

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐỀ TÀI NCKH CẤP NHÀ NƯỚC
NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ
PHỤC VỤ CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG
(thuộc Chương trình KC 04, mã số KC 04.08)

ĐỀ TÀI NHÁNH
**NGHIÊN CỨU CHỌN TẠO VÀ PHÁT TRIỂN CÁC DÒNG LÚA
KHÁNG ĐẠO ÔN VÀ CHẤT LƯỢNG CAO BẰNG CÔNG NGHỆ
TẾ BÀO VÀ TRỢ GIÚP CỦA CÁC CHỈ THỊ PHÂN TỬ**

CNĐT: NGUYỄN ĐỨC THÀNH

Hà Nội - 2005

BÁO CÁO THỰC HIỆN ĐỀ TÀI THUỘC CHƯƠNG TRÌNH KC04
(GIAI ĐOẠN 2001-2004)

1. Tên đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống cây trồng, Mã số: KC.04.08

Chủ nhiệm đề tài: PGS. TSKH. Lê Thị Muội

2. Đề tài nhánh: Nghiên cứu chọn tạo và phát triển các dòng lúa kháng đạo ôn và chất lượng cao bằng công nghệ tế bào và trợ giúp của các chỉ thị phân tử.

Chủ nhiệm đề tài nhánh: PGS. TS . Nguyễn Đức Thành

3. Thời gian thực hiện: 2001 - 2004

4. Kinh phí được cấp: 150 triệu

5. Những người thực hiện:

PGS. TS. Nguyễn Đức Thành

TS. Phan Thị Bảy

KS. Nguyễn Thuý Hạnh

Th. S. Quách Thi Liên

KTV. Đào Thị Hạnh

Th.S. Lê Thị Bích Thủy

HÀ NỘI - 2004

BÁO CÁO THỰC HIỆN ĐỀ TÀI THUỘC CHƯƠNG TRÌNH KC04 (GIAI ĐOẠN 2001-2004)

1. Tên đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống cây trồng, Mã số: KC.04.08

Chủ nhiệm đề tài: PGS. TSKH. Lê Thị Muội

2. Đề tài nhánh: Nghiên cứu chọn tạo và phát triển các dòng lúa kháng đạo ôn và chất lượng cao bằng công nghệ tế bào và trợ giúp của các chỉ thị phân tử.

Chủ nhiệm đề tài nhánh: PGS. TS . Nguyễn Đức Thành

3. Thời gian thực hiện: T10/2001-T10/2004

4. Kinh phí được cấp: 150 triệu

5. Những người thực hiện:

PGS. TS. Nguyễn Đức Thành

TS. Phan Thị Bảy

KS. Nguyễn Thuý Hạnh

Th. S. Quách Thị Liên

KTV. Đào Thị Hạnh

Th.S. Lê Thị Bích Thủy

6. Nội dung nghiên cứu theo hợp đồng:

- + Tạo các cặp lai giữa các giống kháng đạo ôn với giống lúa có chất lượng gạo tốt, năng suất cao
- + Thu các thế hệ con lai F1, nuôi cấy bao phấn để tạo dòng thuần
- + Sử dụng chỉ thị phân tử đã xác định để đánh giá sớm các con lai có tính kháng đạo ôn và chất lượng cao.
- + Trồng và theo dõi các đặc điểm nông sinh học các thế hệ con lai

7. Công việc đã tiến hành và kết quả đạt được

a. Thu thập, trồng, đánh giá và lưu giữ các giống lúa kháng đạo ôn và chất lượng cao:

- Đã thu được 11 giống/dòng lúa trong đó có 6 giống kháng đạo ôn, 5 giống có chất lượng cao.

b. Lai tạo để thu hạt F1:

- Đã tạo được 14 cặp lai giữa các giống kháng đạo ôn và chất lượng cao (bảng 1, phụ

lục)

- Trồng các cây F1 của 14 cặp lai, đồng thời nhân và giữ các cây F1 trong điều kiện in vitro

c. Nuôi cấy bao phấn các dòng cây F1 để tạo dòng thuần:

- Nhận được 93 dòng cây từ bao phấn của 10 cặp lai (bảng 2, phụ lục)

d. Nghiên cứu đánh giá bằng chỉ thị phân tử tính kháng đạo ôn và chất lượng gạo:

- Tách ADN genome từ 92 dòng cây gồm các dòng đơn bội kép, các dòng cây ở các thế hệ khác nhau và các giống/dòng bố mẹ để phân tích ADN
- Đã thiết kế và đặt tổng hợp 9 cặp mồi liên quan đến tính kháng đạo ôn và chất lượng gạo (hàm lượng amylose, độ bền gel, mùi thơm, độ dài hạt v.v.)
- Sử dụng các chỉ thị RG64, RG28, RG171, Wx1, Wxa, Wxb, G243, RZ323, RZ284 để đánh giá tính kháng đạo ôn và chất lượng (hàm lượng amylose, độ bền gel, mùi thơm, độ dài hạt v.v.) ở 5 dòng cây từ bao phấn và 2 dòng cây F3. Kết quả nhận được là: với mỗi RG64 (liên kết với tính kháng đạo ôn) có thể phân biệt được các dòng kháng đạo ôn. Đã xác định một số dòng cây lai F3 và 4 dòng cây từ hạt phấn mang chỉ thị kháng đạo ôn.
- Trong số các mồi khác, có mỗi G243 (liên kết với gel mềm) và RZ284 (liên kết với độ dài hạt) cũng có thể cho thấy sự khác nhau giữa bố mẹ và con lai mang các tính trạng tương ứng.

đ. Trồng và theo dõi đặc điểm nông sinh học của 71 dòng thế hệ con lai và 61 dòng cây từ bao phấn: Đã theo chiều cao cây, số nhánh, số hạt trên bông, hình thái hạt (bảng 3, Phụ lục)

e. Thu hoạch các dòng lai và đơn bội kép từ bao phấn và chọn dòng: Đã chọn được 2 dòng cây F3, F5 và 2 dòng cây đơn bội kép từ nuôi cấy bao phấn mang đặc điểm phân tử kháng đạo ôn và có chất lượng gạo khá (dựa vào độ dài hạt và phân tích sinh hóa hạt như hàm lượng amylose, độ bền gel, mùi thơm)

f. Đưa khảo nghiệm Quốc gia một dòng (HPKW1) chất lượng cao

g. Công bố 2 bài báo và đào tạo 1 sinh viên.

8. Kế hoạch tiếp theo 2005 - 2006

- + Kiểm tra tính kháng đạo ôn trong nhà lưới và trên đồng ruộng, theo dõi đánh giá các đặc điểm nông học để chọn dòng ưu tú
- + Hoàn thiện qui trình đánh giá chất lượng hạt dựa vào chỉ thị phân tử và sinh hoá

- + Phân tích các chỉ tiêu sinh hoá liên quan đến chất lượng hạt (hàm lượng protein, hàm lượng amylose, nhiệt độ hoá hồ, độ bền gel) của một số dòng chọn lọc
- + Chọn 2 dòng để khảo nghiệm vào cuối 2004 và 2 dòng vào 2005

Phụ lục

1. Kết quả lai tạo:

Bảng1. Bảng các tổ hợp lai giữa các giống lúa kháng bệnh đạo ôn và giống lúa chất lượng cao chọn lọc

TT	Cặp lai	Mục tiêu chọn dòng
1	Moroberekan/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
2	Moroberekan/WAB56-125	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
3	C101A51/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
4	C71/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
5	Tẻ tép/Q5	Lúa kháng đạo ôn năng suất cao
6	Q5/KDML105	Lúa năng suất cao, chất lượng tốt
7	KDML105/WAB56-125 <i>Và ngược lại</i>	Lúa chất lượng cao
8	WAB56-125/Tẻ tép	Lúa kháng đạo ôn chất lượng cao
9	Khang dân/Moroberekan	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá
10	Khang dân/Tẻ tép	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá
11	BR12/WAB56-125	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá
12	BR12/Tám thơm	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng tốt
13	BR12/KDML105	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng tốt
14	C71/WAB56-125	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng tốt

2. Kết quả nuôi cấy bao phấn:

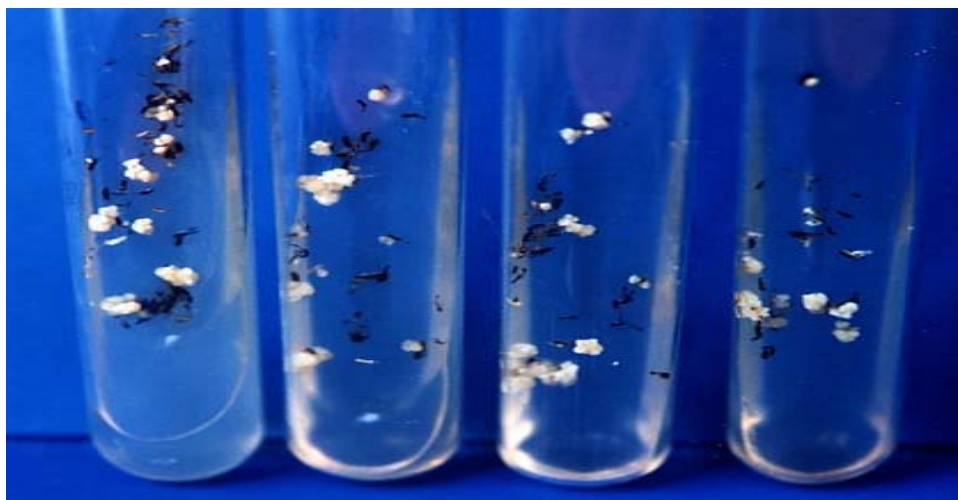
Nhận được 1079 dòng mô sẹo và 387 dòng cây tái sinh (trong đó có 93 dòng cây xanh) từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn của các tổ hợp lai (bảng2).

Bảng 2. Kết quả tạo mô sẹo và tái sinh cây từ nuôi cấy bao phấn

Cặp lai	Số bao phân nuôi cấy	Số mô sẹo hình thành và cấy chuyển		Tái sinh cây					
				Số mô tái sinh cây		Số mô tạo cây xanh		Số mô tạo cây bạch tạng	
		Số mô	%	Số mô	%	Số mô	%	Số mô	%
1	750	38	5,1	12	31,5	2	16,6	10	83,4
2	720	130	18	94	72,3	32	34	62	66
3	870	285	32,7	44	15,4	15	34	29	66
4	1050	140	13,3	16	14,4	2	12,5	14	87,5
5	1870	131	7	59	45	3	5	56	95
6	2160	248	11	111	44	29	20	82	74
7	735	51	7	22	43	2	9	20	81
8	660	26	4	20	76,9	6	30	14	70
9	300	12	4	3	25	0	0	3	100
10	930	28	3	6	21,4	2	33	4	67
Tổng		1079		387		93			

Chú thích bảng 1: thứ tự các cặp lai như sau

- | | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 1. Moroberekan/ KDM L 105 | 2. Moroberekan/ WAB 56- 125 |
| 3. BR12/ WAB56-125 | 4. C71/ KDML105 |
| 5. Kháng dân/Moroberekan | 6. WAB56-125/Tẻ tép |
| 7. WAB56-125/KDML105 | 8. Q5/KDML105 |
| 9. C101A51/KDML105 | 10. Tẻ tép |



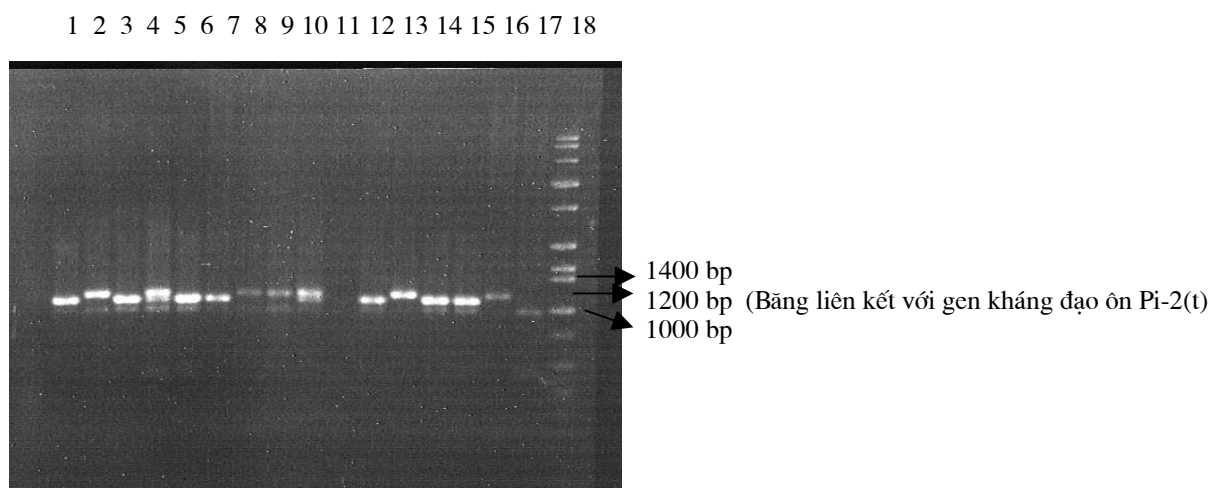
Hình 1. Mô sẹo tạo từ hạt phấn cặp lai Moroberekan và WAB56-125 trên môi trường thạch



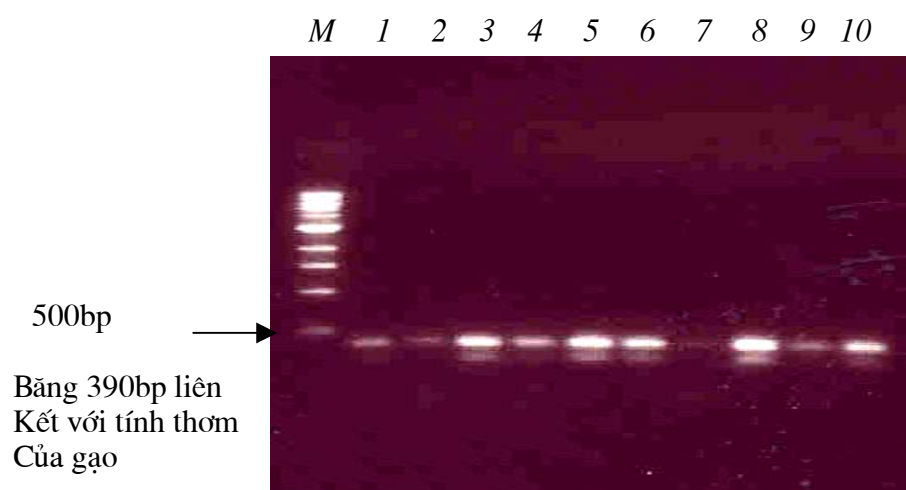
Hình2. Cây lúa tái sinh từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Moroberekan và WAB56-125

3. Kết quả sử dụng các chỉ thị phân tử để phát hiện sớm các dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao

Phản ứng PCR với cặp mồi RG64 431, RG64 432 và các mồi liên quan đến chất lượng gạo (Wxa, RZ284, RG28, G243A) đã bước đầu chọn được 5 dòng lúa đơn bội kép (HPMD4, HPMD6 và HPMD9, HPMD13, HPMD20) mang đoạn ADN liên kết với gen kháng bệnh đạo ôn pi-2(t) và 2 dòng cây F3 (F3C1 và F3C10) vừa có tính kháng bệnh đạo ôn vừa có các đặc điểm chất lượng gạo tốt từ tổ hợp lai Moroberekan và WAB56-125



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN một số dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn cây F1 cặp lai Moroberekan và WAB56-125 với cặp môi RG64 431 và RG64 432



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN một số cây lúa lai với môi RG28

Chú thích hình 4:

1. ADN cây WAB56125; 2. KDMKL105 (cây lúa thơm đã được xác định)
3. Tế bào; 4 – 9 Các cây lai F5 của cặp lai WAB56.125 và KDML105 (WK)



Hình 5. Sản phẩm PCR của ADN các cây lúa lai chọn lọc với môi RZ284 (Môi liên kết độ dài hạt).

Chú thích hình 5: 1 – 5 các cây lúa lai F5 của cặp lai WK

7. cây F1 của cặp lai WK; 8. Cây KDML105(Cây bố của cặp laiWK

9. Cây WAB56.125 (Cây mẹ của cặp lai WK

10. Cây tẻ tếp

4. Kết quả theo dõi đặc điểm nông sinh học một số dòng lúa chọn lọc.

Chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm đồng ruộng để kiểm tra một số chỉ tiêu nông sinh học ở một số dòng lúa nhận được từ nuôi cấy bao phấn. Kết quả cho thấy, nhìn chung các chỉ tiêu nông học ở 5 dòng lúa nhận được từ nuôi cấy bao phấn có hệ số biến đổi di truyền không đáng kể, đặc biệt các cây trong cùng một dòng là tương đối đồng đều (bảng 2).

Bảng 3. Mức độ biến động một số chỉ tiêu hình thái ở các dòng lúa nuôi cấy bao phấn

Chỉ tiêu Tên dòng	Cao cây		Dài bông		Số hạt chắc/bông		Dài hạt		Rộng hạt	
	X	Cv %	X	Cv %	X	Cv %	X	Cv %	X	Cv %
HPMD4	95,8 ±1,9	3,2	28,7 ±1,7	6,0	164,5 ±26,6	14	7,58 ±0,31	2,5	2,7 ±0,07	2,0
HPMD6	102,2 ±2,2	4,0	22,7 ±2,2	7,0	185,7 ±27,4	14	6,7 ±0,10	2,5	2,38 ±0,08	2,5
HPMD9	100,3 ±2,8	3,5	27,3± 2,1	7,2	273,3 ±24,6	17	6,92 ±0,18	1,5	2,5 ±0,07	2,0
HPMD13	90,5 ±3,3	4,0	20,1 ±1,9	7,0	144,4 ±22,6	15	7,2 ±0,13	1,5	2,54 ±0,08	2,0
HPMD20	96,7 ±3,5	3,8	22,5 ±1,8	6,8	145,4 ± 21,2	13	6,8 ±0,2	2,0	2,8 ±	2,0
Moroberekan	97,3 ±3,0	3,2	23,9 ±1,6	6,5	151,5 ±22,2	14	6,86 ±0,21	2,0	2,84 ±0,05	2,0
WAB56-125	98,3 ±4,5	3,5	20,4 ±2,0	8,5	142,9 ±16,3	11	7,25 ±0,23	2,0	2,82 ±0,08	2,0

Chú thích bảng2: X là giá trị trung bình mẫu

Cv là hệ số biến đổi di truyền

5. Kết quả phân tích sinh hoá một số dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn

Bốn dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn có triển vọng đã được lấy mẫu hạt phân tích các chỉ tiêu sinh hoá liên quan đến chất lượng nấu nướng và ăn uống của gạo như: hàm lượng protein, hàm lượng Amylose, nhiệt độ hoá hồ và độ bền thể gel, Kết quả cho thấy (bảng 3) các dòng lúa chọn lọc từ nuôi cấy bao phấn cây lai F1 tổ hợp lai (Morobekan/WAB 56-125) là những dòng lúa có chất lượng tốt. Đặc biệt có dòng lúa HPMD9 có hàm lượng Amylose 21,5, nhiệt độ hoá hồ TB và độ dài gel mềm nên cơm gạo từ dòng này sẽ rất mềm dẻo, không bị cứng khi để nguội và dòng HPMD4 có độ dài gel loại TB, hàm lượng Amylose thấp và nhiệt độ hoá hồ trung bình nên cũng cho cơm mềm dẻo.

Bảng 4. kết quả phân tích sinh hoá một số dòng/giống lúa thí nghiệm

Tên dòng/giống lúa	Protein	Amylose		Nhiệt độ hoá hồ		Chiều dài Gel C (mm)		
	% CK	% CK	Phân loại	Nhiệt độ hoá hồ (0°C)	Phân loại	Sau 30'	Sau 60'	Phân loại
WAB56-125	11,93	15,25	Thấp	70-74	TB	69	71	Mềm
Moroberekan	10,18	20,52	TB	<70	Thấp	54	58	TB
HPMD4	11,98	18,54	Thấp	70-74	TB	40	42	TB
HPMD6	8,69	20,07	TB	70-74	TB	42	45	TB C
HPMD9	9,33	21,65	TB	70-74	TB	75	78	Mềm
HPMD13	10,12	20,60	TB	74-75	TBC	39	43	TB C

6. Kết quả chọn dòng lúa kháng bệnh đạo ôn chất lượng cao

Dựa vào các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã định hướng chọn một số dòng lúa ưu tú từ các tổ hợp lai để phát triển thành giống

Bảng 6. Một số dòng lai và dòng đơn bội kép chọn lọc cho các nghiên cứu khảo nghiệm

TT	Cặp lai	Số dòng chọn đến 2003		Mục tiêu chọn dòng	Chú thích
		<u>Dòng ĐBK</u>	<u>Dòng cây lai</u>		
1	Moroberekan/KD ML105	1 dòng (HPMK1)	2 dòng F3 (MK1,MK2)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	
2	Moroberekan/WA B56-125 Và ngược lại	2dòng HPMD4,HPMD9	2 dòng (MWC1, MWC10)	Lúa kháng đạo ôn,chất lượng cao	
3	C101A51/KDML 105	0	1 dòng F2	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	Cây kém <u>0</u> phát triển
4	C71/KDML105	0	1 dòng F5 (CK1)	Lúa kháng đạo ôn , chất lượng cao	
5	Tẻ tép/Q5 và ngược lại	0	1 dòng F2	Lúa kháng đạo ôn năng suất cao	Kém không phát triển
6	Q5/KDML105	0	1 dòng F2	Lúa năng suất cao, chất lượng tốt	Kém không phát triển
7	KDML105/WAB 56-125 Và ngược lại	1 dòng (HPKW1)	2 dòng F5 (KW1, KW2)	Lúa chất lượng cao	
8	WAB56-125/ Tẻ tép	2 dòng (HPWT1, HPWT2)	1 dòng F3 (WT1)	Lúa kháng đạo ôn chất lượng cao	
9	Khangdân/ Moroberekan	1 dòng (HPKDM1)	2 dòng F3 (KDM1, KDM2)	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá	
10	Khangdân/Tẻ tép	2 dòng	1 dòng F3 (KT1)	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá	

11	BR12/ WAB56-125	1 dòng Kém phát triển	1 dòng F5 (BW12)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá	
12	BR12/Tám thơm	2 dòng	1 dòng	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	Kém không phát triển
13	BR12/KDML105	1 dòng	1 dòng		Kém không phát triển
14	C71/WAB56-125	2 dòng	1 dòng		Kém không phát triển

Dự kiến : Cuối năm 2004 sẽ đưa khảo nghiệm 2 dòng thuần (HPKW1, BW12)
Cuối năm 2005 đưa khảo nghiệm 2 dòng HPMK1, KDM1, các dòng còn
lại sẽ đưa khảo nghiệm vào các năm tiếp theo.

Một số hình ảnh các dòng lúa chọn lọc phát triển ngoài đồng ruộng



Hình 6. Dòng lúa đơn bội kép HPMK1 nhận được từ nuôi cấy bao phấn cây F1
cặp lai Moroberekan và KDML105 trồng trong nhà lưới vụ đông 2003



Hình 7. Cây lúa đơn bội kép HPMD4 nhận được từ nuôi cấy bao phấn cây
F1 cặp lai Morroberekan và WAB56-12



Hình 8. Dòng lúa đơn bội kép HPKW1 nhận được từ tổ hợp lai KDML105 và WAB56-125



Hình 9. Dòng lúa lai F3 KDM1 nhận từ cặp lai Moroberekan và Khang dân trồng vụ đông 2003



Hình 10. Dòng lúa F6 BW12 trồng vụ xuân 2004



Hình 11. Dòng lúa F4 KDM1 từ cặp lai Khang dân và Moroberekan trồng vụ xuân 2004



*Hình 12. Dòng lúa F4 KDM2 từ cặp lai Khang dân và Moroberekan
trồng vụ xuân 2004*



*Hình 13. Dòng lúa HPMK1 từ cặp lai Morobereka và KDML105
trồng vụ xuân 2004*



*Hình 14. Dòng lúa KW1 từ cặp lai KDML105 và WAB56-125
trồng vụ xuân 2004*

7. Các công trình đã công bố

Hoàn thành 2 bài báo (1 bài nhận đăng tại hội nghị CNSH tháng 12 năm 2003 và 1 bài nhận đăng trên tạp chí Sinh học).