

DU NHẬP GEN KHÁNG RẦY NÂU TỪ LOÀI LÚA HOANG SANG LÚA TRỒNG (*Oryza sativa* L.)

Bùi Chí Bửu¹, D.S. Brar³ và Nguyễn Thị Lang²

¹ Viện Khoa Học Kỹ Thuật Nông Nghiệp Miền Nam

² Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long

³ Viện Nghiên Cứu Lúa Quốc Tế (IRRI)

TÓM TẮT

Oryza rufipogon (2n=24), genome AA, phân bố rộng khắp trên các vùng sinh thái Việt Nam. Một dòng dẫn xuất từ *O. rufipogon* có nguồn gốc ở Đồng Tháp Mười được khai thác thành công trong 20 năm qua là AS996 (mẹ là IR64, trong hồi giao nhờ chỉ thị phân tử). Nó là nguồn cho (donor) đối với tính kháng rầy nâu, đạo ôn và các tính trạng phi sinh học (abiotic) trong chương trình cải tiến giống lúa ở miền Nam. Dòng dẫn xuất từ loài *Oryza nivara* (Bà Rịa-VT) được khai thác thành công tạo dòng lúa kháng đạo ôn. Dòng dẫn xuất từ loài *Oryza rufipogon* (Đồng Tháp Mười), và *Oryza officinalis* (Bán đảo Cà Mau) trở thành nguồn cho gen kháng rầy nâu, gen *Bph-10*, thông qua phân tích quần thể con lai phân ly trồng dồn (bulk segregants), gen đích nằm trong khu vực 4,6 cM bao gồm sự hiện diện của 11 microsatellites và RFLPs trên nhiễm sắc thể 12. Gen kháng bệnh virus RSV, GSV do rầy nâu lan truyền cũng được phân tích. Hai chỉ thị STS được thiết kế từ trình tự RG457 có thể giúp nhà chọn giống xác định được các alen đồng hợp tử và dị hợp tử điều khiển gen *Bph-10* trong quần thể dòng phân ly. Chỉ thị SSR được đề nghị sử dụng trong chọn giống nhờ marker là RM227 và RM260 định vị trên nhiễm sắc thể 12. Hai dòng BAC là 7₁₂ và 16 C₄ (thư viện BAC của IRRI) được xác định nhờ kết quả chồng lấp tại locus RG457 trong bản đồ vật lý (đoạn phân tử 105 kb).

Từ khóa: dòng dẫn xuất, gen kháng rầy nâu, lúa bản địa, lúa hoang, RFLP, SSR, và STS

TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Hơn 5.000 mẫu giống lúa trồng và 160 mẫu giống lúa hoang thuộc 4 loài chính (*Oryza rufipogon*, *O. nivara*, *O. officinalis*, *O. granulata*) được thu thập và bảo quản tại ngân hàng gen của Viện Khoa Học Nông Nghiệp Việt Nam. Các loài lúa hoang dại (21-23 loài) cung cấp nguồn gen quan trọng, đặc biệt đối với tính kháng sâu bệnh hại chính, chống chịu điều kiện bất lợi do môi trường, thời tiết, và là nguồn cung cấp vật liệu bắt dục đực tế bào chất (gen *cms*) cho lúa lai. Việc tạo ra các dòng MAAL (monosomic alien addition lines) dòng dẫn xuất (derivatives) từ loài lúa hoang được thực hiện. Nội dung này mất nhiều thời gian nhất trong lai tạo và chọn giống lúa cải tiến.

Di truyền gen kháng rầy nâu

Rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal; BPH) là đối tượng quan trọng bậc nhất cho các vùng trồng lúa trên thế giới, nó chích hút nhựa làm khô cây lúa và truyền các bệnh virus cho lúa, thí dụ như bệnh virus lúa cổ, bệnh virus xoắn đột lá lúa.

Sử dụng giống kháng rầy nâu là biện pháp kinh tế nhất trong quản lý dịch hại. Nguồn giống bản địa của Việt Nam rất thiếu gen kháng, do đó việc quan tâm đến nguồn lúa hoang được bắt đầu từ những năm 1990 tại Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, bổ sung với nguồn giống bản địa của Ấn Độ cho gen kháng (Babawee, Rathu Heenathi, PTB33).

Lúa trồng indica thể hiện tính kháng rầy nâu tốt hơn lúa trồng japonica (Huang và ctv. 2013). Có 26 gen kháng chủ lực được xác nhận có từ lúa trồng và lúa hoang. Các loài lúa hoang tập hợp nhiều alen điều khiển tính kháng rầy nâu. Cho đến nay, có ít nhất 10 gen kháng được phân lập từ loài hoang dại. Gen *Bph10* định vị trên vai dài của nhiễm sắc thể 12 trong quần thể *O. australiensis* (Ishii và ctv. 1994). Gen *bph11(t)* được xác định trên vai dài của nhiễm sắc thể 3 trong quần thể *O. officinalis* (Hirabayashi và ctv. 1998). Gen trội *BPH12* (trước đây là *Bph12(t)*) được tìm thấy trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 4, nằm giữa hai chỉ thị RM16459 và RM1305 trong quần thể *O. latifolia* (Yang và ctv. 2002; Qiu và ctv. 2012). Gen lặn *bph16* (trước đây là *bph12(t)*), định vị trên vai dài của nhiễm sắc thể 4, nằm giữa hai chỉ thị RFLP là G271 và R93 (Hirabayashi và ctv. 1998). Hai gen trội có cùng tên *Bph13(t)*, được tìm thấy trên vai dài của nhiễm sắc thể 2 từ quần thể loài *O. eichingeri* và trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 3 từ *O. officinalis* (Renganayaki và ctv. 2002). Trong loài *O. officinalis*, hai gen trội *Bph14* và *Bph15*, được lập bản đồ trên vai dài của nhiễm sắc thể 3 và vai ngắn của nhiễm sắc thể 4, theo thứ tự (Huang và ctv. 2001). *Bph18(t)* được lập bản đồ trên vai dài của nhiễm sắc thể 12 trong loài *O. australiensis* (Jena và ctv. 2006). Hai gen mới được phân lập từ loài *O. minuta*, là *Bph20(t)* và *Bph21(t)*, được lập bản đồ trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 4 và vai dài của nhiễm sắc thể 12, theo thứ tự (Rahman và ctv. 2009). Ba cơ chế kháng rầy nâu cũng được tổng kết với chức năng sinh lý như sau: cơ chế "antixenosis" (không ưa thích), giảm quần cư hoặc đẻ trứng; cơ chế kháng hóa sinh (antibiosis), giảm sự sống của côn trùng, mức độ tăng trưởng hoặc sinh dục sau khi chích hút dưỡng chất của cây lúa; và cơ chế chống chịu (tolerance), với mức độ chống chịu trung bình. Qui và ctv. (2011) đã xác định cấp độ chống chịu, kháng hóa sinh của rầy nâu đối với các dòng lúa trên nhiều quần thể khác nhau của rầy. Trong trường hợp gen *Bph14*, tính

kháng biểu hiện cơ chế kháng hóa sinh (Du và ctv. 2009). Gen *BPH6* có liên quan đến cơ chế không ưa thích và kháng hóa sinh trên các dòng NIL (near-isogenic line) (Qiu và ctv. 2010).

Một gen lặn trong lúa hoang *O. rufipogon* (số mẫu giống GX2183) là *bph18(t)*, biểu hiện được tính kháng phổ rộng đối với các biotype rầy nâu, bao gồm biotypes 1 và 2 ở Bangladesh, đồng bằng sông Cửu Long (Việt Nam) và Pantnagar (Ấn Độ) (Li và ctv. 2006). Jena và ctv. (2006) cũng ghi nhận tên gen này trong một nguồn cho khác IR65482-7-216-1-2, dẫn xuất của *O. australiensis*. Gen *Bph20(t)* và *Bph26* vừa được người ta chính thức ghi nhận, đồng thời cũng thông báo việc định danh gen *bph18(t)* là *BPH27*, đăng ký tên các gen này vào Ngân Hàng Dữ Liệu *Oryza*. *Bph27* được lập bản đồ trên vùng có độ lớn 17 cM ở giữa hai chỉ thị kế cận RM273 và RM471 trên vai dài của nhiễm sắc thể số 4 (Li và ctv. 2006, Huang và ctv. 2013). Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định nguồn gen kháng rầy nâu ổn định có từ quần thể lúa hoang, du nhập gen này vào giống lúa cao sản thành công, qua sự trợ giúp của chỉ thị phân tử.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Quần thể lúa hoang được thu thập tại CLRRRI và được ly trích DNA để nghiên cứu bao gồm 3 loài: *Oryza rufipogon* (AA), *O. nivara* (AA), và *O. officinalis* (CC). Một số loài khác được sử dụng là nguồn vật liệu của Ngân Hàng Gen IRRI. Áp dụng phương pháp hồi giao cải tiến nhờ chỉ thị phân tử (MAB) để tạo dòng dẫn xuất.

Dòng dẫn xuất AS996 được phát triển từ tổ hợp lai IR64 x *Oryza rufipogon* (acc. 106424, Tràm Chim, Đồng Tháp Mười), và dòng IR65482-4-136-2-2 (IR31917-45-3-2 x *O. australiensis*), dòng IR54742 từ (IR31917-45-3-2 x *O. officinalis*) được sử dụng trong khai thác gen kháng rầy nâu, phổ rộng đối với các quần thể rầy nâu có ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL).

Đánh giá kiểu hình tính kháng rầy nâu bằng phương pháp hộp mạ rầy nâu tiêu chuẩn (standard seed box screening), giảm thiểu được sự kiện chọn lọc do cơ chế kháng hóa sinh (antibiosis) trên tuổi mạ 2-3 lá. Chuẩn nhiễm là TN1.

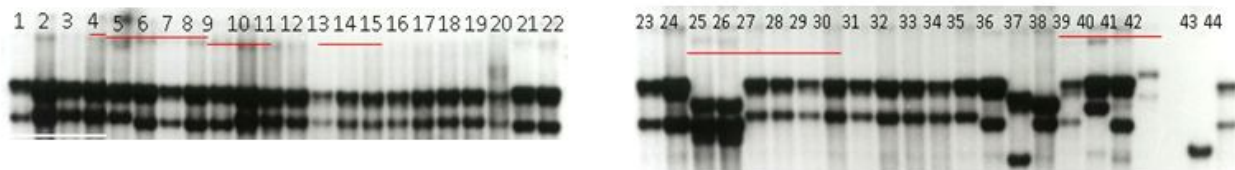
Đánh giá kiểu gen bằng chỉ thị STS được thiết kế lại từ chuỗi trình tự RFLP, SSR từ kết quả nghiên cứu được công bố trên “Ngân hàng dữ liệu *Oryza*”. Thực hiện bước 1: điều tra tính đa hình của các chỉ thị, bước 2: xây dựng bản đồ di truyền gen kháng, bước 3: thực hiện bản đồ phân giải cao nhờ phần mềm on-line Gramene, bước 4: thực hiện so sánh kiểu gen và kiểu hình.

Sử dụng thư viện BAC của IRRI từ DNA genome của quần thể đơn bội kép (DH) giữa IR64 x Azucena. Kích thước của phân tử DNA được chuyển vào là 37 - 364 kb, trung bình 107kb. Cổ định BAC DNAs: Những clone giả định từ thư viện BAC được chủng vào 2 ml LB bao gồm 12.5% µg/ml chloramphenicol và được định ôn ở nhiệt độ 37C, để qua đêm. DNA của bố mẹ và con lai được ly trích bằng CTAB và bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Phân tích lai Southern của những clone chồng lấp. Từng phân tử BAC DNA được phân cắt bởi *HindIII*. Clone nào cho ra nhiều đoạn phân tử hơn sẽ được chọn lọc với probe, đánh dấu bằng ³²P-dCTP. Thực hiện lai DNA theo qui trình lai của IRRI. Sau khi chụp hình bức xạ, so sánh từng cặp bằng hình của những clone chồng lấp giả định trên bản đồ. Có 75% BAC clone có khả năng mang 76-135 Kb, trung bình là 107 Kb.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

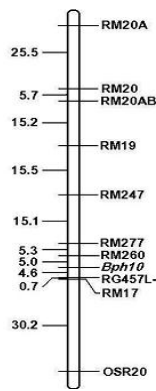
Gen kháng rầy nâu

Điều tra đa hình của chỉ thị phân tử cho thấy, trong các chỉ thị RFLP; ví dụ S3A9 cho hình ảnh các băng đa hình khá rõ (hình 1). Genome AA bao gồm *O. rufipogon*, *O. nivara*, *O. longistaminata*, *O. barthii* biểu hiện trên cùng một dải băng; *O. officinalis* (genome CC) có mức đa hình biến động trong những quần thể khác nhau. Tương tự, *O. minuta* (BBCC) và *O. alta* (CCDD) rất biến động trong cùng một loài.



Hình 1: Đa hình tại locus S3A9, lane số 1: IR31917, số 2: IR56, số 3: IR64; số 4-8: *O. rufipogon*; số 9-11: *Oryza longistaminata*; số 12: *O. barthii*; số 13-15: *O. nivara*; số 25-30: *O. officinalis*; số 39-42: *O. minuta*; số 43-44: *O. alta*

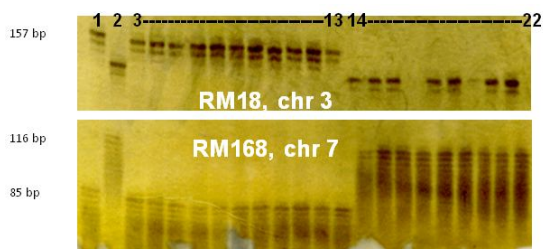
Phản ứng của rầy nâu đối với quần thể lúa hoang của Việt Nam khá thuyết phục đối với *Oryza officinalis* hơn là *O. rufipogon* (bảng 1). Có 8 mẫu loài lúa hoang thuộc *O. officinalis* (nguồn: Cà Mau, Tiền Giang, Bà Rịa), và 17 mẫu loài lúa hoang *O. rufipogon* phân bố rộng khắp miền Nam được đánh giá kiểu hình ở giai đoạn mạ; và có 42 mẫu *O. officinalis* và 31 mẫu *O. rufipogon* được đánh giá ở giai đoạn tăng trưởng, cho thấy phản ứng kháng ở điểm 1 đến 3 nghiêng về loài *O. officinalis* nhiều hơn.



Bảng 1: Phản ứng của rầy nâu đối với các quần thể lúa hoang ở giai đoạn mạ (10-20 ngày tuổi) và giai đoạn lúa tăng trưởng (30-40 ngày tuổi) – nhà lưới của CLRRI (2010)

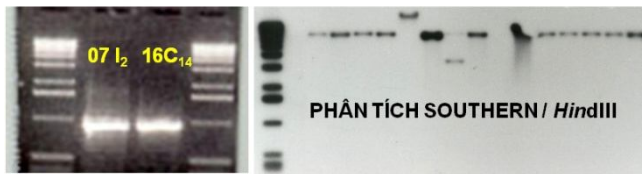
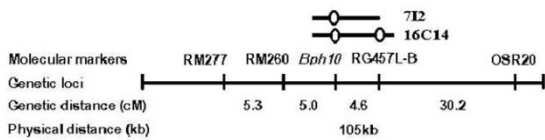
Số mẫu giống lúa hoang	Giai đoạn mạ (10-20 ngày)					
	Phản ứng với rầy nâu (0-9 điểm: kháng đến nhiễm)					
	0	1	3	5	7	9
<i>O. officinalis</i>	1	7	0	0	0	0
<i>O. rufipogon</i>	0	2	13	2	0	0
Số mẫu giống lúa hoang	Giai đoạn lúa tăng trưởng (30-40 ngày)					
	Phản ứng với rầy nâu (0-9 điểm: kháng đến nhiễm)					
	0	1	3	5	7	9
<i>O. officinalis</i>	0	40	2	0	0	0
<i>O. rufipogon</i>	0	3	21	7	1	1

Hình 2: Bản đồ di truyền gen *Bph10* trên nhiễm sắc thể 12 của *O. australiensis*



Hình 3: Sản phẩm PCR của quần thể RIL7 giữa IR50 x *O. officinalis* tại loci RM18 và RM168 liên kết với gen kháng BPH4 loại hình BPH4. Lane số 1: *O. officinalis*; số 2: IR50; số 3-13: dòng kháng; số 14-22: dòng nhiễm

Đánh giá kiểu gen đối với *Bph10*: sử dụng 118 chỉ thị SSR phủ trên 12 nhiễm sắc thể trong quần thể F₂ của IR31917 x IR58742 (*O. australiensis*) với chiều dài 1.298,007cM. Gen mục tiêu định vị trên nhiễm sắc thể số 12. Chiều dài tổng số chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể 12 là 121,8cM. Trung bình giữa hai marker là 12,1cM. Marker RM260 liên kết với gen kháng *Bph-10* với khoảng cách di truyền 5cM và RM457 liên kết với *Bph-10* là 0,7cM. Một thí nghiệm bổ sung cho thấy, gen kháng rầy nâu nằm giữa quãng RM277-RM260, có giá trị khoảng cách di truyền là 0,2 cM và 5cM, theo thứ tự.



Hình 4: Thanh lọc thư viện BAC ở locus RG457, nhiễm sắc thể 12 chỉ thị phân tử chính xác hơn (hình 4). Tổ hợp có triển vọng chống chịu bệnh virus vàng lùn-lùn xoắn lá: **AS996 / PSBRC4**.

Dòng dẫn xuất từ *O. australiensis* chứa gen kháng phổ rộng *Bph18* liên kết chặt chẽ với chỉ thị RM463, định vị trên nhiễm sắc thể 12 (Jena và ctv. 2006) được khai thác trong chương trình cải tiến giống lúa của Viện Lúa ĐBSCL, với ký hiệu IKO. Kết quả thanh lọc được trình bày trong bảng 2. Nhiều dòng con lai từ nguồn cho gen kháng *Bph18* đã và đang được khai thác thành công ở đồng bằng sông Cửu Long. So với các giống đối chứng kháng của Ấn Độ các dòng dẫn xuất từ *O. australiensis* biểu hiện tính kháng tốt hơn, thông qua tỷ lệ cây nhiễm rất thấp.

Phân tích gen kháng rầy nâu, biotype 4 từ loài *Oryza officinalis* trên cơ sở quần thể RIL7 (IR50 x *O. officinalis*) ở hình 3 cho thấy gen kháng này phân ly theo tỷ lệ 9 : 7 ở F₂ (2 gen trội hoạt động bổ sung) ; liên kết với chỉ thị RM18 (nhiễm sắc thể số 3) và RM168 (nhiễm sắc thể số 7) (Bửu và ctv. 1997). Sử dụng thư viện BAC của IRRI từ DNA genome của quần thể đơn bội kép (DH) giữa IR64 x Azucena nhằm xác định vùng định vị của gen *Bph10* trên nhiễm sắc thể 12 với độ lớn phân tử của khu vực 105 kb. Giải trình tự đoạn DNA này, chúng ta có thể thiết kế những cặp mồi (primer) mong muốn giúp việc chọn giống nhờ

Bảng 2: Dòng dẫn xuất từ *Oryza australiensis* (IKO) chứa gen *Bph18* được đánh giá kiểu hình với quần thể rầy nâu ở ĐBSCL, bộ giống đối chứng có từ ngân hàng gen của Ấn Độ

Dòng dẫn xuất	Số cây	Kháng	Nhiễm	Chỉ số nhiễm (%)	Điểm
IKO 1500	30	27	3	0,10	3
IKO1465	25	23	2	0,09	3
IKO1537	25	25	0	0,00	1
IKO116	25	23	2	0,09	3
IKO1527	40	38	2	0,05	3
Mudgo	40	17	23	1,40	7
ASD7	45	28	17	0,60	5
Rathu Heenati	68	51	17	0,30	5
Babawee	44	26	18	0,70	5
PTB33	39	29	10	0,30	5

KẾT LUẬN

Gen *Bph-10* có thể kiểm soát tính kháng rầy nâu đối với các quần thể hiện nay ở ĐBSCL (quần thể có sự pha trộn của loại hình BPH2 và BPH3), đang được khai thác thành công để phát triển các giống lúa cao sản kháng rầy. Sử dụng STS marker được thiết kế từ trình tự RG457, chỉ thị SSR (RM227-RM260) trong phân tích bản đồ phân giải cao, phủ trên nhiễm sắc thể 12 với chiều dài 121,8 cM để ứng dụng chọn giống kháng rầy nâu nhờ chỉ thị phân tử. Hai clone 7 I₂ và 16 C₄ trong BAC library của IRRI được xác định chồng lấp trên locus của RG457 trong bản đồ vật lý, với đoạn phân tử 105 kb đã giải trình tự, nhằm thiết kế các cặp mồi phục vụ cho nghiên cứu gen kháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bừu BC, Renganayaki K, Reddy AS. (1997). Phân tích di truyền tính kháng rầy nâu của giống lúa hoang nhờ marker phân tử. Kết quả nghiên cứu khoa học 1977-1997. Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long. *Nhà xb Nông nghiệp, TP Hồ chí Minh*. Tr. 79-82
- Du B, Zhang WL, Liu BF, Hu J, Wei Z, Shi ZY, He RF, Zhu LL, Chen RZ, Han B, He GC. (2009). Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(52):22163 – 22168
- Huang Z, He GC, Shu LH, Li XH, Zhang QF. (2001). Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. *Theor Appl Genet* **102**:929–934
- Huang D, Qiu Y, Zhang Y, Huang F, Meng J, Wei S, Li R, Chen B. (2013). Fine mapping and characterization of BPH27, a brown planthopper resistance gene from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Theor Appl Genet* **126**:219-229.
- Ishii T, Brar DS, Multani DS, Khush GS. (1994). Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Genome* **37**: 217–221
- Jena KK, Jeung JU, Lee JH, Choi HC, Brar DS. (2006). High-resolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, *Bph18(t)*, and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **112**(6):1192-4.
- Li RB, Li LS, Wei SM, Wei YP, Chen YZ, Bai DL, Yang L, Huang FK, Lu WL, Zhang XJ, Li XY, Yang XQ, Wei YW. (2006). The evaluation and utilization of new genes for brown planthopper resistance in common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Mol Plant Breed* **4**(3): 365–371.
- Qiu YF, Guo JP, Jing SL, Zhu LL, He GC. (2010). High-resolution mapping of the brown planthopper resistance gene *Bph6* in rice and characterizing its resistance in the 9311 and Nipponbare near isogenic backgrounds. *Theor Appl Genet* **121**:1601–1611
- Qiu YF, Guo JP, Jing SL, Zhu LL, He GC. (2012). Development and characterization of japonica rice lines carrying the brown planthopper resistance genes *BPH12* and *BPH6*. *Theor Appl Genet* **124**(3): 485–494
- Rahman ML, Jiang WZ, Chu SH, Qiao YL, Ham TH, Woo MO, Lee JH, Khanam MS, Chin JH, Jeung JU, Brar DS, Jena KK, Koh HJ. (2009). High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)* and *Bph21(t)*, originating from *Oryza minuta*. *Theor Appl Genet* **119**(7):1237–1246
- Renganayaki K, Feitz AK, Sadasivam S, Pammi S, Harrington SE, McCouch SR, Kumar SM, Reddy AS. (2002). Mapping and progress toward map-based cloning of brown planthopper biotype-4 resistance gene introgressed from *Oryza officinalis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Crop Sci* **42**:2112–2117
- Yang HY, Ren X, Weng QM, Zhu LL, He GC. (2002). Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Sta'l) resistance gene. *Hereditas* **136**:39–43

INTROGRESSION OF TARGET GENES FROM WILD RICES TO CULTIVARS (*Oryza sativa* L.) TO IMPROVE BROWN PLANT HOPPER RESISTANCE

Bui chi Buu¹, D.S. Brar³ and Nguyen thi Lang²
¹IAS, ²CLRRI, ³IRRI

Oryza rufipogon (2n=24=AA) is widely distributed in tropical and subtropical areas in Vietnam. A derivative from *O. rufipogon* and cultivar (IR64) has been successfully exploited to develop acid sulfate soil tolerance genotype (namely AS996). It became a donor for abiotic tolerance, blast (Bl) and brown plant hopper (BPH) resistance at CLRRI rice breeding program. Advanced mapping population derived from *Oryza officinalis*, *O. australiensis* as a donor and through bulked segregant and linkage analyses, *Bph-10* was detected within 4.6 cM region containing 11 microsatellites and RFLPs in chromosome 12. BPH resistance genes were also detected in *Oryza rufipogon* populations collected in Bird Sanctuary (Tram Chim, DTM) in Mekong Delta. Resistance genes to virus diseases transmitted by BPH as RSV, GSV have been analysed. Gene *Bph-10* controls resistance to BPH populations in Mekong Delta (mixed BPH2 and BPH3). Two STS markers were designed from RG457 sequence can help rice breeders identify homozygous and heterozygous alleles, which control *Bph-10* in segregants. Microsatellite markers were recommended in MAS as RM227 and RM260 located on chromosome 12. Two clones 7 I₂ and 16 C₄ (BAC library by IRRI) were identified to overlap at locus RG457 in physical mapping (105 kb fragment).

Key words: brown plant hopper resistance, derivative lines, landrace, RFLP, SSR, STS, and wild species.