

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU NGẬP AS996-Sub1

Doãn Thị Hương Giang¹, Lưu Minh Cúc¹, Lê Huy Hàm¹

TÓM TẮT

Chỉ thị phân tử đã được ứng dụng rất nhiều trong lĩnh vực chọn tạo giống cây trồng, đặc biệt là cây lúa. Quần thể chọn giống được tạo ra từ việc lai tạo giữa giống lúa AS996 và giống lúa mang gen chịu ngập IR64-Sub1. QTL chịu ngập *Sub1*, giữ vai trò tới 70% tính chịu ngập. Sử dụng 400 chỉ thị để sàng lọc hai giống bố mẹ đã tìm được 71 chỉ thị SSR cho đa hình. Tiến hành chọn lọc các cá thể của quần thể lai trở lại trong thế hệ BC₁F₁, BC₂F₁ và BC₃F₁ bằng chỉ thị phân tử SSR đa hình để sàng lọc sự có mặt của QTL chịu ngập *Sub1* và nền gen giống nhận gen. Trong số 120 cá thể BC₁F₁, đã chọn được cá thể số 16 mang nền gen của giống AS996 là 80% (alen A), và mang kiểu gen dị hợp tử (alen H) đạt tỉ lệ 20% để phát triển tiếp quần thể lai trở lại. Trong số 128 cá thể BC₂F₁, đã chọn được cá thể số 5 mang nền gen của giống AS996 là 93,8% (alen A), và mang kiểu gen dị hợp tử (alen H) đạt tỉ lệ 6,2% để phát triển tiếp quần thể lai trở lại trong việc tạo thế hệ BC₃F₁ cho chọn giống. Trong số 132 cá thể BC₃F₁, đã chọn được cá thể số 56 với 98,9% nền di truyền của giống nhận gen AS996 và mang QTL *Sub1*. Cá thể số 56 của thế hệ BC₃F₁ được tự thụ tạo ra thế hệ BC₃F₂, BC₃F₃ để phát triển thành quần thể chọn giống trong các giai đoạn tiếp theo. Các dòng BC₃F₃ có đặc điểm nông sinh học tốt và có tính chịu ngập cao tiếp tục được chọn lọc để tạo giống lúa chịu ngập mới ASS996-Sub1 thích ứng với biến đổi khí hậu.

Từ khóa: Cây lúa, chọn giống, chỉ thị phân tử, chịu ngập, QTL *Sub1*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo đánh giá của Ủy ban Liên Chính phủ về biến đổi khí hậu (BĐKH), Việt Nam là một trong 5 nước bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi BĐKH. Chịu ảnh hưởng nặng nề do mực nước biển dâng sẽ kéo theo phần lớn đất màu mỡ nhất của Việt Nam sẽ bị ngập. Theo đó, sản lượng lúa có thể giảm đáng kể do mực nước biển dâng cao và sự thay đổi lượng mưa làm thay đổi thủy học ở các vùng đồng bằng (Wassmann *et al.*, 2004). Khi các vùng trồng lúa bị ngập lụt, khoảng 10% dân số Việt Nam sẽ bị ảnh hưởng trực tiếp, nhưng đặc biệt nghiêm trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long (lên tới 38,9%) (Hens *et al.*, 2018). Hiện tượng ngập úng là một vấn đề phổ biến của sản xuất nông nghiệp nước ta, riêng khu vực Đồng bằng sông Cửu Long hiện có khoảng 600.000 ha đất nông nghiệp bị ảnh hưởng của ngập úng thường xuyên (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2015). Đất nông nghiệp bị giảm và năng suất cây trồng giảm sẽ đặt ra những thách thức to lớn cho ngành nông nghiệp trong việc đảm bảo an ninh lương thực cho khoảng 98 triệu người Việt Nam (Dat *et al.*, 2019). Vì vậy, cải thiện khả năng chịu ngập của các giống lúa là yêu cầu cấp thiết trong điều kiện canh tác mới dưới tác động của hiện tượng biến đổi khí hậu toàn cầu. Mục tiêu của

nghiên cứu là ứng dụng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử liên kết qua các thế hệ lai trở lại (MABC) nhằm đưa QTL *Sub1* vào giống lúa AS996 mà vẫn giữ được phần lớn nền gen của giống AS996 để tạo giống chịu ngập thích hợp sinh thái vùng đồng bằng ven biển của Đồng bằng sông Cửu Long.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa nhận gen là giống AS996, ngắn ngày, chất lượng gạo trung bình, năng suất khá cao được trồng phổ biến ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Giống cho gen là giống IR64-Sub1 được nhập nội từ Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế, mang locus gen *Sub1*, là QTL chính chịu trách nhiệm tới 70% tính chịu ngập trong giống lúa. Tổng số 400 chỉ thị SSR được sử dụng để tìm chỉ thị cho đa hình giữa hai giống AS996 và IR64-Sub1 làm bố mẹ trong quần thể lai tạo. Các vật tư, hóa chất sinh học phân tử chuyên dụng của các hãng Sigma, Thermo và IDT (Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chọn giống MABC: AS996 được lai với IR64-Sub1 để thu hạt lai F₁. Thế hệ F₁ được lai trở lại với AS996 để thu hạt BC₁F₁, BC₂F₁ và

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

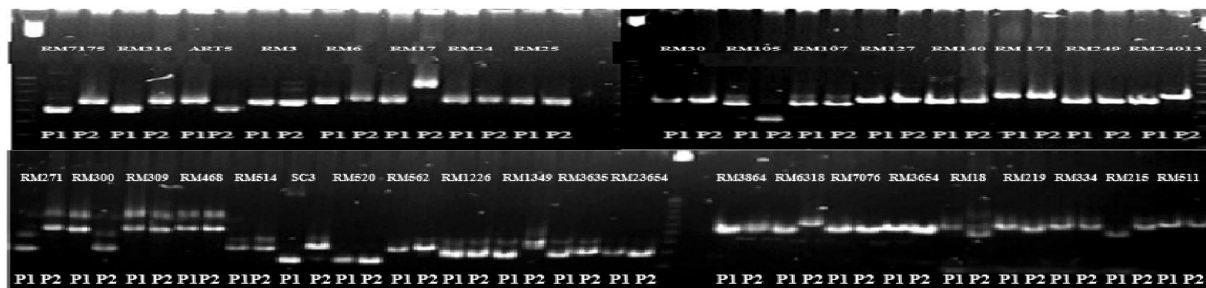
* Tác giả chính: E-mail: gianghd.nnvn@gmail.com

BC₃F₁. ADN của hai giống bố mẹ và các thế hệ con lai được tách chiết bằng phương pháp CTAB. Sử dụng 400 chỉ thị SSR để sàng lọc chỉ thị đa hình giữa hai giống bố mẹ, các chỉ thị cho đa hình được dùng để sàng lọc locut gen chịu ngập *Sub1* và chọn lọc nền di truyền ở các thế hệ chọn giống BC₁F₁, BC₂F₁ và BC₃F₁. Điện di trên gel polyacrylamide 6%, ghi nhận số liệu trên Excel. Phân tích số liệu kiểu gen bằng phần mềm Graphical Genotyper (GGT 2.0) (Van Berloo, 2008).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá đa hình các giống bố mẹ giữa giống cho và nhận gen kháng

Trong nghiên cứu này đã sử dụng tổng số 400 chỉ thị SSR rải rác trên 12 nhiễm sắc thể lúa để xác định các chỉ thị đa hình ADN giữa giống lúa AS996 và IR64-*Sub1*. Kết quả cho thấy, 71 chỉ thị SSR (chiếm 17,75%) cho đa hình giữa hai giống bố mẹ.



Hình 1. Kết quả kiểm tra chỉ thị phân tử SSR để tìm chỉ thị đa hình giữa giống lúa AS996 và IR64-*Sub1*

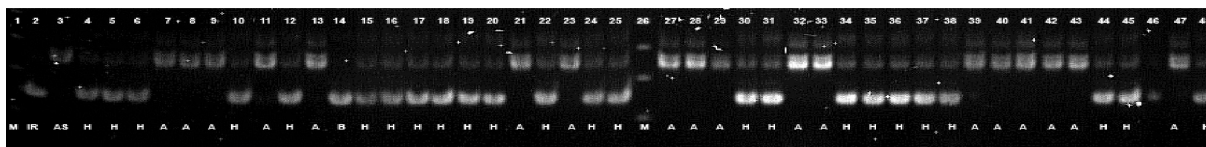
Ghi chú: Hàng chữ phía trên là tên các chỉ thị SSR được sử dụng, hàng chữ phía dưới P1: AS996, P2: IR64-*Sub1*.

3.2. Kết quả chọn lọc cá thể mang locut gen *Sub1* chịu ngập và nền di truyền giống AS996 trong quần thể BC₁F₁

Thế hệ F₁ đã được tạo ra khi tiến hành lai tạo giữa hai giống AS996 và IR64-*Sub1*. Các cá thể F₁ được đánh giá bằng hai chỉ thị ART5 và SC3 và xác định chính xác cây lai. Kiểm tra 22 cây lai F₁ cho thấy, cả 22 cây F₁ đều là cây lai khi mang băng dị hợp tử đối với 2 chỉ thị được dùng để kiểm tra. Tiến hành lai hồi giao các cá thể F₁ với AS996 để tạo

quần thể BC₁F₁, thu được 120 hạt lai BC₁F₁.

Để xác định những cá thể mang locus gen mục tiêu *Sub1* trong quần thể lai trở lại BC₁F₁, chúng tôi đã tiếp tục sử dụng 2 chỉ thị phân tử là SC3 và ART5, có liên kết chặt với locut gen mục tiêu *Sub1*. Kết quả trong tổng số 120 cá thể của quần thể BC₁F₁, đã xác định được 56 cá thể mang gen *Sub1*, có kiểu gen dị hợp tử (H) với hai chỉ thị dùng để sàng lọc là ART5 và SC3 (Hình 2 và 3).



Hình 2. Sàng lọc các cá thể của quần thể BC₁F₁ (AS996/IR64-*Sub1*) bằng chỉ thị ART5

Ghi chú: Làn gel 1, 26: thang chuẩn 25bp (M), Làn gel 2: IR64Sub1, Làn gel .3: AS996; Làn gel 4-25 và 27-48: các cá thể BC₁F₁ (A hoặc H).



Hình 3. Sàng lọc các cá thể của quần thể BC₁F₁ (AS996/IR64-*Sub1*) bằng chỉ thị SC3

Ghi chú: Làn gel 1-24 và 26-47: các cá thể BC₁F₁ (A hoặc H), Làn gel 48: AS996 (A), Làn gel 49: IR64-*Sub1* (B), Làn gel 50: thang chuẩn 25bp (M).

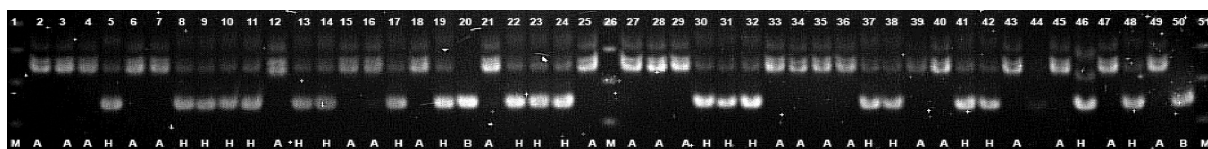
Các cá thể mang locut gen *Sub1* trong quần thể BC₁F₁ tiếp tục được phân tích kiểu gen với 71 chỉ thị phân tử đa hình trên 12 nhiễm sắc thể để đánh giá nền di truyền của từng cá thể ở thế hệ BC₁F₁. Kết quả phân tích kiểu gen của 56 cá thể BC₁F₁ mang locut gen *Sub1* với chỉ thị đa hình trên 12 nhiễm sắc thể được đọc và nhập vào phần mềm Excel và được phân tích qua phần mềm Graphical Genotypes 2.0 (GGT v. 2.0) nhằm tìm kiếm cá thể mang nền di truyền gần với giống AS996 nhất.

Trên quần thể BC₁F₁, khi đưa số liệu vào phân tích trong phần mềm GGT v. 2.0 cho thấy, phần mềm đã tính toán giá trị nền gen của giống AS996 trên cả quần thể là 75,5% (mang alen A), và số cá thể mang gen dị hợp tử (mang alen H) đạt tỉ lệ 24,5%, tương ứng như lý thuyết đã nêu. Trong số các cá thể BC₁F₁, đã chọn

được cá thể số 16 mang nền gen của giống AS996 là 80% (alen A), và mang kiểu gen dị hợp tử (alen H) đạt tỉ lệ 20% để phát triển tiếp quần thể lai trở lại trong việc tạo thế hệ BC₂F₁ cho chọn giống.

3.3. Kết quả chọn lọc cá thể mang locut gen *Sub1* chịu ngập và nền di truyền giống AS996 trong quần thể BC₂F₁

Từ cá thể BC₁F₁ số 16, thế hệ BC₂F₁ được tạo ra gồm có 128 cá thể. Tách chiết ADN của các cá thể BC₂F₁ và tiến hành xác định kiểu gen của các cây ngay từ giai đoạn sớm của cây. Phân tích kiểu gen với hai chỉ thị phân tử liên kết locut gen *Sub1* là ART5 và SC3. Kết quả thu được 62 cá thể mang locut gen *Sub1*, thể hiện bằng kiểu gen dị hợp tử với cả hai chỉ thị này.



Hình 4. Sàng lọc các cá thể của quần thể BC₂F₁ (AS996/IR64-*Sub1*) bằng chỉ thị ART5

Ghi chú: Làn gel 1, 51: thang chuẩn 25bp (M), Làn gel 2-25 và 27-48: các cá thể BC₂F₁ (A hoặc H), Làn gel 49: AS996 (A); Làn gel 50: IR64-*Sub1* (B).



Hình 5. Sàng lọc các cá thể của quần thể BC₂F₁ (AS996/IR64-*Sub1*) bằng chỉ thị SC3

Ghi chú: Làn gel 1. AS996 (A); Làn gel 2. IR64-*Sub1* (B); Làn gel 3, 28: thang chuẩn 25bp (M); Làn gel 4-27 và 29-50: các cá thể BC₂F₁ (A hoặc H).

Tiếp tục chọn lọc các cá thể vừa mang locut gen mục tiêu *Sub1*, vừa mang nền di truyền gần nhất với giống lúa AS996. Tất cả 62 cá thể BC₂F₁ mang locut gen *Sub1* được tiếp tục phân tích kiểu gen bằng 71 chỉ thị phân tử đa hình trên 12 nhiễm sắc thể. Kết quả đánh giá nền di truyền được xử lý trên phần mềm GGT v. 2.0 để chọn lọc cá thể mang nền di truyền gần nhất với giống AS996.

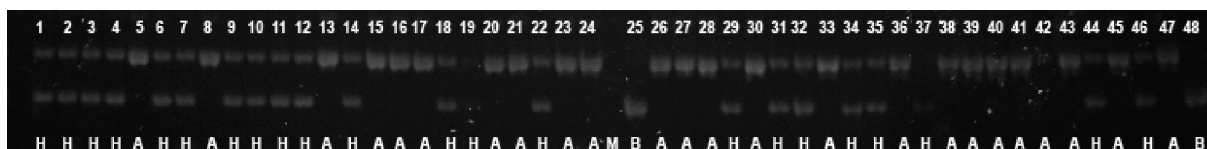
Trên quần thể BC₂F₁, khi đưa số liệu vào phân tích trong phần mềm GGT v. 2.0 cho thấy, giá trị nền gen của giống AS996 trên cả quần thể là 88,1% (mang alen A), và số cá thể mang gen dị hợp tử (mang alen H) đạt tỉ lệ 11,9%.

Trong số các cá thể BC₂F₁, đã chọn được cá thể số 5 mang nền gen của giống AS996 là 93,8% (alen A), và mang kiểu gen dị hợp tử (alen H) đạt tỉ lệ 6,2% để

phát triển tiếp quần thể lai trở lại trong việc tạo thế hệ BC₃F₁ cho chọn giống. Hình 6 và hình 7 là những kết quả được phân tích trên phần mềm GGT phân tích nền di truyền cá thể BC₂F₁ số 5.

3.2.3. Kết quả chọn lọc cá thể mang locut gen *Sub1* chịu ngập và nền di truyền giống AS996 trong quần thể BC₃F₁

Từ cá thể BC₂F₁ số 5, lai trở lại với AS996 để tạo ra được 132 cá thể BC₃F₁. Tách chiết ADN của các cá thể BC₃F₁ và tiến hành xác định kiểu gen của các cây ở giai đoạn sớm của cây. Phân tích kiểu gen BC₃F₁ với hai chỉ thị phân tử liên kết locut gen *Sub1* là ART5 và SC3. Kết quả thu được 58 cá thể mang locut gen *Sub1*, thể hiện bằng kiểu gen dị hợp tử với cả hai chỉ thị này.



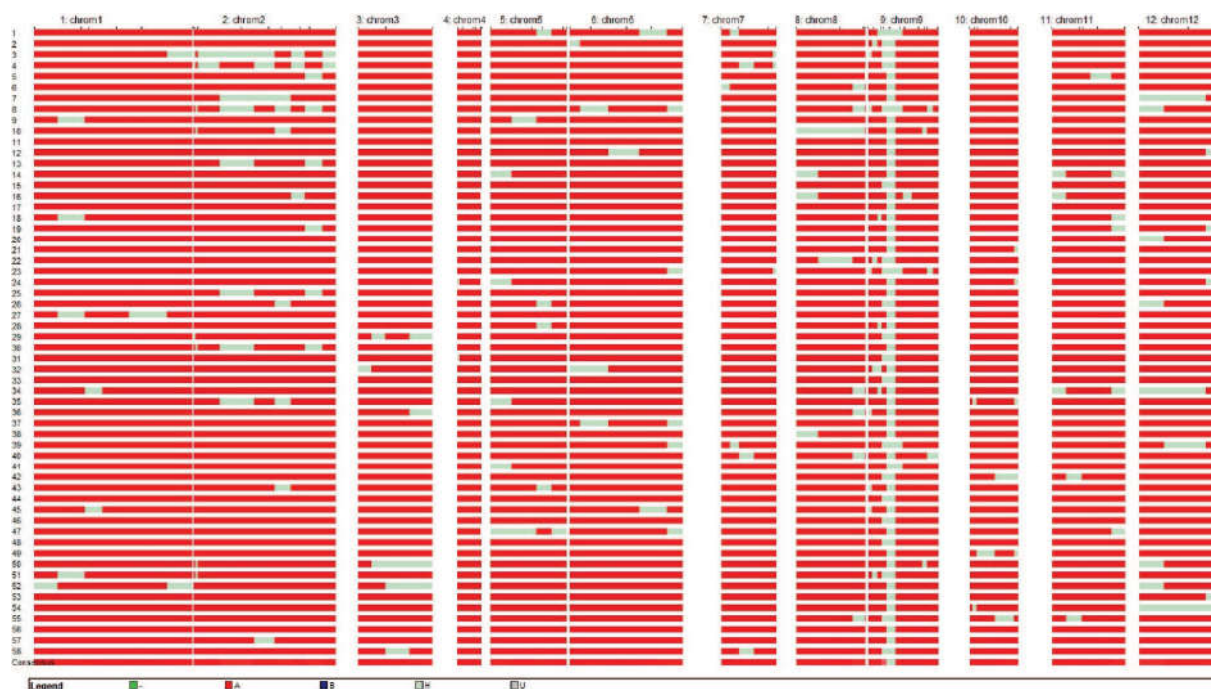
Hình 6. Sàng lọc các cá thể của quần thể BC_3F_1 (AS996/IR64-Sub1) bằng chỉ thị ART5

Ghi chú: Làn gel 1-24 và 25-46: các cá thể BC_2F_1 (A hoặc H); Làn gel 47: AS996 (A); Làn gel 48: IR64-Sub1 (B).



Hình 7. Sàng lọc các cá thể của quần thể BC_3F_1 (AS996/IR64-Sub1) bằng chỉ thị SC3

Ghi chú: Làn gel 1-25 và 26-47: các cá thể BC_2F_1 (A hoặc H); Làn gel 48: AS996 (A), Làn gel 49: IR64-Sub1 (B).



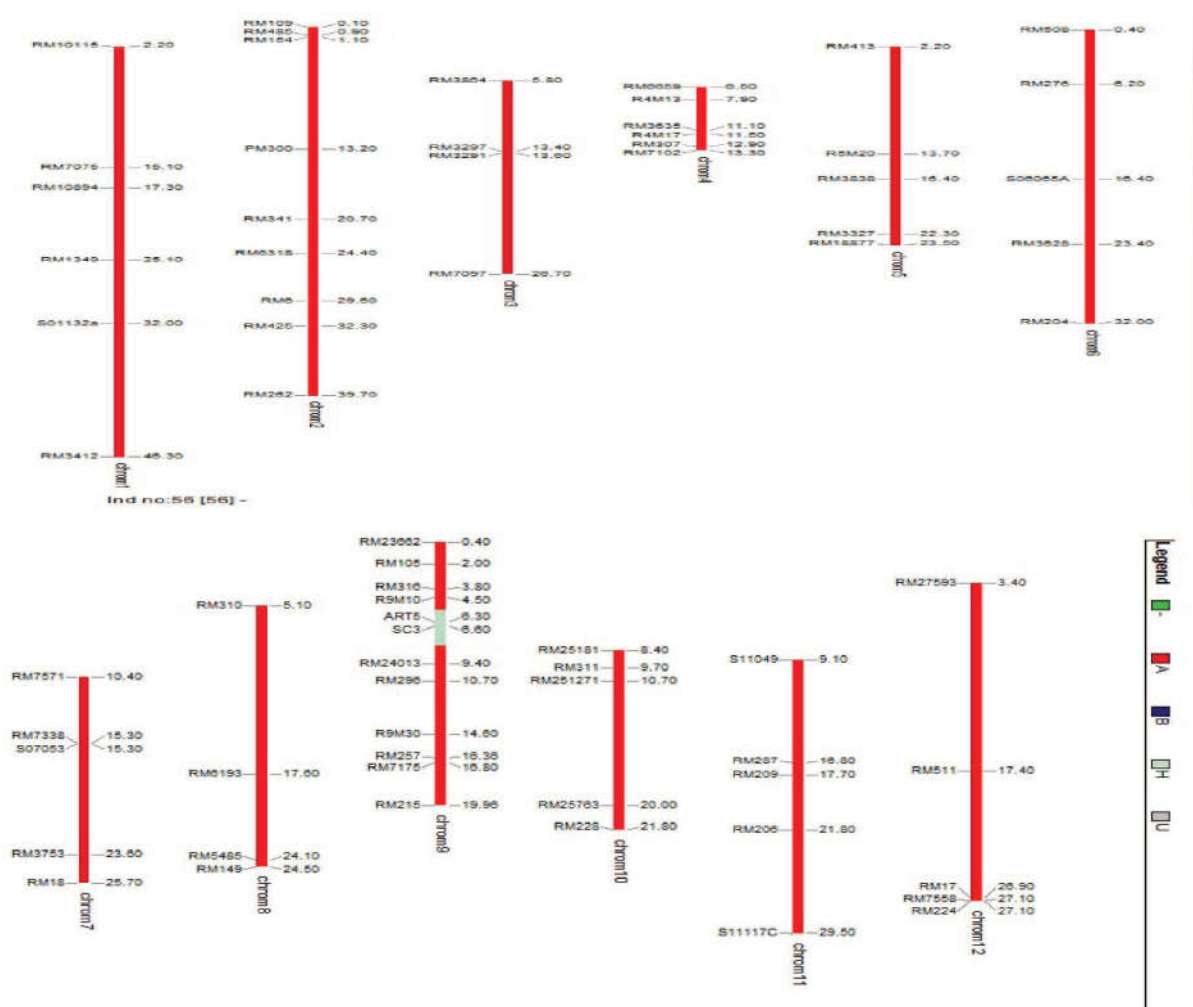
Hình 8. Kết quả phân tích nền di truyền 58 cá thể BC_3F_1 bằng phần mềm GGT v. 2.0

Ghi chú: Phía trên là số thứ tự nhiễm sắc thể; số phía bên trái là số thứ tự cá thể BC_3F_1 kiểm tra nền di truyền, phân biểu thị màu đỏ là nền di truyền AS996, phần xanh là dị hợp tử. Đơn vị bản đồ: cM.

Tương tự như với quần thể BC_1F_1 và BC_2F_1 , tiếp tục chọn lọc các cá thể vừa mang locut gen mục tiêu *Sub1*, vừa có nền di truyền gần nhất với giống lúa AS996. Tất cả 58 cá thể BC_3F_1 mang locut gen *Sub1* được tiếp tục phân tích kiểu gen với 71 chỉ thị phân tử đa hình trên 12 nhiễm sắc thể. Kết quả đánh giá nền di truyền được xử lý trên phần mềm GGT v. 2.0 để chọn lọc cá thể mang nền di truyền gần nhất với giống AS996.

Trên quần thể BC_3F_1 , khi đưa số liệu vào phân tích trong phần mềm GGT v. 2.0 cho thấy, giá trị nền gen của giống AS996 trên cả quần thể là 93,9% (mang alen A), và số cá thể mang gen dị hợp tử (mang alen H) đạt tỉ lệ 6,1%.

Trong số các cá thể BC_3F_1 , đã chọn được cá thể số 56 mang nền gen của giống AS996 là 98,9% (alen A), và mang kiểu gen dị hợp tử (alen H) đạt tỉ lệ 1,1% để phát triển tiếp quần thể chọn giống.



Hình 9. Kết quả phân tích di truyền cá thể BC₃F₁ số 56 bằng phần mềm GGT 2.0

Ghi chú: Bản đồ vị trí và kiểu gen của 71 chỉ thị SSR trên 12 nhiễm sắc thể của cá thể BC₃F₁ số 56. Phần biểu thị màu đỏ (A) là nền di truyền AS996, phần xanh là dị hợp tử (H). Đơn vị bản đồ: cM.

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng 400 chỉ thị để sàng lọc hai giống lúa AS996 và IR64-Sub1 sử dụng làm bố mẹ đã tìm được 71 chỉ thị SSR cho đa hình. Đã sử dụng 71 chỉ thị đa hình để sàng lọc các thế hệ quần thể hồi giao BC₁F₁ đến BC₃F₁ nhằm chọn được các cá thể mang gen kháng và có tối đa nền di truyền của giống nhận gen. Sau ba thế hệ lai trở lại, việc ứng dụng chỉ thị phân tử và lai trở lại đã tạo ra cá thể BC₃F₁ tốt nhất với 98,9% nền di truyền của giống nhận gen AS996 và mang locut gen Sub1 khi đánh giá bằng 2 chỉ thị phân tử ART5 và SC3.

Cây BC₃F₁ số 56 được tự thụ tạo thế hệ BC₃F₂, BC₃F₃ để phát triển thành quần thể chọn giống trong các giai đoạn tiếp theo. Các dòng BC₃F₃ có đặc điểm nông sinh học tốt và có tính chịu ngập cao tiếp

tục được chọn lọc để tạo giống lúa chịu ngập mới ASS996-Sub1 thích ứng với biến đổi khí hậu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2015. Dự thảo 3, Kế hoạch hành động ứng phó với biến đổi khí hậu của ngành nông nghiệp, nông thôn giai đoạn 2016 - 2020, tầm nhìn đến 2050.
- Dat, T.T., Trung, D.D. and Thu, V.T.H., 2019. The Impact of Climate Change on Viet Nam's Economy, National Economics University, Hanoi.
- Hens, L., Thinh, N. A., Hanh, T. H., Cuong, N. S., Lan, T. D., Thanh, N. V., & Le, D. T., 2018. Sea-level rise and resilience in Vietnam and the Asia-Pacific: A synthesis. *Vietnam Journal of Earth Sciences*, 40 (2): 126-152. <https://doi.org/10.15625/0866-7187/40/2/11107>.

Van Berloo R., 2008. GGT 2.0: Versatile software for visualization and analysis of genetic data. *Journal of Heredity*, 99 (2): 232-236, <https://doi.org/10.1093/jhered/esm109>.

Wassmann, R., Hien, N. X., Hoanh, C. T., Tuong, T. P., 2004. Sea Level Rise Affecting the Vietnamese Mekong Delta: Water Elevation in the Flood Season and Implications for Rice Production. *Climatic Change*, 66 (1): 89-107.

Application of molecular markers in breeding of submergence-tolerant rice variety AS996-Sub1

Doan Thi Huong Giang, Luu Minh Cuc, Le Huy Ham

Abstract

Molecular markers have been widely applied in the field of plant breeding, especially in rice breeding. The breeding population was created by crossing two rice varieties, including AS996 and IR64-Sub1 carrying submergence-tolerant gene. QTL *Sub1*, which plays a role of up to 70% of the submergence tolerance. 71 SSR markers were found to be polymorphic among 400 studied markers for screening two parent breeds. The polymorphic SSR makers were used to select individuals of the backcross population in the BC₁F₁, BC₂F₁ and BC₃F₁ generations for screening the presence of QTL *Sub1* and genetic background. The individual number 16 with 80% of AS996 genetic background (A allele), and 20% heterozygous genotype (H allele) was selected among 120 BC₁F₁ individuals for further development of backcross population. The individual number 5 with 93.8% of AS996 genetic background (A allele), and 6.2% heterozygous genotype (H allele) was selected among 128 BC₂F₁ individuals for developing the BC₃F₁ generation. The individual number 56 with 98.9% genetic background of the variety AS996 and carrying the QTL *Sub1* was selected among 132 individuals in the BC₃F₁ generation. The line number 56 of BC₃F₁ was self-pollinated to create the BC₃F₂, BC₃F₃ generations which are used for population selection in the next stages. The BC₃F₃ lines with good agro-biological characteristics and high submergence tolerance continue to be selected for creating a new submergence-tolerant rice variety ASS996-Sub1 adapted to climate change.

Keywords: Rice, breeding, molecular marker, submergence tolerance, QTL *Sub1*

Ngày nhận bài: 27/10/2021

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

Ngày phản biện: 15/11/2021

Ngày duyệt đăng: 30/11/2021

ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA MỘT SỐ DÒNG TỰ PHỐI Ý DĨ (*Coix lacryma-jobi*)

Trịnh Văn Vượng¹, Nguyễn Văn Tâm¹, Nguyễn Thị Hương¹, Tô Thị Ngân¹, Trần Thị Lan¹, Nguyễn Văn Khiêm^{1*}

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, đặc điểm sinh trưởng, phát triển và năng suất của 10 dòng ý dĩ tạo ra bằng tự phối qua ba thế hệ S1, S2 và S3 đã được đánh giá tại huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc trong các vụ Xuân Hè từ tháng 01 năm 2019 đến tháng 10 năm 2021. Thí nghiệm được bố trí tuần tự không nhắc lại, diện tích ô thí nghiệm là 30 m²/dòng. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy các giai đoạn sinh trưởng, phát triển, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của các dòng tự phối tạo ra có sự thay đổi trong các thế hệ. Các dòng có tiềm năng năng suất lý thuyết, thực thu cao và ổn định qua 3 thế hệ là Cx2.1.1, Cx8.1.1, Cx9.1.1. Kết quả nghiên cứu thu được là tiền đề cho phát triển các dòng ý dĩ thuần phục vụ chọn tạo giống ý dĩ năng suất cao trong tương lai.

Từ khóa: Ý dĩ, sinh trưởng, phát triển, tự phối

¹ Viện Dược Liệu

* Tác giả chính: E-mail: ngvankhiem@yahoo.com