

CHỌN DÒNG VÀ ĐÁNH GIÁ CÁC DÒNG LÚA ƯU TÚ THEO MỤC TIÊU CHỊU MẶN VÀ HÀM LƯỢNG AMYLOSE THẤP

Nguyễn Trọng Phước¹, Nguyễn Thị Lang¹, Trần Thị Thanh Xà¹,
Nguyễn công Trứ¹, Bùi Chí Bửu²

¹ Viện Lúa ĐBSCL, ² Viện Khoa học Nông nghiệp miền Nam

TÓM TẮT

Sàng lọc 200 dòng BC2F2 từ quần thể OM7347/OM5629//OM7347 đã được phát triển tại Viện lúa ĐBSCL và đánh giá mức độ phản ứng chống chịu mặn với ba nồng độ muối khác nhau EC=0 dS/m, 8 dS/m, 15 dS/m trên ba giai đoạn: giai đoạn mạ; giai đoạn sinh thực; giai đoạn trổ hoa và đồng thời sau đó tiếp tục đánh giá tính trạng hàm lượng amylose của các dòng này để có thể giúp và đánh giá loại dần các dòng không chống chịu mặn và hàm lượng amylose cho các dòng lai hồi giao. Khả năng phản ứng với mặn của giống lúa có sự khác biệt rất lớn. Tuy nhiên xét về sự sinh trưởng phát triển của các dòng cho thấy: nồng độ muối càng cao thì ngày sống sót càng thấp, phần trăm giảm dần với nồng độ EC= 15ds/m.

Các dòng sau khi đánh giá amylose và mặn cũng được xác định lại yếu tố di truyền thông qua chỉ thị phân tử. Ba chỉ thị phân tử RM3252-S1-1 và WX 1 được đánh giá liên kết với kiểu gen mặn và hàm lượng amylose theo thứ tự cũng được đánh giá và phân tích. Kết quả đều ghi nhận có sự liên kết giữa kiểu hình và kiểu gen. Các dòng từ tổ hợp OM7347/OM5629//OM7347 chọn được chỉ 1 dòng (S1-D1) và 2 dòng từ tổ hợp OM7347/OM5629//OM7347 mang S2-D1 và S2-D2. Các dòng này có thể đưa thử nghiệm trên vùng đất nhiễm mặn giới hạn nồng độ mặn từ 4-5-4‰ để đánh giá năng suất và thành phần năng suất phục vụ cho chương trình nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: amylose, mặn, giai đoạn mạ, kiểu gen, kiểu hình

I. MỞ ĐẦU

Tình trạng của lúa là cây trồng hình mẫu và việc giải trình tự của bộ gen *indica* và *japonica* đã cung cấp cho các nhà lai tạo với các công cụ thiết yếu để chọn giống với sự hỗ trợ marker. Marker SSR (Simple Sequence Repeat) thì sẵn có dễ dàng cho bất kỳ vùng nào đó của bộ gen, và các marker gen ứng viên đang được phát triển nhanh chóng. Các mục tiêu có khả năng của MAS bao gồm năng suất và đặc điểm nông học, phẩm chất cơm và chất lượng dinh dưỡng, và kháng với stress phi sinh học và sinh học. Phát triển nhiều giống chống chịu ngập là một ví dụ hay về việc làm thế nào phương pháp MAB có thể đưa đến kết quả cải thiện đáng kể nhiều giống trong vòng từ hai đến ba năm. Việc sử dụng các marker trong vườn ươm nhân giống truyền thống bị hạn chế bởi chi phí nhưng đang bắt đầu được áp dụng đối với một số tính trạng như chất lượng hạt. Phương pháp marker chi phí thấp kết hợp với phát hiện gen quy mô lớn sẽ làm gia tăng sử dụng MAS trong thập kỷ tới (Mackill 2007).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Địa điểm thí nghiệm

Trồng và thí nghiệm lai hồi giao được thực hiện tại Viện lúa ĐBSCL Marker assisted selection (MAS) được tiến hành tại Phòng Sinh học Phân tử của công ty Công Nghệ Sinh học PCR Cần Thơ và cho tất cả thể hệ lai hồi giao. Sau khi đạt được thể hệ BC2F1, các dòng chọn lọc sẽ được tự thụ để xác định các cá thể đồng hợp (BC2F2) có mang gene mục tiêu bằng phương pháp MAS

2.2. Kiểu gene lúa được dùng trong thí nghiệm

Các dòng BC nguồn gốc lai từ OM7347/OM5629 được sử dụng như cá thể cho gene của QTL liên quan đến khả năng chịu hạn và hàm lượng amylose thấp. Quá trình chọn lọc dựa vào kiểu hình tốt của các dòng về tính trạng nông học và sinh lý được đánh giá tại Viện lúa ĐBSCL. đã mô tả các thiết kế thí nghiệm, điều kiện phát triển, đánh giá và đo lường các tính trạng. Nghiên cứu này được tiến hành với thời gian ra hoa của các dòng thí nghiệm đã được đồng bộ bằng cách trồng so le và các dòng này có mức độ nước tưới khác

nhau bằng dòng nước. Thanh lọc mận: *Thanh lọc mận theo* Gregorio 1997. *Phương pháp cải tiến* (Nguyễn Thị Lang và ctv, 2001).

2.3. Đánh giá kiểu gen theo Lang 2002

2.3.1. Kết quả kiểm tra chất lượng DNA

Các mẫu DNA của tổ hợp OM7347/OM5629 được kiểm tra chất lượng trên môi trường agarose gel 0,9% trong TAE 1X.

Sau khi điện di xong, nhuộm gel với Ethidiumbromide, rồi đem gel vào máy chụp dưới tia UV.

2.3.2. Sản phẩm phản ứng PCR với marker SSR

Phản ứng được tiến hành với các mẫu dựa trên DNA thu được từ các mẫu lá các dòng lúa đã ly trích. Phản ứng PCR được tiến hành với 4 SSR marker. Sản phẩm khuếch đại được

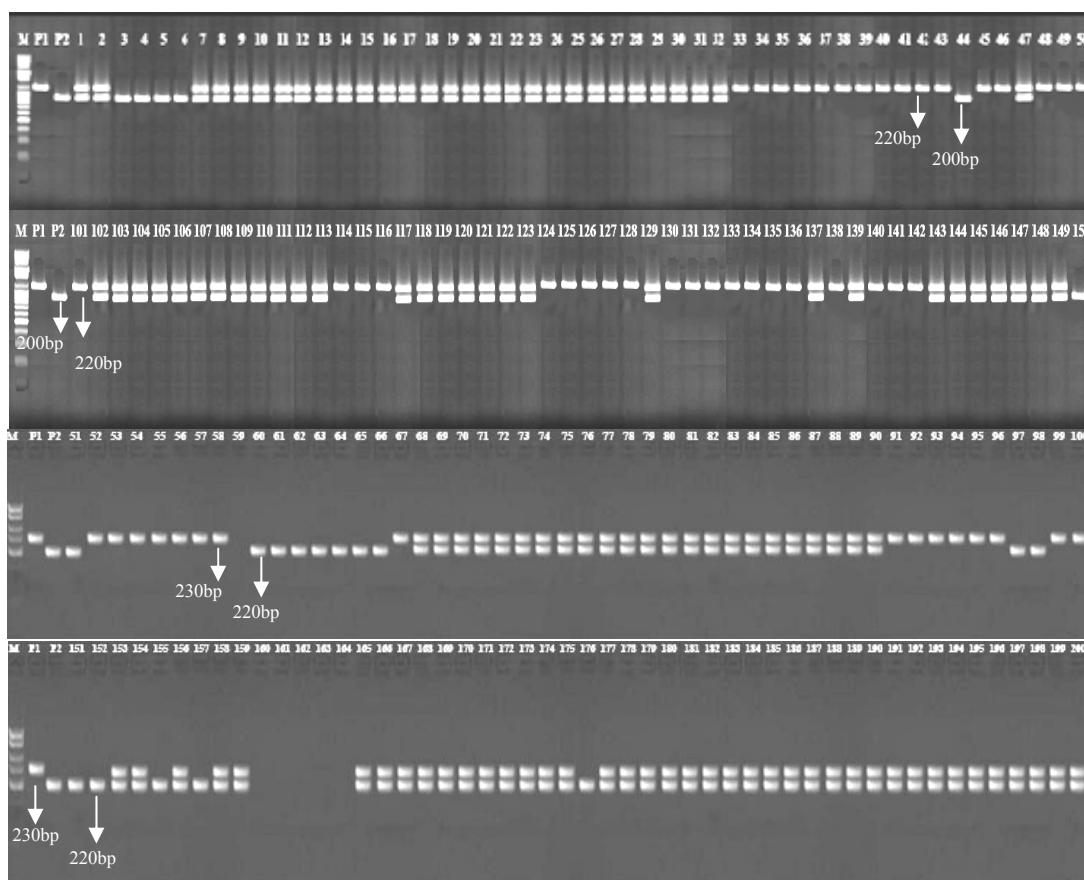
tạo ra từ những primer này được điện di trên gel agarose 3% với đệm TBE 1X, sau đó đem nhuộm Ethidiumbromide, sản phẩm tạo thành sẽ thể hiện trên băng hình gel chụp dưới tia UV.

Xác định dòng cho gene và thể hệ của các dòng chuyển gene bằng phương pháp lai hồi giao và phương pháp MAS

Trong mỗi thể hệ hồi giao, marker chọn lọc trong vùng được sử dụng để thúc đẩy chọn lọc dòng mang QTL của tính trạng mục tiêu. Các marker được sử dụng trong MAS như sau:

Chỉ tiêu 1: WX (marker chỉ định hàm lượng amylose thấp trên nhiễm sắc thể số 8)

Chỉ tiêu 2: chỉ thị RM 3252-S1-1 (cho QTLs chịu mặn trên nhiễm sắc thể số 1) cho gen chống chịu mặn.



Hình 1. Sản phẩm PCR của chỉ thị phân tử Wx trên 200 dòng liên kết với gene hàm lượng amylose thấp trên nhiễm sắc thể số 6 trên gel agarose.

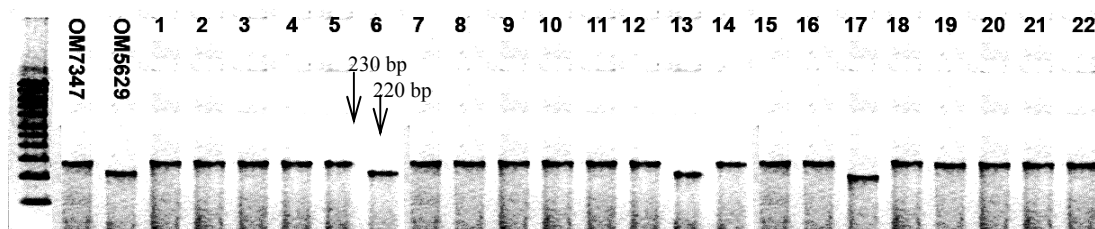
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá kiểu gen trên chỉ thị phân tử Wx nằm trên nhiễm sắc thể số 6. với chỉ thị này sản phẩm cho sản phẩm khuếch đại DNA là 97%. Sản phẩm khuếch đại cho đa hình với hai kích thước phân tử khác nhau là 200 bp với 220 bp.

Quần thể OM7347/OM5629//OM7347 hai giống này quy tụ cả gen chống chịu khô hạn và mặn được đánh dấu cho đa hình trên chỉ thị Wx kết quả với 200 cá thể BC2F1 ghi nhận và tìm sự liên kết đa hình trên chỉ có 22 cây

cho phản ứng đa hình và đồng hợp tử mang gen cùng band với bố mẹ trên giống OM7347 và OM5629.

Tương tự trên tổ hợp OM7347/OM5629//OM7347 đã chọn 22 cây mang hàm lượng amylose thấp. Tiếp tục chọn 22 dòng này đánh giá tiếp tục cho đánh giá với chỉ thị RM 3252-S1-1. Ghi nhận kết quả cho thấy chỉ có 3 cây ghi nhận có mang gen chống chịu mặn là: cây số 6, 13 và số 17.



Hình 2. Sản phẩm PCR của chỉ thị phân tử RM 3252-S1-1 trên 22 dòng liên kết với gene kháng trên nhiễm sắc thể số 1, vị trí hai băng 220bp và 230bp, trên gel Acrylamide và nhuộm bạc.
Ghi chú: M: là marker chuẩn

Như vậy trong 22 dòng mang gen hàm lượng amylose thấp trên quần thể OM7347/OM5629//OM7347 đã chọn 3 dòng vừa mang gen mặn là dòng số 6, 13 và số 17. Tuy nhiên, so sánh với kiểu hình của hàm

lượng amylose có ba dòng tương ứng với gen mặn và hàm lượng amylose đó là dòng số 6 S 2-A 2 (BC2F2-51); dòng S2- A 2 (BC2F2 - 155 và dòng S2-A 2 (BC2F2-162). Tiếp tục chọn hai dòng này để chọn lọc tiếp thế hệ sau.

Bảng 1. So sánh kết quả đánh giá kiểu hình và kiểu gen cho gen chống chịu mặn và hàm lượng amylose thấp

STT	Mã dòng	Hàm lượng amylose	Chống chịu mặn	RM 3252-S1-1	WX	Kết quả
P1	OM7347	18,76	S	S	Thấp	-
P2	OM5629	24,28	T	T	TB	-
1	BC2F2-3	17,8	S	S	Thấp	-
2	BC2F2-4	16,8	S	S	Thấp	-
3	BC2F2-5	19,28	S	S	Thấp	-
4	BC2F2-6	19,25	S	S	Thấp	-
5	BC2F2-44	19,63	S	S	Thấp	-
6	BC2F2-51	19,4	T	T	Thấp	Mang hai gen mặn và hàm lượng amylose thấp

Bảng 2. So sánh kết quả đánh giá kiểu hình và kiểu gen cho gen chống chịu mặn và hàm lượng amylose thấp (tt)

STT	Mã dòng	Hàm lượng amylose	Chống chịu mặn	RM 3252-S1-1	WX	Kết quả
7	BC2F2-60	25,5	T	T	Cao	-
8	BC2F2-61	19,25	S	S	Thấp	-
9	BC2F2-62	24,42	S	S	TB	-
10	BC2F2-63	19,7	S	T	Thấp	-
11	BC2F2-64	21,23	S	S	TB	-
12	BC2F2-65	24,6	S	S	TB	-
13	BC2F2-66	23,68	S	S	Thấp	-
14	BC2F2-150	20,56	S	S	TB	-
15	BC2F2-151	19,18	S	S	Thấp	-
16	BC2F2-152	23,1	T	T	TB	-
17	BC2F2-155	16,25	T	T	Thấp	Mang hai gen mặn và hàm lượng amylose thấp
18	BC2F2-161	17,26	S	S	Thấp	-
19	BC2F2-162	23,79	T	S	TB	Mang hai gen mặn và hàm lượng amylose thấp
20	BC2F2-163	16,25	S	S	Thấp	-
21	BC2F2-164	17,26	S	S	Thấp	-
22	BC2F2-164	17,26	S	S	Thấp	-

Ghi chú: TB: trung bình, T: chống chịu, S: mặn cảm



Hình 3: Dòng chống chịu mặn và hàm lượng amylose thấp

IV. KẾT LUẬN

Qua chọn lọc quần thể OM7347/OM5629//OM7347 có ba dòng S 2-A 2 (BC2F2-51); dòng S2- A 2 (BC2F2 -155 và dòng S2-A 2 (BC2F2-162) mang cả hai gen mặn và hàm lượng amylose thấp trên hai chỉ thị RM3252-S1-1 và Wx. Các dòng này sẽ được đánh giá và chọn lọc các thế hệ tiếp theo để đánh giá về độ thuần các tính trạng khác.

V. ĐỀ NGHỊ

Đánh giá tiếp tục về năng suất và thành

phần năng suất của các dòng triển vọng.

Trong 22 dòng từ được trồng tiếp tục và thanh lọc ngoài đồng. Hầu hết các giống chết hoàn toàn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Gregorio, G.B., Senadhira, D., Mendoza, R.D., 1997. Screening rice for salinity tolerance, IRRI Discussion paper Series No.22. International Rice Research Institute, Los Baños. Laguna, Philippines.

2. IRRI, 1996. *Standard evaluated for germplasm in rice*. Note book, Philippines.
3. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Những phương pháp cơ bản trong công nghệ sinh học*. NXB Nông nghiệp, TP.HCM
4. Nguyen Thi Lang, Seiji, Yanhanagihara and Bui Chi Buu, 2001a. A microsatellite marker for a gene conferring salt tolerance on rice at the vegetative and reproductive stages. SABRAO: Breeding & genetic 1-10.
5. Nguyen Thi Lang, Seji Yanagihara and Bui Chi Buu (2001b), *QTL analysis of salt tolerance in rice*. SABRAO Journal of Breeding.
6. Nguyễn Thị Lang, Hoàng Thị Ngọc Minh, 2006. Đánh giá khả năng chống chịu mặn của các giống lúa ngắn ngày. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn: 24: 32-36.
7. Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu, 2004. Nghiên cứu di truyền cho gen kháng mặn trên quần thể trồng dòn của cây lúa. Nông Nghiệp và phát triển Nông thôn (6: 824-826).
8. Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu, 2011a. Kết quả chọn tạo giống lúa thơm chống chịu khô hạn OM 7347. Tạp chí khoa học và Công nghệ số 2 tháng 12 “ 2011/24-29
9. Nguyễn Thị Lang, Bùi Phước Tâm, Phạm Thị Chúc Loan, Nguyễn Trọng phước, Trần Bảo Toàn, Bùi Chí Bửu, Abdelbagi M. Smail. Glenn Gregorio, russell Reinke, Reiner Wassmann, 2014. Sàng lọc gen chống chịu mặn trên bộ giống ngắn ngày ở giai đoạn mạ. Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn , T.4 trang 19-29
10. Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. & Bonierbale, M.B., 1989. RFLP mapping in plants: new tools for an old science. *Biol. Tech.*, 7: 257-264.

ABSTRACT

Rice breeding for salt tolerance with low amylose content

The 200 progenies of BC₂F₂ population from OM7347/OM5629//OM7347 have been screened for salt stress at Cuulong Delta Rice Research Institute. The screening was conducted in Yoshida solution plus NaCl of different treatments as EC=0 dS/m, 8 dS/m, and 15 dS/m on three stages: seedling; vegetative and flowering. Amylose content was also evaluated among selected progenies. Response to salt stress of rice genotypes was significantly different. The higher salt concentration, the lower survival day was noticed, particularly at EC= 15ds/m. After evaluating salt tolerance of rice lines, they were also identified genetic factor *via* molecular markers. Two microsatellites as RM3252-S1-1 and WX closely associated to salt tolerance and amylose content, respectively. These markers were assessed their accuracy of >90% between genotype and phenotype comparison. The selected lines from the marker-assisted backcrossing of OM7347/OM5629 were pinpointed as S2-A2 (BC₂F₂-51); S2-A2 (BC₂F₂ -155) and S2-A2 (BC₂F₂-162). They exhibited their agronomical traits according to the breeding objective (EC=4 dS/m, SD = 15-20 days at seedling stage, low amylose). They would be sent to national rice testing program for next study.

Keywords: EC (electric conductivity), reproductive stage, salt tolerance, seedling stage, survival day (SD)

Người phản biện: TS. Nguyễn Trọng Khanh