truyền giống hiệu lực để làm tăng tốc độ truyền giống của các cây trồng mới mà không có virus.

Điều hoà sinh trưởng và phát triển của thực vật bao gồm tái sinh các thực vật từ những tế bào và mô tách ra đều dưới sự kiểm tra của hormone còn gọi là phytohormon. Phytohormon gồm nhiều chất như auxin, cytokinin, absizin, etylen, gibberllin, cùng hai loại hormone thực vật quan trọng là auxin và cytokinin quyết định sự kích thích phân chia và biệt hoá tế bào của các mô được nuôi cấy

invitro. Các auxin là các loại hormone thực vật đầu tiên được phát hiện, chúng kích thích sự nở rộng tế bào, phát sinh rễ và kiểm tra sự phản ứng về nhiệt của các cơ quan. Việc nuôi trồng bằng mô lâu dài của một số loài thực vật đã được tiến hành nhờ cộng thêm auxin vào môi trường và phát hiện ra cytokinin khi nghiên cứu yếu tố hoá học cần thiết cho phát triển động học tế bào và sự trưởng thành liên tục của nhu mô ruột cây thuốc lá. Sau đó người ta thấy có nhiều loại cytokinin được xác định trong môi trường.

Cytokinin phải kể đến trước hết là kinetin. Kinetin bình thường không biểu hiện trong cây và được tách ra từ tinh trùng cá trích hấp như là G - ful - furylaminopurine. Đó là sản phẩm tái sắp đặt giả tạo của quá trình hấp sấy. Các cytokonin có khả năng phát động sự phân chia và lớn lên invitro của các mô sẹo callus theo cùng kiểu như kinetin. Cytokinin tự nhiên đầu tiên là zeatin đã được phát hiện và tách ra trong nội nhũ của ngô non.

Hầu hết các nghiên cứu xác định mối liên quan giữa hoạt động sinh học với cấu trúc hoá học của cytokinin đều dùng thử nghiệm trên các callus của thuốc lá. Thử nghiệm này dựa trên khả năng

cytokinin kích thích sự lớn lên của mô chủ yếu của dòng thuốc lá đã được bổ sung auxin. Người ta tìm thấy sự thay đổi chiều dài chuỗi bên, sự bão hoà của liên kết đôi, sự tách hay chuyển nhóm hydroxyd và sự biến đổi cấu trúc adenin của zeatin đã làm giảm sự hoạt động của nó.

Tác dụng của cytokinin

Cytokinin kích thích sự sinh trưởng của các tế bào thực vật nuôi trồng, chúng cũng biểu hiện nhiều hoạt tính sinh học khác. Sự tác dụng tương hỗ giữa chúng với auxin trong việc hình thành cơ quan của nuôi cấy mô thực vật rất quan trọng đối với công nghệ sinh học cây trồng.

Tỷ lệ nồng độ auxin: Cytokinin cao trong môi trường nuôi cấy thì cảm ứng sinh rễ, sinh củ mạnh. Ngược lại thì sinh nụ và cành non tăng. Nguyên lý đó được khai thác một cách rất thành công trong việc phát triển của các kỹ thuật thuần hoá dòng và di truyền đối với một lượng lớn các loài thực vật.

Cytokinin làm tăng sự lớn lên của những chồi bên bởi làm giảm sự lớn của chồi đỉnh, bằng cách này mà làm ảnh hưởng đến hình dạng của cây và hình thành những cành có khả năng sinh sản.

Cytokinin tăng cường sự đề kháng của cây tới các dạng stress khác nhau như độ mặn, độ ẩm, nhiệt độ cao...

Cytokinin điều hoà sự sinh trưởng của cây dưới những điều kiện hạn hán, làm trì hoãn sự già yếu của cây và phần còn lại của cây bị chặt.

Kích thích diệp lục tố phát triển.

Trong một số loài thực vật nào đó, cytokinin điều hoà sự biểu hiện của các gene đặc hiệu.

Có nhiều bất lợi khi đưa cytokinin từ ngoài vào, sự biểu hiện gene ipt cần phtoplast đặt dưới sự kiểm soát của promotor thích hợp đặc hiệu mô hoặc phù hợp với môi trường phát triển, do đó có khả năng tăng nồng độ cytokinin. Một cách thông thường, cytokinin được áp dụng từ ngoài vào là để tăng cành của một số cây trang trí. Thực tế cho thấy, khi đem áp dụng cytokinin vào cây ngũ cốc ngay sau khi ra hoa sẽ làm tăng sự ra hạt và sinh hạt của lúa mì, lúa mạch gạo, yến mạch và ngô. Tác dụng này đặc biệt sâu sắc với những cây lớn lên trong sự thiếu dưỡng nitrate và nó có tầm quan trọng cả về kinh tế và sinh thái.

Việc áp dụng cytokinin tổng hợp rất đắt và gây nguy cơ cho sức khỏe nên người ta hướng sự sản xuất cytokinin bằng công nghệ gene, tức là chuyển gene thực vật. Sự chuyển gene này sẽ tổng hợp ra cytokinin tự nhiên trong các thời điểm thích hợp cho sự phát triển của cây cối.

Khả năng các cytokinin làm tăng sự hoà hợp của thực vật đối với các chấn động (stress) của môi trường có thể làm thực vật chuyển gene này phù hợp với các nước đang phát triển, nơi những điều kiện trồng trọt còn xa mới đạt được mức tối ưu.

Việc đưa gene ipt vào nhằm làm chậm sự già héo của các lá - nguồn quan trọng cho sự quang hợp và phát triển các hạt ngũ cốc, đó là những nghiên cứu đầy hấp dẫn để thấy được tác dụng của cytokinin đối với cây trồng ngũ cốc.

Sự sản xuất cytokinin được tăng lên trong các cây chuyển gene. Với gene ipt được hợp nhất với promotor cấu tạo đã tạo ra những hiệu quả vô cùng lớn trên các phenotype ở thực vật. Đó là sự hình thành nhiều củ, sự lớn lên rậm rạp, ức chế sự phát triển rễ và sự nhiễu loạn hình thành hoa.

C. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG SẢN XUẤT PHÂN BÓN

1. Phân bón sinh học Azotobacterin

Một vấn đề đặt ra là không có cây họ đậu thì không còn sinh vật nào thay thế nổi công việc của vi khuẩn nốt sần hay sao? Đó là nỗi băn khoăn của những người nghiên cứu về vi khuẩn cố định đạm. Với lòng tin vững chắc qua nhiều lần thất bại, các nhà bác học Nga đã tìm ra loại vi khuẩn sống tự do trong đất có khả năng cố định đạm, đó là Azotobacterin. Đây là vi khuẩn hình que hoặc hình cầu, lúc đứng với nhau thành đôi, lúc thành đám. Trung bình dài khoảng 1-2 μ m nhưng cá biệt cũng có con dài tới 12 μ m hoặc thấp tẹt khoảng 0,2 μ m.

Người ta ước tính trung bình mỗi chủng Azotobacterin chỉ cần tiêu thụ 1g chất sinh năng lượng là có thể cố định được 15mg nitơ phân tử, thậm chí có chủng đạt tới 30mg.

Chính sự kiên trì ngày đêm làm việc của các loài vi khuẩn này đã làm cho kho dự trữ NH_3 trong đất tăng lên rất nhiều và đất trở nên màu mỡ.

Bên cạnh đó các vi khuẩn này còn cung cấp một lượng lớn chất auxin, chất giberellin - là những

chất kích thích cây trồng phát triển cực kỳ nhanh chóng.

Do đó, để tăng năng suất cây trồng trong đó có cả cây lúa, người ta sản xuất hàng loạt các vi khuẩn này trong các nhà máy lên men để sản xuất phân bón làm cho đất màu mỡ gọi là phân sinh học Azotobacterin.

Gần đây đối với tế bào rễ lúa mì, mía và lúa nước người ta cũng vừa lập được một vài vi khuẩn sống cộng sinh trong các tế bào đó và xếp loại, gọi là Azotobacterin.

Mặc dù mới phát hiện nhưng người ta cũng đã nhanh chóng nghiên cứu và đưa vào ứng dụng qua các sự gây nhiễm nhân tạo giống đó cho ngô, lúa nhằm nâng cao năng suất mùa màng.

2. Thuốc trừ sâu sinh học

Baculovirus là loại virus được tách ra từ động vật không xương sống, hầu hết là tìm thấy ở côn trùng, sâu bọ. Baculovirus gây nhiễm cho hơn 600 loài côn trùng khác nhau, bao gồm Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera và Coleoptera.

Vấn đề quan trọng là Baculovirus không gây nhiễm cho người, động vật có vú hoặc động vật có

xương sống, không xương sống và cả thực vật nữa. Do đó, Baculovirus có thể được coi như là hệ thống biểu hiện an toàn nhất được tìm thấy hiện nay.

Baculovirus được phân chia thành 3 nhóm:

Nhóm A: Nuclear polyhedrosis viruses (NPV) có một số tiểu phần virus được vùi trong protein để hình thành thành polyhedra.

Khi tách ra có thể có nucleocapsid đơn (S) hay đa (M) chứa trong mỗi tiểu phần virus.

Nhóm B: Gramlaissis virus (GV) có những tiểu phần virus đơn giản chứa chỉ một nucleocapsid được vùi trong protein hạt để hình thành nên những hạt lớn.

Nhóm C: virus không tạo ra những thể vùi (NOV).

Baculovirus thường được đặt tên theo tế bào chủ từ đó chúng được tách ra. Chúng giống nhau về liên quan di truyền trong các virus từ các loài khác nhau. Chẳng hạn, Baculovirus được tách ra từ *Autographa Califonia* multiple nuclear polyhedron virus được gọi tên là Ac MNPV. Song những Baculovirus tìm thấy ở *Trichoplusia ni*, ở *Galleria*

mellomella ở *Holiverpa zea* và *Rachiplusia* ou cũng giống hệ AcMNPV.

AcMNPV đã được nghiên cứu ở mức độ phân tử bởi sự nhân lên có hiệu quả của nó trong nuôi cấy tế bào khi nó là những vector biểu hiện. Song *Bombyx mori* (silkworm) - (Bm) NPV cũng đã được phát triển như vector biểu hiện có hiệu quả, nên có ích trong việc sản xuất những protein tái tổ hợp trong con tằm - con này dễ nuôi dưỡng và sử dụng - song vẫn không phổ biến rộng rãi như hệ thống AcMNPV.

Giai đoạn ấu trùng của vòng sống côn trùng sâu bọ rất dễ bị nhiễm NPV. Polyhedra được ăn vào khi côn trùng ăn thức ăn bị nhiễm bản và hoà tan trong môi trường kiềm ở ruột, giải phóng ra những tiểu phần virus. Vỏ lipoprotein virus hoà vào màng bào tương của tế bào thành ruột và giải phóng nucleosapsid vào trong bào tương. Nucleosapsid này vận chuyển ADN virus vào nhân tế bào. Baculovirus sản sinh ra 2 dạng cấu trúc khác hẳn nhau trong chu kỳ nhân lên 2 giai đoạn.

Trong tế bào ruột bị nhiễm, các nucleosapsid được hình thành khoảng 8 giờ sau nhiễm và bắt

đầu tạo chồi nụ qua màng nhân lúc 12 giờ, như vậy đòi hỏi vỏ lipid - đồng thời có chồi nụ ở màng bào tương - glycoprotein 67 Kda (giải phóng 67) để gài vào.

Virus xuất ngoại (extracellular virus - ECV) được giải phóng vào haemolymph để gây nhiễm cho tế bào khác của côn trùng. Những mô bị nhiễm gồm các tế bào mỡ, tế bào thần kinh và các haemoccyter. Các tế bào bị nhiễm vòng hai của sự nhân lên của virus trong ấu trùng cũng sản xuất ECV nhưng có thêm tiểu phần virus trong polyhedra ở nhân, những tiểu phần này thiếu gp67 mà chỉ có vỏ lipid được tổng hợp mới. Sự tích tụ polyhedra trong côn trùng được tiến hành cho đến khi vật chủ biến thành một túi virus. Ở giai đoạn cuối này, ấu trùng hoá lỏng và giải phóng polyhedra đi gây nhiễm cho côn trùng khác. Người ta mô tả ấu trùng bị nhiễm ở giai đoạn cuối này như là một "bãi lầy vô hình". Ở con tằm, nhân dân ta gọi là "tằm bùng".

Tóm lại, baculovirus sản xuất ra hai dạng cấu trúc của virus.

ECV như là tác nhân phân phát gây nhiễm trong cùng một cá thể.

Polyhedron hoạt động như là tác nhân phân phát giữa các cá thể và duy trì cơ thể sống sót khi vật chủ không nhạy cảm.

Sự nhân lên của baculovirus in vitro như sau:

Nguyên liệu mở đầu cho nuôi cấy các tế bào côn trùng gồm các buồng trứng, các thể mỡ, các hemocyte của ấu trùng hay các mô nghiền nát của toàn bộ ấu trùng.

Những dòng tế bào dùng để nhân lên AcMNPV là mô trứng của con nhộng loài *Spodoptera frugiperda* (Sf).

Hai giai đoạn virion (ECV) và polyhedra trong ấu trùng cũng được tìm thấy trong nuôi cấy. Dạng ECV của AcMNPV đi vào các tế bào của côn trùng trong nuôi cấy bởi quá trình hấp thụ endocytosis. Nucleocapsids dùng như chuyển vị ADN vào trong nhân tế bào, ở đó bắt đầu sự nhân lên của virus.

Khi tiến hành ức chế sao chép của virus, biểu hiện gene virus được phân chia thành 4 giai đoạn:

Giai đoạn sớm ngay lập tức (immediate early).

Giai đoạn sớm hơi muộn (delayed early).

Giai đoạn muộn (late).

Giai đoạn rất chậm promoter của gene baculovirus là gene polyherin và gene pio.

Hệ thống biểu hiện protein dựa trên virus polyhedrosis nuclear *Autographa catformica* (AcNPV) - một baculovirus của côn trùng đang được áp dụng rộng rãi trong hệ thống biểu hiện procaryote hay eucaryote. Baculovirus không gây bệnh cho động vật có xương sống và thực vật. Sản phẩm của loại gene ngoại lai là protein polyherin - một tiểu phần từ đó có thể vùi tinh thể hoặc polyhedron được hình thành.

Sự phát triển hiện nay của các vector virus làm biểu hiện nhiều protein lai hơn là chỉ một - vector biểu hiện đa năng. Khả năng có thể gài 1 copy DNA của bộ gene RNA (6,6Kb) của poliovirus vào baculovirus, do đó những tiểu phần virus không nhiễm trùng được sản xuất, có thể dùng để chủng vaccin...

Các hệ thống biểu hiện của baculovirus dễ dàng sử dụng có đặc tính chung với các hệ thống biểu hiện eucaote, đó là cung cấp sự biến đổi sau dịch mã của protein (chẳng hạn glycosyl hoá, phosphorryl hoá và quá trình hình thành peptit tín hiệu). Song sự biểu hiện mức cao của các gene

ngoại lai đó không được bảo đảm, những mức độ biểu hiện khác nhau có thể phụ thuộc vào đặc trưng vào protein. Trong hệ thống baculovirus, những protein ngoại lai được sản xuất trong lúc nhiễm trùng huỷ hoại các tế bào côn trùng với virus tái tổ hợp. Sự chết tế bào kéo theo sự nhiễm trùng với virus. Điều này có tiến bộ hơn các hệ thống eukaryote hay prokaryote khác.

Hiện nay vector ANPV và tế bào S.frugi-perda là hệ thống được dùng rộng rãi.

Nuôi cấy côn trùng

Môi trường nuôi cấy côn trùng sớm gồm dung dịch muối được cân bằng và bổ sung 5-50% thể tích hemolymph côn trùng để cung cấp yếu tố sinh trưởng. Sự melanin hoá là một vấn đề. Một môi trường nuôi cấy tổ chức (đó là môi trường *Antheraea* Grace) đã cho biết những thông tin về thành phần của hemolymph côn trùng và bổ sung thêm vitamin B và đường. Độ pH của chúng thấp (pH 6,2) hơn là môi trường nuôi cấy tế bào động vật (pH 7,2-7,4). Hemolymph côn trùng hiện đã bỏ và thay thế bằng protein hydrosat và 5-10% huyết thanh phôi bê (FCR) trong môi trường. Các thành phần trong môi trường như

vậy đã được dùng thường quy để nuôi cấy tế bào Sf. Trong một số trường hợp FCS có thể được dùng ở mức độ thấp hơn (2%). Môi trường hoá học không có huyết thanh thì chứa các thành phần khác như dầu gan lạnh, cholesterol, Tween 80 và tocopherol acetate. Chúng được bổ sung như là lipit được nhũ hoá với pluronic lopyol F.68 đã được triển khai.

Các tế bào đã được dùng trong hầu hết các phòng thí nghiệm để nhân lên AcNPV là dòng tế bào IPLB-Sf21- môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng đã được thương mại hóa (GIBCO hoặc FLOW) có cộng thêm protein hydrolysate và bổ sung thêm 5-10% FCS, có thêm kháng sinh như penicillin, streptomycin và thuốc chống nấm. Vaculovirus được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu sản xuất các thuốc trừ sâu sinh học.

1. Endoxin delta từ *Bacillus thuringiensis* được sản xuất bởi AcMNPV tái tổ hợp làm giảm ăn uống của sâu bọ, côn trùng khi ăn thức ăn bị nhiễm.

2. Esterase của hormon trẻ *Heliothis virescens* trong ấu trùng Tni bị nhiễm với AcMNPV tái tổ hợp sẽ làm giảm mạnh trọng lượng của côn trùng và làm suy yếu chúng.

3. Sự biểu hiện của hormone directic đã xúc tiến để virus giết nhanh côn trùng.

4. Như vậy, baculovirus có tiềm năng như là tác nhân kiểm soát sinh học đối với vật làm hại côn trùng vì đặc tính vật chủ, tính hiệu lực và tính bền của chúng. Một số chế phẩm chống sâu bọ (pesticides) dùng baculovirus tái tổ hợp đã được đăng ký bởi hãng bảo vệ môi trường Mỹ và một vài chương trình kiểm soát thành công được công bố. Song thị trường áp dụng vẫn còn có nhiều hạn chế. Một hạn chế quan trọng là côn trùng sâu bọ vẫn tiếp tục ăn uống vài ngày sau khi nhiễm trùng, do đó gây ra thiệt hại mùa màng đáng kể trong khoảng thời gian giữa lúc virus gây nhiễm đến lúc côn trùng chết. Bởi vậy, hiện nay người ta dùng kỹ thuật tái tổ hợp gene vào baculovirus với dòng baculovirus tái tổ hợp đó gây nhiễm trùng cho sâu bọ. Khi côn trùng bị nhiễm đồng thời cũng bị diệt luôn nên côn trùng không thể phá hoại mùa màng được nữa.

Song cần chú ý, một vài sản phẩm gene ngoại lai đặc biệt các toxin có thể gây độc cho nuôi cấy tế bào cho côn trùng. Vấn đề này không quan trọng nhưng phải nghiên cứu để làm trung hoà tác dụng của toxin.

Thật ra một lĩnh vực đòi hỏi phải có nhiều kiến thức hơn nữa là kiểm soát sự biểu hiện gene của baculovirus mới có hy vọng mang đến được nhiều lợi ích cho sản xuất vacxin và thuốc trừ sâu sinh học.

Tóm lại, hàng ngàn năm nay, người nông dân luôn luôn thay đổi cây trồng, thay đổi lối canh tác để có những tiến bộ trong thu hoạch. Họ luôn luôn chọn lọc những hạt giống tốt của các cây trồng mong muốn có mùa màng tốt hơn. Trong thế kỷ vừa qua, giống cây trồng trở thành vấn đề ráo riết và cấp bách hơn trong nghiên cứu. Những tiến bộ có ý nghĩa trong mùa màng vừa qua là kết quả của sự tạo giống chéo của những cá thể khác nhau trong cùng một loài. Hơn nữa, gần đây các nhà nghiên cứu đã thành công trong lai chéo sinh dục giữa các loài không tương hợp trong cùng một họ. Hiện nay xuất hiện một phương pháp đầy hứa hẹn trong sự phát triển những cây trồng cao cấp - đó là công nghệ gene. Dùng kỹ thuật tái tổ hợp ADN, các nhà sinh học có thể trực tiếp làm di chuyển những đoạn gene có ích và đặc hiệu vào những cơ thể và cây trồng thậm chí không có liên quan. Theo phương pháp này, các nhà chọn giống cây trồng có

thể hoàn toàn thoả mãn trong chọn lựa một loạt những đặc tính phân tán khác nhau. Chẳng hạn, trong phòng thí nghiệm, các cây trồng có thể chống lại được côn trùng, virus và cỏ dại, hoa quả của nó có thể chống lại sự hư hại và các hạt trở nên mẩy hơn, giàu dinh dưỡng và rõ ràng mang lợi ích kinh tế cao hơn.

Các nhà sinh học đã tạo ra những cây trồng chuyển gene gần 10 năm nay và họ áp dụng công nghệ di truyền vào hơn 50 loài thực vật khác nhau.

Mặc dù công nghệ gene phức tạp hơn nhiều so với thực hành chọn giống cây trồng cổ điển nhưng an toàn hơn. Cả 2 ADN mới đều đi vào bộ gene của cây trồng và được duy trì, biểu hiện một cách bền vững. Báo cáo của Viện hàn lâm khoa học Mỹ vừa qua đã kết luận: những cây trồng được cải tiến bằng phương pháp tế bào và phân tử đều không có gì khác so với những cây trồng được cải biến bằng phương pháp di truyền cổ điển.

Hướng nghiên cứu bảo vệ cây trồng bằng công nghệ gene cũng được phát triển mạnh mẽ. Theo thống kê, sâu bọ gây thiệt hại khá lớn cho mùa màng, vào khoảng 20-40%. Năng suất mùa màng càng cao thì thiệt hại đó càng lớn. Nước Mỹ mỗi

năm chi 2,5 tỉ đôla về thuốc trừ sâu nhằm bảo vệ mùa màng khỏi thiệt hại. Nhưng thuốc trừ sâu đã để lại nhiều hậu quả khôn lường, người bị ngộ độc thậm chí ung thư, động vật có thể chết. Do đó, bảo vệ thực vật theo hướng công nghệ gene an toàn hơn.

Với khoảng 20 triệu lao động nông nghiệp, hàng năm sản xuất khoảng 20-25 triệu tấn lương thực, Việt Nam là nước đứng thứ hai, thứ ba trong xuất khẩu gạo thế giới. Điều đó đang cổ vũ, động viên các nhà khoa học tiến công vào khoa học, áp dụng mạnh mẽ công nghệ sinh học nhằm đa dạng hoá nông nghiệp, đạt tăng trưởng ngày một cao trong nền kinh tế quốc dân

II. NHỮNG THÀNH TỰU NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN LÚA LAI

1. Những thành tựu trên thế giới

Trung Quốc là quốc gia đi tiên phong trong lĩnh vực nghiên cứu và phát triển lúa lai. Theo Yuan L.P (1996), từ 1976 đến 1994 lúa lai đã giúp Trung Quốc tăng tổng sản lượng lúa thêm 300 triệu tấn. Năm 1994, Trung Quốc đã trồng 15,7 triệu ha lúa lai, chiếm 50% diện tích trồng lúa và 60% sản lượng lúa cả nước. Năng suất lúa lai cao hơn so với lúa thuần khoảng 30%. Trên diện tích hẹp (0,1 ha), lúa lai đạt năng suất kỷ lục là 16,8 tấn/ha/vụ và 23 tấn/ha/2 vụ.

Hiện nay, kỹ thuật sản xuất hạt giống lúa lai của Trung Quốc đã phát triển ở mức độ cao. Năng suất hạt lai F1 đạt bình quân 2,5 tấn/ha trên phạm vi cả nước. Nhiều dòng CMS có tỷ lệ thụ phấn chéo cao từ 85-90% như II-32A, ZhiA, You-1A (Yuan L.P., 1995) và có phẩm chất hạt tốt đã được tạo ra. Từ đó nhiều tổ hợp lúa lai mới chất lượng gạo tốt,

chống chịu nhiều loại sâu bệnh đã được đưa ra sản xuất đại trà. Kể từ khi tổ hợp lúa lai đầu tiên là Nan You2 được tạo ra năm 1974 và đưa vào sản xuất đại trà năm 1976 đến nay đã có hơn 100 tổ hợp được trồng với diện tích lớn. Các tổ hợp lúa lai ba dòng Indica của Trung Quốc chủ yếu thuộc vào các hệ như Wei You (dòng mẹ là V20A) gồm Wei You 64, Wei You 77, Wei You 1126..., hệ Shan You Que 99..., hệ Bo You (dòng mẹ là BoA) gồm Bo You 64, Bo You Que 99; hệ Kim You (dòng mẹ là Kim 23A) gồm Kim You 77, Kim You Que 99... Ngoài ra còn một số hệ khác dùng các dòng mẹ như ZhiA, You-IA, XieA...

Nhiều dòng CMS tốt đã được tạo ra trên nền di truyền của các giống IR, các giống từ Hàn Quốc và từ Ấn Độ. Các dòng IR54752A, IR54753A và IR54754A thể hiện tính thích nghi tốt với vùng nhiệt đới, có khả năng kết hợp tốt và tỷ lệ thụ phấn chéo đảm bảo. Các dòng này đã được sử dụng để tạo các F1.

Trong thí nghiệm so sánh năng suất từ 1986 đến 1992, nhiều tổ hợp lúa lai ba dòng được tạo đã cho năng suất cao hơn so với các dòng thuần đối chứng từ 16-45%. Đó là các tổ hợp IR46830A/IR9761-19-1,

IR54754A/ARC11353, IR46830A/IR29723... Hai giống lúa lai IR64615H (IR58025A/IR29723) và IR64616H (IR62829A/IR29723) (Viện lúa Đ.B.S.C.L. đặt tên là UTL1 và UTL2) đã được trồng ở một số nước như Ấn Độ, Philipin, Việt Nam và Malaysia trong những năm 1990-1992 và cho năng suất cao hơn các giống lúa thuần đối chứng từ 15-20%.

Theo Siddiq, ở Ấn Độ nỗ lực để phát triển và sử dụng công nghệ lúa lai được khởi xướng từ những năm 1970. Tuy nhiên, phải đến cuối năm 1989, nhờ sự ủng hộ của Nhà nước và các tổ chức quốc tế (như FAO, IRRI) chương trình nghiên cứu, phát triển lúa lai mới được tăng cường. Vụ mùa 1996, Ấn Độ trồng trên 60 000 ha lúa lai ở các vùng khác nhau. Từ 1994-1996, 6 giống lúa lai ba dòng của các cơ quan nghiên cứu thuộc khu vực nhà nước đã được công nhận và đưa vào sản xuất đại trà. Đó là giống APCR-1, APCR-2, MGR-1, KRH-1, CNRH-3 và DRRH-1. Trong các thử nghiệm trên đồng ruộng, những tổ hợp này cho năng suất cao hơn các giống lúa thuần từ 16-44% (Siddiq, 1996). Năm tổ hợp lúa lai của các công ty tư nhân cũng đã được chấp nhận và được trồng trên diện tích rộng, đó là các tổ hợp:

PHB71, 6201, 6027, MPH516 và MPH517. Trong đó tổ hợp 6201 đã được thử nghiệm ở miền Bắc Việt Nam và đạt năng suất 7,2 tấn/ha, cao nhất trong thí nghiệm trình diễn giống lúa lai vụ xuân 1997. Hai tổ hợp 6201 và 6207 cũng được triển khai thử nghiệm ở miền Bắc Việt Nam vụ xuân năm 1998. Kết quả cho thấy rằng, hai tổ hợp này cho chất lượng gạo và chống chịu tốt hơn lúa lai của Trung Quốc. Hiện nay kỹ thuật sản xuất hạt giống lúa lai F1 của Ấn Độ đã đạt được những thành tựu bước đầu. Năng suất hạt F1 là 1,5-2,0 tấn/ha trên diện tích rộng lớn.

Ở Hàn Quốc (theo Moon,1998; Moon và Cs.,1994) dự án hợp tác nghiên cứu với IRRI đã đóng vai trò đáng kể trong sự phát triển lúa lai. Nhiều tổ hợp lúa lai ba dòng đã được tạo ra và trong các thí nghiệm so sánh năng suất từ 1990-1992, chúng đã đạt năng suất 9,1-12,1 tấn/ha, vượt trung bình 21% so với các giống lúa thuần tốt nhất. Ví dụ như tổ hợp V20A/Milyang 46, V20A/Suweon 294, HR1619A/Iri362, IR54756A/Iri362...

Theo Suprihatno và Cs.(1994), Indonesia bắt đầu nghiên cứu lúa lai từ năm 1983. Đầu tiên là việc đánh giá và sử dụng nhiều dòng CMS vào

chương trình chọn tạo lúa lai ba dòng. Các tổ hợp lúa lai IR58025A/BR827, IR58025A/IR53942, IR58025A/IR54852 đã được tạo ra và thử nghiệm ở Kuningham, tổ hợp IR62829/BR736 đạt 8,09 tấn/ha, cao hơn IR64 là 18%. Năm 1996, ở Tegalgondo (Trung Java) và Kuningan (Tây Java), tổ hợp IR58025A/IR53942 đạt năng suất cao hơn giống lúa thuần mới công nhận Memberamo tương ứng là 17 và 27%.

Ngoài ra, ở một số nước khác như Nhật Bản, CHDCND Triều Tiên, Philipin, Malaysia, Thái Lan... các chương trình nghiên cứu và phát triển lúa lai đã được triển khai và thu được những kết quả nhất định.

Lúa lai hai dòng luôn gắn liền với việc nghiên cứu phát hiện các dòng bất dục đực nhân nhạy cảm với quang chu kỳ và dòng bất dục đực nhân nhạy cảm với nhiệt độ. Năm 1973, lần đầu tiên dòng PGMS-Nong Ken 58S đã được tác giả Trung Quốc phát hiện. Tiếp đó hàng loạt các dòng P (T) GMS cũng lần lượt được các tác giả Trung Quốc, Nhật Bản, Mỹ, IRRI và Ấn Độ công bố.

Công nghệ sản xuất hạt lai theo phương pháp hai dòng đơn giản và hiệu quả hơn phương pháp ba

dòng. Nếu như tỉ lệ ruộng nhân dòng bất dục: ruộng sản xuất hạt F1: ruộng trồng lúa lai thương phẩm theo phương pháp ba dòng 1:50:5000 thì phương pháp hai dòng sẽ là 1:100:15000. Hơn nữa, năng suất lúa lai thương phẩm hai dòng còn cao hơn lúa lai ba dòng từ 10-15%. Chất lượng hạt lai, khả năng chống chịu sâu bệnh và điều kiện tự nhiên bất thuận tốt hơn lúa lai ba dòng.

Nhờ những ưu điểm trên, diện tích lúa lai hai dòng ngày càng tăng. Năm 1997, Trung Quốc có 640.000 ha lúa lai hai dòng. Viện nghiên cứu lúa quốc tế IRRI, Ấn Độ, Indonexia và Thái Lan cũng thu được kết quả quan trọng trong việc sản xuất lúa lai hệ hai dòng.

2. Những thành tựu ở Việt Nam.

Việt Nam bắt đầu nghiên cứu lúa lai từ những năm đầu của thập kỷ 1980. Các tác giả ở Viện nghiên cứu lúa Đồng bằng sông Cửu Long đã tiến hành đánh giá các dòng CMS, xây dựng các quy trình sản xuất hạt lúa lai F1 và đánh giá ưu thế lai của các tổ hợp lai để tìm ra những tổ hợp lai có triển vọng từ năm 1983. Những thí nghiệm nghiên cứu khả năng xuất hiện ưu thế lai của các giống

lúa trồng tại Việt Nam và các tổ hợp lai có dòng bất dục đực tế bào chất tham gia cũng được các tác giả Viện khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam tiến hành. Năm 1992, chương trình nghiên cứu lúa lai của quốc gia mới thực sự được hình thành.

Dự án TCP/VIE/2251 và TCP/VIE/6614 do FAO tài trợ là những bước khởi đầu thúc đẩy việc hình thành cơ sở nghiên cứu lúa lai ở nước ta tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện cây lương thực và cây thực phẩm, Viện Nghiên cứu lúa đồng bằng sông Cửu Long, Viện Nông hoá thổ nhưỡng, Viện bảo vệ Thực vật và trường Đại học Nông Nghiệp I Hà Nội. Từ năm 1994, Trung tâm nghiên cứu lúa lai thuộc Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam cũng được thành lập. Việt Nam đã nhập vào các dòng A,B và R để tạo ra tổ hợp lai Shan ưu 63, tiến hành đánh giá 24 dòng CMS và 8 dòng phục hồi R là Minh Hui 63, Quế 99, Minh Hui 67, Trắc 64, Minh Dương 46, IR 544742... Sau một thời gian ngắn thực hiện chương trình nghiên cứu lúa lai, Việt Nam đã thu được một số kết quả:

- Cùng với việc nhập nội các giống lúa lai từ Trung Quốc và IRRI, trồng thử nghiệm các dòng

A,B và R tạo ra ở trong nước và nhập nội đã được đánh giá và sử dụng để tạo ra các tổ hợp lúa lai mới có triển vọng trong sản xuất.

- Khoảng 2000 tổ hợp lai đã được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu lúa lai, Viện bảo vệ thực vật đã lai tạo được 2 tổ hợp mang gene kháng rầy nâu biotype. Đó là C95-1 (L) có mẹ là Kim 23A và C 95-2 (L) có mẹ là BoA (Lê Văn Thuyết và Cs.,1995).

- Nhiều tổ hợp cho năng suất cao cũng được tạo ra. Tiêu biểu là tổ hợp BoA/DT12 cho năng suất 7,5-10 tấn/ha, có tính thích ứng cao và đã được chọn lựa để đưa ra sản xuất thử.

- Khả năng chống chịu sâu bệnh cũng như nhu cầu phân bón của lúa lai cũng được các nhà khoa học Việt Nam tiến hành nghiên cứu. Việt Nam đã triển khai được một mạng lưới sản xuất hạt lai F1 tại 18 tỉnh thành trong cả nước, bao gồm:

- Đồng bằng sông Hồng: Nam Định, Hà Tây, Thái Bình, Hải Dương, Hưng Yên, Hải Phòng, Hà Nội.

- Miền núi: Lào Cai, Yên Bái, Tuyên Quang, Bắc Cạn, Thái Nguyên, Cao Bằng.

- Khu bốn: Thanh Hoá, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Trị.

- Đồng bằng sông Cửu Long: Long An.

Đây là cách làm sáng tạo giữa nghiên cứu và triển khai nhằm đón đầu các tiến bộ kỹ thuật và chuyển giao công nghệ cho địa phương sản xuất, rút ngắn thời gian tới đích và tiết kiệm hàng ngàn tỉ đồng cho Nhà nước.

Ví dụ: Vụ xuân năm 1999-2000 cả nước có 1000 ha ruộng sản xuất lai F1 với năng suất trung bình là 2,5 tấn/ha đã cung cấp được gần 25% nhu cầu giống lúa lai trong cả nước. Kết quả này cùng với công tác nhập nội hàng loạt giống lúa lai vào Việt Nam như: Shan ưu 63 (tạp giao 1), Shan ưu Quế 99, Nhị ưu 63, Bắc ưu 64 (tạp giao 4), Kim ưu Quế 99, Bắc ưu 903, Bắc ưu 501, Chỉ ưu Quế 99, Đặc ưu 63... đã làm cho sản lượng và diện tích lúa lai của Việt Nam ngày càng mở rộng. Trong vụ đông xuân năm 2000 cả nước đã tăng thêm 1,2 triệu tấn thóc, riêng lúa lai góp phần 0,33 triệu tấn. Nếu tính cả năm 2000 diện tích lúa lai có thể đạt tới 350 000 ha. Vì vậy, FAO coi Việt Nam là nước áp dụng thành công công nghệ sản xuất lúa lai vào sản xuất đại trà và Việt Nam đã trở thành nước thứ hai (sau Trung Quốc) sản xuất thành công lúa lai trên diện tích rộng.

Đồng thời với việc nghiên cứu và phát triển lúa lai ba dòng, các nhà khoa học trong nước đã nghiên cứu và phát triển lúa lai hai dòng.

Việt Nam là một trong những nước thuộc vùng khí hậu cận nhiệt đới và nhiệt đới, do đó việc sử dụng các dòng TGMS trong công nghệ sản xuất lúa lai hai dòng rất thuận tiện.

Về nhiệt độ, việc duy trì dòng TGMS và sản xuất hạt giống F1 của lúa lai 2 dòng ở nước ta thuận lợi vì sự chênh lệch nhiệt độ ngày đêm không quá lớn và ít khi gặp nhiệt độ tới hạn cực trị. Về mặt địa hình, nước ta trải trên 15 vĩ độ đã tạo ra các vùng sinh thái khác nhau với nền nhiệt độ trong cùng một thời gian cũng khác nhau. Điều đó cho phép có thể thực hiện được việc chuyển vùng để duy trì dòng TGMS hoặc để sản xuất giống F1 khi có nhiệt độ phù hợp. Ngay trong những tháng mùa hè cũng có thể lợi dụng thời tiết mát mẻ ở một số vùng như Sapa, Tam Đảo, Đà Lạt để nhân giống dòng TGMS.

Sau một thời gian tìm tòi nghiên cứu các nhà khoa học đã công bố các công trình nghiên cứu chọn lọc các dòng TGMS và kết quả sử dụng các dòng TGMS mới chọn tạo trong việc sản xuất lúa lai hai dòng ở Việt Nam.

Kết quả bước đầu trong việc nghiên cứu phổ phục hồi hữu dục, khả năng giao phấn tự do và một số đặc tính nông sinh học của một số dòng TGMS đã được các tác giả thuộc Viện Cây lương thực và cây thực phẩm công bố.

Bằng đột biến thực nghiệm kết hợp với các phương pháp lai tạo, chọn lọc và nuôi cấy mô tế bào các nhà khoa học đã tạo ra một số dòng TGMS mới. Trên cơ sở các dòng TGMS này, các tổ hợp lúa lai hai dòng đầu tiên của Việt Nam (TGMS-VNI/D21, TGMS- VN1/D24, VN-01/D118 và VN-01/212) đã được tạo ra. Đặc biệt, quy trình sản xuất hạt lai F1 của tổ hợp lúa lai hai dòng (Bồ tát/Sơn thanh) cũng đã được nghiên cứu hoàn thiện và chuyển giao không chỉ mở rộng diện tích lúa lai hai dòng thương phẩm mà còn đẩy mạnh việc nghiên cứu và sản xuất hạt lai F1 theo phương pháp hai dòng tại Việt Nam.

Song song với việc triển khai sản xuất thử nghiệm một số tổ hợp lúa lai hai dòng dựa trên các dòng TGMS, với sự giúp đỡ của các tổ chức quốc tế, nhiều nhà khoa học đã triển khai những nghiên cứu cơ bản về bản chất phân tử của hiện tượng TGMS, nghiên cứu phát hiện và lập bản đồ gene

tms của dòng lúa TGMS-VN1 và xác định được gene tms của dòng lúa TGMS-VN1 là một gene mới, nó nằm trên vai ngắn và ngay sát tâm động thuộc nhiễm sắc thể số 2 của lúa và được đặt tên là tms-4. Đây là thành công đầu tiên của Việt Nam trong lĩnh vực nghiên cứu phát hiện và lập bản đồ gene ở lúa, đồng thời cũng là công trình thứ ba trên thế giới về việc nghiên cứu phát hiện và lập bản đồ gene tms ở lúa. Kết quả nghiên cứu này mở ra một triển vọng mới trong việc tách chiết và nghiên cứu bản chất phân tử của tms4(t), trên cơ sở đó sẽ làm sáng tỏ dần bản chất phân tử của hiện tượng TGMS ở lúa. Qua đó góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng của nó trong công nghệ sản xuất lúa lai hai dòng.

Cho tới nay, Việt Nam đã có nhiều dòng TGMS nhập nội, TMGS chọn lọc từ những tổ hợp lai, những dòng có thể sử dụng cho việc tạo những tổ hợp lúa lai hai dòng. Kết quả đã bước đầu cho thấy, lúa lai hai dòng thực sự có triển vọng phát triển tốt tại Việt Nam.

Nghiên cứu và sử dụng ưu thế lai trong sản xuất tại Việt Nam là một mốc quan trọng, đánh dấu cuộc cách mạng mới trong nghề trồng lúa.

Đây là một mô hình gắn liền giữa nghiên cứu và sản xuất mang nét đặc thù của Việt Nam với tính khoa học và sáng tạo rõ rệt. Chương trình phát triển lúa lai đã mang lại kết quả và triển vọng to lớn được bà con nông dân đồng tình ủng hộ, góp phần đảm bảo an ninh lương thực trong hệ sinh thái bền vững.

III. THỰC HÀNH SẢN XUẤT LÚA LAI

A. SẢN XUẤT HẠT LAI VÀ NHÂN DÒNG MS

* Sản xuất hạt lai

Sản xuất hạt lai gồm hai bước:

Nhân dòng MS ($A \times B$)

Sản xuất hạt lai ($A \times R$)

Tỉ lệ diện tích giữa nhân dòng MS và sản xuất hạt lai thương mại được xác định bằng:

Sản lượng thu hoạch ở diện tích nhân giống dòng MS và diện tích sản xuất hạt lai.

Tỉ lệ hạt của lúa lai thương mại trên một đơn vị diện tích.

Kỹ thuật được tiến hành như sau:

Chọn ruộng:

* Đất màu mỡ, hệ thống tưới tiêu chủ động.

* Đủ nắng

* Không có vấn đề nghiêm trọng về sâu bệnh, đặc biệt là các sâu bệnh đã bị cấm qua kiểm dịch.

* Cách ly

Hạt phấn của lúa rất nhỏ bé và nhẹ, chúng có thể theo gió bay đi rất xa. Để bảo đảm độ thuần của hạt lai và tránh thụ phấn với các giống không mong muốn, ruộng sản xuất hạt lai phải tuyệt đối cách ly.

* Cách ly về không gian: Tầm xa cách ly trên 100m được coi là thoả đáng. Trong tầm xa cách ly này không được trồng một giống lúa nào khác trừ giống bố có phấn.

* Cách ly về thời gian: Thường là trên 20 ngày. Nói cách khác, giai đoạn trổ của các giống trồng trong tầm 100m quanh khu ruộng sản xuất hạt phải sớm hơn hoặc muộn hơn 20 ngày so với dòng MS.

* Cách ly bằng vật cản: Một số nơi, các đặc điểm địa hình và các vật cản nhân tạo có thể được sử dụng làm phương tiện để cách ly.

* Thời điểm trổ và ra hoa tối ưu.

Các điều kiện thời tiết thuận lợi cho hoa nở bình thường của cả ba dòng là:

- Nhiệt độ trung bình ngày là: 24-28°C;
- Độ ẩm tương đối 70-80%;

- Nhiệt độ chênh lệch giữa ngày và đêm là 8-10°C;
 - Đủ nắng;
 - Gió nhẹ.
- * Hoa nở đồng bộ.

Vì sự kết hạt của các dòng MS phụ thuộc vào sự thụ phấn chéo, cho nên tạo cho các cây bố mẹ (và đặc biệt là các tổ hợp lai mà bố mẹ có thời gian sinh trưởng khác nhau) trở đồng bộ là điều quan trọng nhất. Hơn nữa, để kéo dài thêm thời gian thụ phấn, cây bố thường được gieo 2 hoặc 3 lần, mỗi lần cách nhau 5-7 ngày.

Người ta sử dụng ba phương pháp để xác định sự khác nhau về ngày gieo hạt nhằm làm đồng bộ trở giữa các cây bố mẹ. Trong cả ba phương pháp, ngày gieo hạt đầu tiên của cây bố được coi là ngày chuẩn để tính.

* Phương pháp dựa trên thời gian sinh trưởng: Qua kiểm tra các số liệu có trước về thời gian sinh trưởng khác nhau từ gieo đến trở giữa bố mẹ có thể xác định được ngày gieo hạt thích hợp cho cả bố và mẹ trong năm. Phương pháp này khá đơn giản và dễ thực hiện. Ở những vùng vào mùa xuân nhiệt độ thay đổi nhiều dòng bố gieo sớm sẽ có thời gian

sinh trưởng hàng năm khác nhau, tuy nhiên dòng mẹ gieo muộn hơn lại có thời gian sinh trưởng ổn định. Nếu điều chỉnh ngày gieo hạt dòng mẹ chỉ dựa vào thời gian sinh trưởng thì đôi khi sẽ thất bại trong việc làm cho hoa nở đồng bộ. Do vậy, phương pháp này chỉ dùng trong những mùa hoặc những vùng mà nhiệt độ ít thay đổi.

* Phương pháp dựa vào số lá: Một giống lúa tương đối ổn định về số lá và tốc độ ra lá. Trong phương pháp này, số lá thân chính của cây được dùng làm chỉ thị xác định độ chênh lệch về thời gian gieo hạt của cả hai bố mẹ. Chi tiết như sau:

a) Yêu cầu phải có hơn 10 cây mạ để quan sát và ghi chép.

b) Quan sát và ghi chép 3 ngày một lần. Cây bố được gieo đầu tiên được coi như cây chỉ thị dựa trên giá trị trung bình.

c) Tiêu chuẩn tính số lá.

Thông thường, người ta sử dụng ba cách tính điểm như sau:

0,2: lá bắt đầu ra và chưa mở.

0,5: lá mở nhưng chưa mở hết.

0,8: lá mở hoàn toàn.

Cách tính bắt đầu khi có lá hoàn chỉnh đầu tiên trên thân chính của cây. Có thể lấy việc sản xuất giống Wei You 64 tiến hành ở Yangtsse vào mùa xuân, hè và thu làm ví dụ. Thời điểm thích hợp để gieo dòng mẹ là khi số lá ở cây bố được gieo đầu tiên đạt 6,2; 5,2 và 4,2 lá tương ứng với từng mùa.

* Phương pháp dựa vào nhiệt độ tích lũy hữu hiệu (EAT).

Nhiệt độ tích lũy hữu hiệu từ lúc gieo cho tới trổ là khá ổn định trong một giống mặc dầu ngày gieo khác nhau. Nói chung, 12°C được coi là nhiệt độ giới hạn thấp nhất và 27°C là giới hạn nhiệt độ cao nhất ở thực vật.

Thời gian sinh trưởng, số lá và nhiệt độ tích lũy có liên quan chặt chẽ với nhau. Do vậy, có thể sử dụng tổng hợp ba phương pháp này để xác định độ lệch về ngày gieo hạt của hai bố mẹ. Nói chung, phương pháp đếm lá là phương pháp chính, còn hai phương pháp kia là phụ.

* Tỷ lệ, hướng hàng và kiểu cấy

Tỷ lệ hàng là tỷ lệ số hàng của cây bố so với số hàng của cây mẹ tại ruộng sản xuất hạt lai. Cách bố trí tỷ lệ hàng phụ thuộc vào các đặc điểm sau:

- Thời gian sinh trưởng của dòng R;
- Sức sinh trưởng của dòng R;
- Số lượng phấn rơi;
- Độ cao cây của dòng R.

Các nguyên lý bao gồm:

- Tăng thích hợp số hàng của dòng MS với điều kiện là dòng R có đủ phấn.

- Tăng khoảng cách giữa hai hàng của dòng R sao cho dòng MS ít bị che lấp ánh sáng hơn làm cho điều kiện vi khí hậu trên ruộng tốt hơn, như thế tạo điều kiện thích hợp cho dòng MS sinh trưởng tốt và ra hoa bình thường.

- Để hướng hàng cấy gần như vuông góc với hướng gió phổ biến vào thời kỳ trổ để tạo thuận lợi cho thụ phấn chéo.

Trên thực tế, tỉ lệ hàng 1:8-10 hay 2:10-12 thường được sử dụng rộng rãi đối với sản xuất hạt lai Indica và tỉ lệ 1:6 hoặc 2:8 đối với lúa Sinica. Nếu dòng R có nhiều phấn hơn, tỉ lệ hàng có thể tăng lên một cách hợp lý.

Nói chung, người ta trồng dòng R cứ mỗi cây mạ một khóm, các cây cách nhau 13cm và các hàng

cách nhau 165-200cm. Cần trồng khoảng 45 000 khóm một hecta.

Dòng MS được cấy hai cây mạ một khóm, cách nhau 13 x 16cm và cần khoảng 300 000 khóm một hecta.

* Dự đoán và điều chỉnh ngày trổ. Mặc dù khoảng cách ngày gieo giữa hai bố mẹ được xác định một cách chính xác, chưa chắc hoa của chúng đã nở đồng bộ vì nhiệt độ thay đổi và cách quản lý ruộng khác nhau. Do vậy, cần phải dự đoán trước ngày trổ của chúng để có biện pháp điều chỉnh cần thiết càng sớm càng tốt.

Dự đoán ngày trổ: Phương pháp được sử dụng rộng rãi và tỏ ra có hiệu quả là kiểm tra sự phát triển của bông non. Trên cơ sở các đặc tính hình thái, các bông non được sắp xếp thành 8 giai đoạn phát triển. Sử dụng các tiêu chuẩn này có thể dự đoán được sự ra hoa có đồng bộ hay không.

Trong thực tế, khoảng 30 ngày trước khi trổ, người ta lấy mẫu các cây bố mẹ trên ruộng sản xuất hạt và cứ ba ngày một lần quan sát cẩn thận các bông non của chúng ở thân chính và nhánh bằng kính lúp.

Điều kiện để hoa nở đồng bộ bao gồm:

Cây bố phải có một giai đoạn sớm hơn cây mẹ trong ba giai đoạn phân hoá bông non đầu tiên.

Cả hai bố mẹ phải ở cùng giai đoạn trong ba giai đoạn giữa (đó là các giai đoạn IV, V và VI).

Ở giai đoạn cuối cây mẹ phải sớm hơn cây bố một chút.

Điều chỉnh ngày hoa nở: Nếu như ở ba giai đoạn đầu tiên phân hoá bông ta thấy hoa không nở đồng bộ, cần phải bón gấp phân đạm cho cây phát triển sớm, còn cây phát triển muộn phải phun dung dịch 1% phân photphat. Bằng cách này có thể điều chỉnh độ lệch 4-5 ngày. Nếu thấy ở giai đoạn phân hoá bông muộn hoa nở không đồng bộ, có thể điều chỉnh sự chênh lệch 3-4 ngày bằng cách tiêu nước hoặc tưới nước, vì dòng R nhạy cảm với nước dòng MS. Ví dụ: nếu thấy dòng R sớm hơn, rút nước ra khỏi ruộng sẽ làm bông phát triển chậm lại. Mặt khác, nếu thấy dòng R muộn, nước ngập cao hơn sẽ tạo điều kiện cho bông phát triển nhanh.

Nếu thời kì ra hoa của hai bố mẹ chênh lệch nhau đến 10 ngày hoặc hơn, cần phải loại bỏ lá bắc hoặc bông của cây bố/mẹ phát triển sớm và sau đó

bón phân đạm, như thế làm cho nhánh mọc chậm lại hay các nhánh không hữu hiệu đâm bông và làm hoa nở đồng bộ.

Hơn nữa, trong thời kỳ ra hoa nếu thấy hoa nở không đồng bộ (thường là dòng R nở sớm hơn dòng MS) có thể điều chỉnh thời gian nở bằng cách cải thiện vi khí hậu ở ruộng như tháo nước ra, loại bỏ các giọt sương ở cây MS và phun nước lạnh vào cây R.

* Tỉa lá, phun gibberelin và thụ phấn bổ sung.

Các kỹ thuật này có hiệu quả là làm tăng tỉ lệ lai xa.

* Tỉa lá: Lá mọc cao hơn bông là trở ngại chính đối với thụ phấn chéo, do đó cần phải cắt bỏ. Điều này sẽ giúp cho phấn lan truyền dễ dàng hơn và cung cấp thêm phấn cho dòng MS. Hơn nữa, vi khí hậu ở ruộng có thể được cải thiện nhờ tỉa lá, tạo điều kiện tốt cho hoa ở cả hai bố mẹ nở đồng bộ.

Nói chung, tỉa lá được tiến hành 1-2 ngày trước thời kỳ trở đầu tiên và hơn nửa hoặc 2/3 phiến lá lúa bị cắt từ ngọn xuống.

* Phun gibberelin: Gibberelin là một loại hormon sinh trưởng thực vật có tác dụng kích thích sự dài

ra của các tế bào. Sử dụng giberelin có những ưu điểm sau:

1) Làm cho đế bông của dòng MS dạng WA (hay dạng thể bào tử khác) ít bị khép chặt vào bẹ lá hay lộ ra khỏi bẹ lá hoàn toàn.

2) Tăng tỉ lệ núp nhụy thò ra.

3) Điều chỉnh độ cao cho cây

4) Làm cho các nhánh nhỏ lớn nhanh hơn để chúng có thể bắt kịp với các nhánh lớn.

5) Sử dụng liều lượng lớn thì toàn bộ bông có thể mọc cao hơn phiến lá và không cần phải tỉa lá nữa.

Phương pháp:

1) Pha dung dịch phun: Bột giberelin được hoà tan trong cồn vài tiếng. Pha thêm một lượng nước nhất định. Sẽ hiệu quả nếu trộn thêm một ít bột xà phòng trung tính làm bám dính.

2) Định thời gian, nồng độ và liều lượng: Phun giberelin thường tiến hành hai lần cả trên hai đối tượng bố mẹ vào buổi chiều. Lần một, sử dụng khoảng 22,5-30g hoà trong 750kg nước (30-40ppm) phun cho một hecta khi bông đã nhú đến 10%. Lần hai, sử dụng 45-60kg hoà trong 750kg nước (60-80ppm) cho một hecta khi bông đã nhú đến 30%.

* Thụ phấn bổ sung: Rung các bông của cây dòng R bằng cách giật dây hay kéo thùng trong thời kỳ ra hoa có thể làm cho bao phấn nứt ra và tung phấn rộng và đều, làm tăng tỉ lệ lai xa. Tiến hành vào những ngày lặng gió hay có gió nhẹ có hiệu quả hơn.

Thụ phấn bổ sung thường được tiến hành vào buổi sáng khi dòng MS ra hoa. Nếu như chỉ có dòng R ra hoa, còn dòng MS không ra hoa thì không nên tiến hành thụ phấn bổ sung. Vào buổi chiều khi dòng R vẫn đang ra hoa, tiếp tục tiến hành thụ phấn bổ sung ngay cả khi dòng MS đã khép mào.

Nói chung, thụ phấn bổ sung được tiến hành cách nhau 30 phút và 5 lần trong ngày tới khi lúa không còn phấn dòng R nữa, và không cần tiến hành khi có nhiều gió.

* Khử lẫn.

Độ thuần hạt lúa lai sử dụng trong sản xuất thương mại là trên 98%. Để đáp ứng được yêu cầu này, độ thuần của dòng R và dòng MS phải trên 99%. Do vậy, ngoài việc phải cách ly nghiêm ngặt, ruộng sản xuất hạt phải được khử lẫn triệt để.

* Thời điểm: 2-3 lần trước khi trổ, vào thời kỳ trổ đầu và trước khi thu hoạch.

* Các cây phải tỉa là:

1) Các cây dòng duy trì và nửa bất thụ xuất hiện trong các hàng dòng MS.

2) Các cây dị dạng khác lẫn vào các hàng cây bố và cây mẹ.

* Các đặc tính cần xem xét để tỉa bớt:

1) Cây dị dạng được phát hiện bằng màu sắc bẹ lá và cổ lá, kích thước của phiến lá, tình trạng sinh trưởng, kiểu cây, chiều cao cây và thời gian sinh trưởng.

2) Các dòng duy trì: Các dòng này ra hoa sớm hơn dòng MS 3-5 ngày, phấn đế bông nứt bình thường khỏi bẹ lá, bao phấn có màu vàng và tròn, nứt hoàn toàn sau khi nở hoa.

3) Các cây nửa bất thụ: Bao phấn lớn hơn một chút so với bao phấn của dòng MS, có màu hơi vàng và hơi nứt ra. Những bao phấn không nứt chuyển sang màu vàng sẫm vài giờ sau khi nở hoa.

* Quản lý ruộng đặc thù:

Quản lý ruộng tốt rất cần thiết để thu được năng suất hạt cao. Việc quản lý bao gồm:

- Mạ có nhiều nhánh, mọc khỏe.

- Cấy sớm.

- Đối với dòng R cấy mỗi khóm một cây mạ có nhánh và đối với dòng MS mỗi khóm hai cây mạ có nhánh.

- Bón phân vào giai đoạn sinh trưởng đầu để tạo thêm nhiều nhánh hữu hiệu.

- Giảm bón phân và tưới nước trong giai đoạn sinh trưởng giữa và sau để kìm hãm sự sinh trưởng của lá lúa, tạo điều kiện thông khí và nắng sau khi trổ thuận lợi cho sự tung phấn.

- Dòng R phải có 1,2 triệu bông hữu hiệu trên một ha trong khi dòng MS cần phải có hơn 3,8 triệu bông. Tỷ lệ bông giữa dòng R và dòng MS phải là 1:3-4 để thu được sản lượng mong muốn.

Cần chú ý hơn đến việc khống chế sâu bệnh.

2. Kỹ thuật nhân dòng MS

Các kỹ thuật nhân dòng MS về cơ bản giống với các kỹ thuật sản xuất hạt lai nhưng cần lưu ý mấy điểm sau:

- * Khoảng thời gian giữa các lần gieo hạt.

Dòng MS và dòng duy trì của nó (dòng B) giống

như anh chị em sinh đôi, do đó thời gian sinh trưởng của chúng không khác nhau nhiều lắm.

- Các dòng MS Sinica thể giao tử: Số ngày tính tới lúc ra hoa của dòng MS giống như dòng B.

1) Lần gieo hạt đầu tiên của dòng B trùng với dòng MS.

2) Lần gieo hạt thứ hai của dòng B nên làm vào lúc số lá của dòng MS lên tới 1,5-2,0 lá, có nghĩa là 5-7 ngày sau khi gieo lần đầu.

3) Cây dòng A và dòng B cùng ngày không tính đến ngày gieo chúng.

- Dòng MS Indica thể bào tử như dạng WA v.v...: Dòng MS trổ muộn hơn dòng B của nó từ 3-5 ngày.

1) Dòng MS phải gieo sớm hơn.

2) Gieo dòng B lần đầu vào lúc số lá của dòng A đạt 1,5 lá.

3) Gieo dòng B lần hai vào lúc số lá của dòng MS là 2-3 lá.

* Tỷ lệ hàng

Vì không có sự khác biệt nhiều giữa chiều cao cây bố và mẹ, cây bố thường kém hơn so với cây mẹ về khả năng đẻ nhánh và sức sinh trưởng do gieo

chậm hơn, cho nên tỉ lệ hàng của chúng ít hơn. Hiện nay, tỉ lệ hàng được sử dụng rộng rãi để nhân giống là 1:3 hay 2:5.

*** Quản lý ruộng**

Vì dòng MS được gieo và cấy sớm hơn dòng B nên dòng MS thường có sức sinh trưởng và khả năng đẻ nhánh tốt hơn so với dòng B. Điều này sẽ dẫn đến tình trạng thiếu nguồn cung cấp phấn từ dòng B. Do vậy, để tăng sản lượng hạt ở ruộng nhân thì việc sử dụng thêm nhiều biện pháp để tăng cường sức sinh trưởng của dòng B là quan trọng. Ví dụ, dòng B có thể cấy với mạ dính đất để làm mạ hồi xanh hơn. Và có thể rải một lượt phân thoát nhanh cho riêng dòng B.

B. THUẦN HOÁ BA DÒNG VÀ SẢN XUẤT HẠT GIỐNG GỐC

1. Thuần hoá

a. Dòng bất dục đực

Hiện tượng phân ly xảy ra ở kiểu cây, thời kỳ chín và các tính trạng.

Mức độ bất thụ và tỉ lệ cây bất thụ giảm đi, hiện tượng tự phối xuất hiện.

Khả năng phục hồi tính hữu thụ trở nên kém, khả năng tổ hợp giảm sút.

Cách ra hoa không tốt, thời gian nở không tập trung.

Tỉ lệ mày không mở tăng lên.

Tỉ lệ núm nhụy hoa thò ra giảm sút.

Phần đế bông bị khép trong bẹ lá.

b. Dòng duy trì và dòng phục hồi

- Khả năng phục hồi và khả năng duy trì trở nên kém.

- Khả năng tổ hợp giảm.

- Nguồn phấn không đủ, sự rơi phấn bị hãm.

- Sức sinh trưởng của cây giảm sút.

- Sức chống chịu với các điều kiện bất thuận yếu đi.

Xuất hiện phân ly.

c. Con lai F1

1) Tính đồng nhất kém hơn.

2) Độ kết hạt giảm.

3) Sức chống chịu với các điều kiện bất thuận yếu đi.

4) Xuất hiện phân ly.

2. Nguyên nhân thoái hoá

a. Lấn sinh học

Lây nhiễm hạt phấn từ các giống lúa khác trên các ô ruộng khi nhân dòng MS và sản xuất hạt lai là nguyên liệu chủ yếu gây lẫn và thoái hoá các hạt lai.

b. Lấn cơ học

Trong quá trình gieo, cấy, gặt, tuốt lúa, phơi khô, vận chuyển và nhập kho, khi nhân và sản xuất hạt ba dòng bố mẹ hoặc các hạt lai bị lẫn với các giống lúa khác do quản lý không cẩn thận.

c. Biến dị tự nhiên

Biến dị tự nhiên có thể xảy ra tự nhiên khi trồng ba dòng bố mẹ cũng như khi đem chúng từ những địa điểm khác tới. Điều này làm phân ly tính trạng và tính hữu thụ, mặc dù có thể không cao.

3. Phương pháp thuần hóa

- Các phương pháp khác nhau để làm thuần ba dòng bố mẹ, trong đó phương pháp đơn giản và

hiệu quả hơn là sử dụng phương pháp ba khu gồm bốn bước.

- Ba khu là khu lai thử, khu xác định và khu nhân.

- Bốn bước bao gồm chọn lọc các cây cá thể, lai thử theo từng cặp, xác định từng dòng và nhân hàng loạt.

Những điểm mấu chốt trong phương pháp này là:

a. Chọn lọc các cây điển hình

Các cây cá thể nguyên chủng đang trồng bình thường của ba dòng bố mẹ được đánh giá cẩn thận và chọn lọc từng cây theo các tính trạng điển hình, tính bất thụ và khả năng chống chịu mong muốn...

b. Lai thử và lai trở lại theo cặp

Các cây cá thể chọn ra được đem lai thử và lai trở lại trong khu lai thử. Số cặp đem lai tùy theo sức người và điều kiện vật liệu. Nói chung, cần có 50 cặp lai giữa dòng MS x dòng duy trì, mỗi cặp đòi hỏi phải tạo ra hơn 100 hạt giống qua quá trình lai trở lại, trong khi đó cũng đòi hỏi số cặp lai tương tự dòng MS x dòng phục hồi, và mỗi cặp phải tạo ra hơn 200 hạt giống qua lai thử.

c. Xác định từng dòng

Có ba khu xác định:

* Khu xác định tính bất thụ:

1) Chọn một ô cách ly tốt.

2) Dòng MS và dòng duy trì của nó được cấy theo cặp trên ô ruộng này.

3) Vào giai đoạn trổ ban đầu, tính bất dục dục của chúng phải được xác định cẩn thận. Nếu dòng MS có quần thể đồng nhất, biểu hiện ra hoa tốt, cổ bông hơi khép hoặc thoát, tỉ lệ cây bất dục dục và mức độ bất thụ lên tới 100%, dòng MS này sẽ được giữ lại cùng với dòng duy trì tương ứng. Loại bỏ những cặp không đủ tiêu chuẩn.

* Khu đánh giá ưu thế lai và khu dòng R:

1) Trồng khoảng 100 cây F1 cho mỗi cặp dòng MS x dòng phục hồi.

2) Trồng 100-200 cây dòng phục hồi tương ứng ở một ô ruộng khác.

3) Các mục tiêu tập trung vào việc đánh giá ưu thế lai bao gồm sức sinh trưởng, khả năng đẻ nhánh, tỉ lệ nhánh có bông, tỉ lệ kết hạt, tính đồng nhất, khả năng chống chịu và năng suất hạt.

4) Đánh giá dòng bố về tính điển hình, tính đồng nhất và biểu hiện ra hoa.

5) Tuỳ theo hiệu quả của các dòng bố và con lai F1 của chúng, chọn ra các họ tốt và có thể loại các họ này nếu bất cứ một dòng bố, dòng mẹ hay con lai F1 nào của chúng có biểu hiện xấu.

d. Nhân hàng loạt

1) Hạt giống dòng MS và dòng duy trì đã chọn lọc được thu hoạch riêng rẽ hàng loạt, gieo ở các mảnh ruộng cách ly để sản xuất hạt cốt lõi.

2) Mỗi họ phục hồi chọn lọc cũng được thu hoạch hàng loạt và đem gieo ở một mảnh ruộng cách ly khác để nhân lên và sản xuất hạt cốt lõi.

3) Hạt cốt lõi được nhân lên thêm nữa để tạo ra hạt giống gốc.

C - KỸ THUẬT KHỬ ĐỤC

1. Phương pháp

a. Định nghĩa: Khử đục là phương pháp phun một số hoá chất lên những cây lúa dùng làm dòng mẹ để làm cho phấn của nó bị bất thụ, sau đó thụ phấn của một giống lúa khác làm dòng bố để sản xuất hạt lai.

b. Ưu điểm của phương pháp:

1) Có nhiều giống hơn có thể dùng để tạo các tổ hợp lai ưu việt.

2) Quy trình sản xuất hạt lai đơn giản hơn vì không cần phải gây tạo ba dòng và nhân dòng MS.

3) Nếu hoa nở không đồng bộ ở ruộng sản xuất hạt lai, hoặc nếu có những ngày mưa kéo dài liên tục, không thể dùng thuốc khử đực. Nhưng sẽ không có thiệt hại nặng vì sản lượng của cây mẹ có thể vẫn giữ nguyên.

c). Nhược điểm của phương pháp

1) Các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến tác dụng của phương pháp khử đực hoá học. Lượng mưa trong vòng 4 giờ sau khi phun thuốc hoá học sẽ làm cho quá trình khử đực kém hiệu quả hơn. Mưa liên tục sẽ làm mất cơ hội phun thuốc hoá học, khiến độ kết hạt kém và không thuần.

2) Vì giai đoạn sinh trưởng thân chính và các nhánh của một số giống lúa có khác nhau, hiệu quả khử đực sẽ không đồng nhất nếu nồng độ các hoá chất được phun không thay đổi. Nồng độ thấp hơn hiệu quả sẽ kém hơn, còn nồng độ cao hơn sẽ dẫn đến tính bất thụ cái hay số mây không thoát sẽ

tăng lên, điều này làm giảm năng suất và chất lượng hạt.

2. Cách thức tiến hành

a. Chọn bố mẹ

1) Bố mẹ dùng để lai phải có tính đa dạng về mặt di truyền và có các tính trạng bổ sung để tạo ra ưu thế lai.

2) Giống dùng làm dòng mẹ phải có tỉ lệ khử được và tính hữu thụ cái cao, ít mây không khép. Phản ứng với thuốc khử khác nhau ở các giống lúa khác nhau. Xian Dang 1 x IR24 là một ví dụ. Tác dụng khử ở IR 24 cao hơn so với Xian Dang 1 mặc dù phép lai thuận nghịch có thể biểu hiện ưu thế lai tương tự.

3) Giống sử dụng làm dòng mẹ phải nhô ngọn nhanh và đồng đều.

4) Tính đồng bộ và lai xa sẽ tốt hơn nếu bố mẹ được chọn lọc để lai có thời gian sinh trưởng và độ cao cây giống nhau.

b. Phun thuốc khử được

1) Phun thuốc khử được vào giai đoạn thích hợp. Thời điểm thích hợp để phun thuốc phụ thuộc vào

giống lúa được sử dụng. Nói chung, phun thuốc khử đực trong thời kỳ từ lúc giảm nhiễm mạnh đến giai đoạn đơm nhân của tế bào mẹ hạt phấn. Thuốc khử đực sẽ ngấm 4 giờ sau khi phun và sẽ có tác dụng trong vòng 3-11 ngày.

2) Phun thuốc khử đực đúng nồng độ. Nồng độ thích hợp của thuốc khử đực phụ thuộc vào các công thức. Đối với Axenat metyl kẽm, nồng độ thông thường dùng cho lúa Indica là 0,015-0,025% và cho Sinica thì thấp hơn một chút. Trước khi phun cần phải pha nước cốt (chứa 10% Axenat metyl kẽm) bằng cách dùng axit clohidric đậm đặc làm dung môi, sau đó pha loãng với nước theo tỉ lệ 1:10. Khi phun, thuốc khử đực lỏng cần làm loãng lại ở một mức độ nhất định. Hiện nay Axenat metyl kẽm đang dần dần bị thay thế bằng Axenat metyl natri. Chất thay thế này có thể hoà tan trong nước mà không cần có axit clohidric làm dung môi, tác dụng khử đực vẫn như nhau.

3) Phun thuốc khử đực đúng liều lượng và thời gian thích hợp. Khử đực hoá học thường được tiến hành chỉ một lần vào buổi chiều. Phun khoảng 10ml thuốc khử đực lỏng vào tất cả các khóm cây. Liều lượng đủ dùng là 3 000kg/ha. Sẽ có hiệu quả

hơn nếu phun thuốc khử đực hai lần lên các giống lúa mà bông non phát triển không đồng đều. Phun lần đầu vào giai đoạn phân bào giảm nhiễm của tế bào mẹ hạt phấn, lần thứ hai chỉ phun một lượng bằng nửa lần đầu (hoặc liều lượng thích hợp) cách lần thứ nhất 7 ngày.

c. Xử lý sau khi phun

1) Tiến hành tỉa lá sau khi phun 72 giờ.

2) Những bông xuất hiện trong vòng 3 ngày sau khi phun phải được ngắt do khử đực không hoàn toàn.

3) Nếu trời mưa trong vòng 4 ngày sau khi phun, nên phun thuốc khử đực bổ sung với liều lượng thích hợp.

4) Cây khử đực bằng thuốc hoá học sẽ kém hơn so với dòng bất dục đực qua quá trình gây tạo xét về mặt tính hữu thụ cái và tỉ lệ núp nhụy thò ra. Do vậy, cần phải tăng cường thụ phấn bổ sung.

D- GÂY TẠO LÚA LAI HỆ HAI DÒNG

1. Ưu điểm của lúa lai hệ hai dòng

1) Có thể đơn giản hoá quy trình sản xuất lai và giảm chi phí sản xuất hạt lai vì không cần đến

dòng B nữa. Trong điều kiện độ dài của ngày dài hơn hay trong điều kiện nhiệt độ cao hơn, dòng PGMS và TGMS tỏ ra có tính bất thụ hạt phấn hoàn toàn, do đó có thể sử dụng chúng để sản xuất hạt lai trong những điều kiện như vậy. Trong điều kiện độ dài ngày ngắn hơn hay nhiệt độ thấp hơn, các dòng này hầu như hữu thụ bình thường, do đó chúng có thể tự nhân lên được bằng tự phối.

2) Vì tính bất dục là do các gene lặn quy định ở các dòng PGMS và TGMS, cho nên gần như tất cả các giống lúa thường đều có thể dễ dàng hồi phục tính hữu thụ của các dòng MS này. Do đó, việc chọn lọc các bố mẹ để tạo ra các con lai ưu việt được mở rộng đáng kể, và như thế khả năng thu nhận được các tổ hợp lai tốt hơn tăng lên.

3) Các gene PGMS và TGMS có thể dễ truyền vào phần lớn các giống lúa để gây tạo các dòng MS mới phục vụ cho các mục đích gây tạo giống khác nhau.

4) Tính bất dục ở các dòng PGMS và TGMS không có quan hệ với tế bào chất. Tính trạng tế bào chất đơn lẻ dạng WA sẽ tránh được.

2. Các dòng lúa lai.

a. PGMS.

1) Giai đoạn nhạy cảm ánh sáng để thay đổi tính hữu thụ là giai đoạn từ lúc phát triển đầu tiên của nhánh cấp hai đến lúc hình thành tế bào mẹ của hạt phấn.

2) Độ dài ngày tới hạn để gây ra tính hữu thụ là 13,75 đến 14,00 giờ.

3) Cường độ ánh sáng tới hạn để tạo ra cây bất thụ là trên 50 Lux.

4) Nhiệt độ có ảnh hưởng nhất định đối với sự thay đổi tính hữu thụ. Vượt qua mức nhiệt độ cần thiết, độ dài ngày sẽ không còn hiệu lực đối với tính hữu thụ.

Có hai điểm thiết yếu trong gây tạo dòng PGMS. Thứ nhất, nhiệt độ tới hạn gây tính bất dục đực phải thật thấp. Thứ hai, khoảng nhiệt độ gây nhạy cảm với ánh sáng (PSTR) phải thật rộng.

b. TGMS

1) Giai đoạn nhạy cảm với nhiệt độ để thay đổi tính hữu thụ là giai đoạn từ lúc hình thành tế bào

mẹ hạt phấn cho tới lúc bắt đầu giai đoạn giảm phân.

2) Nhiệt độ tối hạn để gây bất dục đực 23-29°C, thay đổi tùy theo các dòng.

3) Ở điều kiện nhiệt độ tối hạn trong ba ngày liên tiếp dòng TGMS hữu thụ đực trở lại.

Điểm quan trọng nhất trong ứng dụng thực tế các dòng TGMS là nhiệt độ tối hạn để gây bất dục đực phải tương đối thấp, đặc biệt là ở vùng ôn đới.

Ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, các dòng TGMS có ích hơn là các dòng PGMS và độ dài của ngày ở đó khá ngắn, nhiệt độ lại khá cao, trong khi đó các dòng PGMS lại ưa các vĩ độ cao hơn.

c. Các dòng PGMS và TGMS ngược

Gần đây người ta tìm thấy hai kiểu lúa EGMS mới rất đặc thù trong phản ứng của chúng đối với môi trường. Sự thay đổi tính hữu thụ của chúng do yếu tố môi trường lại ngược với những dòng PGMS và TGMS nêu trên, do đó chúng được gọi là các dòng kháng PGMS và kháng TGMS.

Lúa kháng PGMS tỏ ra hữu thụ bình thường trong điều kiện độ dài ngày hơn và trở nên bất thụ

ở độ dài của ngày ngắn. Lúa kháng TGMS có tính hữu thụ hạt phấn bình thường ở nhiệt độ cao hơn nhưng lại bất thụ ở nhiệt độ thấp hơn.

Những nguồn MS mới này cũng có thể ứng dụng vào thực tế theo điều kiện khí hậu địa phương khác nhau.

d. EGMS

Sau khi phát hiện ra lúa PGMS, nhiều dòng EGMS đã được gây tạo bằng cách chuyển các gene PGMS vào các giống Indica và japonica có các cơ sở di truyền khác nhau. Một số nguồn EGMS mới cũng thu được qua sàng lọc hay gây đột biến.

Có thể thấy các vật liệu EGMS ở một quần thể lúa lớn bằng cách quan sát cẩn thận vào giai đoạn chín. Nếu thấy có cây bất dục đực hoàn toàn, để cho nó mọc chồi và sau đó quan sát sự thay đổi tính hữu thụ của nó ở độ dài ngày khác nhau và có điều kiện nhiệt độ khác nhau nhằm xác định xem có phải là cây EGMS không hay chỉ là một cây OGMS (bất dục đực nhân bắt buộc).

Các nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc đã khẳng định là cùng một gene PGMS

hoặc TGMS có cơ sở di truyền khác nhau có thể cho những mô hình thay đổi tính hữu thụ khác nhau khi phản ứng với độ dài của ngày và nhiệt độ. Hiện tượng này thuận lợi để gây tạo nhiều kiểu dòng EGMS khác nhau thích ứng với các vùng khí hậu khác nhau. Dưới đây là hai phương pháp thường được dùng để chuyển các gene EGMS.

*** Lai đơn kèm theo chọn phả hệ**

Phương pháp này tương đối nhanh để có được các dòng EGMS cải tiến. Những bước cơ bản như sau:

1) Tiến hành lai đơn giữa các giống đã chọn và dòng bố/mẹ cho EGMS.

2) Cần phải trồng một quần thể F₂ gồm ít nhất 1000 cây trong điều kiện độ dài của ngày dài hơn, nhiệt độ cao hơn và trong quần thể F₂ chọn ra các cây bất dục đực hoàn toàn.

3) Xác định sự thay đổi tính hữu thụ của các cây đã chọn ở những cây mọc chồi trong điều kiện độ dài của ngày và nhiệt độ khác đi. Những hạt tự phối của các cây F₂ đã chọn lọc được xử lý bằng độ dài của ngày ngắn hơn và nhiệt độ thấp hơn được

thu nhập và trồng để tiếp tục chọn lọc ở các thế hệ sau.

*** Phương pháp lai trở lại**

Người ta chỉ dùng phương pháp lai trở lại khi cần đến gene EGMS của một dòng cho gene và dòng bố hồi quy có một số tính trạng đáng mong muốn nhưng chưa có gene EGMS.

Vì tính bất dục đực của các dòng PGMS và TGMS là do các gene lặn quy định, ngay từ thế hệ F1 cần phải xen kẽ sự tự phối và lai trở lại để duy trì các gene MS ở các thế hệ của lai trở lại liên tiếp.

Phương pháp lai trở lại là một phương pháp thay thế mong muốn để chuyển các gene MS giữa các loài phụ. Tính bất tương hợp giữa các bố mẹ sẽ được khắc phục bằng cách lai trở lại liên tiếp.

Các thể đột biến gây tạo là một nguồn biến dị di truyền có hiệu quả hơn so với nguồn gene mà thiên nhiên bảo tồn được. Có thể cải tiến các dòng EGMS hiện có hoặc gây tạo các nguồn EGMS mới.

Ở Nhật Bản, người ta đã gây được một dòng TGMS nhờ chiếu tia gama giống Reimei của Nhật với cường độ 20.000 Rad. Qua 4 thế hệ chọn lọc và

đánh giá, người ta nhận được dòng H89-I từ thế hệ M5 và từ thế hệ M7, nó được đặt tên là Norin PL12 vào năm 1990.

Một dòng EGMS có thể sử dụng trong thực tiễn cần phải có những tính trạng cơ bản tương tự như một dòng MS, bên cạnh đó các dòng EGMS phải có những tiêu chuẩn đặc thù sau:

1) Một quần thể xác định gồm 1000 cây hoặc hơn với những đặc tính nông học đồng nhất và ổn định.

2) Tỷ lệ các cây bất dục dục trong quần thể phải là 100% và độ bất dục hạt phấn là 99,5% hoặc hơn, xét về mặt tỷ lệ của các bông không hữu thụ bị khép lại và tỷ lệ phấn bất thụ.

3) Những thay đổi tính hữu thụ phải rõ ràng. Trong điều kiện tự nhiên, cần phải có một giai đoạn bất dục ổn định kéo dài 30 ngày hoặc hơn. Trong giai đoạn hữu dục, yêu cầu tỷ lệ kết hạt phải là 30% hoặc hơn.

4) Ở các chân ruộng sản xuất hạt giống, tỷ lệ lai xa của các dòng EGMS không được thấp hơn tỷ lệ đó ở các dòng CMS hiện có được sử dụng trong sản xuất thương mại.

5) Sự thay đổi tính hữu thụ của một dòng EGMS phải được thử nghiệm cẩn thận trong điều kiện môi trường nhân tạo để xác định rõ kiểu phản ứng của nó đối với giai đoạn ánh sáng và nhiệt độ.

6) Ký hiệu của các dòng EGMS là "S" để phân biệt với "A" là ký hiệu của các dòng CMS.

3. Nhân dòng và sản xuất hạt lai

a. Nhân dòng MS

Nhân các dòng EGMS tương đối đơn giản, vì chỉ cần cấy 1 dòng đơn thay vì hai dòng ở hai ruộng nhân. Tuy nhiên, cần phải thực hiện biện pháp sau:

1) Giai đoạn nhạy cảm phải trùng với độ dài ngày và nhiệt độ thích hợp để đảm bảo cho hạt phấn phát triển bình thường.

2) Vì vôi nhụy của các dòng EGMS thường khỏe và lộ, cần phải cách ly nghiêm ngặt ruộng để đảm bảo độ thuần của hạt.

b. Sản xuất hạt lai

Sản xuất hạt lai hệ hai dòng tương tự như sản xuất hạt lai hệ ba dòng và cần tiến hành toàn bộ các biện pháp trong sản xuất hạt lai hệ ba dòng.

Vì sự thay đổi tính hữu dụng của các dòng EGMS do điều kiện môi trường gây ra, nên cần phải xem xét cẩn thận thời vụ gieo trồng cho dòng EGMS duy trì được tính bất dục ổn định.

E - QUẢN LÝ CANH TÁC

Quản lý canh tác lúa lai về cơ bản tương tự như đối với canh tác lúa truyền thống nhưng cần chú ý một vài điểm sau:

1. Chọn các tổ hợp tối ưu

Yêu cầu đối với tổ hợp bao gồm:

- * Tiềm năng năng suất cao.
- * Thời gian sinh trưởng phù hợp với thời vụ gieo trồng và hệ thống canh tác tại một địa phương nhất định.
- * Chống chịu được với các sâu bệnh chính.
- * Có phẩm chất hạt tốt.

2. Chăm sóc mạ đẻ nhánh khỏe

a. Ưu điểm của mạ đẻ nhánh

Sử dụng mạ đẻ nhánh có những ưu điểm sau:

- * Thuận lợi cho sự hình thành bông to hơn.

* Tỷ lệ gieo có thể giảm đi do các nhánh có thể thay thế cho cây mạ mọc từ hạt.

* Mâu thuẫn giữa sự phát triển của các cây cá biệt và của quần thể được giải quyết tốt.

b. Các phương pháp

* Vãi và cả gieo hạt: Xác định tỷ lệ gieo hạt phù hợp với tuổi mạ. Nói chung, tỷ lệ gieo của lúa chín sớm và lúa chín trung bình vào khoảng 225kg/ha. Có nghĩa là mỗi cây mạ chiếm từ 3-4,5 cm². Đối với lúa lai chín muộn tỷ lệ gieo hạt vào khoảng 150kg/ha, mỗi cây mạ chiếm 6,5-10cm² trên ruộng. Tốt hơn là gieo thành hàng, cứ mỗi một hạt một hốc.

* Chăm sóc mạ trong điều kiện làm ẩm nhân tạo: Ở những vùng nhiệt độ thấp vào mùa xuân, ruộng mạ nên phủ một lớp polyetylen để giữ ẩm.

* Tỉa cây và cấy lai: Khi mạ có từ 1,5-2,5 lá, nên nhổ bớt chỗ mạ mọc dày và cấy lại vào nơi có ít mạ.

* Chăm sóc mạ theo hai giai đoạn: Đầu tiên, gieo hạt rất dày trong nhà kính (đối với lúa lai chín sớm

hay chín trung bình) và ở ngoài trời (đối với lúa lai chín muộn). Khi mạ đã có hai lá, cấy vào khu ruộng chung theo khoảng cách 3,3 x 6,6cm hoặc 3,3 x 10cm hoặc 6,6 x 10cm.

3. Gieo hạt và cấy đúng thời vụ

So với các giống truyền thống, lúa lai nhạy cảm hơn với nhiệt độ trong giai đoạn ra hoa và thụ tinh. Nhiệt độ quá cao hay quá thấp có thể gây hại cho sự ra hoa và ngăn cản hạt phấn rụng. Hậu quả sẽ gây ra tính bất thụ và tăng số hạt lép.

Nhiệt độ trung bình hàng ngày tối ưu cho sự ra hoa của giống lúa lai Indica là 24-29°C. Nhiệt độ trung bình hàng ngày trên 30°C (trên 35°C ở vùng có bông) hoặc dưới 23°C kéo dài trong 3 ngày hoặc hơn sẽ làm tăng nhiều số hạt lép. Đối với giống lúa Sinica, nhiệt độ trung bình hàng ngày tối ưu cho sự ra hoa là 23-26°C.

Do đó, để đảm bảo cho hoa nở và thụ tinh bình thường tránh thiệt hại do nhiệt độ cao hoặc thấp, cần thiết phải định thời vụ gieo hạt và cấy thích hợp cho lúa lai tùy theo điều kiện thời tiết của từng vùng và thời gian sinh trưởng của lúa.

4. Thiết lập cơ cấu quần thể cao sản

a. Tiêu chuẩn của lúa lai chín sớm cho năng suất 7,5-8,25 tấn/ha

* Khoảng cách và mạ gốc: 4-5 cây mạ (bao gồm cả nhánh) một gốc, khoảng 30-37,5 nghìn gốc một ha.

* Số nhánh tối đa: 4,5-5,24 triệu/ha.

* Số nhánh sinh sản: 2,7-3 triệu/ha đối với các tổ hợp lai có bông lớn và chừng 3,7 triệu đối với các tổ hợp lai có cỡ bông trung bình.

b. Tiêu chuẩn của lúa lai chín trung bình cho năng suất 9,75-10,5 tấn/ha

* Khoảng cách và mạ gốc: 3-4 cây mạ (kể cả nhánh) một gốc (đối với mạ cỡ trung bình cấy sớm), hoặc 6-7 cây mạ (bao gồm cả nhánh) một gốc (đối với mạ cỡ lớn cấy muộn), khoảng 30 nghìn gốc/ha.

* Số nhánh tối đa: 4,5-5,25 triệu/ha đối với các tổ hợp lai dạng bông lớn và 5,25-6,00 triệu/ha đối với các tổ hợp lai bông cỡ trung bình.

* Số nhánh sinh sản: khoảng 3 triệu/ha đối với các dạng bông lớn và 3,7 triệu đối với dạng bông trung bình.

c. Tiêu chuẩn của lúa lai chín muộn năng suất 7,5 tấn/ha

* Khoảng cách và mạ gốc: 5-6 cây mạ (gồm cả nhánh) một gốc và 37,5 nghìn gốc/ha.

* Số nhánh tối đa: 4,5-5,25 triệu/ha.

* Số nhánh sinh sản: khoảng 2,7 triệu đối với các dạng bông lớn và 3,7 triệu đối với dạng bông trung bình.

5. Phân bón

a. Yêu cầu về phân bón của lúa lai

1) Vì rất nhạy cảm với phân đạm, nên lúa lai cần ít phân đạm hơn so với các giống lúa truyền thống mà vẫn cho sản lượng ngang nhau. Các thực nghiệm do Viện Hàn lâm Khoa học Nông nghiệp Quảng Đông tiến hành đã chứng tỏ rằng lượng phân đạm cần để sản xuất 500kg thóc là 9kg đối với Shan You2, nhưng với giống truyền thống Zhen Zhu Ai là 10,3kg. Điều đó cũng chứng tỏ việc sử dụng phân đạm làm tăng sản lượng lúa lai nhiều hơn so với các giống truyền thống, đặc biệt là khi phân bón được dùng ở mức độ thấp hay trung bình.

2) Lúa lai cần nhiều Kali (bồ tát) hơn các giống truyền thống. Tăng tỉ lệ kali so với đạm là một biện pháp quan trọng để tăng sản lượng hạt của lúa lai.

b. Bón phân đạm

Nói chung, để sản xuất 7,5 tấn lúa lai trên 1ha ruộng cần bón 150kg phân đạm ở nơi có độ màu mỡ trung bình, và nếu bón 187,5kg trên 1ha có thể đạt 9 tấn thóc/ha.

c. Tỉ lệ N:P:K

Thông thường tỉ lệ 1:0,3-0,5:0,7 NPK là tối ưu đối với lúa lai.

d. Tỉ lệ bón lót và bón thúc

1) Đối với lúa lai chín sớm, tỉ lệ bón lót : bón thúc là 6:4.

2) Đối với lúa lai chín trung bình và chín muộn, tỉ lệ này là 5:5 hay 4:6.

e. Các phương pháp bón

1) Nên bón thúc khoảng 70% ở giai đoạn đầu để có thể có số lượng nhánh mong muốn trước khi kết thúc thời kỳ đẻ nhánh có lợi.

2) Có thể bón sau một số phân khác sau khi đâm

bông tùy theo hiệu suất của cây. Tuy nhiên, lượng phân bón đặc biệt là lượng đạm phải điều chỉnh thật tốt để cho bông lớn.

3) Trước và sau khi trở hoàn toàn, có thể phun 2,35-3,75kg photphatdihidro kali hay 0,5kg uree pha trong 750-1120kg nước trên một ha để tránh sự thoái hoá sớm.

6. Thu hoạch chậm hơn vài ngày

Bên cạnh việc có bông lớn và nặng hạt, đặc tính của lúa lai cũng được xác định ở giai đoạn kết hạt. Do đó, lúa lai mất nhiều thời gian để kết hạt đủ và chín hơn so với các giống truyền thống. Nên trì hoãn thời điểm thu hoạch lúa lai một vài ngày trong trường hợp gieo và cấy luân phiên không gặp trở ngại và không có hiện tượng kết hạt muộn. Thông thường người ta lấy thời điểm mà tỉ lệ chín của hạt hữu thụ lên tới 90% làm thời điểm thu hoạch lúa lai.

Kết luận: Để tăng lợi ích kinh tế và sản lượng lúa cần phải chú ý một số điểm sau.

1) Gây tạo và sử dụng các dòng MS có các nguồn tế bào chất khác nhau.

Hiện nay, hơn 95% số dòng MS kiểu Indica sử

dụng trong sản xuất là thuộc hệ "WA". Mặc dù người ta vẫn chưa khám phá được tế bào chất "WA" có quan hệ trực tiếp với bất kỳ một bệnh chính nào không, hệ thống bất dục tế bào tròn vện trong tương lai có thể làm cho lúa lai trở nên dễ bị tấn công trước những sâu bệnh hại ở mức độ truyền nhiễm. Giống ngô lai có tế bào chất T là một ví dụ. Hệ thống bất dục tế bào chất tròn vện đã dẫn tới sự lan tràn của *C. Heterostrophus* bằng con đường truyền nhiễm, gây ra những tổn thất về sản lượng lớn ở vành đai ngô của Mỹ. Để tránh cho lúa lai khỏi con đường thảm khốc đó, cần phải thay thế ngay một phần con lai phát sinh từ hệ thống bất dục tế bào chất "WA" bằng các dòng MS nguyên chủng khác từ các nguồn tế bào chất khác tùy theo điều kiện địa phương. Các dòng bất dục dục thể giao tử đáng mong muốn hơn nhiều vì chúng có tập tính ra hoa tốt, bông lộ nhiều, cho tỉ lệ lai xa tự nhiên và năng suất hạt lai cao hơn. Đồng thời chúng cũng có phổ phục hồi rộng hơn, do đó làm cho các dòng này có thêm nhiều giống phục hồi hơn và khả năng tạo các tổ hợp lai tốt cao hơn. Hiện chỉ có các dòng bất dục dục thể giao tử dạng Sinica là được sử dụng trong sản xuất. Phần lớn các dòng

bất dục dục thể giao tử Indica đều có tính bất dục không ổn định hay mức độ phục hồi tính hữu thụ của con lai F1 chưa thoả đáng, vì vậy chúng không được ứng dụng trong sản xuất. Tuy nhiên, trên quan điểm lâu dài, gây tạo các dòng bất dục dục thể giao tử nguyên chủng có tính bất dục ổn định và khả năng phục hồi tính hữu dục tốt là một phương hướng gây tạo ba dòng bố mẹ Indica chủ yếu. Cặp lai Indica x Indica trong đó có một giống cũ địa phương hay một nửa đại làm dòng mẹ có thể là một phương pháp hiệu quả để gây dòng bất dục thể giao tử.

2) Gây tạo các dòng MS có tỉ lệ lai xa cao để tăng năng suất hạt lai và giảm bớt chi phí

Mặc dù các kỹ thuật sản xuất hạt lai đã gần như hoàn thiện và có hiệu quả, nhưng lai rất đắt (ví dụ như việc sử dụng giberenlin) và khó nhọc (ví dụ như cắt tỉa lá). Hơn nữa, năng suất bình quân của sản xuất hạt lai chưa cao (khoảng 1,12t/ha). Giá hạt lai cao nên chưa đem lại lợi ích để phát triển lúa lai.

Biện pháp chính để tăng sản lượng hạt lai và giảm chi phí sản xuất là gây các dòng MS bằng tỉ lệ lai xa cao. Gần đây, một số viện nghiên cứu ở

Trung Quốc đã có những tiến bộ lớn trong lĩnh vực này và đã gây tạo được nhiều dòng bất dục tế bào chất Indica có tập tính ra hoa tốt, vòi nhụy lớn (tỉ lệ vòi nhụy thò hết là 9) và tán bông lớn. Quan sát sơ bộ cho thấy tỉ lệ kết hạt tự nhiên của các dòng này là 30-35%, cao hơn so với các dòng MS tốt nhất đang được sử dụng. Người ta hy vọng rằng khi các dòng MS mới này được đưa vào sản xuất, sản lượng hạt lai trung bình sẽ tăng lên ít nhất tới 3-3,75 tấn/ha.

3) Gây tạo giống cho năng suất vượt trần

Trên cơ sở những kết quả nghiên cứu và sự tích lũy kinh nghiệm thực tiễn trong lĩnh vực lúa lai, có thể phát động một chương trình gây tạo giống có năng suất vượt trần bằng cách kết hợp dáng cây tốt hơn với khả năng sinh lý được cải thiện. Trên thực tế, tiềm năng năng suất của các tổ hợp nguyên chủng cá biệt gần đây đã nhích gần tới đích này, cho thấy việc đạt năng suất vượt trần là không khó. Về việc này lựa chọn bố mẹ để lai, cần phải chú trọng tới việc nghiên cứu và khai thác ưu thế mạnh ở cặp lai Indica x Sinica và các gene gây ưu thế lai ở lúa lai, thêm vào đó tiếp tục khai thác ưu thế lai khi lai giữa các giống có quan hệ xa về mặt

sinh thái và địa lý. Viện Di truyền Nông nghiệp đã tạo ra được những tổ hợp lai xa giữa Indica x Japonica có năng suất đạt tới 14 tấn/ha/vụ. Các tổ hợp này đang được thử nghiệm để đưa vào sản xuất thử.

4) Gây giống có chất lượng hạt tốt

Hiện nay, các chương trình gây tạo giống lúa nhấn mạnh đến chất lượng hạt để tăng giá trị của nó trên thị trường. Nói chung, các giống lúa truyền thống có chất lượng hạt tốt nhưng kém năng suất. Gây tạo lúa lai có ưu điểm là nhanh chóng hợp nhất hai yếu tố năng suất cao và chất lượng hạt tốt, tuy nhiên sẽ có phân ly di truyền đối với một số đặc tính chất lượng ở những hạt (F2) sản xuất từ cây F1, làm giảm giá trị kinh tế. Có thể lấy Wei You 16 làm ví dụ. Mẹ của giống này là lúa tẻ, còn bố là lúa nếp. Trong số hạt của Wei You 16, số hạt nếp chiếm 1/4. Hạt gạo bị trộn lẫn như vậy là không thể chấp nhận đối với người tiêu dùng.

Do vậy, có thể là trong các chương trình chọn giống cho hạt chất lượng tốt, cả bố mẹ đều phải có chất lượng tốt và có đặc điểm chất lượng giống nhau. Hiện nay, số dòng phục hồi có phẩm chất hạt tốt chiếm nhiều hơn. Tuy nhiên, phần lớn các dòng

MS đều có phẩm chất hạt xấu. Do đó, chọn các dòng MS có phẩm chất hạt tốt được coi là một trong những mục tiêu then chốt trong gây tạo giống lúa lai.

5) Gây tạo giống đa chống chịu

Hiện nay, một số tổ hợp lai tốt đang mất dần khả năng kháng bệnh. Ví dụ, Shan You 2 và Shan You 6 có khả năng chống chịu với đạo ôn trước đó, nhưng nay dễ bị nhiễm ở một số nơi vì có sự thay đổi của các chủng sinh lý. Cần phải thay thế chúng ngay bằng những tổ hợp lai mới. May mắn là phần lớn các gene chống sâu bệnh ở lúa đều là gene trội hoặc trội một phần. Trong những năm gần đây, việc kết hợp khả năng đa chống chịu với khả năng cho năng suất cao trong gây tạo lúa lai đã thu được nhiều thành tựu. Wei You 64 là một tổ hợp như vậy. Nó ra đời vào năm 1983 và được trồng trên hơn 200. 000 ha vào năm 1984. Giống này chống chịu khoẻ hơn với 5 loại sâu bệnh chính (đạo ôn, bạc lá, vàng úa, rầy nâu và rầy trắng), có tiềm năng năng suất cao và ổn định. Vì thế, người nông dân rất ưa chuộng giống này. Gây tạo khả năng đa chống chịu hiện nay vẫn được tiến hành sát sao và một loạt các tổ hợp mới có thời gian sinh trưởng

ngắn, tiềm năng năng suất cao, phẩm chất hạt tốt và phổ chống chịu rộng đã nhanh chóng ra đời. Đó là các giống Bắc ưu 64, Bắc ưu 903, Bồi tạp sơn thanh, Bồi tạp 77, Bồi tạp 269, Bồi tạp 99, Nhị ưu 63...

6) Gây tạo giống chống chịu hạn

Lúa lai mọc khoẻ và có bộ rễ sâu nên có sức chịu hạn giỏi. Gần đây, các thử nghiệm so sánh về canh tác lúa nửa cạn đã được tiến hành trên diện tích rộng ở miền Bắc. Kết quả cho thấy nếu chỉ đáp ứng một nửa lượng nước theo yêu cầu, năng suất lúa lai Sinica đạt tới 4,5-5,1 tấn/ha, cao hơn so với các giống truyền thống 30-50%. Điều này cho thấy lúa lai Sinica có triển vọng sáng sủa ở miền Bắc. Nếu như khả năng chịu hạn được tăng cường hơn qua tạo ưu thế lai, thì cả diện tích canh tác lẫn sản lượng trên một đơn vị diện tích sẽ tăng lên một cách đáng kể.

7) Khai thác khả năng của lúa mọc chồi

Người nông dân có thể có lợi nhờ trồng lúa lai bằng chồi ở những khu vực mà mùa gieo trồng không đủ dài để trồng hai vụ lúa, vì ưu thế lai vẫn còn tồn tại ở những cây F1 mọc bằng chồi có tiềm

năng suất cao hơn. Ví dụ, năng suất của lúa lai mọc bằng chồi đạt tới trên 4,5 tấn/ha ở ruộng thử nghiệm của Viện lúa tại Quảng Tây (Trung Quốc). Không may là khả năng nảy chồi của các giống lai tốt nhất lại không đủ sức khỏe để sản xuất đại trà. Nhưng một vài nghiên cứu ban đầu cho thấy khả năng nảy chồi của lúa là một tính trội hay trội một phần, điều đó rất có ích đối với việc gây tạo lúa lai mọc bằng chồi. Gần đây đã có nhiều tiến bộ trong lĩnh vực nghiên cứu này và tương lai của nó rất sáng sủa.

PHỤ LỤC

NGHIÊN CỨU GÂY TẠO

LÚA LAI HỆ MỘT DÒNG

Chiến lược cơ bản của công tác gây tạo lúa lai là đơn giản hoá các phương pháp gây tạo và tăng mức ưu thế lai. Nó bao gồm ba giai đoạn chính:

- Khai thác ưu thế lai của các con lai khác giống bằng phương pháp ba dòng;
- Khai thác ưu thế lai của các con lai khác loài phụ bằng phương pháp hai dòng
- Khai thác và cố định ưu thế lai của các con lai khác loài phụ và thậm chí cả các con lai xa hơn bằng phương pháp một dòng.

Dựa trên quan điểm chiến lược này, gần đây một số nhà khoa học đã đi vào nghiên cứu phương pháp lai một dòng nhằm cố định ưu thế lai.

Trên lý thuyết thì có một số phương pháp khả dĩ cố định được ưu thế lai. Hiện nay người ta thường áp dụng một vài phương pháp nghiên cứu như sau:

Nhân vô tính con lai F1 bằng phương pháp dùng chồi lúa hoặc sử dụng lúa đại.

Sản xuất quy mô lớn cây con tái sinh từ các tế bào xôma của con lai F1.

Sử dụng hệ thống gây chết cân bằng trong đó chỉ các cây dị hợp tử có thể phát triển và sinh hạt, còn các cây đồng hợp tử không phát triển và sinh hạt được do tính chất gây chết của đồng hợp tử.

Thông qua sự vô phối để sản xuất hạt lai vô tính.

Các con lai nhân tế bào chất có ưu thế lai có thể được tạo ra khi nhân của loài này được đưa vào trong tế bào chất của loài khác bằng phương pháp lai trở lại liên tiếp.

Gây tạo nhị thể bội kép mà nhiễm sắc thể bổ sung của nó được tạo bởi các nhóm bổ sung xôma của cả hai loài. Một nhị thể bội kép thường xuyên là dị hợp tử cho các alen từ hai loài khác nhau cùng tồn tại.

Trong những phương pháp này, thì phương pháp sử dụng sự vô phối để cố định ưu thế lai của lúa được chú ý nhiều nhất.

Trung Quốc, bắt đầu nghiên cứu sự vô phối ở lúa từ đầu những năm 1980. Từ đó đến nay đã có một

số công trình thăm dò tìm kiếm vật liệu vô phôi ở lúa cũng như những nghiên cứu di truyền và phôi sinh học với những vật liệu này. Một số vật liệu tỏ ra có một số đặc tính vô phôi như sau:

*** *Lúa đa phôi***

Người ta nhận thấy bốn dòng mạ sinh đôi là Lu 52 (Japonica), Alixisini (Japonica), Shuang 13 (Indica) và Shang 3 (Indica) được tuyển chọn từ hàng nghìn giống lúa trồng có kiểu sinh sản vô phôi không bắt buộc và lần lượt được gọi theo mã hiệu là AP I, AP II, AP III và AP IV.

Tỉ lệ mạ sinh đôi trung bình của AP I, AP II, AP III và AP IV lần lượt là 16,1%, 23,4%, 32,4% và 5,0%. Tuy nhiên, tần số phôi tự nhiên có trong các dòng mạ sinh đôi này rất thấp (3-5%) do phần lớn các mạ sinh đôi đều bắt nguồn từ sự phát sinh phôi tro bào hay thuộc về tính đa phôi chia cắt. Để tăng tỉ lệ phôi tự nhiên cũng như tỉ lệ mạ sinh đôi của những dòng mạ đôi này, có hai biện pháp hữu ích là:

1) Giữ các hạt nảy mầm trong tối sao cho thân mầm dài ra và dễ nhận thấy, rồi chỉ chọn các mạ sinh đôi khi nào chồi mạ có thân mầm riêng của nó;

2) Tách vỏ hạt để gieo nhằm chọn ra những mạ sinh đôi nào có một mạ trong đó mọc từ phần giữa hay gần giữa hạt. Như thế, tần số phôi tự nhiên trong đó các dòng nêu trên tăng tới 8-12%.

Các nghiên cứu di truyền cho thấy đặc tính mạ sinh đôi là di truyền được do hai cặp gene lặn với số yếu tố thay đổi quyết định.

**** Vật liệu vô phôi bất dục dục***

Lúa vô phôi Sinchuan (SAR 1) được phát hiện ở con lai F7 của Fan 4/Zhong Dan 2// Zhen Shan 97. Phấn của SAR 1 bất thụ cao. Tuy nhiên trong điều kiện cách ly, SAR 1 có thể tự kết hạt với tỉ lệ 55,33%. Sau khi cắt tia máy và khử dục bằng nước hơi ấm, nó vẫn kết hạt với tỉ lệ cao nhất là 17,5%.

Các nghiên cứu về phôi sinh học tế bào cho thấy các phôi chủ yếu phát sinh từ trứng có số nhiễm sắc thể tự nhân đôi trong túi phôi giảm nhiễm, hoặc trong một số trường hợp phát sinh từ các tế bào lớp mặt bên trong vách bầu. Hai nhân cực có thể phân chia để tạo thành nội nhũ lưỡng bội mà không cần qua thụ tinh. Sự tự hình thành nội nhũ của SAR 1 là một thuộc tính rất có giá trị, ngay cả

khi sự sinh sản vô phối thể giao tử sau khi giảm phân không thể dùng để cố định ưu thế lai.

Các gene quy định sinh sản đơn tính SAR 1 có thể di truyền được và không có quan hệ nào với các gene hữu thụ của phấn.

** Vật liệu vô phối có tần số cao*

Người ta đã thu nhận được HDAR001 bằng cách xử lý bức xạ ion hoá khô của một dòng mạ sinh đôi là con cháu của cặp lai giữa một dòng mạ sinh đôi với một giống Japonica. HDAR002 cũng phát sinh từ cặp lai giữa hai giống Indica và Japonica. Cả hai dòng đều tái sinh theo tần số vô phối cao.

Tần số vô phối là 48% ở HDAR001 và 50% ở HDAR002 trên cơ sở quan sát các phần của noãn ngay trước và sau khi thụ tinh. Các bầu nhụy nở rộng trước khi hình thành bao phấn và tự phát triển phôi trong điều kiện không có thụ tinh. Có thể thấy phôi cầu lớn trong túi phôi không thụ tinh một hoặc hai ngày trước và sau khi hình thành bao phấn.

Tỉ lệ kết hạt của HDAR001 là 80%, và của HDAR002 là từ 50% đến 85%. Chồi rễ của cả hai dòng cho thấy số lượng nhiễm sắc thể lưỡng bội là

$2n=2x=24$. Nhưng nguồn gốc của phôi, dù là lưỡng bào tử hay vô bào tử xôma vẫn còn là một vấn đề phải nghiên cứu.

Gây tạo kiểu sinh sản vô phôi là phương pháp mới để khai thác ưu thế lai ở lúa. Vì không có sẵn các loài lúa vô phôi nên bí quyết để đi tới thành công là thu được các gene vô phôi có ích.

Để duy trì ưu thế lai, một kiểu sinh sản vô phôi lý tưởng cần có những đặc tính sau:

1) Gene quy định sinh sản vô phôi là gene trội với kiểu di truyền đơn giản để con lai F1 vô phôi có thể nhân lên một cách dễ dàng.

2) Biểu hiện của sinh sản vô phôi là ổn định, hoàn chỉnh và không dễ bị ảnh hưởng của môi trường.

3) Thuộc tính của sinh sản vô phôi là bắt buộc hoặc gần là như vậy.

4) Nội nhũ phát triển tốt và có thể dùng làm thực phẩm chính.

Điều này có thể thực hiện được bằng cách:

- Tìm các cây cá thể bất dục đực hay hữu thụ kém nhưng lại có thể sinh nhiều hạt tự nhiên;

- Lai các cá thể này với các nhân tố đánh dấu trội;

- Chọn ra những cây mang đặc tính của cây mẹ trong số các con lai F₁;

Bằng cách lai lúa với các loài lúa dại và chọn ra các cá thể có khả năng tạo hạt đơn tính cao trong số các cây F₁ có bất thụ cao.

Có thể tìm các vật liệu vô phôi bằng cách chọn lọc các mạ đa phôi

Mạ đa phôi là biểu hiện chính của phôi tự nhiên ở lúa. Chọn lọc những mạ đa phôi từ nhiều giống lúa trồng là một cách khả dĩ để thu được các vật liệu vô phôi. Cần nghiên cứu phôi sinh học để tìm hiểu liệu các mạ đa phôi thu được có thuộc kiểu sinh sản vô tính hay không. Nghiên cứu di truyền học cũng cần thiết để xác định thuộc tính sinh sản vô phôi của chúng.

Có thể chuyển các gene vô phôi hiện có từ các loài có họ hàng gần với lúa bằng cách lai tạo có sự hỗ trợ của phương pháp nuôi cấy mô hay công nghệ sinh học.

Gần đây, người ta đã thu được một dạng đột biến có phôi hợp tử bị thui qua xử lý 0,1% EMS. Sự

thụ tinh của thể đột biến này là bình thường với nội nhũ tốt, nhưng phôi hợp tử bị thui và hạt không nảy mầm được. Các nghiên cứu di truyền học chỉ ra rằng tính gây chết của phôi hợp tử bị thui do cặp gene lặn quy định.

Các nghiên cứu phôi sinh học về các dòng mạ sinh đôi hiện có cũng cho thấy rằng tỉ lệ phôi tự nhiên cao nhất ở một số cây có thể lên tới 40%, nhưng phần lớn các phôi tự nhiên non đã không thể thành thực được do phải cạnh tranh với phôi hợp tử.

Dường như có thể tăng tần số phôi tự nhiên thành thực lên tới 40% bằng cách đưa đặc tính của phôi hợp tử gây chết vào các dòng mạ sinh đôi vô phôi không bắt buộc hiện có để loại trừ sức ép cạnh tranh của hợp tử. Nếu việc này đạt kết quả, ta có thể sử dụng vật liệu này làm vật di truyền cố định ưu thế lai.

Ngân hàng gene lúa Quốc tế

Thế giới đã quan tâm việc bảo tồn quỹ gene cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng từ nhiều thập kỷ trước. Ngay từ đầu năm 1924, Viện nghiên cứu cây trồng toàn Liên Xô (VIR) đã được thành lập mà

nhiệm vụ chính của nó là thu thập, đánh giá và bảo quản nguồn gene cây trồng. Theo số liệu đã công bố thì ngân hàng gene của Viện bảo tồn tới 150.000 mẫu giống cây trồng và cây đại thân thuộc được thu nhập và cung cấp miễn phí cho các chương trình hợp tác, các chương trình chọn tạo giống của các quốc gia mà những mẫu giống cây trồng các quốc gia đó cần nhưng chưa có điều kiện thu thập, bảo tồn. Trong chương trình hợp tác Việt - Xô giai đoạn 1983-1987, VIR đã đưa vào Việt Nam 2 259 mẫu giống lúa và nhiều loại cây khác như đậu đỗ, cà chua, ớt, đậu, bông... (Nguyễn Hữu Nghĩa và cộng sự 1986).

Đến thập kỷ 60 nhiều viện nghiên cứu cây trồng hoặc trung tâm nghiên cứu quốc tế được thành lập như Trung tâm nghiên cứu Ngô và Lúa mì quốc tế CIMMYT, Trung tâm khoai tây và cây có củ Quốc tế CIP, Viện nghiên cứu lúa quốc tế IRRI... Bên cạnh việc nghiên cứu chọn tạo giống, kỹ thuật canh tác, hệ thống trồng trọt... tại các cơ sở này có một trung tâm bảo tồn vốn gene rất lớn.

Viện nghiên cứu lúa Quốc tế IRRI được thành lập năm 1960, năm 1962 đã tiến hành thu thập

nguồn gene cây lúa phục vụ cho công tác cải tiến giống lúa và đến năm 1977 chính thức khai trương Ngân hàng gene cây lúa Quốc tế IRG (International Rice Genbank). Tại đây một tập đoàn lúa từ hơn 80.000 mẫu, trong đó các giống lúa trồng châu Á *O.sativa* chiếm tới 95%, *Oryza glaberrima* 1,4%, có 21 loài hoang dại chiếm: 2,9%. Hiện nay còn 2.194 mẫu đang ở thời kỳ nhân hạt chuẩn bị đăng ký vào ngân hàng gene cây lúa.

IRRI hợp tác chính thức với Việt Nam từ năm 1975, trong chương trình thử nghiệm giống lúa quốc tế (IRTP) trước đây và nay là chương trình đánh giá nguồn gene cây lúa (INGER). Trong quá trình hợp tác, Việt Nam đã nhận được 279 tập đoàn lúa gồm hàng ngàn mẫu giống mang nhiều đặc điểm nông sinh học tốt, năng suất cao, chống chịu sâu bệnh và điều kiện ngoại cảnh bất thuận như hạn, úng, chua, mặn, phèn...

Nguồn gene lúa giống Việt Nam

Theo nhận định của Lưu Ngọc Trình (1977), trên lãnh thổ Việt Nam có 14.600 loài thực vật bậc cao, trong đó đang khai thác và sử dụng 700 loài cây trồng thuộc 10 chi thực vật. Tại Ngân hàng gene

Quốc gia đã thu thập và bảo quản 1.300 mẫu giống lúa, 8.000 mẫu cây trồng nông nghiệp ngắn ngày. Trong thời gian trước mắt, ngân hàng gene các cây trồng bằng hạt sẽ tăng số lượng mẫu giống lên 6.500.

Đối với cây lúa, ngoài việc tiến hành thu thập và bảo quản tại ngân hàng gene quốc gia thì các cơ quan nghiên cứu đã tiến hành thu nhập để sử dụng.

Năm 1988 Viện cây lương thực và cây thực phẩm đã thu thập tới 3.691 giống lúa, trong đó 3.186 mẫu thu từ 30 nước khác nhau trên thế giới, 500 mẫu giống địa phương. Các mẫu giống được đánh giá các tính trạng và sắp xếp thành từng nhóm theo thời gian sinh trưởng:

Nhóm cực ngắn có thời gian sinh trưởng 90-100 ngày: 345 mẫu.

Nhóm ngắn ngày có thời gian sinh trưởng 111-120 ngày: 866 mẫu.

Nhóm trung ngày có thời gian sinh trưởng 121-136: 896 mẫu.

Nhóm dài ngày có thời gian sinh trưởng trên 140 ngày :78 mẫu.

Từ ngân hàng vật liệu đa dạng đó, các nhà chọn tạo giống Viện cây lương thực và cây thực phẩm đã chọn ra 15 giống chịu chua phèn, 23 giống kháng rầy và 385 giống kháng đạo ôn (Vũ Tuyên Hoàng và cộng sự 1988).

Tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long, đợt khảo sát năm 1992 đã thu về 1.447 mẫu giống lúa địa phương, trong đó 1.335 giống mùa trung và muộn, 112 giống mùa sớm, 50 giống lúa nổi và 4 loài lúa hoang dại (Bùi Chí Bửu và cộng sự 1992).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tủ sách khuyến nông phục vụ người lao động

1. Mai Phương Anh, Trần Khắc Thi, Trần Văn Lại: *Rau và trồng rau*. Nxb Nông nghiệp - 1996.
2. Bùi Chí Bửu - Nguyễn Thị Lang: *Ứng dụng công nghệ sinh học trong cải tiến giống lúa* - Nxb Nông nghiệp - 1995.
3. Luyện Hữu Chỉ và cộng sự. 1997. *Giáo trình giống cây trồng*.
4. *Công nghệ sinh học và một số ứng dụng ở Việt Nam*. Tập II. Nxb Nông nghiệp - 1994.
5. G.V. Guliaeb, I.U.L. Guijop. *Chọn giống và công tác giống cây trồng* (bản dịch) Nxb Nông nghiệp - 1978.
6. Cục Môi trường. *Hiện trạng môi trường Việt Nam và định hướng trong thời gian tới*. Tuyển tập Công nghệ môi trường, Hà Nội, 1998.
7. Lê Văn Cát. *Cơ sở hóa học và kỹ thuật xử lý nước*. Nxb Thanh Niên, Hà Nội, 1999.
8. Chương trình KT-02, *Bảo vệ môi trường và phát triển bền vững*, Tuyển tập các báo cáo khoa học tại Hội nghị khoa học về Bảo vệ môi trường và PTBV, Hà Nội, 1995.
9. *Dự báo thế kỷ XXI*, Nxb Thống Kê, 6/1998.
10. Lê Văn Khoa và Trần Thị Lành, *Môi trường và phát triển bền vững ở miền núi*, Nxb Giáo dục, 1997.
11. *Luật Tài nguyên nước*, Nxb Chính trị quốc gia, 1998.
12. Lê Văn Nãi, *Bảo vệ môi trường trong xây dựng cơ bản*, Nxb Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, 1999.

13. Trần Văn Nhân, Lê Thị Nga. *Giáo trình công nghệ xử lý nước thải*, Nxb Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, 1999.
14. Nguyễn Văn Tuyên, *Sinh thái và môi trường*, Nxb Giáo dục, 2000.
15. *Tập hợp các tiêu chuẩn kỹ thuật an toàn về điện* - Nxb Lao động, Hà Nội, 8/1998.
16. *Thi công công trình thủy lợi*, Trường Đại học Thủy lợi, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 1983.
17. Kiều Hữu Ánh và Ngô Tự Thành. *Vi sinh vật của các nguồn nước* (Dịch từ G. Rheinheimer). Nxb Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 1985.
18. Đường Hồng Dật và các tác giả. *Giáo trình vi sinh vật trồng trọt*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 1979.
19. Mai Hồ Dịch, *Ứng dụng hệ thống cố định đạm trong việc cải tạo đất* (Dịch từ Hamdi - Y.A). Nxb Giáo dục, Hà Nội, 1992.
20. Nguyễn Lâm Dũng. *Vi sinh vật đất và sự chuyển hóa các hợp chất cacbon và nitơ trong đất*. Nxb Khoa học kỹ thuật, 1984.
21. Nguyễn Lâm Dũng. *Sử dụng vi sinh vật để phòng trừ sâu hại cây trồng*. Nxb Khoa học kỹ thuật, 1985.
22. Nguyễn Văn Lâm. *Biện pháp sinh học phòng chống dịch hại nông nghiệp*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 1995.
23. Trần Thị Thanh. *Công nghệ vi sinh*. Nxb Giáo dục, 2000.
24. Nguyễn Đức Khảm, 1976. *Mối ở miền Bắc Việt Nam*. Hà Nội, 1-214.
25. Nguyễn Đức Khảm - Vũ Văn Tuyển, 1985. *Mối và kỹ thuật phòng chống mối*. Hà Nội, 1-228.
26. Nguyễn Ngọc Kiểng. 1987. *Phòng và chống mối*. Nxb Thành phố Hồ Chí Minh: 1-112.

27. Nguyễn Xuân Khu, 1964. *Đặc tính sinh vật học và sự xâm nhập của mối vào công trình*. Tập san xây dựng số 5: 21-22.
28. Lê Văn Nông: 1985: *Côn trùng hại gỗ, tre ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam và phương pháp phòng trừ* (Một số kết quả nghiên cứu ứng dụng khoa học công nghiệp rừng). Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 81-90.
29. Lê Văn Nông: 1991: *Một hại gỗ và vỏ gỗ được ghi nhận ở Việt Nam*. Hội nghị côn trùng học quốc gia Việt Nam lần thứ nhất. Hà Nội - Việt Nam: 30-31.
30. Suichi Yosida. *Những kiến thức cơ bản của khoa học trồng lúa*. Người dịch: Mai Văn Quyển. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1985.
31. Bộ môn cây lương thực. *Giáo trình cây lương thực*. Tập 1. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội 1997.
32. Lê Song Dư, Nguyễn Thế Côn. *Giáo trình cây lạc*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1979.
33. Nguyễn Danh Đông. *Cây lạc*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1984.
34. Nguyễn Văn Bộ. *Những bức xúc và giải pháp giảm thiểu ô nhiễm môi trường từ các nguồn phân bón*. Tạp chí: Bảo vệ môi trường, số 4/2002.
35. Lê Văn Khoa, Nguyễn Đức Lương, Nguyễn Thế Truyền, *Nông nghiệp và môi trường*. Nxb Giáo dục, 1999.
36. Nguyễn Đình Mạnh. *Hóa chất dùng trong nông nghiệp và ô nhiễm môi trường*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 2002.
37. Phan Thị Quốc Tâm. *Nguồn ô nhiễm phân tán trong nông nghiệp: Chất thải từ chăn nuôi gia súc, tác động môi trường và biện pháp quản lý*. Tập san Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp số 3/2001.
38. Vũ Biệt Linh, Nguyễn Ngọc Bình: *Các hệ nông lâm kết hợp ở Việt Nam*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1995.

39. Nguyễn Văn Siêu, Nguyễn Trọng Khiêm, Cù Xuân Dư. *Sổ tay kỹ thuật trồng cây ăn quả*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1978.
40. Đỗ Tất Lợi. *Cây thuốc Việt Nam*.
41. Vụ Khoa học Công nghệ Bộ Lâm nghiệp: *Kỹ thuật trồng một số cây loài rừng*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1994.
42. Dự án UNDP/FAO/VE96/014 (Chủ biên Nguyễn Ngọc Bình - PGS. PTS. Chu Đức): *Phương thức canh tác và phương thức đánh giá nhanh các hệ nông lâm kết hợp*.
43. Trịnh Văn Thịnh. *Kỹ sinh trùng học thú y*. Nxb NN, 1963.
44. Trịnh Văn Thịnh, Đỗ Dương Thái. *Công trình nghiên cứu kỹ sinh trùng ở Việt Nam*. Tập II, IV. Nxb KHKT - 1978.
45. Nguyễn Hữu Vũ, Phạm Sĩ Lăng. *Những bệnh quan trọng của gà*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1997.
46. Phan Thế Việt, Nguyễn Thị Kỳ, Nguyễn Thị Lê. *Giun sán ký sinh ở động vật Việt Nam*. Nxb KHKT - 1977.
47. Đường Hồng Dật (chủ biên): *Lịch sử nông nghiệp Việt Nam* - Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1994.
48. Nguyễn Văn Trương - Nguyễn Pháp (Viện Kinh tế sinh thái Việt Nam): *Vấn đề kinh tế sinh thái Việt Nam* Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 1993.
49. Trần Thị Áng (1995), "*Nghiên cứu và thử nghiệm hiệu quả ứng dụng phân vi lượng đa thành phần đối với một số cây trồng trên một số loại đất*". *Yếu tố dinh dưỡng hạn chế năng suất và chiến lược quản lý dinh dưỡng cây trồng*. Viện Thổ nhưỡng nông hóa, đề tài KN-01-10. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội.
50. Lê Thái Bạt (1991) "*Các nguyên tố vi lượng dễ tiêu trong một số loại đất Tây Bắc*". *Nông nghiệp Công nghiệp thực phẩm* (9) trang 421-423.
51. Lê Đức (1998) "*Các hàm lượng đồng, mangan, molybden trong một số loại đất chính phía Bắc Việt Nam*". *Khoa học đất* (10) trang 421-4230.

52. Phạm Quang Hà (2003) "*Hàm lượng kẽm trong một số loại đất ở Việt Nam và cảnh báo ô nhiễm*" Khoa học đất (17) trang 71-77.
53. Vũ Văn Nhân, Nguyễn Đình Mạnh (1990) "*Ảnh hưởng của nồng độ kẽm và sự phối hợp kẽm - bo đến năng suất lạc trên đất bạc màu HTX Nguyên Khê - Đông Anh - Hà Nội*". Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm (7) trang 424-426.
54. Nguyễn Ngọc Nông (2003) "*Hàm lượng các nguyên tố vi lượng và kim loại nặng trong một số loại đất chính ở vùng núi Đông Bắc Việt Nam*". Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (1) trang 58-60.
55. Thái Phiên, Nguyễn Tử Siêm và Trần Đức Toàn (1998). "*Sử dụng, quản lý đất dốc để phát triển nông nghiệp lâu bền*". Canh tác bền vững trên đất dốc Việt Nam. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội.
56. Phạm Đình Thái. "*Hiệu lực của phân vi lượng đối với các cây trồng trên các loại đất và chế độ thâm canh khác nhau*". Trang 47-55.
57. Trần Minh Tâm. *Bảo quản và chế biến nông sản sau thu hoạch*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 2004.
58. Trần Văn Mão. *Sử dụng vi sinh vật có ích*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 2004.
59. *Phòng trị một số bệnh thường gặp trong thú y bằng thuốc nam*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 2004
60. *Phòng trị một số bệnh thường gặp ở động vật*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 2004
61. Phạm Xương. *Kỹ thuật diệt chuột*. Nxb Đà Nẵng 2001.
62. Lương Đức Phẩm. *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*. Nxb Nông nghiệp - Hà Nội, 2000.

MỤC LỤC

	Trang
<i>Lời nói đầu</i>	5
I. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TRONG SẢN XUẤT NÔNG NGHIỆP	7
II. NHỮNG THÀNH TỰU NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN LÚA LAI	63
III. THỰC HÀNH SẢN XUẤT LÚA LAI	76
<i>Phụ lục. NGHIÊN CỨU GÂY TẠO LÚA LAI HỆ MỘT DÒNG</i>	122
<i>Tài liệu tham khảo</i>	134

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TRONG SẢN XUẤT LÚA

NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG - 175 GIẢNG VỐ - HÀ NỘI

ĐT: 7366522 - 8515380 - 8439543

Chịu trách nhiệm xuất bản:

PHAN ĐÀO NGUYỄN

Chịu trách nhiệm bản thảo:

TRẦN DŨNG

Biên tập: **TRƯỜNG HỮU THẮNG**

Vẽ bìa: **TRƯỜNG GIANG**

Sửa bản in: **NGỌC ANH**

In 3000 cuốn, khổ 13 x 19 cm, tại Công ty Hữu Nghị.

Giấy phép xuất bản số: 70 - 2006/CXB/49 - 03/LĐ.

Cấp ngày 08 tháng 03 năm 2006.

In xong và nộp lưu chiểu Quý II năm 2006

TỦ SÁCH KHUYẾN NÔNG PHỤC VỤ NGƯỜI LAO ĐỘNG

Ứng dụng công nghệ TRONG SẢN XUẤT LÚA



Ứng dụng công nghệ trong



1

006042

000335

14.000 VNĐ

GIÁ: 14.00