

KẾT QUẢ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU MẶN SHPT15 BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHỌN DÒNG CÁ THỂ SỬ DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Lê Hùng Linh¹, Lê Huy Hàm¹, Nguyễn Thúy Kiều Tiên²,
Lê Hà Minh¹, Chu Đức Hà^{1*}, Khuất Thị Mai Lương¹

¹Viện Di truyền Nông nghiệp - VAAS

²Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long - VAAS

TÓM TẮT

Chọn dòng cá thể sử dụng chỉ thị phân tử (MAS) là một trong những công cụ đắc lực để tạo ra giống lúa mới có khả năng ứng phó với biến đổi khí hậu. Trong nghiên cứu này, dòng lúa SHPT15 đã được chọn tạo bằng phương pháp MAS từ phép lai Bắc Thơm số 7 (BT7) × FL478 (giống cho gen mang locus gen *Saltol*). Cụ thể, SHPT15, chọn dòng cá thể từ thế hệ BC₃F₆, đã được kiểm tra có mặt của locus gen *Saltol* ở trạng thái đồng hợp tử bằng hai chỉ thị phân tử. Đánh giá kiểu hình cho thấy dòng lúa SHPT15 có khả năng chịu được mặn 6‰ trong điều kiện nhân tạo ở giai đoạn cây non trong 15 ngày xử lý. Đánh giá trong hai vụ tại xã Giao Châu, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định đã cho thấy, SHPT15 có khả năng thích ứng với canh tác tại các tỉnh phía Bắc. Dòng lúa SHPT15 có các đặc tính nông sinh học tốt, thời gian sinh trưởng ngắn, tương đương so với BT7. Trong điều kiện vụ Xuân và vụ Mùa, năng suất thực thu của SHPT15 cao hơn so với BT7, đạt 6,37 tấn/ha (vụ Xuân) và 6,14 tấn/ha (vụ Mùa). Ngoài ra, dòng lúa SHPT15 cũng thể hiện khả năng chống chịu một số sâu bệnh hại chính ở mức khá, tương đương so với BT7. Kết quả của nghiên cứu này sẽ tạo tiền đề quan trọng cho việc khảo nghiệm sinh thái dòng lúa SHPT15 tại các tỉnh phía Bắc.

Từ khóa: Chọn tạo giống lúa; chỉ thị phân tử; Bắc thơm số 7; SHPT15; chịu mặn.

Ngày nhận bài: 06/5/2020; Ngày hoàn thiện: 18/5/2020; Ngày đăng: 11/6/2020

CONSTRUCTION OF THE SALT-TOLERANT RICE VARIETY SHPT15 USING THE MARKER-ASSISTED SELECTION

Le Hung Linh¹, Le Huy Ham¹, Nguyen Thuy Kieu Tien²,
Le Ha Minh¹, Chu Duc Ha^{1*}, Khuat Thi Mai Luong¹

¹Agricultural Genetics Institute - VAAS

²Cuu Long Delta Rice Research Institute - VAAS

ABSTRACT

Marker-assisted selection (MAS) has been considered as one of the most effective tools for the construction of rice varieties adapted to climate change. In this study, we successfully created the new rice line, namely SHPT15 from Bac Thom No 7 (BT7) × FL478 (donor harboring *Saltol*) by the MAS approach. Particularly, the SHPT15 line was obtained from the BC₃F₆ generation and validated the occurrence of the homozygous *Saltol* locus gene by molecular markers. Our results also demonstrated that SHPT15 could resist high salinity conditions (6‰) at the seedling stage for 15 days. Next, our author testings in two seasons in Giao Chau Commune, Giao Thuy District, Nam Dinh Province found that SHPT15 has potentially developed in the Northern provinces. More specifically, SHPT15 had some good agronomical traits, such as the short growth duration, as similar to the BT7 varietal. Interestingly, the yields of SHPT15 have been found to be significantly higher than BT7 (6.37 tons/ha in the Spring season and 6.14 tons/ha in the Summer season). Additionally, SHPT15 also exhibited a high tolerance to major insects/diseases in the field. Taken together, our results could provide a solid foundation for further ecological testings of SHPT15 in the Northern provinces in Vietnam.

Keywords: Rice breeding; molecular marker; Bac Thom 7; SHPT15; salinity tolerance.

Received: 06/5/2020; Revised: 18/5/2020; Published: 11/6/2020

* Corresponding author. Email: hachu_amser@yahoo.com

1. Giới thiệu

Chọn tạo dòng/giống lúa ứng phó với biến đổi khí hậu được xem là một trong những nhiệm vụ quan trọng của nền sản xuất nông nghiệp bền vững ở nước ta hiện nay. Trong đó, cải thiện đặc tính chịu mặn ở lúa gạo được xem là ưu tiên hàng đầu, nhất là trong bối cảnh Việt Nam đang chịu ảnh hưởng nặng nề của tình trạng xâm nhập mặn [1], đặc biệt đối với các giống lúa chất lượng đại trà.

Để giải quyết bài toán này, rất nhiều phương pháp chọn giống truyền thống (lai hữu tính, chọn dòng đột biến) và hiện đại (giải trình tự thể hệ mới, chỉnh sửa gen, chuyển gen, chọn giống sử dụng chỉ thị phân tử) đã được áp dụng nhằm lai tạo ra các dòng/giống có khả năng chịu mặn từ 4 - 6‰. Trong đó, chọn dòng cá thể bằng chỉ thị phân tử (Marker-assisted selection, MAS) là một trong những công cụ phát huy được hiệu quả trong việc rút ngắn thời gian lai tạo, quy tụ chính xác được locus gen mục tiêu vào giống nhận.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã chọn tạo thành công dòng lúa mới có khả năng chịu mặn 6‰, đặt tên là SHPT15, bằng phương pháp MAS dựa trên việc tích hợp locus gen *Saltol* quy định tính trạng chịu mặn vào giống lúa Bắc Thơm số 7 (BT7) [2], một trong những giống lúa chủ lực tại các tỉnh phía Bắc [3]. Kết quả của nghiên cứu này tạo tiền đề cho việc đăng ký khảo nghiệm giống lúa SHPT15, tiến tới công nhận giống lúa sản xuất thử nhằm đưa ra những khu vực chịu ảnh hưởng mặn.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu khởi đầu cho chọn tạo là giống cho gen FL478, mang locus gen *Saltol* có khả năng chịu mặn ở nồng độ 6‰, nhập nội từ Viện nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI) [4] và giống nhận gen, BT7, cung cấp bởi Viện Di truyền Nông nghiệp [2]. Giống đối chứng Pokkali (+) và IR29 (-) được nhập nội từ Viện nghiên cứu Lúa Quốc tế [4].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm đồng ruộng được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Cây mỗi dòng 2 - 4 hàng, mỗi hàng 30 khóm, khoảng cách 20×15 cm, 1 cây/khóm. Thí nghiệm trong nhà lưới được tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp, trong khi khảo nghiệm tác giả được thực hiện tại xã Giao Châu, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định.

2.2.2. Phương pháp theo dõi và thu thập số liệu

Các quan sát và đánh giá được tiến hành dựa theo mô tả trong “Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa - QCVN 01-55:2011/BNNPTNT” [5]. Một số chỉ tiêu theo dõi trên đồng ruộng, bao gồm đặc tính nông sinh học chính, các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất thực thu và khả năng phản ứng sâu bệnh hại chính được đánh giá và phân nhóm theo tiêu chuẩn “Đánh giá nguồn gen cây lúa” của IRRI (2002) [6].

2.2.3. Phương pháp quy tụ gen mục tiêu

Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số từ mẫu lá lúa của quần thể lai được tiến hành theo phương pháp Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) có cải tiến [7]. Kỹ thuật PCR với các cặp mồi SSR (IDT, Hoa Kỳ) được tiến hành dựa theo quy trình được mô tả trước đây. Kiểm tra sản phẩm khuếch đại gen được tiến hành theo phương pháp điện di trên gel agarose 2,5% trong đệm TBE 0,5X có bổ sung Ethidium bromide.

2.2.4. Phương pháp thanh lọc mặn nhân tạo

Thí nghiệm đánh giá ở giai đoạn cây con trên môi trường dinh dưỡng Yoshida được tiến hành theo mô tả trong phương pháp xử lý của IRRI [8]. Thang đánh giá mức độ kháng/mẫn cảm với xử lý mặn được theo dõi theo tiêu chuẩn của IRRI (2002) [6].

2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý thống kê

Phân tích xử lý số liệu được thực hiện theo phần mềm Microsoft Office và IRRISTAT 5.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lai tạo và đánh giá quần thể con lai BC_3F_2 từ tổ hợp lai BT7 $\times$ FL478

Trong nghiên cứu này, dòng/giống lúa mới SHPT15 được chọn tạo ở thế hệ BC_3F_2 từ tổ hợp lai BT7 (♀) $\times$ FL478 (♂). Cụ thể, vụ Xuân 2009 đã thu được 30 cá thể lai F_1 từ cặp lai này. Trong đó, sàng lọc bằng chỉ thị phân tử đã chỉ ra 27 trên tổng số 30 cá thể F_1 mang locus gen *Saltol* ở trạng thái dị hợp tử. Ở thế hệ BC_1F_1 (BT7 $\times$ F_1), sử dụng hai chỉ thị RM3412 và RM493 đã xác định được 70 trên tổng số 78 cá thể mang locus gen *Saltol* ở trạng thái dị hợp tử.

Tiếp tục tiến hành lai trở lại với BT7 để củng cố nền di truyền, đồng thời kết hợp kiểm tra sự có mặt của locus gen *Saltol* bằng chỉ thị phân tử, kết quả đã lai tạo thành công quần thể BC_2F_1 (108/115 cá thể mang locus gen *Saltol* ở trạng thái dị hợp tử) và BC_3F_1 (102/113 cá thể mang locus gen *Saltol* ở trạng thái dị hợp tử). Để đưa locus gen *Saltol* vào trạng thái đồng hợp tử, nghiên cứu đã tiếp tục tự thụ tạo quần thể BC_3F_2 . Trong đó, kết hợp thanh lọc mặn nhân tạo và sàng lọc chỉ thị phân tử đã xác định được 10 cá thể mang locus gen *Saltol* ở trạng thái đồng hợp tử và có khả năng chịu mặn ở nồng độ 6‰ (Hình 2). Mỗi cá thể này được nhân dòng và phát triển thành quần thể BC_3F_3 khác nhau.

Đánh giá khả năng chịu mặn ở 10 dòng BC_3F_3 trong điều kiện nhân tạo cho thấy các dòng đều có khả năng chịu mặn khá (điểm 3), tương đương giống cho gen FL478, trong khi BT7 và đối chứng IR29 đều mẫn cảm với điều kiện mặn (điểm 7) (Bảng 1). Từ đó, các dòng có đặc tính nông sinh học tốt ở thế hệ BC_3F_3 được làm thuần đến thế hệ BC_3F_6 . Dòng thuần triển vọng có nhiều đặc điểm nông sinh học tốt, khả năng kháng sâu bệnh và tiềm năng năng suất cao, được đặt tên là SHPT15.

Xử lý thanh lọc mặn nhân tạo trong 15 ngày ở giai đoạn cây non cho thấy tỷ lệ sống của

dòng SHPT15 đạt 97%, khả năng chịu mặn đạt điểm 3 (Hình 3), đồng thời quy tụ thành công locus gen *Saltol* ở trạng thái đồng hợp tử. Như vậy, trải qua 9 vụ (vụ Xuân 2009 - vụ Xuân 2013), nhóm nghiên cứu đã chọn tạo được dòng lúa triển vọng SHPT15 từ tổ hợp lai BT7 $\times$ FL478 theo phương pháp MAS (Hình 1). Dòng lúa SHPT15 có đặc điểm nông sinh học tốt, khả năng chịu mặn 6‰ được tiếp tục tiến hành khảo nghiệm tác giả nhằm đánh giá đặc điểm nông sinh học, các yếu tố cấu thành năng suất và khả năng chống chịu sâu bệnh.

3.2. Đánh giá đặc điểm nông sinh học chính, các yếu tố cấu thành năng suất và khả năng chống chịu sâu bệnh của dòng triển vọng SHPT15 qua khảo nghiệm tác giả

Trong nghiên cứu này, dòng triển vọng SHPT15 được khảo nghiệm tác giả trong hai vụ (vụ Xuân 2014 và vụ Hè 2014) tại xã Giao Châu, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định nhằm bước đầu đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển tại các tỉnh phía Bắc. Kết quả theo dõi một số đặc điểm nông sinh học của dòng triển vọng SHPT15 trong hai vụ được thể hiện ở bảng 2.

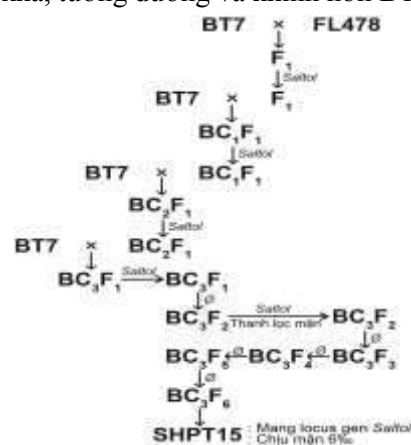
Kết quả khảo nghiệm tác giả cho thấy dòng triển vọng SHPT15 có các đặc điểm nông sinh học tốt, dáng cây đẹp, tương đương so với BT7 (Bảng 2). Cụ thể, dòng triển vọng SHPT15 có thời gian sinh trưởng ngắn hơn BT7 từ 2 - 4 ngày (vụ Xuân - 118 ngày, vụ Mùa - 104 ngày) (Bảng 2). Dòng lúa SHPT15 là dạng thấp cây (102 - 105 cm), dáng cây gọn, cứng cây, thể hiện khả năng chống đổ tốt (Bảng 2).

Một trong những điểm quan trọng để đánh giá khả năng thích ứng trên diện rộng của các dòng lúa ưu tú là xem xét các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực thu. Kết quả cho thấy, dòng lúa triển vọng SHPT15 có các yếu tố cấu thành năng suất ở mức tương đương so với giống BT7. Cụ thể, chỉ tiêu số bông/khóm, số hạt/bông, tỷ lệ lép của SHPT15 ở mức tương đương hoặc thấp hơn

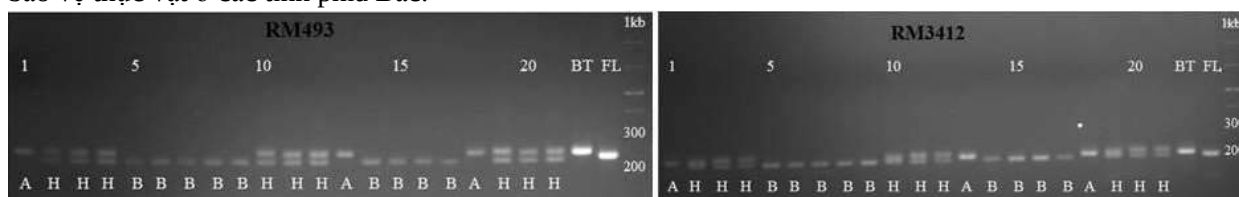
không đáng kể so với BT7 (Bảng 3). Đáng chú ý, trọng lượng 1000 hạt của SHPT15 (24,5 g - vụ Xuân và 24,0 g - vụ Hè) tỏ ra vượt trội so với BT7 (19,0 g - vụ Xuân và 18,3 g - vụ Hè) trong cả hai vụ. Năng suất thực thu trung bình của SHPT15 cao hơn giống BT7 ở mức ý nghĩa 95%. Trong điều kiện vụ Xuân và vụ Mùa 2014, dòng lúa triển vọng SHPT15 có năng suất thực thu đạt lần lượt 63,7 và 62,6 tạ/ha, cao hơn so với BT7 (54,3 và 51,8 tạ/ha) (Bảng 3).

Bên cạnh đó, khả năng chống chịu sâu bệnh hại của dòng lúa SHPT15 cũng được quan tâm trong khảo nghiệm tác giả. Kết quả đánh giá cho thấy, trong điều kiện canh tác có sử dụng thuốc bảo vệ thực vật, dòng lúa SHPT15 có mức độ kháng/nhiễm sâu bệnh hại chính ở mức tương đương so với BT7. Các kết quả này cho thấy, dòng lúa SHPT15 có thể thích ứng với chế độ chăm sóc và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật ở các tỉnh phía Bắc.

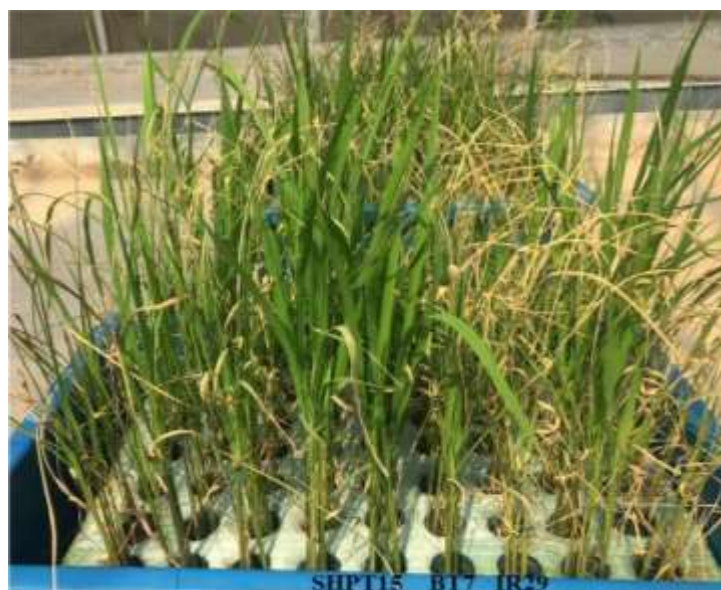
Như vậy, dòng lúa SHPT15, tích hợp thêm locus gen *Saltol* chịu mặn, vẫn có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện khảo nghiệm tại các tỉnh phía Bắc. SHPT15 có các đặc điểm nông sinh học tốt, năng suất thực thu cao hơn BT7, khả năng chống chịu ở mức khá, tương đương và nhìn hơn BT7.



Hình 1. Sơ đồ chọn tạo dòng/giống lúa chịu mặn SHPT theo phương pháp MAS



Hình 2. Phân tích kiểu gen của các cá thể BC_3F_2 với chỉ thị RM493 và RM3412 liên kết chặt với locus gen *Saltol*
Ghi chú: BT - Bắc thơm số 7, FL - FL478, A - Đồng hợp giống BT7, B - Đồng hợp từ giống FL478, H - Dị hợp từ



Hình 3. Thử nghiệm khả năng chịu mặn ở 6‰ NaCl của dòng triển vọng SHPT15

Bảng 1. Đánh giá khả năng chịu mặn nhân tạo của các dòng BC₃F₃ từ tổ hợp lai BT7 × FL478

TT	Tên dòng	Saltol	Tỷ lệ cây sống (%)	Thang đánh giá
1	BC ₃ F ₃ -1	+	95	3
2	BC ₃ F ₃ -2	+	91	3
3	BC ₃ F ₃ -3	+	94	3
4	BC ₃ F ₃ -4	+	86	3
5	BC ₃ F ₃ -5	+	93	3
6	BC ₃ F ₃ -6	+	89	3
7	BC ₃ F ₃ -7	+	85	3
8	BC ₃ F ₃ -8	+	97	3
9	BC ₃ F ₃ -9	+	88	3
10	BC ₃ F ₃ -10	+	85	3
11	IR29	-	0	9
12	FL478	+	98	3
13	Pokkali	+	100	3
14	BT7	-	10	7

Bảng 2. Đặc tính nông sinh học chính của SHPT15 trong khảo nghiệm tác giả

TT	Chỉ tiêu	SHPT15	BT7
1	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Vụ Xuân Vụ Mùa	118 104
2	Chiều cao cây (cm)	102 - 105	106 - 108
3	Độ cứng cây (điểm)	1	1
4	Dạng thân	Đứng	Đứng
5	Dạng lá đồng	Nửa đứng	Nửa đứng
6	Màu sắc lá	Xanh trung bình	Xanh trung bình
7	Bệnh đạo ôn (điểm)	Hại lá Cổ bông	0-1 0-3
8	Bệnh bạc lá (điểm)	0-1	0-3
9	Bệnh khô vằn (điểm)	0-1	1-3
10	Sâu cuốn lá (điểm)	0-3	0-5
11	Sâu đục thân (điểm)	0-1	0-1
12	Rầy nâu (điểm)	0-1	0-3
		0-3	0-3

Bảng 3. Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực thu của SHPT15 trong khảo nghiệm tác giả

Chỉ tiêu	Số bông/ khóm	Số hạt/ bông	Tỷ lệ lép (%)	P1000 hạt (g)	NSLT (tạ/ha)	NSTT (tạ/ha)	% năng suất vượt đôi chứng
Vụ, tên giống							
Vụ Xuân SHPT15	5,7	150	10,0	24,5	75,4	63,7	17,3
Xuân BT7	5,3	160	8,0	19,0	59,3	54,3	-
CV(%)						1,2	
LSD _{0,05}						3,4	
Vụ Mùa SHPT15	5,3	140	12,0	24,0	62,7	61,4	18,5
Mùa BT7	5,3	150	10,0	18,3	52,4	51,8	-
CV(%)						2,0	
LSD _{0,05}						3,8	

P₁₀₀₀: Khối lượng 1000 hạt

NSTT: Năng suất thực thu

4. Kết luận

Bằng phương pháp MAS, dòng lúa SHPT15 đã được chọn lọc ở thể hệ BC₃F₆ từ tổ hợp lai BT7 và FL478 (mang locus gen *Saltol*) sau 9 vụ. Dòng lúa triển vọng SHPT15 đã được quy tụ thành công locus gen *Saltol* ở trạng thái đồng hợp tử, có khả năng chịu mặn đến 6‰ ở giai đoạn cây non trong 15 ngày. Dòng lúa SHPT15 có thời gian sinh trưởng ngắn, các đặc tính nông sinh học

chính tương đương so với BT7. Năng suất thực thu của SHPT15 vượt trội so với BT7. Trong điều kiện canh tác có sử dụng thuốc bảo vệ thực vật, dòng lúa triển vọng SHPT15 có mức độ kháng/nhiễm sâu bệnh hại chính ở mức tương đương BT7. Cần chú ý các biện pháp bảo vệ thực vật trong quá trình canh tác.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ từ đề tài “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật công nghệ sinh học trong chọn tạo giống lúa chịu mặn ứng phó biến đổi khí hậu tại Việt Nam” thuộc Chương trình Công nghệ Sinh học Nông nghiệp Thủy sản - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. D. T. Vu, T. Yamada, and H. Ishidaira, "Assessing the impact of sea level rise due to climate change on seawater intrusion in Mekong Delta, Vietnam," *Water Sci Technol*, vol. 77, no. 5-6, pp. 1632-1639, 2018.
- [2]. Ministry of Agriculture and Rural Development, *Decision no. 1224 QĐ/BNN-KHCN on approval of the crop varieties, technical solutions for the agricultural production in the Northern provinces*, 1998.
- [3]. T. X. Dinh, N. N. Hai, N. V. Vuong, and P. V. Thuyet, "Evaluation and screening of the distribution of rice varieties in Vietnam 2015 for the reconstruction of rice production," *The 3rd Proceed Crop Sci*, 2015, pp. 89-104.
- [4]. M. A. Rahman, M. J. Thomson, M. Shah-E-Alam, M. de Ocampo, J. Egdane, and A. M. Ismail, "Exploring novel genetic sources of salinity tolerance in rice through molecular and physiological characterization," *Ann Bot*, vol. 117, no. 6, pp. 1083-1097, 2016.
- [5]. Ministry of Agriculture and Rural Development, *QCVN 01-55: 2011/BNNPTNT - National standard of testing of cultivation and useable values in rice*, 2011.
- [6]. IRRI, *Standard evaluation system for rice*, 2002.
- [7]. G. C. Allen, M. A. Flores-Vergara, S. Krasynanski, S. Kumar, and W. F. Thompson, "A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide," *Nat Protoc*, vol. 1, no. 5, pp. 2320-2325, 2006.
- [8]. L. B. Gregorio, D. Senadhira, and R. D. Mendoza, "Screening rice for salinity tolerance," *IRRI Discussion Paper Series*, no. 22, pp. 1-15, 1997.