



MỘT SỐ KỸ THUẬT TRONG NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ CHỌN GIỐNG LÚA TẠI VIỆT NAM

PGS.TS PHẠM CÔNG HOẠT
Bộ KH&CN

PGS.TS VÕ CÔNG THÀNH
Trường Đại học Cần Thơ

PGS.TS TRẦN TRUNG
Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Hưng Yên

Lúa gạo được coi là loại lương thực hàng đầu trong các loại ngũ cốc nhờ giàu chất dinh dưỡng, với các thành phần khoáng như: canxi, magie, phosphor, kẽm, đồng, sắt, mangan... Lúa gạo cung cấp đến 23% tổng năng lượng và 16% lượng protein cho dân số toàn cầu (IRRI, 1997). Protein trong lúa gạo có giá trị

sinh học cao và dễ tiêu hoá, là loại dinh dưỡng “có một không hai” vì chứa các axit amin hết sức cần thiết cho cơ thể.

Ở Việt Nam, trong hơn 2 thập niên qua, công nghệ sinh học đã bắt đầu được chú ý phát triển và ngày càng được đầu tư mạnh mẽ hơn. Trong nông nghiệp, hoạt động nghiên cứu, sản xuất và thương mại hóa lĩnh vực này đang

được tập trung tại một số cơ quan nghiên cứu hàng đầu của Việt Nam như: Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long, Viện Công nghệ sinh học, Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội... Việc nghiên cứu, chọn tạo các loại giống lúa có hàm lượng amylose trung bình

(20-24%) đang là một mục tiêu lớn trong những năm tới khi mà dự đoán sản lượng gạo từ các giống lúa này sẽ chiếm khoảng 60-80% thị trường. Để có giống lúa có hàm lượng amylose như mong muốn, thử thách lớn nhất đối với các nhà chọn giống chính là hiện tượng tích lũy amylose ở những thế hệ con lai sau cùng (amylose dosage effect). Bên cạnh đó, có những yếu tố có khả năng làm thay đổi hàm lượng amylose như: trong thời gian hạt vào chắt, amylose giảm khi nhiệt độ tăng đối với nhóm japonica, trái lại amylose tăng khi nhiệt độ thấp hơn 29°C đối với indica; hàm lượng amylose hơi giảm nhẹ với việc bón phân N nuôi hạt.

Việc nâng cao hàm lượng protein trong lúa cũng được chú ý

Những năm gần đây, nhiều kỹ thuật mới đã được các nhà khoa học trong nước ứng dụng vào việc nghiên cứu, chọn tạo các giống lúa mới cho năng suất, chất lượng cao. Bài viết giới thiệu khái quát một số kỹ thuật đã và đang được áp dụng trong việc nghiên cứu đánh giá chọn giống lúa tại Việt Nam thời gian qua, trong đó nhấn mạnh đến kỹ thuật điện di protein.

trong những năm gần đây, nhưng nếu xét về lâu dài, chúng ta cần quan tâm đến cải tiến thành phần amino acid cần thiết cho dinh dưỡng. Có sự tương quan nghịch giữa năng suất hạt và hàm lượng protein trong hạt là do sự phân phối năng lượng trong quá trình tổng hợp protein hoặc tổng hợp tinh bột trên cơ sở sự ưu tiên theo quá trình nào của một giống lúa. Giống lúa năng suất cao, protein trong gạo có xu hướng thấp. Đó là một thử thách cho các nhà chọn giống để có giống lúa cải tiến vừa đạt năng suất cao, vừa có hàm lượng protein cao.

Một số phương pháp đang được ứng dụng trong chọn tạo lúa giống ở Việt Nam

Kỹ thuật lai nhiều dòng

Kỹ thuật này có nhiều ưu thế về năng suất, tính kháng chịu sâu bệnh, thiên tai. Có thể kể đến các giống lúa TH3-3, TH3-4, TH3-5, TH3-11, VL20, VL75 của Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội; TL6, TL6.1, HYT100 của Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm (kết hợp nuôi cấy bao phấn); DT 28 của Viện Di truyền nông nghiệp; các giống OM của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long... Nghiên cứu lúa ưu thế lai ở Việt Nam được bắt đầu từ năm 1983; lúa lai thương phẩm được gieo trồng từ năm 1991.

Công nghệ tế bào và phôi

Đến nay, Việt Nam đã đạt đến trình độ cho phép hoàn thiện quy trình nhân giống invitro đối với hầu hết các đối tượng ở quy mô phòng thí nghiệm: cây lương thực (khoai tây, khoai lang, khoai sọ, sắn); cây ăn quả (dứa, chuối, gốc

ghép cam, chanh); một số cây công nghiệp (mía, cà phê, điều); cây lâm nghiệp (bạch đàn, keo, tre) và nhiều loại hoa (lan, cẩm chướng, hồng, đồng tiền).

Thông qua nuôi bao phấn đã tạo các giống lúa thuần như Khao 85, Khao 1105, VH2. Đặc biệt, thông qua chọn dòng tế bào soma thu được các giống DR1, DR2, DR3 đang mở rộng ra quy mô sản xuất. Kết hợp biến dị tế bào soma với gây đột biến đã tạo được giống lúa KDM39. Trong nghiên cứu lúa lai đang áp dụng kỹ thuật lai xa, cứu phôi, đột biến tạo dòng TGMS và CMS mới. Bên cạnh các công nghệ nêu trên cũng cần kể đến công nghệ vi sinh, công nghệ enzym... Tuy nhiên, việc triển khai ở quy mô lớn còn hạn chế.

Kỹ thuật phân tích phân tử DNA

Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) đã được áp dụng trong đánh giá đa dạng di truyền trên các đối tượng: cúc lai, cà phê, bắp, đậu nành, lúa mì, lúa mạch, dâu tây, khoai tây, cà chua... Tuy nhiên, khi thực hiện kỹ thuật này chúng ta cần quan tâm đến yếu tố nồng độ DNA, điều kiện thí nghiệm, chương trình chạy PCR và cần lựa chọn primer thích hợp cho sự đa hình cao. Đối với nấm bệnh thực vật thì kỹ thuật RAPD đã được áp dụng để phân tích đa dạng di truyền của nhiều loại nấm khác nhau như: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not, *Corynespora cassiicola*, *Rhizoctonia solani*, *Frontonia* sp. Ở Việt Nam, kỹ thuật RAPD được kết hợp với nhận diện chỉ thị phân tử (MAS) trong nghiên cứu đa

dạng di truyền và mối tương quan giữa kiểu gen RGA và kiểu hình phản ánh bệnh đạo ôn của một số giống lúa ở Việt Nam. Kỹ thuật RAPD còn được sử dụng kết hợp với kỹ thuật SDS-PAGE trong nghiên cứu đa dạng di truyền và chọn giống lúa, kết hợp RAPD và PCR để nghiên cứu gen kháng rầy nâu ở lúa indica (Viện Công nghệ sinh học), ngoài ra, kỹ thuật RAPD còn được áp dụng trong xây dựng bản đồ gen.

Một kỹ thuật phân tích DNA khác cũng được áp dụng, đó là kỹ thuật AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, phát triển dựa trên PCR) do ưu điểm biểu hiện được nhiều băng DNA hay độ đa dạng di truyền cao. Viện Di truyền nông nghiệp đã áp dụng kỹ thuật này để xác định gen kiểm soát tính kháng đạo ôn và rầy nâu ở lúa (tiến hành quy tụ các gen kháng rầy nâu, đạo ôn, bạc lá vào nền gen các giống lúa có năng suất, chất lượng cao đang được trồng phổ biến ở Việt Nam: các giống lúa MT508-1, Khang Dân 18, Bắc Thơm số 7, Q5...); hay nghiên cứu đa hình cho công tác chọn giống: đã sử dụng công nghệ chỉ thị phân tử RAPD, SSR, AFLP, RGA... để đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn lúa (khoảng gần 80 dòng/giống) phục vụ cho việc tuyển chọn các tổ hợp lai tiềm năng phục vụ tạo quần thể lập bản đồ phân tử ở lúa.

Tuy RAPD, AFLP được phát triển rất mạnh trong thập niên 1990-2000, nhưng gần đây, các kỹ thuật này ít được dùng trong lĩnh vực chọn giống vì chúng không biểu hiện tính đồng trội. Theo khuyến cáo của một số

chuyên gia, các kỹ thuật phân tích DNA chỉ nên áp dụng kỹ thuật Microsatellite vì thoả mãn được các tiêu chí nêu trên, hơn nữa kỹ thuật microsatellite chỉ biểu hiện một ít băng DNA cần tìm nên kết quả rất đáng tin cậy. Kỹ thuật phân tích gen chịu mặn (một cặp mỗi RM223 gen thơm với hai cặp mỗi primer) cho biết chính xác cá thể mang gen thơm ở thể đồng hợp lặn hay cá thể không thơm ở thể đồng hợp trội, trong khi cá thể còn phân ly mang gen dị hợp. Đến nay, hầu hết các báo cáo nghiên cứu được công bố trên thế giới đều ứng dụng kỹ thuật microsatellite trong công tác đánh giá giống cây/con.

Tuy nhiên, so với một số nước trong khu vực thì sự phát triển trong lĩnh vực công nghệ sinh học nói chung, cây trồng biến đổi gen (GMO) nói riêng của Việt Nam còn chậm. Thái Lan, Malaysia, Indonesia, Philippin đều đã có văn bản của nhà nước hướng dẫn việc thử nghiệm, đánh giá và cho phép sử dụng GMO, trong khi chúng ta còn chưa có quy định rõ ràng.

Sử dụng kỹ thuật điện di protein trong nghiên cứu đánh giá chọn giống lúa tại Việt Nam

Theo Paul Gelp (nhà chọn giống người Mỹ), tương lai công nghệ sinh học thuộc về các kỹ thuật proteomics: điện di 1 chiều SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) và kỹ thuật điện di 2 chiều. Ông đã căn cứ vào tổng số các bài báo quốc tế đăng tải cho thấy, số lượng nghiên cứu bằng kỹ thuật protein tăng theo số mũ (e), trong khi

các kỹ thuật DNA ngày càng giảm. Nhiều công trình cho thấy, kỹ thuật điện di SDS-PAGE đã được sử dụng từ rất sớm để nghiên cứu gen waxy điều khiển trên nhiễm sắc thể số 6 nhằm xác định hàm lượng amylose trong hạt lúa. Từ những năm 1985, kỹ thuật SDS-PAGE kết hợp với HPLC (High performance liquid chromatography) đã được J.E. Backer (Isect Biochem. Vol. 17, No.1, pp 34-44, 1987) áp dụng để nghiên cứu sự phân huỷ của amylose trong gạo do men amylosa của một gạo. Theo một hướng khác, I.A. Khan, H. Ahmad, S.-ul Ghafoor, S. Gun, I. Muhammad, M. Ilias (Asian J. of Agricultural Science, Vol.2, No. 4, pp 120-123, 2010) đã sử dụng kỹ thuật SDS-PAGE để xác lập bản đồ các protein trong lúa ở Pakistan. Các nghiên cứu khác còn cho thấy, mối quan hệ giữa cấu trúc hạt lúa với hàm lượng amylose chứa trong nó. Nghiên cứu của Hyun J. Chung, Qiang Liu, Laurence Lee, Dongzhi Wei (Food Hydrocolloids, Vol. 25, No. 5, pp. 968-975, 2011) chỉ ra rằng, lúa hạt dài có hàm lượng amylose cao nhất (27,2%), trái lại lúa nếp có hàm lượng amylose thấp nhất (4%).

Kỹ thuật proteomics không chỉ cho phép nhận dạng các loại proteins: Albumin, Globulin, Glutelin, prolamin có trong hạt lúa mà còn cho phép nhận được những thông tin về cấu trúc của các proteins này (Y.R. Mawal, M.R. Mawal, M.N. Sainani, P.K. Ranjeka, Plant Science, Vol. 70, pp. 73-80, 1990). Nghiên cứu này cho thấy, albumin có cấu trúc β -bends/turns chiếm ưu thế mà không có các cấu trúc tương tự ở

các proteins khác trong hạt lúa; còn Prolamin chủ yếu là có cấu trúc dạng α -helical (cấu trúc này có thể chuyển sang dạng cấu trúc trung gian α - β); Glutelin thì lại có cấu trúc ngẫu nhiên kiểu đồng tiền (random coil structure) với sự có mặt của cấu trúc α -helical bậc hai, chiếm khoảng vài % trọng lượng. Kỹ thuật proteomic cũng chỉ ra các dạng proteins tiềm ẩn (secreted proteins) trong cây lúa được trồng trong môi trường vô trùng (T. Shinano, S. Komatsu, T. Yoshimura, S. Tokutake, F.J. Kong, T. Watanabe, J. Wasaki, M. Osaki, *Phytochemistry* Vol. 82, No. 4-5, pp. 312-320, 2011).

Ở Việt Nam, áp dụng kỹ thuật điện di SDS-PAGE, PGS.TS Võ Công Thành cùng với Yutaka Hirata (Nhật Bản) đã nhận dạng được mối quan hệ di truyền giữa lúa hoang, lúa cỏ và phát hiện một loài lúa hoang mới (*Biosphere conservation* Vol. 4, No. 2, 2002). Kỹ thuật này cho phép phát hiện và nhận dạng các proteins có trong hạt lúa, trên cơ sở đó đóng góp phục vụ công nghệ lai tạo, tuyển chọn giống lúa dựa trên sự kết hợp các kỹ thuật sinh học như gây đột biến, lựa chọn theo phả hệ, lai tạo theo phương pháp truyền thống, kết hợp với kỹ thuật phân tử mới... góp phần tạo nên một bước tiến mạnh mẽ trong công nghệ chọn tạo giống lúa mới năng suất, chất lượng cao.

Kỹ thuật điện di 2D polyacrylamide độ phân giải cao (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE) đã hình thành từ năm 1975 (P.Z. O'Farrell, H.M. Goodman, *Cells*, Vol. 9, No. 2, pp. 289-298, 1976) nay đã trở thành một trong các

kỹ thuật hiệu quả nhất trong việc phân tách và đánh giá chất lượng protein từ các hỗn hợp phức tạp. Nhật Bản với những thành tựu trong công nghệ gen nhằm cải tạo, tuyển chọn giống cây trồng, nhưng cũng là nước phát triển kỹ thuật điện di protein SDS-PAGE trong nhận diện các proteins đặc trưng khi chọn tạo ra những dòng lúa siêu lai nổi tiếng đứng dưới một cái tên chung japonica được cả thế giới biết đến. Các giống japonica này thích nghi với nhiều vùng đất có thổ nhưỡng khác nhau của Nhật Bản, từ vùng ít nước đến vùng ngập mặn (Setsuko Komatsushu, 2004), với năng suất ổn định 9,4 tấn/ha, riêng vùng ngập lụt 8,2 tấn/ha, với giống siêu cao sản (Super-high yielding) năng suất là trên 10 tấn/ha (Yoichiro Kato, *Field Crops Research* 2009). Không chỉ phát triển các giống lúa siêu lai cho lương thực, các nhà khoa học Nhật Bản còn tạo ra những dòng lúa làm nền tảng cho việc phát triển vắc xin, thực phẩm chức năng (Tomonori Nochi, 2007), đặc biệt là gạo màu có chứa anthocyanin giúp ngăn ngừa bệnh ung thư.

Là một kỹ thuật đơn giản, chi phí thấp hơn rất nhiều so với kỹ thuật chỉ thị phân tử, kỹ thuật điện di protein SDS-PAGE đã được sử dụng có hiệu quả trong đánh giá, tuyển chọn giống lúa theo chương trình hợp tác giữa Trường Đại học Cần Thơ và Trường Đại học Công nghệ và Nông nghiệp Tokyo (Nhật Bản). Bên cạnh đó, nhiều đề tài nghiên cứu trong lĩnh vực này đã thực hiện thành công và được chuyển giao vào thực tiễn canh tác lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long mang lại hiệu quả thiết

thực trong sản xuất. Hiện nay, kỹ thuật điện di protein SDS-PAGE cũng đang được phối hợp triển khai thực hiện tại Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Hưng Yên thông qua việc triển khai thực hiện đề tài độc lập cấp Nhà nước “Ứng dụng công nghệ sinh học để chọn tạo giống lúa năng suất cao, chất lượng tốt cho Hưng Yên và Đồng bằng Bắc Bộ” ■

Tài liệu tham khảo

1. Võ Công Thành, đề tài cấp tỉnh: *Chọn giống lúa thơm, kháng rầy và bệnh đạo ôn cho năng suất cao, chất lượng tốt thích nghi cho tỉnh Hậu Giang*, 2011.
2. Võ Công Thành, *Phục tráng giống lúa nếp CK2003*, Tạp chí Khoa học 2011, quyển 18b, trang 102-107.
3. Võ Công Thành, Huỳnh Kỳ, *Kết quả chọn dòng/giống lúa một bụi đổ có chất lượng tốt tại nhà lưới Trường Đại học Cần Thơ*, Tạp chí Khoa học 2011, quyển 18b, trang 157-162.
4. Nguyen Loc Hien, Tadashi Yoshihashi, Wakil Ahmad, Sahardi, Vo Cong Thanh, Yosei Oikawa Hirata, *Evaluation of aroma in rice (Oriza sativa L) using KOH method, molecular markers and measurement of 2-acetyl-1-pyrroline concentrations*, *Jpn. J. Trop. Agr.*, 50 (4), 190-198, 2006.
5. *Kết quả tuyển chọn giống lúa thơm năng suất cao, chất lượng tốt tại tỉnh Hậu Giang vụ đông xuân 2009-2010*, Tạp chí Khoa học 2011, quyển 18b trang 163-172.
6. Võ Công Thành, *Lai chọn giống lúa ngắn ngày năng suất cao, thơm, kháng rầy nâu và bệnh vàng lùn lùn xoắn lá*, đề tài cấp bộ B2009-16-146 TĐ.
7. Hoàng Thị Kim Hồng, Nguyễn Đình Cường, *Đánh giá phẩm chất gạo của một số giống lúa kháng rầy nâu trồng ở Thừa Thiên - Huế*, Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, 64, 33-43, 2010.