

***NÔNG NGHIỆP - THỦY SẢN*****ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP LAI HỒI GIAO KẾT HỢP VỚI  
CHỈ THỊ PHÂN TỬ ĐỂ PHÁT TRIỂN CÁC GIỐNG LÚA CHỊU MẶN  
CHO VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG*****(Utilization of backcrossing breeding method via molecular markers for  
developing of salinity tolerance rices (Oryza sativa) for the Mekong Delta)*****BÙI HỮU THUẬN<sup>1\*</sup>, NGUYỄN THỊ LANG<sup>2</sup>*****Tóm tắt***

**P**hát triển những giống lúa chịu mặn, hiệu suất cao và phẩm chất tốt là yêu cầu cần thiết cho sản xuất lúa của vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Nghiên cứu này áp dụng phương pháp lai hồi giao dùng với chỉ thị phân tử để tìm và phát triển các giống lúa mới có khả năng chịu mặn ở giai đoạn mạ và giai đoạn sinh sản.

Giống có gene chịu mặn đã được khai thác đưa vào thành công ở các giống lúa năng suất cao qua chương trình lai tạo. Qua các thế hệ lai, các dòng chịu mặn sẽ tiếp tục phát triển để được đánh giá trên đồng ruộng ở các giai đoạn sinh trưởng phát triển, để tuyển chọn ra các dòng ưu tú cho chương trình lai tạo.

Nghiên cứu này đã tạo, chọn được các giống lúa tốt, chịu mặn 4‰ ở giai đoạn mạ, chịu được 2‰ ở giai đoạn sinh sản, có năng suất cao, phẩm chất tốt... đạt các yêu cầu sản xuất.

**Từ khóa:** lai hồi giao, lúa chịu mặn, đất nhiễm mặn

***Abstract***

The development of rice cultivars with salinity tolerance, high yield, and good quality is a very essential demand for rice production in the Mekong Delta. This study used backcrossing breeding methods via molecular marker for finding and developing new rice lines that were tolerant of salinity at the seedling and reproductive stages

The typical tolerant genotype was successfully exploited into high-yielding rice cultivars via breeding programs. Through generation, the salt tolerant lines will continue to grow to be evaluated in the field evaluated vegetative and growth stages, and be taken some elite lines varieties into breeding programs.

This study found down the good lines that were tolerant of 4‰ salinity at the seedling stage and 2‰ salinity at the reproductive stage with high yield, good quality... to meet the needs of the production.

**Key words:** back cross breeding, salinity soil, salinity tolerance rice

<sup>1</sup> Trường Đại học Cửu Long

<sup>2</sup> Viện nghiên cứu nông nghiệp công nghệ cao Đồng Bằng Sông Cửu Long (HATRI)

\* Người chịu trách nhiệm về bài viết: Bùi Hữu Thuận (Email: Buihuuthuan@mku.edu.vn)



## GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long là vựa lúa quan trọng của Việt Nam và được cung cấp nước ngọt chủ yếu từ sông Cửu Long. Những năm gần đây do nhiều yếu tố tác động, Đồng bằng sông Cửu Long bị biến đổi môi trường canh tác. Hiện tượng xâm nhập mặn có khuynh hướng lấn sâu thêm vào khu vực nông nghiệp nước ngọt, làm cho một khu vực rộng lớn của đồng bằng bị nhiễm mặn. Xâm nhập mặn gây biến đổi môi trường và gây thiệt hại nặng nhất cho lúa và nhiều cây trồng vào mùa khô. Bắt đầu từ tháng 11, 12 khi mùa mưa kết thúc, nước sông Cửu Long đổ yếu, nước mặn từ biển xâm nhập theo các nhánh sông vào lưu vực. Nước mặn theo đường sông thâm nhập sâu tới 35 - 70 km vào vùng ngọt ổn định, gây thiệt hại đến khu vực trồng lúa và cây trồng, tác động xấu đến kinh tế xã hội của vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

Năm 2019 xâm nhập mặn xảy ra rất sớm và nghiêm trọng nhất so với trước đây, diện tích chịu ảnh hưởng là 1,7 triệu ha (Thanh Phong, 2020) dự báo ĐBSCL chịu một mùa hạn mặn nghiêm trọng. Tuy nhiên các nhà quản lý nông nghiệp biết áp dụng nhiều biện pháp thích nghi cần thiết như né mặn, tích trữ nước, dịch chuyển mùa vụ, ... Những biện pháp này đã giúp vụ mùa năm 2019 giảm nhẹ thiệt hại so với vụ xâm nhập mặn năm 2015. Mặc dù vậy, diện tích mất trắng cũng lên đến 26.000 ha (Thanh Phong, 2020)

Nếu giống lúa canh tác chịu được mặn trong trong giai đoạn mạ và chịu được mặn ở giai đoạn trổ hoa, 2 giai đoạn rất nhạy cảm về chịu mặn của lúa (Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu, 2017), thì các nhà quản lý nông nghiệp có thêm thời gian để sắp xếp lịch thời vụ hợp lý, tránh né mặn dễ dàng hơn và mùa vụ ít bị thiệt hại năng suất.

Giống lúa chịu mặn còn phải có năng suất cao, phẩm chất ăn tốt thì người nông dân

mới có thể trồng và có thể tiêu thụ vì trồng lúa phải đạt được các yêu cầu kinh tế.

Vì những lý do đó, Chương trình Khoa học và Công nghệ phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Nam Bộ đã phê duyệt đề cho trường Đại Học Cửu Long chủ trì đề tài cấp nhà nước “Tạo, chọn các giống lúa chống chịu mặn thích nghi với biến đổi khí hậu cho vùng đồng bằng sông Cửu Long” (Bùi Hữu Thuận, 2020). Đề tài này đã hoàn thành và đã được nghiệm thu. Bài báo cáo này muốn giới thiệu một phương pháp khoa học hiện đại để tạo ra giống lúa mới mà đề tài đã áp dụng thành công.

### Đặc điểm chịu mặn của cây lúa

Lúa là cây trồng nước ngọt không thể sống được trong môi trường nước mặn. Cây lúa rất nhạy cảm trong giai đoạn mạ non (giai đoạn 2-3 lá), sau đó chống chịu mặn trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng, rồi lại bị nhiễm mặn trong suốt giai đoạn thụ phấn, cuối cùng trở nên chống chịu hơn trong giai đoạn chín (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu 2017, Reddy *et al.*, 2017).

Ở môi trường nhiễm mặn, rễ cây lúa hấp thu ion  $\text{Na}^+$  đưa lên thân, lá. Sự vận chuyển ion  $\text{Na}^+$  phụ thuộc vào từng cây lúa. Ở cây lúa nhiễm, ion  $\text{Na}^+$  di chuyển lên cây, lá nhiều hơn so với những cây lúa có khả năng chống chịu mặn tốt. Do đó, tỉ số ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ở thân, lá cây lúa cho biết về tình trạng chịu mặn (Reddy *et al.*, 2017). Thông thường, ngưỡng chống chịu  $\text{NaCl}$  của cây lúa là nước mặn có độ dẫn điện  $\text{EC} = 2 \text{ dS/m}$  (Reddy *et al.*, 2017). Khi nước mặn hơn, ngoại trừ các giống kháng mặn, hầu hết cây lúa bị tổn thương, giảm năng suất hoặc chết.

### Năng lực chống chịu với nhiễm mặn ở cây lúa sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố:

Giống: một số giống lúa có khả năng hạn chế thâm nhập ion gây độc.

Sức khỏe cây lúa: những khả năng chuyển hóa chống ROS...

Môi trường sống: loại đất mặn, loại tác động của các ion trong đất như  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{3+}$  ....

Thời gian lúa chịu đựng các tác động bất lợi

...

Muốn đưa giống lúa chịu mặn vào sản xuất, bên cạnh yêu cầu chịu được mặn nó còn phải có năng suất cao, phẩm chất ăn tốt, bền vững, chống chịu được sự tấn công của rầy nâu, một số bệnh thường gặp... Bài báo này chỉ trình bày phần tạo giống lúa kháng mặn.

Ở đồng bằng Sông Cửu Long hiện nay, cây lúa rất phát triển. Chúng ta có nhiều giống tốt, năng suất cao, chất lượng tốt và kỹ thuật trồng cũng khá tiên tiến của thế giới. Tuy nhiên những giống lúa này không chịu được đất nhiễm mặn, năng suất giảm thậm chí mất trắng khi môi trường sống bị nhiễm mặn.

Trong thiên nhiên cũng có những giống lúa chịu mặn tốt, nổi tiếng như Pokkali... tuy nhiên giống lúa này có năng suất hạt rất kém, phẩm chất ăn không ngon. Vì vậy giống lúa Pokkali không thể sử dụng để sản xuất có hiệu quả kinh tế.

Sự đa dạng về tính chịu mặn ở cây lúa cho phép các nhà di truyền tạo giống nghĩ đến việc tạo ra các dòng lai có được tính chịu mặn của Pokkali kết hợp tính trạng cao sản, phẩm chất ăn tốt và các đặc tính sinh học tốt khác ở các giống đang sản xuất mà không thể chịu được ngập mặn.

Cách lai tạo truyền thống được sử dụng là phương pháp lai hồi giao để đưa một tính trạng mục tiêu (chịu mặn) vào một giống tốt nhưng giống tốt này chưa có được tính trạng chịu mặn mong muốn đó. Kỹ thuật này được sử dụng để loại bỏ hầu hết các tính trạng từ giống lúa bố (donor) trong dòng tái tục (recurrent) (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2017).

Các giống cao sản qua thanh lọc mặn

được cho lai với giống chịu mặn để đưa tính trạng chịu mặn tốt vào giống cao sản và loại trừ các tính trạng xấu khác đến từ giống chịu mặn.

Sự tiên bộ công nghệ sinh học phân tử giúp người nghiên cứu di truyền có thể hiển thị tính trạng kiểu gene góp phần tích cực, có độ chính xác cao, hỗ trợ công tác tạo chọn giống.

Với cách này, người ta có thể phát hiện sớm tính trạng di truyền, lựa chọn cây lai có mang tính trạng mục tiêu nhanh chóng, có thể tiết kiệm thời gian được 2 - 3 thế hệ lai hồi giao.

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Áp dụng phương pháp lai hồi giao là tuyển chọn giống lúa có tính trạng cao sản tốt của cây mẹ và chỉ tuyển lấy gel chịu mặn của cây lúa bố. Các giống lúa tuyển chọn tốt về kiểu hình và kiểu gel như vậy được trồng trên môi trường đồng ruộng diện rộng ở nhiều địa phương và các thời vụ khác để đánh giá năng lực thích nghi của cây lúa với môi trường tự nhiên... qua đó chọn lựa, đánh giá.

Đề tài đã dùng 100 giống lúa cao sản để tìm vật liệu cho lai tạo. Các dòng cao sản chịu tác động mặn khác nhau về nồng độ trong các môi trường thanh lọc mặn có độ dẫn điện 0 dS/m, 8 dS/m, 15 dS/m được thực hiện theo phương pháp thanh lọc của IRRI (IRRI, 1967).

Bên cạnh đó, các giống lúa cũng được chọn lọc giống lúa dựa trên chỉ thị phân tử (Marker Assisted Selection - MAS) là sử dụng chỉ thị ADN liên kết chặt với locus chịu mặn mục tiêu. Chỉ thị phân tử SSR (Simple Sequence Repeat) liên kết chặt với tính trạng mong muốn được sử dụng để tìm gene chịu mặn của các cây lai. Các chuỗi này được khuếch đại trong phản ứng PCR nhờ vào môi xuôi và môi ngược (Lang, 2001). Đề tài đã sử dụng nhiều cặp mồi (primer) có được từ đề tài và các cặp mồi khác để phát hiện gene chịu mặn ở trên các nhiễm sắc thể. DNA của lúa giống được trích ly dùng để phân tích. Máy PCR



dùng các cặp mồi SSR để sao chép và khuếch đại sản phẩm và dùng kỹ thuật điện di phân ly sản phẩm chạy trên gel agarose 3%. Sắc ký điện di cho phép nhận diện được tính đa hình của các dòng về tính chịu mặn.

Đề tài sử dụng nhiều SSR liên kết với gene chịu mặn ở nhiễm sắc thể số 1 và số 8 để đánh giá kiểu gene của các giống lúa phục vụ cho việc chọn lựa tính trạng chịu mặn trong quá trình lai hồi giao ở các thế hệ. Các cây lai được lựa chọn theo kiểm tra với nhiều SSR cũng được kiểm tra bằng kiểu hình để xác định lại tính xác thực của loại SSR liên kết đúng với tính trạng mục tiêu để tin cậy đưa vào sử dụng.

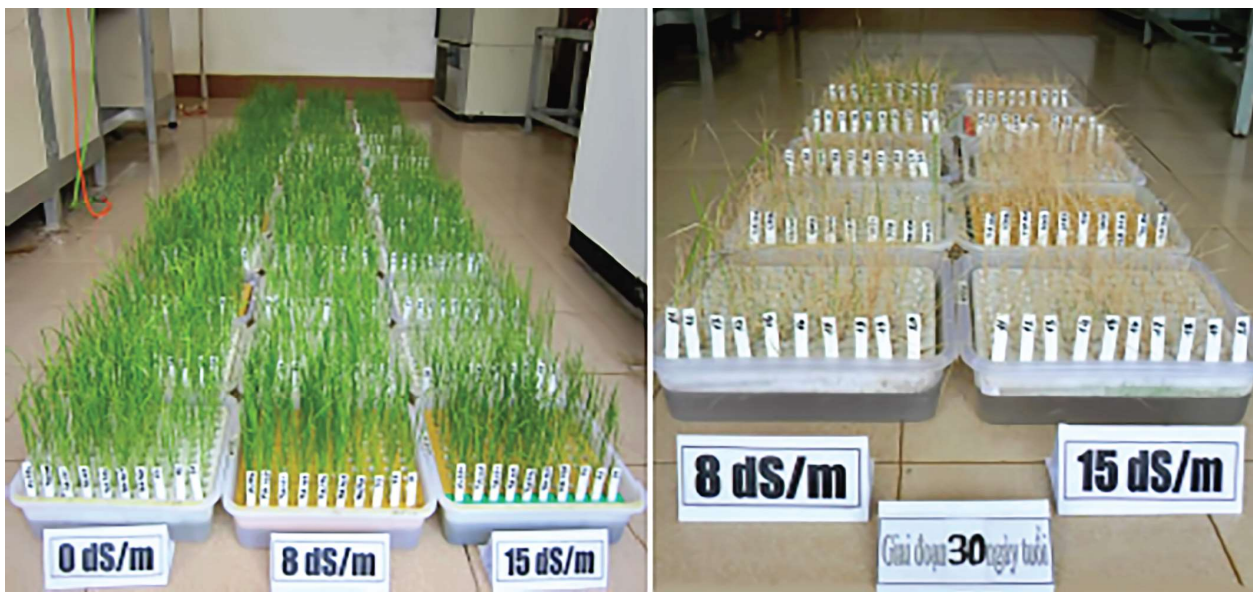
Những dòng ưu tú tuyển chọn được đưa

ra thử nghiệm trên địa bàn các tỉnh có đất nhiễm mặn để tiếp tục đánh giá về tính phân ly, tác động của thổ nhưỡng, các đặc điểm mong muốn khác.

Nồng độ ion  $\text{Na}^+$  và  $\text{K}^+$  được xử lý và phân tích để theo dõi sự di chuyển các ion lên cây lúa. Hàm lượng 2 ion này được phân tích bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử với máy Perk-inElmer Analyst 300.

### KẾT QUẢ

Thí nghiệm thanh lọc kiểu hình ở giai đoạn mạ trên nước mặn theo phương pháp của Viện nghiên cứu lúa IRRI, cho phép thanh lọc, tuyển chọn các giống có tính trạng kháng mặn. Thử nghiệm được thực hiện như Hình 1.

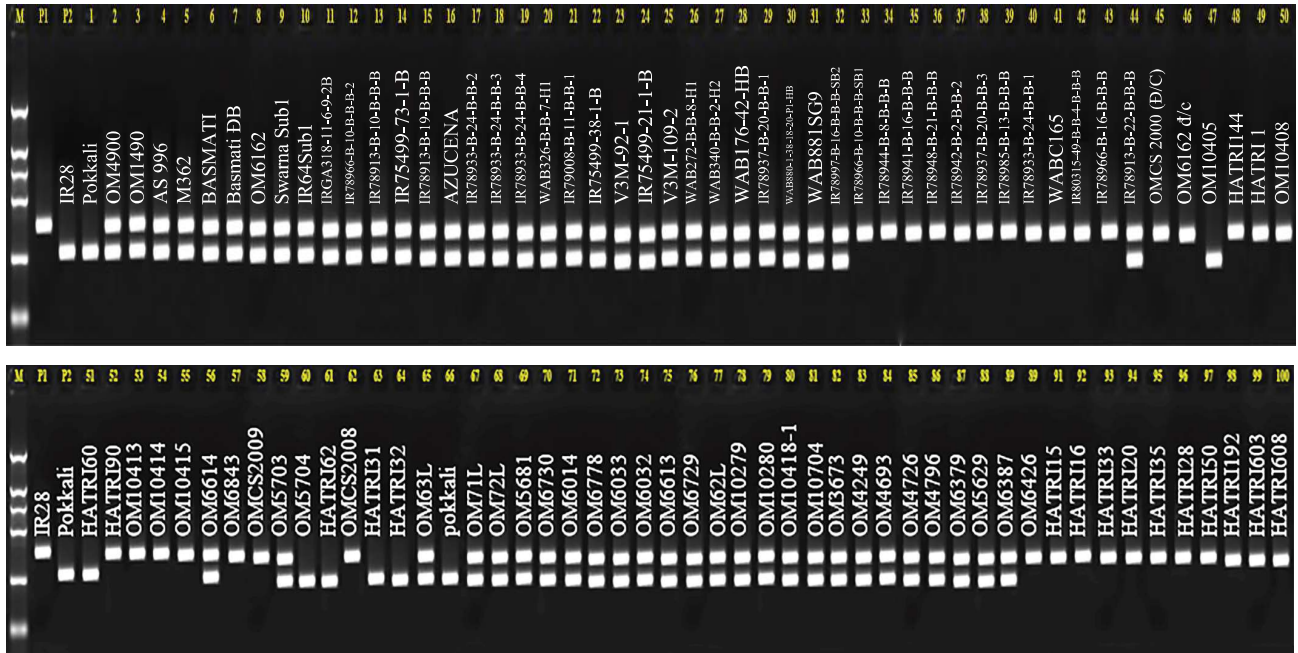


**Hình 1: Thí nghiệm đánh giá kiểu hình của lúa về tính chịu mặn**

Các thử nghiệm đánh giá tính trạng chịu mặn của 100 giống ban đầu cho thấy hầu hết các giống cao sản không đủ sức chống chịu độ mặn 8 dS/m và 15 dS/m. Những môi trường mặn càng khắc nghiệt làm cho lúa chịu mặn kém sẽ phát triển không bình thường sớm hơn và chúng chết sớm hơn. Cây lúa được thanh lọc xếp loại theo thời gian chịu được môi trường khắc nghiệt. Sau 1 tháng ở môi trường mặn

các giống này chết hết.

Các giống lúa dùng trong lai tạo (100 giống) cũng được kiểm tra gene chịu mặn bằng cách dùng các cặp mồi nhận diện gene chịu mặn. Kết quả phân tích PCR với các cặp mồi SSR đã chứng tỏ một số giống đó có kiểu gene giống như các giống chịu mặn các giống khác thì không nhận được sự hiện diện của gene chịu mặn theo SSR.

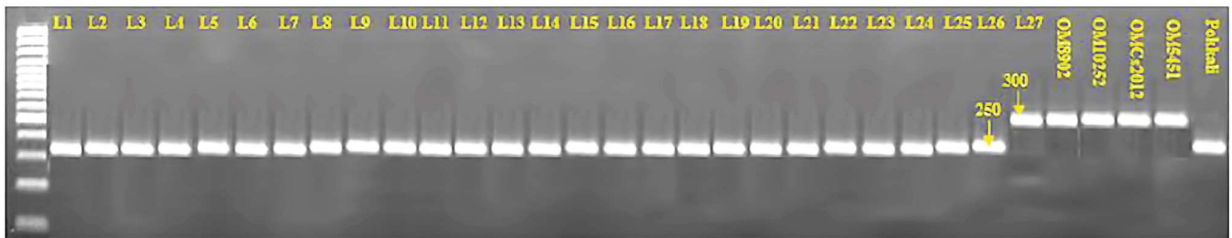


**Hình 2: Sắc ký điện di trên gel agarose trong đánh giá gene chịu mặn của giống lúa**

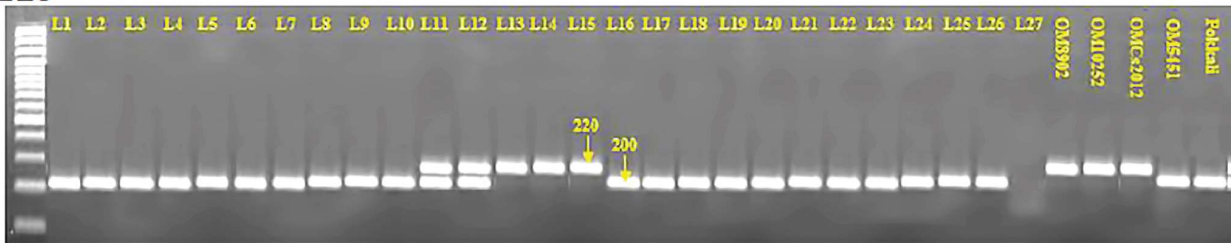
Hầu hết các dòng lúa cao sản ban đầu đều mẫn cảm ở các cấp độ khác với nước muối có độ mặn khác nhau mặc dầu một số giống này vẫn tìm thấy gene liên kết với chỉ thị SSR chịu mặn. Khả năng chịu mặn của lúa rất phức tạp,

chịu ảnh hưởng bởi nhiều gene! (Reddy *et al.*, 2017). Như vậy, các thử nghiệm kiểu hình và kiểu gene đều cần thực hiện để nhận diện thêm tính xác thực về chịu mặn các dòng lúa lai tạo.

**HATRI 02**



**RM223**



**Hình 3: Kết quả phân tích PCR, sắc ký điện di với 2 SSR HATRI02 và RM223 chỉ ra gene chịu mặn tương ứng ở nhiễm sắc thể 1 và 8 liên kết với tính chịu mặn.**

Phương pháp lai hồi giao được thực hiện kết hợp với phương pháp sử dụng các SSR (HATRI02, RM223...) và các SSR khác (không

trình bày ở đây) để nhận ra sự hiện diện của gene chịu mặn trong các dòng lúa lai. Hình 3 chỉ ra sự khác biệt thể gene được nhận diện



bởi 2 SSR trong thử nghiệm là HATRI02 và RM223

Kết quả phân tích PCR có thể giúp nhận định nhanh về tính chịu mặn nhưng cần sử dụng thêm các SSR để tăng cường tính chính xác của kết quả về gene chịu mặn trong sàng lọc tuyển chọn và khả năng chịu mặn thực sự của dòng lúa mới.

Các dòng lúa được thanh lọc có thể được đánh giá khả năng ngăn chặn  $\text{Na}^+$  bằng cách phân tích nồng độ ion  $\text{Na}^+$  trong môi trường mặn di chuyển lên thân cây.

Kiểm tra thành phần  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ở giống chịu mặn Pokkali và giống không kháng mặn OM 10252 với một số dòng lai từ chúng được tuyển chọn cho thấy số cây lai được tuyển chọn có tính kháng (tỉ số  $\text{Na}/\text{K}$  nhỏ hơn 1) và trong khi cây không kháng, OM 10252, có tỉ số này lớn hơn 1. Phương pháp phân tích hóa học cho phép đánh giá được khả năng ngăn chặn ion  $\text{Na}^+$  di chuyển lên cây lúa ở các giống kháng mặn. Kết quả phân tích ion Na và K được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1: Kết quả phân tích thành phần  $\text{Na}^+$  và  $\text{K}^+$  trong cây lúa.**

Dòng	Điểm chịu mặn	Na(%)	K(%)	Tỉ lệ Na/K
BC3F4-17	1	0,532	2,51	0,21
BC3F4-18	1	0,562	2,55	0,22
BC3F4-23	1	0,541	2,37	0,23
BC3F4-28	1	0,612	2,96	0,21
BC3F4-40	1	0,445	2,98	0,15
BC3F4-46	3	0,422	2,98	0,14
BC3F4-53	3	0,745	2,59	0,14
BC3F4-54	3	0,632	2,62	0,24
BC3F4-56	3	0,745	2,59	0,29
BC3F4-60	3	0,669	2,12	0,32
BC3F4-68	3	0,756	2,02	0,37
BC3F4-80	3	0,563	2,16	0,26
BC3F4-81	3	0,632	2,45	0,26
OM10252 (SS parent)		1,75	1,32	1,32
POKKALI (RR parent)		0,53	2,5	0,21

Các dòng lúa lai xác định có tính trạng chịu mặn được đánh giá thử nghiệm, sàng lọc tính chịu mặn bằng kiểu hình, kiểu gene được thực nghiệm sàng lọc ở qui mô thí nghiệm rồi

chuyển ra môi trường sản xuất. Các thử nghiệm đánh giá thực tế trên đồng ruộng ở 6 tỉnh cho kết quả ở Bảng 2.

**Bảng 2: Năng suất (tấn/ha) của mô hình thử nghiệm tại các tỉnh Cần Thơ, Bến Tre, Long An, Sóc Trăng, Bạc Liêu, Trà Vinh**

TT	Tên dòng	Năng suất (tấn/ha)						
		Cần Thơ	Bến Tre	Long An	Sóc Trăng	Bạc Liêu	Trà Vinh	Trung Bình
1	<b>TLG 1</b>	7,56	8,00	7,45	7,99	7,16	7,63	7,63
2	HATRI 20	7,70	6,59	7,84	8,37	7,43	8,00	7,66
3	HATRI 62	8,65	7,55	7,86	7,35	7,46	8,04	7,82
4	HATRI 190	7,91	7,79	7,08	7,54	7,67	7,29	7,55
5	HATRI 169	8,50	7,38	8,68	9,11	7,28	7,87	8,14
6	HATRI 170	7,29	8,18	6,42	7,92	6,03	7,17	7,17
7	HATRI 192	7,94	8,81	8,06	8,56	7,75	8,01	8,19
8	HATRI 457	8,20	7,08	7,32	7,82	6,97	8,51	7,65
9	HATRI 195	7,19	8,06	7,31	7,81	6,96	8,49	7,64
10	HATRI 188	7,56	7,44	7,69	8,19	7,34	7,87	7,68
11	HATRI 144	7,19	7,07	7,31	7,81	6,97	7,51	7,31
12	<b>TPG 1</b>	8,82	6,69	6,94	7,44	6,59	7,33	7,30
13	HATRI 60	7,87	7,75	8,00	7,50	8,65	8,18	7,99
14	OC 10	7,40	7,27	7,52	8,02	7,17	7,71	7,52
TB		7,84	7,55	7,53	7,96	7,25	7,83	

Các kết quả cho thấy các dòng ưu tú trên, do kết quả lai hồi giao kết hợp với phương pháp dùng chỉ thị phân tử SSR, vừa chịu được mặn vừa có được năng suất vượt trội so với tính trạng của giống chịu mặn ban đầu (Pokkali). Các giống lúa mới này đạt các yêu cầu về chịu mặn và đạt năng suất trồng lúa ở mức khá ở đồng bằng sông Cửu Long.

### KẾT LUẬN

Phương pháp lai hồi giao kết hợp với kỹ thuật SSR chứng tỏ hiệu quả hiệu quả trong việc hiện đại hóa kỹ thuật di truyền, phương pháp này đưa gene chịu mặn mong muốn và kiểm tra hiện diện của gene này trong các dòng

lai. Phương pháp này cho thêm một cách kiểm tra nhanh chóng khả năng tiềm ẩn khó quan sát trong cách di truyền truyền thống trước đây

Phương pháp lai hồi giao kết hợp với chỉ thị phân tử SSR đã được áp dụng thành công, làm được nhiều giống lúa chịu mặn, chịu được độ mặn 2‰ trong giai đoạn mạ và 4‰ trong giai đoạn trổ đạt yêu cầu trong sản xuất.

### CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Chương trình Khoa học và Công nghệ phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Nam Bộ, Trường Đại học Cửu Long, Viện Nghiên cứu Nông nghiệp Công nghệ Cao Đồng



bằng Sông Cửu Long, đã giúp đỡ tài chính nghiên cứu, phương tiện nghiên cứu, tạo các điều kiện thuận lợi để đề tài hoàn thành được nhiệm vụ nhà nước giao.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bùi Hữu Thuận, 2020, Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu tạo, chọn các giống lúa chống chịu mặn thích nghi với biến đổi khí hậu đồng bằng sông Cửu Long, mã số: KH-CN-TNB/14-19/C13, Văn phòng Chương Trình Tây Nam Bộ, Đại học quốc Gia TP Hồ Chí Minh.
- [2] IRRI (International Rice Research Institute) 1967, Annual report for 1967, IRRI Los Banos Philippines.
- [3] Lang NT, Yanhanagihara S, Buu BC (2001) A microsatellite marker for a gene conferring salt tolerance on rice at the vegetative and reproductive stages. SABRAO:Breeding and genetic 1-10.
- [4] Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu .2017. Nghiên Cứu chọn tạo giống lúa chịu mặn, phẩm chất tốt : OM341. Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông Thôn . số 2. Trang: 5-12.
- [5] Thanh phong, 2020, Đợt hạn, mặn nghiêm trọng nhất trong lịch sử ĐBSCL, Báo nhân dân, ngày 20-6-2020, Hà nội, <https://nhandan.vn/chuyen-lam-an/dot-han-man-nghiem-trong-nhat-trong-lich-su-dbscl-475180/>
- [6] Reddy Inja Naga Bheema Lingeswara, Beom-Ki Kim, In-Sun Yoon, Kyung-Hwan Kim, Taek-Ryoun Kwon, 2017, Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches, Rice Science, 2017, 24(3): 123-144