

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH TÍCH HỢP ĐA GEN KHÁNG ĐA YẾU TỐ VÀO GIỐNG LÚA CHẤT LƯỢNG BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ (MABC)

Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Nguyễn Thị Nhài¹,
Nguyễn Bá Ngọc¹, Đào Văn Khởi², Chu Đức Hà¹,
Lê Hùng Linh¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy²

TÓM TẮT

Giống lúa chất lượng Bắc Thơm số 7 (BT7) là một trong những giống lúa chủ lực trong sản xuất lúa gạo ở các tỉnh phía Bắc. Tuy nhiên, canh tác giống BT7 đang chịu ảnh hưởng nghiêm trọng do sự phát triển của sâu bệnh hại, đặc biệt là bệnh bạc lá, bệnh đạo ôn và rầy nâu. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích xây dựng Quy trình tích hợp đa gen kháng đa yếu tố vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử (MABC). Kết quả nghiên cứu đã áp dụng thành công phương pháp chọn giống dựa vào chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC) để tích hợp được 5-6 gen kháng (bệnh bạc lá, rầy nâu và đạo ôn) vào giống lúa chất lượng BT7. Dòng lúa triển vọng AGI-6 (từ dòng gốc BT7.10.20) tích hợp 6 gen kháng *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1* và *Pi9(t)* đã biểu hiện khả năng chống chịu tốt với các tình trạng mục tiêu: kháng bạc lá điểm 2,9, kháng rầy nâu điểm 3,7 và kháng đạo ôn điểm 3,0. Dòng AGI-6 mang các đặc điểm nông sinh học chính của giống gốc BT7, có chất lượng cơm gạo gần tương tự giống gốc BT7 và có năng suất vượt đối chứng 14,7% trong vụ mùa sẽ được tiếp tục chọn lọc làm thuần và gửi khảo nghiệm VCU, khảo nghiệm DUS và khảo nghiệm sản xuất tại các vùng sinh thái để đánh giá khả năng thích ứng và triển vọng của giống lúa tích hợp đa gen kháng. "Quy trình tích hợp đa gen kháng đa yếu tố vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử MABC" có khả năng áp dụng để cải tiến giống cây trồng mang những tính trạng mong muốn phục vụ sản xuất nông nghiệp bền vững tại Việt Nam.

Từ khóa: Quy trình tích hợp đa gen kháng, MABC, đạo ôn, bạc lá, rầy nâu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo là nguồn lương thực cần thiết cho một phần không nhỏ dân số trên thế giới và là nguồn lương thực chính ở phần lớn châu Á, châu Đại Dương, Bắc và Nam Mỹ, châu Phi. Hàng năm có hàng triệu hecta trồng lúa trên khắp thế giới, nơi sản xuất hàng triệu tấn lúa gạo đã bị nhiễm sâu bệnh hại, làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng lúa gạo. Trong số các loại bệnh hại trên cây lúa, bệnh bạc lá (BB) do vi khuẩn *Xanthomonas Oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo) và bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe oryzae* (tên gọi khác là *Pyricularia grisea*) gây ra là hai loại bệnh hại nghiêm trọng nhất ở hầu hết các vùng trồng lúa trên thế giới. Bên cạnh đó, rầy nâu (BPH) *Nilaparvata lugens* cũng là một

trong những tác nhân gây hại nghiêm trọng nhất ở các nước châu Á nơi lúa được trồng rộng rãi.

Với sự tiến bộ vượt bậc của các kỹ thuật sinh học phân tử và sự hiểu biết về cơ chế gây bệnh của các tác nhân gây hại (đạo ôn, bạc lá, rầy nâu...), những chiến lược tạo ra tính kháng phổ rộng với những tác nhân này đã mang lại những kết quả khả quan, nhiều giống kháng bệnh mới đã được đưa vào sản xuất (Sharma & cs., 2012; Vera cruz & cs., 2014; Jena & cs., 2014...). Hiện nay, các nhà khoa học trong nước đã thực hiện các nghiên cứu quy tụ nhiều gen kháng với một tính trạng mong muốn vào một giống lúa bằng phương pháp chọn giống dựa vào chỉ thị phân tử (MAS, MABC) và mang lại nhiều kết quả đáng ghi nhận. Nhiều giống lúa kháng bạc lá, giống kháng đạo ôn và giống kháng rầy nâu được lai tạo và thử nghiệm trong sản xuất đã quy tụ 2, thậm chí 3 gen kháng chính. Tuy nhiên, hầu hết các giống lúa đa gen kháng được chọn tạo trong thời gian vừa qua

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp
Email: nguyetha176@gmail.com

² Bộ Nông nghiệp và PTNT

mới chỉ kháng với đơn tính trạng. Chính vì vậy, việc ứng dụng công nghệ chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại để cải tiến giống lúa chất lượng có khả năng kháng đa yếu tố là một vấn đề cấp thiết hiện nay không chỉ đối với nước ta mà còn với các quốc gia trên toàn thế giới. Nghiên cứu xây dựng "*Quy trình tích hợp đa gen kháng đa yếu tố vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử (MABC)*" được đặt ra nhằm mục tiêu ứng dụng công nghệ chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại để cải tiến giống lúa chất lượng kháng đa yếu tố phục vụ sản xuất lúa gạo bền vững tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống lúa cần cải tiến: Bắc Thơm số 7 (BT7) là giống lúa thuần nhập nội từ Trung Quốc, được công nhận giống theo Quyết định số 1224/QĐ/BNN-KHCN, ngày 21/4/1998. BT7 là giống lúa thơm, chất lượng, được gieo trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam, tuy nhiên giống nhiễm nặng bệnh bạc lá, nhiễm rầy nâu và nhiễm nhẹ bệnh đạo ôn.

- Các dòng/giống cho gen kháng do IRRI cung cấp, gồm có: Dòng mang đa gen kháng bệnh bạc lá: IRBB64 (*Xa4 + xa5 + Xa7 + Xa21*); dòng mang đa gen kháng rầy nâu: IR71033-121-15 (*Bph20, Bph21*); dòng mang đa gen kháng đạo ôn: IRBL9-W (*Pi9(t)*); IRBL1-CL (*Pi1*); AH3 [*Pi9(t) + Pi1 + Pi33 + Pita*]...

- Ba giống nhiễm chuẩn, bao gồm IR24 (chuẩn nhiễm bạc lá), TN1 (chuẩn nhiễm rầy nâu) và LTH (chuẩn nhiễm đạo ôn).

- Bộ vật liệu lai tạo là các dòng lúa thể hệ BC₄F₁ tích hợp đa gen kháng đơn tính trạng được tuyển chọn từ phép lai giữa BT7 (♀) với các dòng lúa cho gen kháng (♂).

- Các chỉ thị liên kết với gen kháng mục tiêu (*xa5, Xa7, Bph20, Bph21, Pi1, Pi9(t)*...) được sử dụng trong chọn lọc các cá thể mang gen kháng mục tiêu trong các quần thể lai trở lại (Bảng 1) và 472 chỉ thị SSR phân bố trên 12 NST của hệ gen lúa sẽ được sàng lọc để xác định bộ chỉ thị đa hình giữa giống cho gen và giống nhận gen để kiểm tra nền di truyền của các dòng vật liệu.

Bảng 1. Các chỉ thị phân tử liên kết với các gen kháng mục tiêu sử dụng trong chọn lọc cá thể

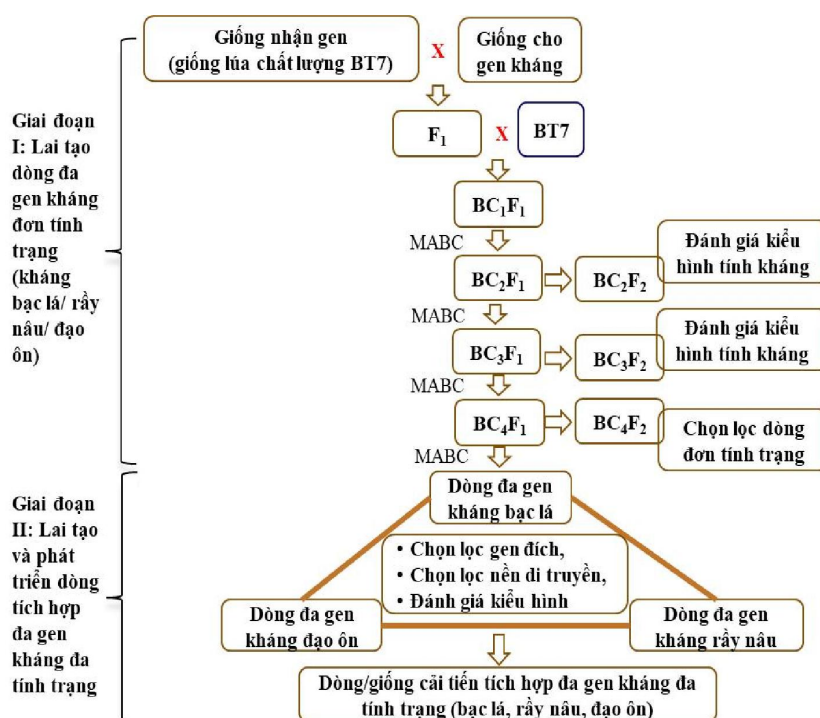
Gen kháng	NST	Chỉ thị liên kết	Khoảng cách (cM)	Trình tự mỗi xuôi/ngược	TLTK
<i>xa5</i>	5	RM153	5,6	F: GCCTCGAGCATCATCATCAG R: ATCAACCTGCACTTGCCTGG	Blair et al., 2003
<i>Xa7</i>	6	P3	3,4	F: CAGGAATTGACTGGAGTAGTGGTT R: CATCACGGTCACCGCCATAT	Porter & cs., 2003
<i>Bph20</i>	4	MS5	2,9	F: TTGTGGGTCCTCATCTCCTC R: TGACAACTTGTGCAAGATCAAA	Rahman & cs., 2009
	4	MS10	0,7	F: CAATACGAGAAGCCCCCTCAC R: CTGAAGGAACACGCGGTAGT	
<i>Bph21</i>	12	S12091A	3,8	F: TGGGGTTAAATGTTGCCTCT R: CATATGTGGGAGCAGACTAGCA	
<i>Pi1</i>	11	RM224	0	F: ATCGATCGATCTTCACGAGG R: TGCTATAAAAGGCATTTCGGG	Fjellstrom và cs., 2004
<i>Pi9 (t)</i>	6	pB8	0	F: CCGGACTAAGTACTGGCTTCGATA R: CCCAATCTCCAATGACCCATAAC	Wen và Gao, 2011

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lai tạo

Phương pháp MABC được áp dụng nhằm cải tiến giống lúa chất lượng bằng cách tích hợp đa gen chống chịu với các tác nhân gây bệnh (bệnh bạc lá,

đạo ôn, rầy nâu). Để thực hiện được mục đích này, đầu tiên các dòng đa gen kháng đơn tính trạng được phát triển bằng phương pháp MABC, sau đó sử dụng phương pháp lai đơn, lai kép và sàng lọc kiểu hình, kiểu gen để tạo ra các dòng đa gen kháng với đa tính trạng (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ tích hợp đa gen kháng bệnh bạc lá, rầy nâu và đạo ôn vào giống lúa chất lượng BT7 bằng phương pháp MABC

2.2.2. Phương pháp phân tích kiểu gen bằng chỉ thị phân tử

- ADN được tách chiết từ mẫu lá non sử dụng phương pháp tách nhanh phục vụ cho PCR của Wang & cs. (1993). Tiến hành kỹ thuật PCR với tổng dung dịch phản ứng là 15 µl bao gồm 50 ng ADN tổng số, 0,15 µM mỗi, 0,2 mM dNTPs, 1 X dịch đệm PCR, 2,5 mM MgCl₂ và 0,5 đơn vị Taq TaKaRa. Điều kiện phản ứng PCR: 95°C - 7 phút; 40 chu kỳ của: 94°C - 15 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 2 phút; giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose gel TBE 0,5X 2,5% có bổ sung edithium bromide để xác định sự có mặt của gen kháng mục tiêu và đánh giá nền di truyền của các cá thể.

2.2.3. Phương pháp đánh giá tính kháng/nhiễm bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu bằng lây nhiễm nhân tạo

Phương pháp đánh giá tính kháng/nhiễm bệnh bạc lá: Các chủng vi khuẩn bạc lá sử dụng trong nghiên cứu được thu thập từ các vùng sinh thái, đã được đánh giá độc tính với bộ giống lúa chỉ thị mang đơn gen kháng và được bảo quản tại Viện Di truyền Nông nghiệp. Lây nhiễm nhân tạo bằng phương pháp sử dụng kéo nhúng vào dung dịch vi khuẩn (nồng độ

10⁸-10⁹ CFU) cắt đầu lá lúa để tạo vết thương. Thí nghiệm lây nhiễm được thực hiện sau khi cấy lúa 45 ngày, mỗi cây nhiễm 5 lá với giống nhiễm chuẩn là IR24. Đối chứng âm được làm với nước cất khử trùng. Chiều dài vết bệnh được đo sau 18 ngày lây nhiễm. Kết quả đánh giá dựa trên thang đánh giá bệnh tiêu chuẩn (IRRI, 2013).

Phương pháp lây nhiễm bệnh đạo ôn trên lá: Các nòi nấm bệnh đạo ôn sử dụng trong nghiên cứu được thu thập từ các vùng sinh thái, đã được đánh giá độc tính với bộ giống lúa chỉ thị mang đơn gen kháng và được bảo quản tại Viện Di truyền Nông nghiệp. Dung dịch chứa bào tử nấm (nồng độ ~5x10⁴ bào tử/ml) được phun đều lên cây mạ 14 - 21 ngày tuổi (4 - 5 lá) bằng bình tích áp. Ủ các khay mạ trong buồng tối (độ ẩm 100%, 25°C) và giữ trong 24 giờ để bào tử nảy mầm. Đưa khay mạ ra nhà lưới (ánh sáng thường, độ ẩm > 70%, 25°C) và giữ trong 7 ngày để nấm phát triển và gây bệnh. Kết quả đánh giá sau 7 ngày phun nhiễm nhân tạo dựa trên thang đánh giá tiêu chuẩn của IRRI (2013).

Phương pháp lây nhiễm nhân tạo rầy nâu: Nguồn rầy nâu thu thập Hà Nội và một số tỉnh phía Bắc (Hà Nam, Nam Định...) được nhân nuôi trong

nhà lưới Viện Di truyền Nông nghiệp. Mạ 10-15 ngày tuổi (2-3 lá) của giống nhiễm chuẩn TN1 được dùng để nuôi rầy. Rầy tuổi 1-2 được thả vào lồng thí nghiệm với mật độ 4-5 con/cây mạ. Thời điểm đánh giá được tiến hành khi 100% giống nhiễm chuẩn TN1 chết (khoảng 10-15 ngày sau khi thả rầy). Kết quả đánh giá dựa trên triệu chứng gây tổn thương, thang điểm dựa trên thang đánh giá bệnh tiêu chuẩn (IRRI, 2013).

2.2.4. Phương pháp thí nghiệm đồng ruộng

Khảo nghiệm tác giả: Các dòng lúa triển vọng được triển khai khảo nghiệm tác giả tại 5 điểm thí nghiệm tại Hà Nội (2 điểm), Thái Bình, Quảng Ninh và Hà Tĩnh, quy mô thí nghiệm: 2.000 m²/điểm x 5 điểm x 2 vụ = 20.000 m². Quan sát và đánh giá dựa theo “Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa” (QCVN 01-55:2011/BNNPTNT) và “Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định của giống lúa QCVN 01-65:2011/BNNPTNT”. So sánh dòng triển vọng với giống BT7.

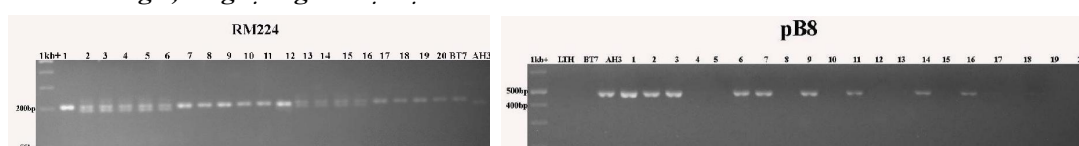
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu, số liệu đồng ruộng được phân tích, xử lý bằng các phần mềm IRRISTAT v. 5.0 và Microsoft excel 2010. Phân tích số liệu kiểu gen bằng phần mềm Graphical Genotypes 2.0 (GGT v. 2.0).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu tích hợp đa gen kháng bệnh bạc lá, rầy nâu và đạo ôn vào giống lúa Bắc Thơm 7 bằng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại

3.1.1. Đánh giá, sàng lọc nguồn vật liệu



Hình 2. Kết quả phân tích kiểu gen quần thể N1.3 với các chỉ thị RM124, pB8 liên kết gen kháng *Pi1*, *Pi9(t)*

Chú thích: 1kb+: Thang ADN chuẩn; 1-20: các cá thể của quần thể N1.3; BT7, AH3

*Chỉ thị pB8 là chỉ thị trội, băng sản phẩm PCR đặc hiệu chỉ xuất hiện ở cá thể mang gen kháng *Pi9(t)*.*

Các cá thể được xác định mang hai gen kháng với một tính trạng (chống chịu bạc lá/rầy nâu/đạo ôn) và mang nền di truyền > 98% của giống gốc BT7 của các quần thể N1.1, N1.2, N1.3 được sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm tích hợp đa gen kháng hai tính trạng trong vụ xuân năm 2018. Kết quả đã tạo ra được 4 tổ hợp lai N2.1 (N1.2 x N1.3), N2.2 (N1.3 x

Trong vụ xuân năm 2018, thí nghiệm gieo trồng, đánh giá, sàng lọc nguồn vật liệu kế thừa thể hệ BC₄F₁ đã được tiến hành tại ruộng thí nghiệm tại xã Lại Yên, Hoài Đức, Hà Nội. Tổng số 3 quần thể BC₄F₁ đã được sử dụng làm nguồn vật liệu (Bảng 2). Các chỉ thị phân tử liên kết chặt với các gen đích: RM153 (gen *xa5*), P3 (*Xa7*), MS5, MS10 (*Bph20*), S12091A (*Bph21*), RM224 (*Pi1*) và pB8 (*Pi9(t)*) được sử dụng để xác định các cá thể mang gen kháng mục tiêu trong các quần thể lai trở lại. Bộ chỉ thị phân tử cho đa hình giữa giống cho và nhận gen được sử dụng để phân tích nền di truyền (52 chỉ thị cho quần thể N1.1; 56 chỉ thị cho quần thể N1.2 và 63 chỉ thị cho quần thể N1.3).

Bảng 2. Danh sách các quần thể tích hợp đa gen kháng với một tính trạng

Mã số	Quần thể BC ₄ F ₁	Gen kháng mục tiêu	Số lượng cá thể
N1.1	BT7/IRBB64///BT7	<i>xa5</i> , <i>Xa7</i>	153
N1.2	BT7/IR71033-121-15///BT7	<i>Bph20</i> , <i>Bph21</i>	125
N1.3	BT7/AH3///BT7	<i>Pi1</i> , <i>Pi9(t)</i>	100

Kết quả phân tích kiểu gen kháng và nền di truyền của các quần thể N1.1 đã xác định được 7 cá thể mang hai gen kháng *xa5* + *Xa7*, có nền di truyền giống với giống gốc BT7 (> 98%). Tương tự, ở quần thể N1.2 đã xác định được 4 cá thể mang hai gen kháng *Bph20* + *Bph21* có nền di truyền giống với giống gốc BT7 và quần thể N1.3 thu được 7 cá thể mang 2 gen kháng *Pi1* + *Pi9(t)*, có nền di truyền của giống gốc BT7 (Nguyễn Thị Minh Nguyệt và ctv., 2020, Hình 2).

3.1.2. Lai tạo và chọn lọc các dòng Bắc Thơm 7 tích hợp đa gen kháng hai tính trạng

Trong vụ mùa năm 2018, 4 quần thể N2.1, N2.2, N2.3 và N2.4 tích hợp đa gen kháng hai tính trạng đạo ôn và rầy nâu, bạc lá và rầy nâu được gieo trồng để phân tích kiểu gen và theo dõi kiểu hình. Kết quả phân tích kiểu gen đã xác định được 17 cá thể mang 4 gen kháng *Pi1*, *Pi9(t)*, *Bph20*, *Bph21* ở trạng thái dị hợp tử; 24 cá thể mang 4 gen kháng *xa5*, *Xa7*, *Bph20* và *Bph21* ở trạng thái dị hợp tử (Nguyễn Thị Minh Nguyệt và ctv, 2020).

Tổng hợp kết quả theo dõi đặc tính nông sinh học, đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu trong vụ mùa 2018, đã xác định được 7 dòng lúa thế hệ BC₄F₂ mang đa gen kháng với hai tính trạng, trong đó 3 dòng N2.3.38, N2.3.55 và N2.3.64 mang 4 gen *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21* biểu hiện tính kháng với bạc lá và rầy nâu và 4 dòng

N2.2.32, N2.2.41, N2.2.47 và N2.2.55 mang 4 gen *Pi1*, *Pi9(t)*, *Bph20*, *Bph21*, biểu hiện tính kháng với đạo ôn và rầy nâu. Các dòng này được tiếp tục sử dụng làm vật liệu lai tạo và phát triển thành dòng tích hợp đa gen kháng ba tính trạng.

3.1.3. Lai tạo và phát triển các dòng Bắc Thơm 7 tích hợp đa gen kháng ba tính trạng kháng bạc lá, đạo ôn và rầy nâu

Các cá thể mang 4 gen kháng với hai tính trạng được sử dụng làm vật liệu lai tạo các tổ hợp lai đa gen kháng với ba tính trạng kháng bạc lá, đạo ôn và rầy nâu. Tổng số 4 quần thể tích hợp đa gen kháng với 3 tính trạng N3.1, N3.2, N3.5 và N3.6, với số lượng từ 50- 67 cá thể/quần thể đã được lai tạo trong vụ mùa 2018 (Bảng 3).

Bảng 3. Danh sách các quần thể tích hợp đa gen kháng ba tính trạng được lai tạo trong vụ mùa 2018

TT	Mã số dòng	Thế hệ	Giống gốc	Số lượng	Gen kháng mục tiêu	Tính trạng (chống chịu)
1	N3.1	BC ₄ F ₁	BT7	58	<i>xa5</i> , <i>Xa7</i> , <i>Bph20</i> , <i>Bph21</i> , <i>Pi1</i> , <i>Pi9(t)</i>	Bạc lá + rầy nâu + đạo ôn
2	N3.2	BC ₄ F ₁	BT7	50		
3	N3.5	BC ₄ F ₁	BT7	67		
4	N3.6	BC ₄ F ₁	BT7	60		

Kết quả sàng lọc bằng chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng đã xác định được 3 cá thể N3.2.3, N3.2.17, N3.2.42 mang 5 gen kháng *xa5*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)*; 01 cá thể N3.6.54 mang 5 gen *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Pi1* và *Pi9(t)*.

Thí nghiệm lai tạo tiếp tục được thực hiện trong vụ xuân 2019 nhằm phát triển thêm các tổ hợp lai

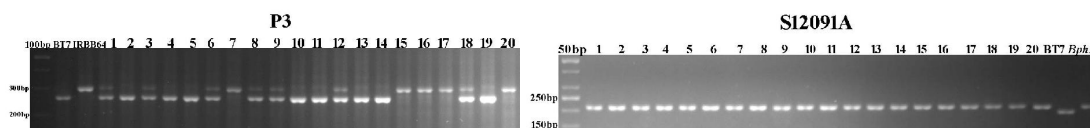
tích hợp 5-6 gen kháng với 3 tính trạng. Vật liệu sử dụng để lai tạo là các cá thể BC₄F₂ mang 4 gen kháng đồng hợp tử chọn lọc được từ quần thể N2.3 và N2.2 trong các thí nghiệm đánh giá kiểu gen. Kết quả lai tạo ở vụ xuân 2019 đã nhận được 03 tổ hợp lai mới (Bảng 4).

Bảng 4. Danh sách các tổ hợp lai (BC₄F₂ x BC₄F₂) tích hợp đa gen kháng ba tính trạng, vụ xuân 2019

TT	Mã số	Tổ hợp lai	Số lượng cá thể	Gen kháng mục tiêu
1	N3.9	N2.3.38.39 x N2.2.32.23	63	<i>xa5</i> , <i>Xa7</i> , <i>Bph20</i> , <i>Bph21</i> , <i>Pi1</i> , <i>Pi9(t)</i>
2	N3.10	N2.3.55.76 x N2.2.41.5	59	
3	N3.11	N2.3.64.18 x N2.2.55.135	70	

Kết quả sàng lọc bằng chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng bạc lá, rầy nâu và đạo ôn đã xác định được ba cây đầu dòng N3.9.15, N3.10.20 và N3.11.25 mang

6 gen kháng *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1* và *Pi9(t)* (Hình 3).



Hình 3. Kết quả phân tích kiểu gen các dòng lúa tích hợp đa gen kháng với chỉ thị P3 và S12091A liên kết gen kháng *Xa7* và *Bph21*

Chú thích: Thang ADN chuẩn 100bp, 50bp; 1-20: các cá thể của các dòng lúa tích hợp đa gen kháng; BT7, dòng cho gen (*IRBB64/IR71033-121-15*)

Tổng hợp kết quả đánh giá đặc tính nông sinh học, đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu của các dòng lúa mang đa gen kháng ba tính trạng trong vụ mùa 2019, 7 dòng trong đó có 4 dòng N3.2.3, N3.2.17, N3.2.42 và N3.6.54 tích hợp 5 gen kháng *xa5/Xa7*, *Pi1*, *Pi9(t)*, *Bph20/Bph21*; 3 dòng N3.9.15, N3.10.20 và N3.11.25 tích hợp 6 gen kháng *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)* đã được chọn lọc

và tiếp tục phát triển thành dòng thuần. Những dòng này đều biểu hiện tính kháng tốt với bạc lá và đạo ôn (điểm < 3), chống chịu vừa rầy nâu (điểm < 5). Bốn dòng N3.2.17, N3.9.15, N3.10.20 và N3.11.25 được lựa chọn (đặt tên lần lượt là BT7.2.17; BT7.9.15, BT7.10.20 và BT7.11.25) để khảo nghiệm tác giả tại các vùng sinh thái (Bảng 5, 6).

Bảng 5. Tổng hợp kết quả đánh giá đặc điểm nông sinh học và năng suất của các cá thể đầu dòng tích hợp đa gen kháng ba tính trạng (vụ mùa, 2019)

TT	Mã số dòng	TGST (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số bông /khóm	Dài bông (cm)	Số hạt chắc/bông	KL 1000 hạt	NSLT (g/khóm)
1	N3.2.3	103	103	7	26	144,4	22,0	22,2
2	N3.2.17	103	107	7	25,5	157,6	20,6	22,7
3	N3.2.42	103	118	8	28	132,8	20,0	21,2
4	N3.6.54	104	112	7	27,5	128	20,6	18,5
5	N3.9.15	105	113	8	28,5	131,8	22,0	23,2
6	N3.10.20	104	114	8	29	151,2	21,0	25,4
7	N3.11.25	105	115	8	27	138,8	20,6	22,9
BT7 (đối chứng)		103	117,5	7	24,8	179	18,0	22,6

Bảng 6. Tổng hợp kết quả đánh giá kiểu gen và kiểu hình tính kháng của các cá thể đầu dòng tích hợp đa gen kháng ba tính trạng (vụ mùa, 2019)

TT	Mã số dòng	Đánh giá kiểu gen kháng						Đánh giá kiểu hình tính kháng ^(*)							
		Bạc lá		Rầy nâu		Đạo ôn		Bạc lá			Rầy nâu		Đạo ôn		
		<i>xa5</i>	<i>Xa7</i>	<i>Bph20</i>	<i>Bph21</i>	<i>Pi1</i>	<i>Pi9(t)</i>	CDVB	Điểm	Tính kháng	Điểm	Tính kháng	Điểm	Tính kháng	
1	N3.2.3	x		x	x	x	x	3,5	1	R	4,0	MR	3,0	R	
2	N3.2.17	x		x	x	x	x	2,5	1	R	4,0	MR	3,0	R	
3	N3.2.42	x		x	x	x	x	4,0	1	R	3,8	MR	2,5	R	
4	N3.6.54	x	x	x		x	x	2,5	1	R	3,8	MR	2,5	R	
5	N3.9.15	x	x	x	x	x	x	2,0	1	R	3,9	MR	3,0	R	
6	N3.10.20	x	x	x	x	x	x	2,5	1	R	3,9	MR	2,5	R	
7	N3.11.25	x	x	x	x	x	x	2,5	1	R	3,8	MR	3,0	R	
BT7 (ĐC)								21,9	9	HS	9	HS	5,5	MS	

Chú thích: (*): Mức điểm trung bình thang điểm IRRI (2013); CDVB: Chiều dài vết bệnh; R: Kháng, MR: Kháng vừa; MS: Nhiễm vừa; HS: Nhiễm nặng

3.2. Kết quả khảo nghiệm tác giả và đánh giá tính kháng của các dòng triển vọng tích hợp đa gen kháng ở các vùng sinh thái

Bốn dòng lúa BT7.2.17; BT7.9.15, BT7.10.20 và BT7.11.25 được triển khai khảo nghiệm tác giả tại 5 điểm thí nghiệm tại Hà Nội (2 điểm), Thái Bình, Quảng Ninh và Hà Tĩnh. Kết quả theo dõi một số đặc điểm nông sinh học chính, năng suất và chất lượng của các dòng triển vọng được thể hiện ở bảng 6. Bốn

dòng triển vọng nhìn chung có TGST ngắn, các đặc điểm nông sinh học tương tự giống BT7. Hai dòng BT7.10.20 và BT7.11.25 tích hợp 6 gen kháng (*xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)*) đều có khả năng kháng tốt với bệnh bạc lá và đạo ôn trong điều kiện không sử dụng thuốc BVTV. Dòng lúa BT7.11.25 có năng suất thực thu (NSTT) cao hơn đối chứng BT7 16,5% trong vụ xuân. Trong vụ mùa, dòng BT7.10.20 có NSTT cao hơn đối chứng BT7 17,1% và có chất lượng cơm gạo nổi trội hơn 3 dòng còn lại. Dòng

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

BT7.10.20 tích hợp 6 gen kháng (*xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)*) nền di truyền của giống Bắc Thơm 7 được đặt tên là AGI-6 và gửi Viện Bảo vệ Thực vật đánh giá tính kháng với bệnh bạc lá, đạo ôn

và rầy nâu trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo. Kết quả đánh giá cho thấy dòng triển vọng AGI-6 có khả năng kháng bạc lá điểm 2,9, kháng vừa rầy nâu điểm 3,7 và kháng đạo ôn điểm 3,0 (Bảng 8).

Bảng 7. Kết quả so sánh các dòng triển vọng

TT	Tên dòng		BT7.2.17	BT7.9.15	BT7.10.20	BT7.11.25	BT7 (Đ/c)
	Chỉ tiêu						
1	TGST (ngày)	Vụ xuân	127	128	128	126	126
		Vụ mùa	102	102	100	101	101
2	Chiều cao cây (cm)		106-116	107-115,5	104-112,6	108,9-115,9	106,2-112,3
3	Độ cứng cây (điểm)		1	1	1	1	1
4	Dạng thân		1	1	1	1	1
5	Dạng lá đồng		1	1	1	1	1
6	Màu sắc lá		5	5	5	5	5
7	Số bông hữu hiệu/khóm		5,7	5,7 - 6	5,8 - 6,4	5,8 - 6,5	5,3 - 5,9
8	Số hạt chắc/bông		158,5-161	155,7-161	153,7-165,1	159,0-162,4	142,6-145,5
9	KL1000 hạt (g)		20-20,5	19,3-19,5	18,6-19,9	18,4-19,1	18,3-17,5
10	Tỷ lệ hạt lép		11,0	12,5	11,9	13,1	12,6
11	NSTT (tạ/ha)	Vụ xuân	57,2	55,8	56,4	57,3	49,3
		Vụ mùa	56,1	53,9	54,2	53,3	46,3
12	% NSTT vượt đối chứng	Vụ xuân	16,3	13,5	14,7	16,5	
		Vụ mùa	21,1	16,5	17,1	15,1	
13	Bệnh đạo ôn (điểm)	Hại lá	0-1	0-1	0-1	0-1	1-3
		Cổ bông	0-1	0-1	0-1	0-1	1-3
14	Bệnh bạc lá (điểm)		0-1	0-1	0-1	0-1	1-5
15	Bệnh khô vằn (điểm)		1-3	1-3	1-3	1-3	1-3
16	Sâu cuốn lá (điểm)		0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
17	Sâu đục thân (điểm)		0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
18	Rầy nâu (điểm)		0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
19	Chất lượng cơm (điểm)		15,8	15,8	16,0	15,6	16,8

Bảng 8. Kết quả đánh giá khả năng chống chịu rầy nâu, bạc lá, đạo ôn của dòng lúa AGI-6 trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo

STT	Tên giống	Rầy nâu		Đạo ôn lá		Bạc lá	
		Cấp hại	Mức đánh giá	Cấp hại	Mức đánh giá	Cấp hại	Mức đánh giá
3	AGI-6	3,7	Kháng vừa	3,0	Kháng	2,9	Kháng

Nguồn: Viện Bảo vệ Thực vật

Tóm lại, áp dụng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC) đã tích hợp được 5- 6 gen kháng *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)* vào giống lúa chất lượng Bắc Thơm số 7. Các dòng triển vọng vẫn giữ được các đặc điểm nông sinh học, chất lượng tương tự giống gốc. Các dòng triển vọng có khả năng kháng tốt với bệnh đạo ôn, bệnh bạc lá (điểm ≤ 3) và chống chịu vừa với rầy nâu (điểm < 4). Kết quả theo dõi trong hai vụ xuân 2020 và vụ mùa 2020 đã cho thấy, dưới áp lực của sâu bệnh hại, năng

suất của các dòng triển vọng có thể vượt đối chứng từ 13% trở lên. Dòng lúa triển vọng AGI-6 (từ dòng gốc BT7.10.20) tích hợp 6 gen kháng *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)*, có khả năng kháng bạc lá điểm 2,9, kháng vừa rầy nâu điểm 3,7 và kháng đạo ôn điểm 3,0 đã mang các đặc điểm nông sinh học chính của giống gốc BT7, có chất lượng cơm gạo gần tương tự giống gốc BT7 sẽ được tiếp tục chọn lọc làm thuần và gửi khảo nghiệm VCU, khảo nghiệm DUS và khảo nghiệm sản xuất tại các vùng sinh thái để

đánh giá khả năng thích ứng và triển vọng của giống lúa tích hợp đa gen kháng.

3.3. Kết quả xây dựng Quy trình tích hợp đa gen kháng đa yếu tố vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử MABC

Áp dụng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC) đã tích hợp thành công 6 gen kháng *xa5*, *xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1* và *Pi9(t)* vào giống lúa chất lượng Bắc Thơm số 7. Quy trình tích hợp đa gen kháng đa yếu tố vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử (MABC) được thực hiện trong 3 giai đoạn và được diễn giải cụ thể dưới đây (Hình 4).

3.3.1. Giai đoạn 1: Lai tạo dòng đa gen kháng đơn tính trạng (kháng bạc lá/rầy nâu/đạo ôn)

Bước 1: Chọn nguồn vật liệu cho gen là các dòng NILs nhập nội từ IRRI mang gen kháng mục tiêu (*xa5*, *xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)*...) và giống nhận gen là giống lúa chất lượng Bắc Thơm số 7 (BT7). Lai tạo các quần thể F_1 . Xác định bộ chỉ thị liên kết chặt với các gen kháng mục tiêu cho đa hình giữa hai giống bố mẹ để phân tích chọn lọc cá thể mang gen kháng và bộ chỉ thị SSR đa hình giữa hai giống bố mẹ trên toàn hệ gen để phân tích và chọn lọc cá thể mang nền di truyền của giống BT7.

Bước 2, Bước 3, Bước 4, Bước 5, Bước 6: Lai tạo và chọn lọc các cá thể mang gen mục tiêu và mang nền di truyền cao nhất của giống BT7 trong các quần thể BC_1F_1 , BC_2F_1 , BC_3F_1 , BC_4F_1 bằng phương pháp chọn lọc dựa vào chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC) (chọn lọc ~ 10-20 cá thể mang 2 gen kháng/quần thể).

3.3.2. Giai đoạn 2: Lai tạo và phát triển dòng tích hợp đa gen kháng đa tính trạng

Bước 7: Lai tạo quần thể tích hợp đa gen kháng với đa tính trạng. Phân tích kiểu gen và chọn lọc cá thể mang các gen kháng mục tiêu và mang nền di truyền giống với giống gốc.

- Lựa chọn 7-10 cá thể BC_4F_1 /quần thể có kiểu gen dị hợp tử đối với 2 gen kháng mục tiêu/tính trạng (kháng bạc lá/đạo ôn/rầy nâu) và mang nền di truyền giống gốc lớn nhất (nền di truyền của giống BT7).

- Lai tạo các tổ hợp lai BC_4F_1 mang đa gen kháng với hai tính trạng (bạc lá và rầy nâu, đạo ôn và rầy nâu). Phân tích kiểu gen để chọn các cá thể BC_4F_1 mang đa gen kháng hai tính trạng (kháng bạc lá và rầy nâu, đạo ôn và rầy nâu). Theo dõi đặc điểm nông sinh học trên đồng ruộng, chọn lọc các cá thể có đặc điểm nông sinh học với giống gốc, lấy nhiệm nhân tạo để chọn lọc tính kháng, chọn ~ 3- 5 cá thể đầu dòng/quần thể tiếp tục làm vật liệu lai tạo.

Bước 8: Lai tạo các cây BC_4F_1 mang đa gen kháng hai tính trạng với nhau để tạo quần thể tích hợp đa gen kháng với ba tính trạng (kháng bạc lá, rầy nâu và đạo ôn).

Bước 9, Bước 10, Bước 11: Tiếp tục tự thụ tạo thế hệ BC_4F_2 , BC_4F_3 và đánh giá các dòng tích hợp gen kháng ba tính trạng (kháng bạc lá, rầy nâu và đạo ôn).

- Đánh giá kiểu hình tính kháng, phân tích kiểu gen, các đặc điểm nông sinh học, năng suất, chất lượng, khả năng kháng sâu bệnh trên đồng ruộng. Chọn 5-7 dòng lúa có đặc điểm nông sinh học, năng suất, chất lượng tương đương giống lúa gốc BT7, tích hợp 4-6 gen kháng (*xa5*, *xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1*, *Pi9(t)*...) và biểu hiện tính kháng bạc lá, rầy nâu, đạo ôn (điểm < 5).

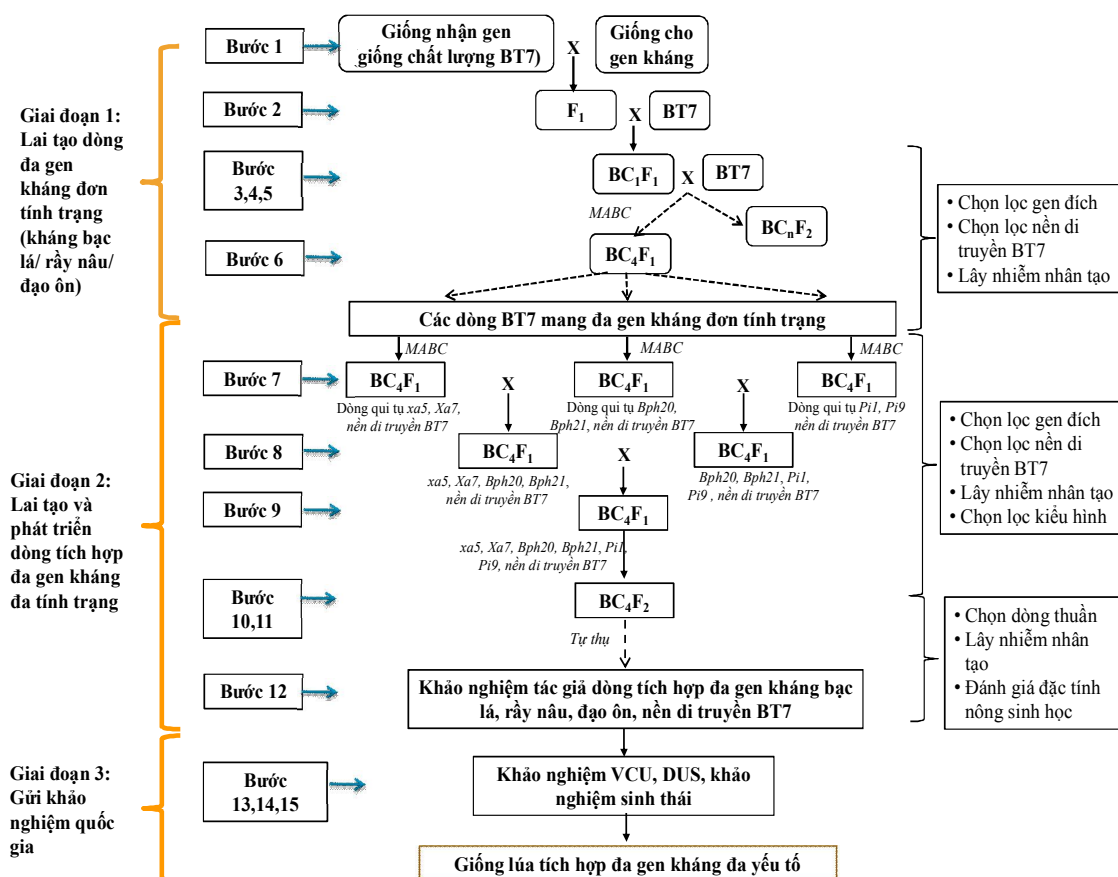
Bước 12: Phát triển các dòng thuần tích hợp đa gen kháng ba tính trạng, khảo nghiệm tác giả, so sánh xác định các dòng tích hợp gen có triển vọng (mang các đặc điểm nông sinh học, chất lượng gạo của giống gốc BT7, tích hợp 5- 6 gen kháng và biểu hiện tính kháng với bạc lá, đạo ôn (điểm ≤ 3) và chống chịu rầy nâu (điểm < 5) trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo).

3.3.3. Giai đoạn 3: Gửi khảo nghiệm quốc gia giống lúa triển vọng tích hợp đa gen kháng đa yếu tố

Bước 13, Bước 14, Bước 15:

- Gửi khảo nghiệm VCU, khảo nghiệm DUS và khảo nghiệm sản xuất các dòng ưu tú tích hợp đa gen kháng với ba tính trạng (kháng bạc lá, rầy nâu, đạo ôn).

- Đánh giá nhân tạo và đồng ruộng về khả năng kháng đa tính trạng của giống lúa triển vọng tích hợp đa gen kháng với bạc lá, rầy nâu, đạo ôn.



Hình 4. Quy trình tích hợp đa gen kháng đa yếu tố vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử MABC

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tích hợp thành công 5-6 gen kháng bệnh bạc lá, rầy nâu và đạo ôn vào giống lúa chất lượng Bắc Thơm số 7 bằng phương pháp chọn giống dựa vào chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC). Dòng lúa triển vọng AGI-6 được tích hợp 6 gen kháng *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1* và *Pi9(t)*, có khả năng kháng bạc lá điểm 2,9, kháng vừa rầy nâu điểm 3,7, kháng đạo ôn điểm 3,0, đã mang các đặc điểm nông sinh học chính của giống gốc BT7, có chất lượng cơm gạo gần tương tự giống gốc BT7. Dòng triển vọng AGI-6 sẽ được tiếp tục chọn lọc làm thuần và gửi khảo nghiệm VCU, khảo nghiệm DUS và khảo nghiệm sản xuất tại các vùng sinh thái để đánh giá khả năng thích ứng và triển vọng của giống lúa tích hợp đa gen kháng.

Nghiên cứu đã xây dựng thành công Quy trình tích hợp đa gen kháng đa yếu tố vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử MABC. Quy trình có khả năng áp dụng để cải tiến giống cây trồng mang

những tính trạng mong muốn phục vụ sản xuất nông nghiệp bền vững tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu là sản phẩm khoa học công nghệ của Đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu tích hợp đa gen kháng bệnh bạc lá, rầy nâu và đạo ôn cổ bông vào giống lúa chất lượng bằng chỉ thị phân tử (MABC)” thuộc chương trình Công nghệ Sinh học Nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2011). QCVN 01-55: 2011/BNNPTNT. Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa.
2. Trần Xuân Định, Nguyễn Như Hải, Nguyễn Văn Vương, Phạm Văn Thuyết (2015). Kết quả điều tra, rà soát giống lúa toàn quốc năm 2015 phục vụ tái cấu trúc ngành lúa gạo. Hội thảo Quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ hai, 89-104.

3. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Bá Ngọc, Nguyễn Thị Oanh, Lê Thị Ngọc, Đặng Văn Duyên, Đào Văn Khởi (2020). Nghiên cứu tích hợp đa tính kháng bệnh bạc lá, rầy nâu vào nền di truyền giống lúa chất lượng Bắc Thơm 7 bằng phương pháp MABC. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, 14: 37-44.
4. Nguyen T. M. N., Hoang H. L., Nguyen B. N., Nguyen T. N., Nguyen T. T. T., Hayashi N., Fukuta Y. (2020). Diversity and distribution of rice blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) races in Vietnam, Plant Disease, 104: 381-387.
5. Wang H. M., Cutler A. J. (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res, 21(17): 4153-4154.
6. Blair M. W., Garriss A. J., Chapman B., Kresovich S., McCouch S. R. (2003). High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the *xa5* locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet, 107: 62-73.
7. Porter B. W., Chittoor J., Yano M., Sasaki T., White F. F. (2003). Development and mapping linked to the rice bacterial blight resistance gene *Xa7*. Crop Sci, 43: 1484-149.
8. Rahman M. L., Jiang W., Chu S. H., Qiao Y., Ham T. H., Woo M. O., Lee J., Khanam M. S., Chin J. H., Jeung J. U., Brar D. S., Jena K. K., Koh H. J. (2009). High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)* and *Bph21(t)*, originating from *Oryza minuta*. Theor Appl Genet, 119:1237-1246.
9. International Rice Research Institute (2013). Standard Evaluation System (SES) for Rice, 5th Edition.

RESEARCH ON PROCEDURE OF INTROGRESSING MULTIPLE RESISTANCE GENES FOR MULTI-TRAITS INTO HIGH QUALITY RICE CULTIVAR BY USING MARKER-ASSISTED BACKCROSSING (MABC)

**Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Bá Ngọc,
Đào Văn Khởi, Chu Đức Hà,
Lê Hùng Linh, Nguyễn Thị Thanh Thủy**

Summary

A high quality rice cultivar Bac Thom No. 7 (BT7) is one of the most popular rice varieties in the Northern provinces. However, cultivation of BT7 is seriously affected by the development of pests and diseases, especially bacterial leaf blight, blast and brown plant hopper. This study is carried out with the purpose of building the procedure of introgressing multiple resistance genes for multi-traits into high quality rice cultivar by using marker-assisted backcrossing (MABC). The research results have successfully applied the MABC method to introgress 5-6 resistance genes (*xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1* and *Pi9 (t)*) into the high quality rice cultivar, Bac Thom No7 (BT7). A potential rice line, AGI-6 (from the original line BT7.10.20) harboring 6 resistance genes *xa5*, *Xa7*, *Bph20*, *Bph21*, *Pi1* and *Pi9 (t)*, demonstrated good tolerance to target traits: resistant to bacterial leaf blight (score 2.9), middle resistant to brown plant hopper (score 3.7), and resistant to blast (score 3.0). AGI-6 line showed the main agronomic characteristics of original variety BT7, grain quality was almost similar to BT7 and yield 14.7% higher than BT7 in the summer crop. This line will be further selected for purification and sent for VCU, DUS testing and production trials in ecological regions to evaluate the adaptability and prospect of new variety in production. "Procedure of introgressing multiple resistance genes for multi-traits into high quality rice cultivar by using marker-assisted backcrossing (MABC)" can be applied to improve plant varieties with desirable traits for sustainable agricultural production in Vietnam.

Keywords: *Bacterial blight, blast, brown planthopper, MABC, procedure of introgressing multiple resistance genes.*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 18/11/2020

Ngày thông qua phản biện: 18/12/2020

Ngày duyệt đăng: 25/12/2020