

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

VŨ HỒNG ANH

NGHIÊN CỨU CHỌN TẠO GIỐNG LẠC KHÁNG
BỆNH ĐÓM MUỘN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội, tháng 12 năm 2014

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

VŨ HỒNG ANH

NGHIÊN CỨU CHỌN TẠO GIỐNG LẠC KHÁNG
BỆNH ĐÓM MUỘN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Đồng Thị Kim Cúc

Hà Nội, tháng 12 năm 2014

Lời cảm ơn

Trước hết. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy cô và cán bộ công tác tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đã giảng dạy và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập tại viện.

*Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới **TS. Đồng Thị Kim Cúc**, người đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình công tác cũng như trong thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.*

Nhân dịp này, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các cán bộ, anh chị em trong Trung tâm TNSHNCNC, Viện Di truyền Nông nghiệp đã giúp đỡ và động viên tôi trong quá trình công tác và nghiên cứu khoa học vừa qua.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình và bạn bè đã nhiệt tình động viên, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu khoa học cũng như trong cuộc sống.

Luận văn này được thực hiện từ nguồn kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu chọn tạo giống lạc kháng bệnh đốm muộn bằng chỉ thị phân tử”

Xin chân thành cảm ơn!

Hà nội, tháng 12 năm 2014

Vũ Hồng Anh

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đã trực tiếp thực hiện các nghiên cứu trong luận văn này. Mọi kết quả thu được nguyên bản, không chỉnh sửa hoặc sao chép từ các nghiên cứu khác, các số liệu, sơ đồ kết quả của luận văn này chưa từng được công bố.

Mọi dữ liệu hình ảnh, biểu đồ và trích dẫn tham khảo trong luận văn đều được thu thập và sử dụng từ nguồn dữ liệu mở hoặc với sự đồng ý của tác giả.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm với những lời cam đoan trên!

Tác giả

Vũ Hồng Anh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	vii
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1 GIỚI THIỆU VỀ CÂY LẠC	3
1.1.1 Cây lạc (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	3
1.2 Bệnh đốm lá muện ở Lạc	4
1.2.1 Bệnh đốm lá muện ở lạc	4
1.2.2 Triệu chứng bệnh đốm lá muện	5
1.2.3 Di truyền tính kháng bệnh đốm muện ở lạc.....	6
1.3 Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử.....	6
1.3.1 Chỉ thị phân tử.....	7
1.3.2 Kỹ thuật PCR(Polymerase Chain Reaction)	11
1.4 Lập bản đồ tính trạng số lượng (mapping quantitative traits – QTL)	11
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	14
2.1 Vật liệu nghiên và phương pháp nghiên cứu ngoài đồng ruộng	14
2.1.1 Vật liệu	14
2.1.2 Phương pháp nghiên cứu.....	16
2.2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu dùng cho lấy mẫu, phân lập và	
lây nhiễm bệnh nhân tạo	17
2.2.1 Vật liệu nghiên cứu	17
2.2.2 Phương pháp nghiên cứu.....	17
2.3 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm.....	19
2.3.1 Phương pháp tách chiết ADN: phương pháp CTAB	19
2.3.4 Kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamide.....	24
2.3.5 Xử lý số liệu	26
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	30
3.1 Thu thập, đánh giá, xây dựng nguồn vật liệu	30
3.1.1 Nguồn gốc và đặc điểm hạt của các giống mẫu.....	30
3.1.2 Các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của lạc.....	30
3.1.3 Thu thập nguồn bệnh, đánh giá vật liệu khởi đầu và đánh giá nhân	
tạo về khả năng kháng bệnh của tập đoàn lạc.....	37
3.2 Lập bản đồ QTLs liên kết tính trạng kháng bệnh đốm muện	43
3.2.1 Xác định chỉ thị cho đa hình giữa các dòng/giống bố mẹ tham gia	
thí nghiệm	43
3.2.2 Phân tích di truyền các cá thể trong quần thể lập bản đồ BC ₁ F ₁ ,	
BC ₂ F ₁ bằng chỉ thị phân tử SSR đã cho đa hình giữa hai giống bố mẹ. ..	56

3.3	Nghiên cứu chọn tạo giống lạc kháng bệnh đốm muện bằng chỉ thị phân tử.....	64
3.3.1	Xác định giống lạc tiêu biểu có năng suất cao, ổn định nhiễm bệnh đốm lá muện dùng làm cây nhận QTL/gen kháng	64
3.3.2	Lai tạo các quần thể trong chọn tạo giống lạc kháng bệnh đốm lá muện, năng suất cao BC ₁ F ₁ , BC ₂ F ₁	64
3.3.3	Sử dụng phương pháp chọn giống truyền thống kết hợp với sử dụng chỉ thị phân tử liên kết QTL/gen kháng bệnh đốm lá muện , chọn lọc cá thể có tiềm năng năng suất, kháng bệnh, dạng hình đẹp triển vọng. ...	64
3.3.4	Kết quả đánh giá khả năng kháng nhiễm bệnh đốm lá muện (trong điều kiện nhân tạo) của các cá thể trong quần thể lập bản đồ BC ₁ F ₁ , BC ₂ F ₁	67
3.3.5	Lập bản đồ, phân tích và xác định các chỉ thị phân tử liên kết với QTL/gen kháng đốm muện.....	75
3.3.6	So sánh tiềm năng năng suất và kháng bệnh của các dòng lạc triển vọng(tại hai vùng Bắc Giang và Nghệ An)	83
3.4	Bước đầu đánh giá tuyển chọn giống lạc kháng bệnh đốm lá muện, năng suất cao ngoài đồng ruộng.....	86
3.4.1	So sánh đánh giá các dòng/ giống lạc kháng bệnh lá đốm muện (thể hệ BC ₂ F ₄) có năng suất cao.....	86
3.4.2	Khảo nghiệm sinh thái các dòng/ giống lạc kháng bệnh đốm lá muện, năng suất cao triển vọng ở một số vùng sinh thái.	89
	KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	94
1.	Kết luận.....	94
2.	Kiến nghị.....	94

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
2.1	Nguồn gốc các mẫu giống	14
2.2	Các công thức kết hợp sự thay đổi thành phần phản ứng PCR	21
3.1	Nguồn gốc và đặc điểm hạt các mẫu giống	30
3.2	Sự phân bố của các mẫu giống theo các tính trạng về thân cành	31
3.3	Sự phân bố các mẫu giống theo các tính trạng hoa và lá	32
3.4	Sự phân bố các mẫu giống theo các tính trạng về quả và hạt	33
3.5	Sự phân bố các mẫu giống theo thời kỳ sinh trưởng	31
3.6	Sự phân bố các mẫu giống theo các chỉ tiêu về năng suất	36
3.7	Sự phát sinh, gây hại của bệnh đốm muện tại Huyện Diễn Châu – Nghệ An và huyện Tân Yên – Bắc Giang, năm 2012	38
3.8	Sự phát sinh, gây hại của bệnh đốm muện ở các giai đoạn sau khi trồng	38
3.9	Kết quả giám định mẫu bệnh đốm muện trên lạc (Viện BTVT, tháng 7-2012)	39
3.10	Kết quả lây bệnh nhân tạo cho lạc bằng nguồn <i>Phaeiosaraopsis personata</i>	39
3.11	Khả năng kháng bệnh đốm muện của tập đoàn giống lạc	40
3.12	Danh sách các chỉ thị SSR đã dùng để sàng lọc điều kiện phản ứng PCR	44
3.13	Danh sách các chỉ thị RAPD đã tham gia sàng lọc	47
3.14	Danh sách 50 chỉ thị dùng trong đánh giá đa dạng di truyền	49
3.15	Khả năng kháng bệnh đốm muện của các quần thể lai F ₂	57
3.16	Danh sách các chỉ thị SSR dùng đánh giá đa hình hai giống bố mẹ của quần thể lập bản đồ	60
3.17	Khả năng kháng bệnh đốm lá muện của các cá thể BC ₁ F ₁ của các cặp lai từ TB25/giống kháng	67
3.18	Danh sách các chỉ thị dùng cho đánh giá đa hình bố mẹ năm 2014	62
3.19	Danh sách chỉ thị đa hình dùng trong phân tích quần thể lập bản đồ	73
3.20	Khả năng kháng bệnh đốm lá muện của các cá thể BC ₁ F ₁ của các cặp lai từ TB25/TN6	75
3.21	So sánh tiềm năng năng suất của 19 dòng BC ₂ F ₃ triển vọng (vụ Xuân – Hè 2014)	84
3.22	Đánh giá khả năng kháng bệnh ĐLM của 19 dòng BC ₂ F ₃ triển vọng (vụ Xuân – Hè 2014)	85

3.23	So sánh tiềm năng năng suất các dòng triển vọng (thế hệ BC ₂ F ₄) (vụ Hè Thu 2014 tại Hoài Đức – Hà Nội)	87
3.24	Đánh giá khả năng kháng bệnh ĐLM của các dòng Lạc triển vọng thế hệ BC ₂ F ₄ (vụ Hè Thu 2014 tại Hoài Đức – Hà Nội)	88
3.25	So sánh đặc điểm nông sinh học của các dòng BC ₂ F ₅ trồng tại Bắc Giang và Hà Nội (vụ thu - đông năm 2014)	89
3.26	So sánh năng suất của các dòng BC ₂ F ₅ trồng tại Bắc Giang và Hà Nội (vụ thu - đông năm 2014)	91
3.27	So sánh khả năng kháng bệnh ĐLM của các dòng BC ₂ F ₅ trồng tại Bắc Giang và Hà Nội (vụ thu - đông năm 2014)	92

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
3.1	Kết quả điện di kiểm tra ADN của các giống trên gel agarose 1%.	42
3.2	Kiểm tra điều kiện phản ứng PCR trên gel agarose 1,5% đối với một số chỉ thị SSR lạc	49
3.3	Đánh giá đa hình các giống lạc với chỉ thị pPGSeq13E6 trên gel polyacrylamide đối với 64 giống lạc	51
3.4	Đánh giá đa hình các giống lạc với chỉ thị pPGSeq8H1 trên gel polyacrylamide đối với 64 giống lạc	51
3.5	Đánh giá đa hình các giống lạc với chỉ thị pPGSeq11H1 trên gel polyacrylamide đối với 64 giống lạc	52
3.6	Đánh giá đa hình các giống lạc với chỉ thị pPGSeq2F5 trên gel polyacrylamide đối với 64 giống lạc	52
3.7	Đánh giá đa hình các giống lạc với chỉ thị Lec1 trên gel polyacrylamide đối với 64 giống lạc	52
3.8	Mức độ phân nhóm chủng loại phát sinh của 64 giống lạc nghiên cứu khi đánh giá với 50 chỉ thị trong chương trình NTSYS 2.1	53
3.9	Mức độ phân nhóm của 64 giống lạc nghiên cứu khi phân tích số liệu trong chương trình NTSYS 2.1	54
3.10	Minh họa thí nghiệm đánh giá đa hình di truyền giữa các chỉ thị dùng trong nghiên cứu.	56
3.11	Đánh giá con lai của quần thể lập bản đồ ở thế hệ F1	57
3.12	Đánh giá ADN các giống lạc sau khi tách chiết và tinh sạch	59
3.13	Sử dụng chỉ thị phân tử PM 179 và pPGPseq2H8 sàng lọc các cá thể của tổ hợp lai BC1F1 TB25/TN6 dùng để phát triển các cá thể của quần thể lập bản đồ.	59
3.14	Kết quả đánh giá đa hình hai giống lạc TB25 và TN 6 để sàng lọc chỉ thị đa hình dùng cho lập bản đồ, với tổng số 22 chỉ thị cho đa hình	64
3.15	Đánh giá con lai đã được chọn của quần thể chọn giống	64
3.16	Đánh giá các dòng lạc kháng cao bằng một số chỉ thị đa hình của tổ hợp BC ₁ F ₁ /CNC3	65
3.17	Sử dụng chỉ thị phân tử PM 179 và pPGPseq2H8 sàng lọc các cá thể của tổ hợp lai BC1F1 TB25/TN6 dùng để phát triển các cá thể của quần thể lập bản đồ. Các cá thể ở Làn 3, 4, 5, 8, 9, 10, 14, 17, 18 mang băng chỉ thị của TN6 (giống kháng bệnh đốm muộn) sẽ được dùng để phát triển quần thể tiếp theo.	66
3.18	Kết quả sử dụng chỉ thị PM179 để đánh giá các cá thể BC1F2 của quần thể lập bản đồ TB25/TN6.	67

3.19	Sử dụng chỉ thị đa hình trong lập bản đồ gen kháng bệnh đốm muện trên quần thể BC2F1: Chỉ thị Seq13A7 ; Seq7G2 ; Seq3A08 ; Seq3A10 ; GM1501, GM660	76
3.20	Sử dụng chỉ thị đa hình trong lập bản đồ gen kháng bệnh đốm muện trên quần thể BC2F1: Chỉ thị GM2009 ; GM2301 ; GN686 ; TC4F12 ; GNB38 ; TC1D12	77
3.21	Bản đồ nhóm liên kết LG7-G16 đối với 58 cặp môi sử dụng. LOD = 3. Bên trái là khoảng cách giữa các chỉ thị tính bằng cM. Bên phải là tên của chỉ thị.	79
3.22	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL1	81
3.23	Sử dụng chỉ thị Lec1 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL1	81
3.27	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL4 TB25; B.TN6 Các dòng B sẽ được chọn trong thế hệ tiếp theo.	82
3.28	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL5 TB25; B.TN6 Các dòng B sẽ được chọn trong thế hệ tiếp theo.	82
3.29	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL6 TB25; B.TN6 Các dòng B sẽ được chọn trong thế hệ tiếp theo.	82
3.30	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL7 TB25; B.TN6 Các dòng B sẽ được chọn trong thế hệ tiếp theo.	82
3.31	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL8TB25; B.TN6 Các dòng B sẽ được chọn trong thế hệ tiếp theo.	83
3.32	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL11 TB25; B.TN6 Các dòng B sẽ được chọn trong thế hệ tiếp theo	83
3.33	Sử dụng chỉ thị PM179 để chọn cá thể mang gen kháng dòng CL12 TB25; B.TN3 Các dòng B sẽ được chọn trong thế hệ tiếp theo.	83
3.34	5 Dòng lạc triển vọng kháng bệnh đốm lá muện, năng suất cao	91
3.35	So sánh quả và hạt của các dòng lạc triển vọng kháng bệnh đốm lá muện, năng suất cao(thế hệ BC ₂ F ₅).	92