

tăng số hạt trên bông giữa Bắc thom 7, Khang dân 18, OM6976, NPT1 và KC25 gồm: RM445, RM500, RM21615.

3. Xác định được các chỉ thị cho đa hình trên 12 NST gồm: 59 chỉ thị cho đa hình giữa giống Bắc thom 7 và KC25, 62 chỉ thị cho đa hình giữa giống Khang dân 18 và KC25, 58 chỉ thị cho đa hình giữa giống OM6976 và KC2, 63 chỉ thị cho đa hình trên 12 NST giữa dòng NPT1 và KC25. Lai tạo thành công tổ hợp F1. Bước nghiên cứu tiếp theo là tiến hành phát triển các thể hệ BC và ứng dụng phương pháp MABC để chọn tạo ra những cá thể có nền di truyền giống cây mẹ cao nhất và mang QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bernatzky, R., & Tanksley, S. D. (1986). *Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences*. Genetics, 112, 887-898.
2. Ikeda, M., Miura, K., Aya, K., Kitano, H., Matsuoka M. (2013). *Genes*

offering the potential for redesigning yield-related traits in rice. Cur Opin Plant Biol (đang phát hành).

3. Khanh T.D, Linh L.H., Linh T.H., Ham L.H., Xuan T.D.. (2013). *Rapid and high-precision marker assisted backcrossing to introgress the SUB1 QTL into the Vietnamese elite variety*. J. Plant Bred Crop Sci, 5: 26-33.
4. Takeda, S., and Matsuoka, M. (2008). *Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes*. Nature, 9:444-457.
5. T.Đ.Khánh, Đ.M. Cường. (2012). *Báo cáo chuyên đề số: 1.1 “Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử liên kết với các tính trạng cấu thành năng suất tạo giống lúa thuần siêu năng suất*. Viện Di truyền Nông nghiệp. Tháng 10, 2012.

Ngày nhận bài: 15/4/2013

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý
ngày 7/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA THUẦN KHÁNG RẦY NẤU

Lưu Thị Ngọc Huyền, Phùng Tôn Quyền,
Vũ Đức Quang

SUMMARY

Application of Marker Assisted Selection technology in brown planthopper resistant rice breeding

Brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stal, which causes serious yield reduction by directly sucking the plants and acting as a vector of various diseases such as rice grassy stunt and ragged stunt, is one of the major insect pests of rice throughout the Asian rice growing countries. Marker Assisted Selection (MAS) is a tool for enhancing the efficiency of Rice Molecular Breeding. Introgression of Bph3 and BphZ genes from the rice line IS1.2 into the elite cultivar IR64 was confirmed using MAS. From the BC3F6 generation, the most promising rice line KR8 was selected. The rice line KR8 was shown high resistance level with most of brown planthopper biotypes in Vietnam. Real revenue yield of the rice line KR8 was 5,2 to 8,0 ton/ha.

Keywords: Brown planthopper, Marker Assisted Selection (MAS), Rice breeding, SSR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rầy nâu là côn trùng nguy hiểm và nghiêm trọng bậc nhất đối với cây lúa, đã gây ra thiệt hại nghiêm trọng ở nhiều nước trồng lúa trên thế giới, đặc biệt là các nước Đông Nam Á. Tại Việt Nam, năm 2010 diện tích lúa bị rầy nâu gây hại trên toàn quốc lên tới 1.082.309 ha. Ở các tỉnh Nam bộ, rầy nâu vẫn gây hại trên diện tích 332.941 ha. Ở các tỉnh đồng bằng sông Hồng (ĐBSH) và ven biển Trung bộ, rầy nâu gây hại trực tiếp trên lúa và truyền bệnh virus lùn xoắn lá với diện tích gây hại trong năm là 749.368 ha (Bộ NN&PTNT, 2010; Cục BVTV, 2010).

Cho tới nay trên thế giới đã xác định được 25 gen kháng rầy nâu. Trong đó có 21 gen đã được lập bản đồ trên các NST của lúa. Các gen kháng Bph1, bph2, Bph9, Bph10, Bph18, Bph21 được phát hiện trên NST số 12, gen Bph12, Bph15, Bph17, Bph20 trên NST số 4, các gen Bph11, Bph13, Bph14, Bph19 trên NST số 3, gen kháng Bph3, bph4 trên NST số 6, gen bph6 trên NST số 11 (Jena, K.K at al 2009; Rahman at al 2009 Jena S at al 2004) nhiều chỉ thị phân tử liên kết chặt chẽ với các gen đã được xác định (Bra et al., 2009). Một số gen đã được sử dụng trong chiến lược chọn tạo giống kháng rầy nâu nhờ chỉ thị phân tử (Marker Assisted selection, MAS). Theo Jairin và cộng sự (2007), Bph1, Bph2, Bph3, và Bph4 đã được sử dụng rộng rãi trong chương trình chọn tạo giống tại Thái Lan. Sự phát triển của công nghệ sinh học và chỉ thị phân tử có thể cho phép đẩy nhanh chương trình chọn tạo giống lúa. Sử dụng MAS không những nâng cao hiệu quả của chọn giống mà còn rút ngắn được thời gian. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là chọn tạo giống lúa kháng rầy nâu bền vững bằng chỉ thị phân tử kết hợp với phương

pháp chọn giống truyền thống, đưa hai gen kháng rầy nâu vào một giống lúa năng suất chất lượng cao của Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống lúa năng suất cao, được trồng phổ biến tại Việt Nam IR64.

- Dòng lúa IS1.2 mang 2 gen kháng rầy nâu Bph3 và BphZ và đã được đánh giá là kháng cao với quần thể rầy nâu ở ĐBSH và đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), nhưng đặc điểm nông sinh học không đáp ứng được nhu cầu sản xuất được sử dụng làm dòng cho gen kháng.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Chọn giống truyền thống để chọn lọc, đánh giá các dòng triển vọng về các đặc tính nông sinh học và yếu tố cấu thành năng suất.

- Đánh giá khả năng kháng/nhiễm rầy nâu các dòng/giống lúa theo tiêu chuẩn của IRRI, đánh giá các dòng lúa mang gen kháng rầy nâu sử dụng công nghệ chỉ thị phân tử SSR.

- Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 5%.

- Phương pháp nhuộm bạc phát hiện băng đa hình ADN.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân tích cá thể mang gen kháng rầy

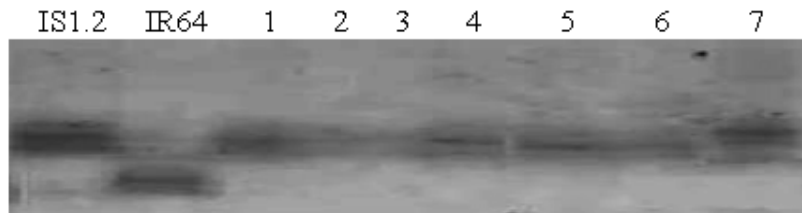
Dòng IS1.2 là dòng lúa mang 2 gen kháng rầy nâu là Bph3 và BphZ. Dòng KR8 là con lai thế hệ BC3F6 của tổ hợp IR64 × IS1.2. Trong nghiên cứu này đã sử dụng chỉ thị SSR để xác định các cá thể và dòng triển vọng mang gen kháng rầy nâu.

Phản ứng PCR được thực hiện với ADN của một số cây của giống KR8 và hai

giống bố mẹ IR64; IS1.2 với các môi trên theo quy trình SSR. Các chỉ thị RM3367 dùng để phát hiện gen kháng liên kết BphZ, còn chỉ thị RM190 dùng để phát hiện gen kháng Bph3. Đây là 2 chỉ thị cho đa hình

khá rõ có thể phát hiện ra các cá thể có mang gen kháng.

Sau khi có kết quả điện di trên gel agarose phản ứng PCR, tiến hành điện di trên gel polyacrylamid 4,5%.



Hình 1: Hình ảnh điện di sử dụng chỉ thị RM3367 liên kết với gen BphZ

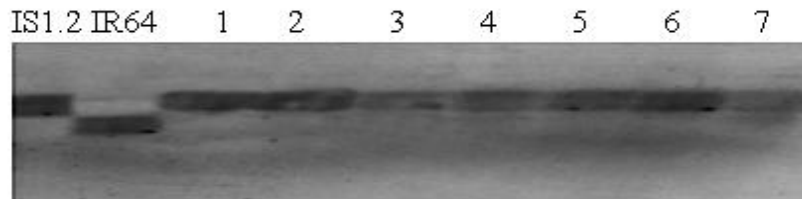
Xác định các cá thể mang gen kháng của dòng KR8. IS1.2: mang băng ADN liên kết gen kháng; băng ADN của giống IR64 không liên kết gen kháng.

Giếng 1-7: các cá thể của dòng KR8 xuất hiện băng ADN của dòng IS1.2 liên kết gen kháng.

Kết quả phân tích trên cho thấy toàn bộ các cá thể KR8 đều mang băng ADN của dòng IS và không có cá thể nào mang băng ADN của dòng IR64. Chúng là các dòng

mang gen kháng BphZ, bao gồm các dòng từ số 1 đến 7. Sử dụng các chỉ thị SSR RM3367, RM6997, RM1388, RM3735 liên kết gen kháng BphZ, đã khẳng định được sự có mặt của gen BphZ trong dòng lúa KR8 trên NST số 4.

Sau đó, các cá thể BC3F6 này đã được tiếp tục kiểm tra với các môi SSR: RM190, RM588, RM589 liên kết gen Bph3 trên NST số 6.



Hình 2: Ảnh phân tích dòng mang gen kháng sử dụng chỉ thị RM190 liên kết Bph3 trong chọn lọc các cá thể của dòng KR8

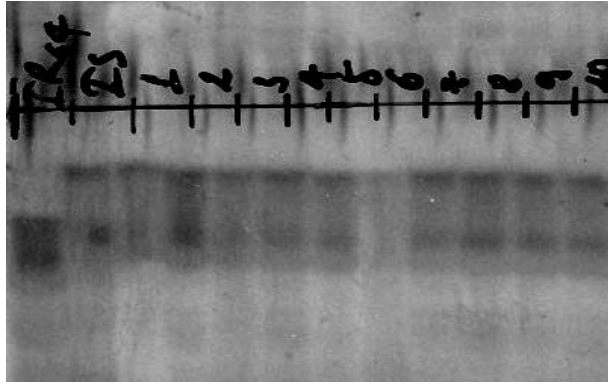
Dòng IS1.2: Mang gen kháng.

Dòng IR64: Không mang gen kháng.

Giếng 1- 7: Các cá thể KR8 mang băng ADN của dòng IS1.2.

Hình 2 minh họa thí nghiệm phân tích sự có mặt của gen Bph3 trong các dòng

KR8 sử dụng chỉ thị RM190 liên kết gen Bph3. Trên cơ sở kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide, đã nhận thấy tất cả các cá thể của dòng KR8 được kiểm tra đều mang gen kháng rầy nâu Bph3.



Hình 3: Ảnh phân tích dòng mang gen kháng sử dụng chỉ thị RM588 liên kết Bph3 trong xác định các cá thể mang gen kháng của dòng KR8

Hình 3 minh họa thí nghiệm phân tích sự có mặt của gen Bph3 trong các dòng KR8, sử dụng chỉ thị RM588 liên kết gen Bph3. Trên cơ sở kết quả phân tích trên gel polyacrylamide, đã nhận thấy tất cả các cá thể của dòng KR8 được kiểm tra đều mang gen kháng rầy nâu Bph3.

Đã xác định được sự có mặt của gen Bph3 trong dòng lúa KR8 bằng RM190, RM586, RM588 chỉ thị liên kết với gen Bph3 trên NST số 6. Như vậy, bằng phân tích chỉ thị phân tử SSR liên kết gen, đã xác

định dòng KR8 mang 2 gen kháng rầy nâu Bph3 và BphZ.

2. Kết quả đánh giá tính kháng rầy nâu theo tiêu chuẩn của IRRI

Tiến hành đánh giá tính kháng rầy nâu của dòng KR8 với nguồn rầy nâu thu thập tại 5 vùng: Hà Nội, Nam Định, Nghệ An, Đồng Tháp, Cần Thơ... Các giống đối chứng là TN1 (giống chuẩn nhiễm) và giống Ptb33 (giống chuẩn kháng), các dòng bố mẹ IR64 và IS1.2.

Kết quả đánh giá tính kháng/nhiễm rầy của giống KR8 được ghi lại trên bảng 1

Bảng 1. Kết quả đánh giá tính kháng/nhiễm rầy nâu

| STT | Tên dòng | Điểm kháng tại các nguồn rầy | | | | |
|-----|-----------|------------------------------|----------|---------|-----------|---------|
| | | Hà Nội | Nam Định | Nghệ An | Đồng Tháp | Cần Thơ |
| 1 | KR8 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | IS1.2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 3 |
| 3 | IR 64 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| 4 | Swanalata | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 5 | Ptb33 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| 6 | TN1 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| 7 | KD18 | 7 | 7 | 9 | 9 | 9 |

KR8 có mức kháng cao từ điểm 1 đến điểm 3. Kết quả này đã khẳng định giống lúa KR8 mang hai gen kháng rầy nâu kháng bền vững với các biotype rầy nâu đã được

thu thập và đánh giá. Đặc biệt là tính kháng rầy nâu của KR8 cao hơn hẳn so với Khang dân 18 (KD18).

3. Kết quả khảo nghiệm giống KR8

Dòng KR8 có thời gian sinh trưởng ngắn từ 110-112 ngày vụ Mùa, dài hơn 3-5 ngày so với giống KD18. Bên cạnh đó, độ cứng cây giúp chống đổ tốt. Chỉ tiêu

quan trọng nhất là tính kháng rầy cũng được thể hiện ở cấp độ 2, là cấp độ kháng cao. Trên bảng 2 thể hiện các chỉ tiêu cấu thành năng suất của giống KR8 so với giống KD18, đặc biệt là chỉ tiêu kháng rầy với tính kháng là rất cao.

Bảng 2. Các chỉ tiêu cấu thành năng suất của dòng KR8 vụ Xuân năm 2012 tại Đan Phượng - Hà Nội (điều kiện thâm canh)

| STT | Tên dòng | Số bông /khóm | Số hạt/ bông | Tỷ lệ hạt chắc (%) | P1000 hạt (g) | NSLT (tạ/ha) | NSTT (tạ/ha) |
|-----|--------------------|---------------|--------------|--------------------|---------------|--------------|--------------|
| 1 | KR8 | 5,55±0,28 | 158,2±10,17 | 88,80 | 27,29 | 105,29 | 80,0 |
| 2 | IR64 | 5,75±1,10 | 102,5± 4,95 | 90,47 | 22,31 | 74,08 | 58,8 |
| 3 | IS1.2 | 6,25±1,10 | 98,5± 4,95 | 86,47 | 23,31 | 71,10 | 51,0 |
| 4 | KD18 | 6,0±0,28 | 190,2±19,82 | 88,03 | 19,80 | 99,35 | 70,2 |
| | CV(%) | | | | | | 4,6 |
| | LSD _{.05} | | | | | | 4,9 |

Bảng 3. Các chỉ tiêu cấu thành năng suất của dòng KR8 vụ Xuân năm 2012 (theo Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống cây trồng và Phân bón Quốc gia)

| STT | Tên dòng | Thời gian sinh trưởng | Số bông/ khóm | Số hạt/bông | Tỷ lệ hạt lép % | Khối lượng 1000 hạt (g) |
|-----|----------|-----------------------|---------------|-------------|-----------------|-------------------------|
| 1 | KR8 | 142 | 4,5 | 152 | 10,7 | 29,1 |
| 2 | KD18 | 136 | 5,2 | 178 | 13,3 | 19,6 |

Bảng 4. Năng suất thực thu của KR8 so với Khang dân (tạ/ha), tại 8 địa phương vùng đồng bằng Trung du Bắc bộ (theo Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống cây trồng và Phân bón Quốc gia)

| STT | Tên dòng | Hưng Yên | Hải Dương | Hải Phòng | Thái Bình | Thanh Hóa | Nghệ An | Bắc Giang | Hà Tĩnh | Trung bình |
|-----|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|---------|------------|
| 1 | KR8 | 68,5 | 57,3 | - | 55,13 | 68,80 | 68,63 | 72,76 | 62,33 | 64,77 |
| 2 | KD18 | 69,2 | 56,73 | 64,97 | 53,80 | 64,47 | 62,23 | 67,33 | 57,33 | 61,97 |

Con lai KR8 của tổ hợp IR64 × IS1.2 hội tụ được những điểm tốt của giống bố mẹ. Tỷ lệ hạt lép của giống KR8 là 10,7% trong khi giống KD18 là 13,3% và khối lượng (P1000) hạt của KR8 là 29,1g trong khi giống KD18 là 19,6g. Đây cũng là 2 yếu tố tạo nên năng suất của giống KR8 cao hơn giống KD18. Năng suất của giống KR8 là 80 tạ/ha cao hơn 13,96% so với giống KD18 trong điều kiện thâm canh.

Theo kết quả của Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống cây trồng và Phân bón Quốc gia, năng suất trung bình của giống KR8 trên 7 tỉnh của vùng Bắc bộ là 64,77 tạ/ha trong khi KD18 là 61,97 tạ/ha. Tỷ lệ hạt lép của KR8 cũng thấp hơn KD18. Điểm mạnh đặc biệt của giống KR8 là tính kháng rầy nâu cao hơn hẳn KD18 khi đánh giá đặc tính kháng rầy nâu trong nhà lưới theo tiêu chuẩn quốc tế.

Giống lúa KR8 được trồng trên ruộng thí nghiệm trong điều kiện hoàn toàn không phun thuốc bảo vệ thực vật từ khi trồng đến khi thu hoạch. Kết quả những dòng lúa mang gen kháng rầy được chọn lọc bằng chỉ thị phân tử đã thể hiện tính kháng rầy nâu cao trên đồng ruộng.

Như vậy, giống lúa kháng rầy KR8 đã có những đặc tính tốt về các đặc điểm nông sinh học và năng suất. Riêng tính kháng rầy cao do mang 2 gen kháng rầy nâu từ dòng IS1.2 rất thích hợp để khảo nghiệm đưa vào sản xuất tại những vùng có nguy cơ xảy ra dịch rầy nâu. Ngoài ra, giống KR8 không thấy bị nhiễm đạo ôn, bạc lá năm 2011 khi dịch bạc lá và đạo ôn xảy ra tại vùng Hải Quang, Hải Hậu - Nam Định. Tại Nam Định, năng suất giống KR8 đạt 74 tạ/ha vụ Xuân năm 2012 trong điều kiện thâm canh.

IV. KẾT LUẬN

1. Giống lúa KR8 đã được chọn tạo từ tổ hợp lai dòng lúa IS1.2 kháng rầy nâu với giống lúa IR64. Bằng chỉ thị phân tử kết hợp chọn giống truyền thống đã chọn lọc được giống triển vọng KR8 mang 2 gen kháng rầy nâu Bph3 và BphZ.

2. Đã xác định đặc tính kháng rầy nâu của giống bằng phương pháp tiêu chuẩn của IRRI với các nguồn rầy nâu thu thập tại Hà Nội, Nam Định, Nghệ An, Đồng Tháp, đạt điểm kháng rầy từ 1 đến 3.

3. Giống lúa KR8 có năng suất trung bình là 64,77 tạ/ha trong khảo nghiệm quốc gia so với KD18 là 61,97 tạ/ha, đã được Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống cây trồng và Phân bón quốc gia đánh giá là giống triển vọng kháng rầy nâu. Trong

điều kiện thâm canh, giống KR8 đã thể hiện năng suất cao từ 70 - 80 tạ/ha vụ Xuân năm 2011 và 2012 tại Hà Nội, Nam Định, Thái Bình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Chỉ thị số 146/CT-BNN-BVTV ngày 13 tháng 01 năm 2010 V/v phòng chống bệnh lùn sọc đen và bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá trên lúa đông xuân 2009 - 2010 ở phía Bắc và Nam Trung bộ.*
2. *Chỉ thị số 456/CT-BNN-TT ngày 11 tháng 02 năm 2010 về tăng cường chỉ đạo sản xuất lúa Xuân năm 2010 ở các tỉnh phía Bắc trong điều kiện vụ Xuân ẩm, hạn và đe dọa của bệnh lúa lùn sọc đen.*
3. Brar D.S., P.S. Virk, K.K. Jena, and G.S. Khush (2009). *Breeding for resistance to planthoppers in rice*. In: Heong K.L. and Hardy B., editors. *Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia*. Los Baños (Philippines), International Rice Research Institute. Pp. 401-428.
4. Jena S, Sahoo P, Mohanty S, Das AB (2004) "Identification of RAPD markers, in situ DNA content and structural chromosomal diversity in some legumes of the mangrove flora of Orissa", *Genetica*; Tập 122; Số 3; Trang 217-226.
5. Jarin J., Phengrat K, Teangdeerith S, Vanavichit A, Toojinda T, 2007a. *Mapping of a broad spectrum brown planthopper resistance gen Bph3 on rice chromosome 6*. *Mol Breed* 19: 35-44.

Ngày nhận bài: 2/5/2013

Người phản biện: TS. Lã Tuấn Nghĩa,
ngày 7/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013