

NGHIÊN CỨU KHẢO SÁT ĐA HÌNH GIỮA GIỐNG CHO VÀ NHẬN QTL/GEN TĂNG SỐ HẠT TRÊN BÔNG TRONG NGHIÊN CỨU VÀ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA THUẦN CAO SẢN

Trần Đăng Khánh, Lê Hùng Lĩnh, Tạ Hồng Lĩnh,
Đỗ Mạnh Cường, Lê Hoàng Anh, Nguyễn Thị Loan,
Phạm Phương Thu, Lê Huy Hàm

SUMMARY

Study on screening polymorphic markers between the donor and recipient plants (QTL/GEN-Increase Grains Per Panicle) for rice yield improvement

Rice plant (*Oryza sativa* L.) is a key plant and providing daily foods for over 89 million persons in Vietnam. However, the pressure of rapid population growth, adverse effects from climate change and limited areas of rice growing in the country due to the urbanization and industrialization that needs to urgently enhance rice yield to meet the above demands. The objective of this study is to apply molecular assisted backcrossing (MABC) to transfer the QTL/gene (IGP7-increase grains per panicle) to some elite Vietnamese rice cultivars. The donor (KC25) and recipient plants (Khang dan 18, Bac thom 7, OM6976 and NPT1) have been successfully selected based on the agronomic and rice yield traits via field screenings. Initial results showed that the 3 SSR markers RM445, RM500 and RM21615 revealed polymorphism at the target between the parental plants. A total of 156 markers distributed on the 12 chromosomes were used to screen the polymorphism between the parental polymorphism for background selection. Among these, 59 polymorphic markers between Bac thom 7/KC25, 62 polymorphic markers for Khang dan 18/KC25, 58 polymorphic markers for OM6976/KC25, and 63 polymorphic markers for NPT1/KC25, respectively. Ongoing works have been done to generate BC generations and followed the MABC steps in order to simultaneously attain the individual plants with the highest background of recipient parent and carrying the QTL/gene *IGP7*.

Keywords: Marker assisted backcrossing, rice yield, agronomic traits.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây trồng quan trọng nhất ở Việt Nam, đồng thời cũng là nguồn thức ăn chính cho một nửa dân số thế giới. Việt Nam là một trong những quốc gia đứng đầu về xuất khẩu gạo, chiếm khoảng 50% tổng sản lượng gạo thương mại trên thế giới. Lúa gạo là nguồn thu ngoại tệ lớn nhất của nền nông nghiệp xuất khẩu Việt Nam và cũng là nguồn thức ăn chính của hơn 89 triệu dân số trong nước. Đồng bằng sông Hồng và đồng bằng sông Cửu Long có sản lượng gạo lần lượt là 17% và 50% (MPI, 2009). Tuy nhiên, do quá trình công nghiệp hóa và đô thị hóa, quỹ đất dành cho trồng lúa bị thu hẹp đáng kể, cùng với những ảnh hưởng tiêu cực từ biến đổi khí hậu năng

suất lúa đã bị sụt giảm rõ rệt. Do vậy, phát triển nguồn giống đã được cải tiến cho năng suất cao, chất lượng tốt là yếu tố quan trọng đảm bảo hệ thống sản lượng lúa. Chọn tạo giống lúa có năng suất cao là hết sức cần thiết và có ý nghĩa an toàn lương thực và tăng thu nhập của nông dân.

Yếu tố cấu thành năng suất ở lúa là một tính trạng phức hợp gồm: Số bông trên khóm, số hạt trên bông và khối lượng nghìn hạt. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC - Marker Assisted Backcrossing) là phương pháp thiết thực, hiệu quả trong việc chuyển locus gen quy định tính trạng di truyền số lượng (QTL - Quantitative Trait Loci) hay gen vào giống mới. Phương pháp MABC cho phép rút ngắn quá trình chọn lọc, chọn lọc được

những tính trạng khó, giảm thiểu được giá thành và thời gian. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử là kỹ thuật hiệu quả so với phương pháp chọn giống truyền thống, cho phép chọn lọc trực tiếp hệ gen của từng cá thể trong quần thể. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử có thể sử dụng một lượng lớn chỉ thị để kiểm tra di truyền của dòng bố mẹ.

Từ đó có thể kiểm soát được các alen đặc biệt trong các cá thể của quần thể. Kiểm tra theo phương pháp đó, kết hợp lại trở lại 2 đến 3 thế hệ là có thể thu được cá thể với nền di truyền của dòng mẹ và mang gen cần chuyển. Các dòng này có thể cho tự thụ, thu hạt để làm thí nghiệm thử nghiệm trên đồng ruộng.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu theo hướng này kể từ khi nhà khoa học Bernatzky và Tanksley, (1986) lần đầu tiên lập bản đồ bằng chỉ thị phân tử RFLP trên cây cà chua. Các nhà chọn giống tại IRRI đã thành công trong việc tạo ra các giống lúa vừa có năng suất cao, vừa có khả năng chống chịu với các điều kiện phi sinh học bất lợi. Theo số liệu cập nhật nhất, khoảng trên 40 QTL/gen quy định yếu tố cấu thành năng suất đã được xác định, phân lập và nhân bản, trong đó gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông (GN1) đã chuyển thành công bằng phương pháp (MABC) vào giống lúa Koshihikari, tăng 20% năng suất so với đối chứng hiện đang được trồng đại trà tại Nhật Bản (Sakamoto và Matsuoka, 2008; Ikeda và cs., 2013).

Ở nước ta, chọn tạo giống bằng chỉ thị phân tử và lai trở lại là lĩnh vực non trẻ và còn nhiều hạn chế, chưa có nghiên cứu nào chuyên sâu về cải tiến năng suất lúa. Từ những vấn đề nêu trên, mục tiêu của đề tài là ứng dụng phương pháp MABC để chuyển QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông vào một số giống lúa trồng đại trà tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Gồm 13 giống mang QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông được thu thập tại một số cơ sở nghiên cứu lúa Quốc Tế, được sử dụng làm cây cho QTL/gen. Đối với giống nhận gen, đề tài đã thu thập được 67 dòng/giống lúa trồng phổ biến tại Việt Nam được sử dụng làm vật liệu cây nhận gen.

- Các chỉ thị phân tử SSR liên quan.

- Các vật tư, hóa chất sinh học phân tử chuyên dụng.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp bố trí thí nghiệm ngoài đồng ruộng đánh giá các chỉ tiêu hình thái sinh trưởng và phát triển, yếu tố cấu thành năng suất và khả năng chống chịu sâu bệnh của vật liệu cho gen và nhận gen.

- Phương pháp chọn giống phân tử và lai trở lại (MABC) (Khanh và cs., 2013).

- Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN theo CTAB cải tiến.

- Phương pháp phân tích số liệu thống kê: Số liệu được xử lý thông kê trên máy tính bằng chương trình Excel, cùng phần mềm SAS, 2008, và các phương pháp phân tích thống kê khác.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đánh giá chỉ tiêu năng suất và yếu tố cấu thành năng suất của dòng/giống cho và nhận QTL/gen tăng số hạt trên bông

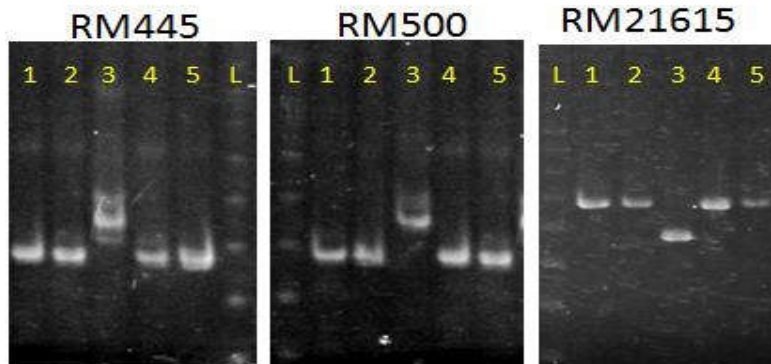
Kết quả khảo sát trên đồng ruộng đánh giá về đặc điểm sinh trưởng và phát triển, các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất thực thu, khả năng chống chịu sâu bệnh, chống đổ và đánh giá độ thuần của 13 giống lúa mang QTL/gen tăng số hạt trên bông, đã

lựa chọn được giống KC25 triển vọng, sử dụng làm giống cho gen (donor plant) quy định tính trạng tăng số hạt trên bông (Khánh và cs, 2012). Tương tự, kết quả đánh giá 67 dòng/giống lúa thu thập, đã chọn được 4 dòng triển vọng dùng làm cây nhận QTL/gen (recipient plants) tăng số hạt trên bông gồm: Bắc thom 7, Khang dân 18, OM6976 và dòng NPT1. Trong đó, giống Khang dân 18 thể hiện tính ổn định và Bắc thom 7 là giống lúa chất lượng, hiện đang được trồng phổ biến ở khu vực đồng bằng sông Hồng, OM6976 là giống lúa năng suất được trồng trên diện rộng ở đồng bằng sông Cửu Long, và dòng dạng hình mới (NPT1) (Khánh và cs, 2012).

2. Xác định chỉ thị phân tử đa hình tại vị trí vùng QTL/gen giữa dòng/giống cho và nhận gen

Giống KC25 mang gen quy định tăng số hạt trên bông *IGP7* đã được xác định và phân lập do các nhà khoa học Nhật Bản và

Hàn Quốc (Takeda và Matsuoka, 2008). Nhằm mục đích tìm kiếm chỉ thị có thể sử dụng để phát hiện QTL/gen *IGP7* trong các cá thể con lai, tiến hành phản ứng PCR với ADN của các giống lúa Bắc thom 7; Khang dân 18; OM6976, NPT1 và giống cho gen KC25. Sử dụng 6 chỉ thị SSR nằm ở vị trí của gen, về hai phía của gen *IGP7* trên nhiễm sắc thể số 7. Xác định được 3 chỉ thị cho đa hình giữa giống Bắc thom 7, Khang dân 18, OM6976 và KC25 gồm: RM445, RM500, RM21615. Kết quả được thể hiện qua Hình 1. So sánh với băng chuẩn L (ladder), với các chỉ thị RM445, RM500 băng chạy số 3 (mẫu DNA của giống KC25) xuất hiện băng DNA cao hơn các băng chạy 1,2,4 và 5, với chỉ thị RM21615 băng chạy số 3 thấp hơn các băng chạy còn lại. Sự chênh lệch về vị trí các băng DNA ở đường chạy số 3 với các băng 1, 2, 4 với 5 thể hiện đa hình giữa các giống Bắc thom 7, Khang dân 18, OM6976, NPT1 với giống KC25 (Hình 1).



Hình 1: Một số kết quả chạy điện di khảo sát, xác định chỉ thị cho đa hình tại vị trí QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông giữa giống cho và nhận gen. Trong đó băng 1: Bắc thom 7, băng 2: Khang dân 18; băng 3: KC25; băng 4: OM6976; băng 5: NPT1

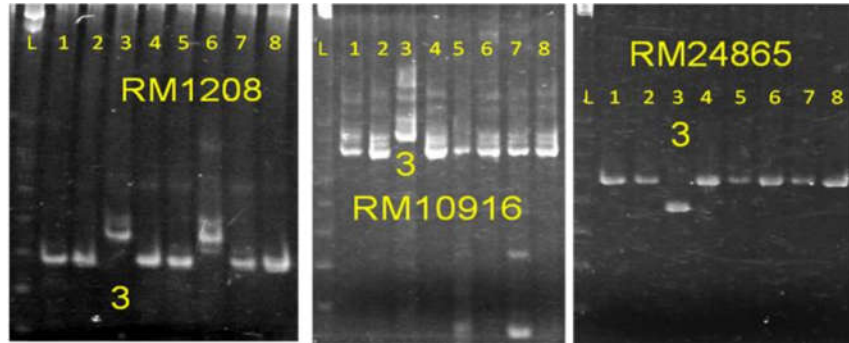
3. Xác định các chỉ thị phân tử đa hình giữa dòng/giống cho và nhận QTL/gen trên 12 nhiễm sắc thể

Bước đầu sử dụng 156 chỉ thị phân tử SSR để khảo sát các chỉ thị cho đa hình

giữa giống cho và nhận QTL/gen trên 12 nhiễm sắc thể (NST) nhằm phục vụ chọn lọc nền di truyền giống nhận gen và chọn lọc các cá thể con lai. Tiến hành làm phản ứng PCR với ADN của các giống lúa nhận và cho gen. Kết quả thu được: 59 chỉ thị

phân tử cho đa hình giữa giống Bắc thom 7/KC25, 62 chỉ thị cho đa hình giữa giống Khang dân/KC25, 58 chỉ thị đa hình giữa giống OM6967/KC25 và 63 chỉ thị đa hình

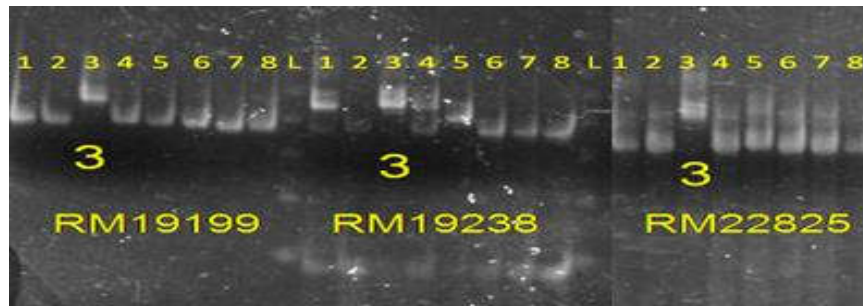
giữa dòng NPT1/KC25 (bảng 1). Một số kết quả điện di chỉ thị phân tử đa hình ADN trên 12 NST được minh họa qua Hình 2, Hình 3.



Hình 2: Một số hình ảnh điện di kết quả khảo sát đa hình với ADN các giống cho và nhận gen với chỉ thị RM2108; RM10916; RM24865. L.Marker ladder; 2.Bắc thom 7; 3.KC25; 4. Khang dân 18; 5.OM6976; 7.NPT1

Quan sát Hình 2, so sánh với băng chuẩn ladder, các chỉ thị RM1208, RM10916, đường chạy số 3 (mẫu DNA của giống KC25) xuất hiện băng DNA cao hơn các băng ở đường chạy số 2 (mẫu DNA của

giống Bắc thom 7), băng số 4 (mẫu DNA của giống Khang dân 18), số 5 (mẫu DNA của giống OM6976), và băng số 7 (mẫu DNA của dòng NPT1).



Hình 3: Kết quả khảo sát đa hình với ADN các giống cho và nhận gen với chỉ thị RM19199; RM19238; RM22825

L.Macker ladder; 2. Bắc thom 7; 3. KC25; 4. Khang dân 18; 5. OM6976; 7. NPT1

Chỉ thị RM24865 ở băng chạy số 3 xuất hiện băng DNA thấp hơn băng DNA ở các băng số 2, 4, 5,7. Sự chênh lệch về vị trí các băng DNA ở các đường chạy 2, 4, 5 và 7 với 3 thể hiện đa hình giữa các giống Bắc thom 7, Khang dân 18, OM6976 với giống KC25. Tương tự, kết quả Hình 3, so sánh

với băng chuẩn ladder, cũng cho thấy chỉ thị RM19199, RM22825 có vị trí mẫu DNA ở đường chạy số 3 cao hơn các đường chạy số 2, 4, 5 và 7. Ở chỉ thị RM19238 mẫu DNA ở đường chạy số 2, 4 lên mờ, đường chạy số 3 và 5 lên rõ, có sự khác biệt vị trí ở đường chạy số 3 và số 5.

Bảng 1. Kết quả xác định chỉ thị phân tử đa hình giữa giống cho và nhận QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông

NST	Chỉ thị phân tử cho đa hình giữa NPT1 và KC25	Chỉ thị phân tử cho đa hình giữa BT7 và KC25	Chỉ thị phân tử cho đa hình giữa KD18 và KC25	Chỉ thị phân tử cho đa hình giữa OM6976 và KC25
1	RM10115, RM10136, RM10694, RM10741, RM10800, RM10815, RM10916, RM11062, RM11438, RM11504, RM1287, RM3412b, RM5365, RM7075	RM10115, RM10136, RM10694, RM10741, RM10800, RM10815, RM10916, RM11062, RM11438, RM11504, RM1287, RM3412b, RM493, RM5365, RM7075	RM10115, RM10136, RM10694, RM10741, RM10800, RM10815, RM10916, RM11062, RM11438, RM11504, RM1287, RM3412b, RM493, RM5365, RM7075	RM10115, RM10136, RM10741, RM10800, RM10815, RM10916, RM11062, RM11438, RM11504, RM1287, RM3412b, RM493, RM5365, RM7075
2	RM1243, RM526, RM5356, RM6, RM7355	RM1243, RM526, RM5356, RM6	RM526, RM5356, RM6, RM7355	RM207, RM526, RM5356, RM6, RM7355
3	RM14795, RM14820, RM282, RM3654, RM5480, RM7389	RM13332, RM14795, RM282, RM3297, RM3654, RM5480	RM14795, RM14820, RM282, RM3297, RM3654, RM5480, RM7389	RM14795, RM14820, RM282, RM3297, RM3654, RM5480
4	RM16589, RM16820, RM280, RM3333, RM349, RM551	RM16820; RM280; RM3333; RM349; RM551	RM16589, RM16820, RM280, RM3333, RM349, RM551,	RM16589, RM16820, RM280, RM349, RM551
5	RM19199; RM31	RM19199; RM31, RM7027	RM19199; RM31, RM7027	RM19199; RM31
6	RM19238, RM3, RM345, RM494, RM527, RM528, RM7434	RM3, RM345, RM494, RM527, RM528, RM7434	RM3, RM345, RM494, RM527, RM528, RM7434	RM19238, RM3, RM345, RM494, RM527, RM528, RM7434
7	RM11, RM21539, RM21769, RM248, RM7338	RM11, RM21539, RM21769, RM248, RM7338	RM11, RM21539, RM21769, RM248, RM7338	RM11, RM21769, RM7338
8	RM22825, RM331, RM447	RM22825, RM331, RM447	RM22825, RM331, RM447	RM22825, RM331, RM447
9	RM1026, RM296, RM11874, RM1208	RM1026, RM11874, RM1208	RM296, RM11874, RM1208	RM296, RM11874, RM1208
10	RM24865, RM25181, RM25271, RM3628	RM24865, RM25181, RM3628	RM24865, RM25181, RM25271, RM3628	RM24865, RM25181, RM25271, RM3628
11	RM3137, RM7283, RM19840, RM341	RM7283, RM19840, RM341	RM7283, RM19840, RM341	RM19840, RM341, RM3625
12	RM1194, RM247, RM7102	RM1194, RM247, RM7102,	RM1194, RM247, RM7102	RM1194, RM247, RM7102

Lai tạo các tổ hợp lai F1

Song song với việc xác định đa hình trên 12 NST, đã tiến hành lai tạo các tổ hợp lai F1 giữa giống cho và nhận QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông. Kết quả lai tạo được các tổ hợp Bắc thom 7/KC25 (65 hạt), tổ hợp Khang dân 18/KC25 (35 hạt), tổ hợp OM6976/KC25 (40 hạt) và tổ hợp NPT1/KC25 (32 hạt).

IV. KẾT LUẬN

1. Chọn được 4 dòng/giống dùng làm cây nhận gen gồm Bắc thom 7, Khang dân 18, OM6976, dòng NPT1, 1 giống triển vọng cho QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông là KC25.

2. Xác định được 3 chỉ thị phân tử đa hình tại vị trí QTL/gen quy định tính trạng

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