

THỂ HIỆN CỦA GEN ĐIỀU KHIỂN TÍNH CHỐNG CHỊU KHÔ HẠN

Bùi chí Bửu

Khô hạn là yếu tố chính làm giảm năng suất của lúa (*Oryza sativa* L.), dưới điều kiện canh tác nước trời (rainfed) và sự kiện thiếu nước tưới ngày càng nghiêm trọng hơn ở vùng có nước tưới cũng như vùng lúa rẫy. Người ta tập trung sự chú ý vào đối tượng khô hạn và mặn, hai dạng gây stress phi sinh học quan trọng đối với sản xuất lúa, và đặt ra mục tiêu hướng tới để cải tiến giống lúa trên qui mô toàn cầu. Khô hạn sẽ là yếu tố quan trọng bậc nhất ảnh hưởng đến an ninh lương thực của thế giới, nó có thể làm giảm 70% năng suất cây trồng nói chung (Bray và ctv. 2000). Sự khan hiếm về nước tưới phục vụ cho nông nghiệp đã được báo động trong nhiều hội nghị khoa học của thế giới gần đây. Sản xuất lúa nước ở Việt Nam không phải là ngoại lệ.

Sử dụng biện pháp chọn tạo giống lúa chống chịu khô hạn bằng chỉ thị phân tử (MAS) đã được thảo luận trong nghiên cứu này. Chọn giống truyền thống chống chịu khô hạn là cách tiếp cận rất cơ bản trong một thời gian dài, một vài thành công đã được ghi nhận trên cây ngô (Hoisington và ctv. 1996), cây lúa (Zhang và ctv. 2006), cây lúa mì (Zhao và ctv. 2000). Tuy nhiên, một lỗ hổng lớn giữa các mức độ chống chịu hạn vẫn chưa được xác định trong hầu hết các loài cây trồng. Đặc biệt là sự ổn định về năng suất vô cùng nhạy cảm với sự thiếu nước (Xiao và ctv. 2007). Đáp ứng lại hiện tượng stress do khô hạn, cây trồng có một cơ chế rất tiến bộ từ việc nhận tín hiệu đến truyền nó đi vào hệ thống tinh vi của tế bào, kích thích hoạt động của gen mục tiêu (Thomashow 1999; Xiong và ctv. 2002). Chống chịu khô hạn là tính trạng cực kỳ phức tạp, bị ảnh hưởng bởi sự thể hiện đồng thời cả một hệ thống gen mục tiêu (Thomashow 1999; Xiong và ctv. 2002) và bị ảnh hưởng bởi các yếu tố về môi trường, vật lý, hóa học (Soltis và Soltis 2003). Điều này làm cho những tiến bộ nhất định về cải biến di truyền tính chống chịu khô hạn xảy ra rất chậm chạp. Sự phát triển nhanh chóng của ngành genome học chức năng và công nghệ sinh học trong thời gian gần đây đã cung cấp cho các nhà khoa học cơ hội mới để cải tiến tính trạng chống chịu khô hạn.

Chiến lược có hiệu quả đã được ghi nhận là làm gia tăng lượng đường dễ hòa tan, các hợp chất cần thiết thông qua tiếp cận với kỹ thuật chuyển nạp gen. Những hợp chất đó là: proline, trehalose, betaine và mannitol, đóng vai trò như những thể bảo vệ thẩm thấu (osmoprotectants); trong vài trường hợp, chúng ổn định được các phân tử chức năng dưới điều kiện bị stress (Kishor và ctv. 1995; Hayashi và ctv. 1997; Shen và ctv. 1997; Garg và ctv. 2002). Protein LEA (late embryogenesis abundant) cũng được chú ý trong điều kiện bị stress do thiếu nước (Xu và ctv. 1996; Maqbool và ctv. 2002; Goyal và ctv. 2005). Protein LEA được phân chia thành 5 nhóm chính trên cơ sở chuỗi trình tự amino acid của nó (Bake và ctv. 1988; Dure và ctv. 1989) và chúng được xét nghiệm lại thông qua công cụ tin sinh học (Wise 2003). Những protein như vậy đã đóng góp phần nào vào sự tiến hóa của nhóm protein có tên gọi là “hydrophilins” khi chúng đáp ứng với điều kiện thẩm thấu cực trọng (hyperosmotic) (Garay-Arroyo và ctv. 2000). Vai trò chính của protein LEA là hoạt hóa những amino acid ưa nước và đã nạp năng lượng. Sự thể hiện của các gen *LEA* thường xảy ra dưới dạng abscisic acid độc lập. Nó không những chỉ được phát hiện trong hạt mà còn trong các mô tăng trưởng khi cây bị stress do thiếu nước, do mặn, và do lạnh (Ingram và Bartels 1996; Thomashow 1998; Cumings 1996; Grelet và ctv. 2005). Sự thể hiện của protein LEA và đặc điểm cấu trúc đại phân tử của nó cho thấy vai trò bảo vệ cây chống chịu sự kiện mất nước (Ingram và Bartels 1996). Mặc dù chúng ta có nhiều số liệu về cấu trúc và sự thể hiện của protein này, nhưng rất ít công trình đề cập đến thao tác của các gen *LEA* nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn trong điều kiện đồng ruộng (Raynal và ctv. 1999; Ndong và ctv. 2002; Grelet và ctv. 2005, Xiao và ctv. 2007). Thí dụ, gen *HVA1* mã hóa nhóm protein 3 LAE của cây lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.). Người ta đã chuyển nạp gen này thành công vào cây lúa để tăng cường tính chống chịu khô hạn và chống chịu mặn,

chỉ trong điều kiện ở nhà lưới (Xu và ctv. 1996). Một clone cDNA có độ dài phân tử đầy đủ chứa gen *LEA* nhạy cảm với stress do mặn và gen *OsLEA3-1* đã thể hiện tính chống chịu khô hạn trong điều kiện đồng ruộng, nhờ promoter *HVA1-like* và promoter kiến trúc *CaMV35S* (Xiao và ctv. 2007). Đây có thể nói là sự kiện nổi bật trong thời gian gần đây, nhờ kết quả của thí nghiệm đồng ruộng mang lại.

Hầu hết các nghiên cứu về marker phân tử đều quan tâm đến những thành phần rất đặc biệt trong sự kiện chống chịu khô hạn, đó là

- khả năng của rễ cây phát triển sâu xuống tầng đất bên dưới,
- tính trạng phun râu và tung phấn với thời gian cách quãng được xác định (ASI = được viết tắt từ chữ anthesis to silking interval)
- sự điều tiết áp suất thẩm thấu (OA = được viết tắt từ chữ osmotic adjustment)
- hiện tượng biến dưỡng ABA (abscisic acid)
- hiện tượng nông học WUE (water use efficiency có nghĩa là hiệu quả sử dụng nước)

Số QTL được tìm thấy đối với tính trạng chống chịu khô hạn thường thay đổi từ 1 đến 4 đối với một tính trạng thuộc thành phần trong sự kiện chống chịu hạn, và những QTL này thường trải rộng trên toàn bộ genome với nhiều nhóm liên kết gen. Thí dụ, tính trạng WUE (hiệu quả sử dụng nước) được tìm thấy với rất ít QTL, từ 4 đến 5 trong genome cây đậu nành (Milan và ctv 1998).

Hệ thống rễ phát triển tốt là một tính trạng vô cùng quan trọng giúp cây trồng chống chịu khô hạn (cơ chế thoát hạn = drought avoidance mechanism). Người ta đã sử dụng quần thể đơn bội kép (DH) của cặp lai IR64 x Azucena tại Viện Lúa Quốc Tế (IRRI). Sau đó Shen và ctv. (1999) đã phát triển quần thể gần như đẳng gen (NIL) của IR64 được du nhập với những QTL chủ lực. Các tác giả đã ghi nhận bốn đoạn trên nhiễm sắc thể số 1, 2, 7, và 9 là nơi định vị các QTL chủ lực trong phân tích chọn lọc từng QTL mục tiêu. Người ta thực hiện nhiều cặp lai giữa các cây BC₃F₂ mang những đoạn mục tiêu của vật liệu cho gen điều khiển rễ lúa phát triển tốt, để loại trừ ảnh hưởng di truyền theo kiểu “genetic drag” và ảnh hưởng các QTL mục tiêu khác nhau chồng lấp theo hình tháp (Shen và ctv. 1999).

Tại Đại học Texas Tech, Zhang và ctv. (1999) đã thực hiện bản đồ di truyền QTL đối với 2 tính trạng quan trọng liên quan đến sự kiện chống chịu khô hạn, đó là: khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu (OA), và những tính trạng hình thái của rễ lúa.

Quần thể lúa đã được sử dụng trước đây để lập bản đồ QTL tính trạng OA là:

Quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) của tổ hợp lai CO39 / Moroberekan, với 1 QTL (Lilley và ctv. 1996)

Quần thể đơn bội kép (DH) của tổ hợp lai CT9993 / IR62266, với 4 QTL (Zhang và ctv. 1999)

Quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) của tổ hợp lai CO39 / Moroberekan, với 5 QTL (Lilley và ctv. (1996)

Quần thể lúa đã được sử dụng để lập bản đồ QTL tính trạng tích lũy ABA là: quần thể F₂ của tổ hợp lai IR20 / 63-83, với 10 QTL (Quarrie và ctv. 1997)

Zhikang Li và ctv. (CAAS, IRRI) đã sử dụng 260 vật liệu (trong đó có OM1723 của Việt Nam) từ 15 quốc gia để thực hiện hồi giao với IR64 và Teqing. Họ thanh lọc tính chống chịu khô hạn của 215 quần thể BC₁F₁, và 4.677 dòng lai cận giao (Ils) để nghiên cứu sự biến thiên di truyền chưa được biết (CGV: cryptic genetic variation) của gen chống chịu khô hạn thông qua phân tích QTL (Bừu 2005).

Purwantomo và ctv. khai thác vai trò của các gen có tính chất “homeobox” để phát triển giống lúa chống chịu khô hạn.

Trong khi đó, nhóm nghiên cứu của CIRAD, Pháp, tập trung nghiên cứu đặc tính của rễ lúa thích nghi với sự phát triển (E Guiderdoni). Sự phát triển hệ thống rễ lúa tương thích với stress đã được nghiên cứu và so sánh với cây *Arabidopsis thaliana*. Một array biểu thị clone có qui mô 22 K đối với áp suất thẩm thấu và stress do mặn (SSH), một receptor đặc biệt và một oligo đóng vai trò chuyển mã đã được xác định. Họ phát hiện ra gen mục tiêu có liên quan đến rễ lúa trong điều kiện bị stress.

Giao Sư Ray Wu, ĐH Cornell, Mỹ, đã phát triển 3 dòng lúa chuyển gen: (1) gen tổng hợp proline p5cs, (2) gen choline oxidase COX, (3) dung hợp cả hai gen TPS và TPP trong tổng hợp trehalose. Gorantla và ctv. nghiên cứu phổ thể hiện các gen điều khiển tính chống chịu khô hạn với nhiều gen mục tiêu đã được phát hiện (Bửu 2005)

Toojinda và ctv. thực hiện bản đồ QTL điều khiển tính trạng chống chịu khô hạn tại Thái Lan, với các tính trạng mục tiêu: năng suất hạt, sinh khối, chỉ số thu hoạch HI, số hạt chắc và lép, số hạt / bông, tỉ lệ bất thụ, trọng lượng 1000 hạt, số bông, số chồi, chiều cao, số ngày từ gieo đến trổ, v.v.. QTL định vị trên các nhiễm sắc thể 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 đã được phân tích, trên cơ sở quần thể DH của tổ hợp lai IR62266 / CT9993 tại 3 địa điểm khác nhau trong 3 năm liên tục. Đặc biệt chú ý nhiễm sắc thể số 3 và số 5, nó tập hợp nhiều QTL có liên quan đến tính chống chịu khô hạn (Bửu 2005)

Hiện tượng nông học WUE trong cây lúa đã được Karaba và ctv. (2007) nghiên cứu khá hệ thống với sự thể hiện của gen *HRD* chuyển nạp từ *Arabidopsis*. Cây lúa chống hạn tiêu thụ nước ít biểu thị sự kiện sinh khối rễ tăng lên trong điều kiện có tưới trở lại. Gen *HDR* với yếu tố chuyển mã AP2/ERF, được phân lập trong dòng đột biến của *Arabidopsis* (theo kiểu gắn thêm chức năng) *hrd-D*, điều khiển tính trạng sức mạnh của rễ, sự phân nhánh, tế bào biểu bì, độ dày của lá với tỷ lệ lục lạp tăng cao trong tế bào mesophyll, làm thúc đẩy hiện tượng đồng hóa quang hợp và hiệu suất quang hợp (Karaba và ctv. 2007)

Đặc biệt, Wang và ctv. (2007) đã so sánh sự thể hiện gen giữa giống lúa nước và giống lúa cạn trong điều kiện bị stress do khô hạn, sử dụng phương tiện cDNA microarray. Giống lúa cạn IRAT109, Haogelao, Han 297 và giống lúa nước Zhongzuo 93, Yuefu, Nipponbare đã được sử dụng. Sau khi đọc chuỗi trình tự DNA, có 64 unique ESTs thể hiện ở mức độ cao ở giống lúa cạn và 79 ở giống lúa nước. Tác giả dự đoán sự thể hiện của các gen mục tiêu ở mức độ cao trong lúa cạn có thể cải tiến được khả năng chống chịu stress do khô hạn trong lúa nước và những loài cây trồng có liên quan gần về huyết thống (Wang và ctv. 2007)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bake J, C Steele, LI Dure. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11:277-291
- Bray EA, J Bailey-Serres, E Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, B Buchanan, R John (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 1158-1249
- Bửu BC, NT Lang. 2003. Cơ sở di truyền tính chống chịu đối với thiệt hại do môi trường của cây lúa. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, TP Hồ chí Minh. 223 pp.
- Bửu BC. 2005. Báo cáo Bộ Trưởng. Hội nghị quốc tế lần thứ năm về di truyền cây lúa tại Philippines. Viện Lúa ĐBSCL (báo cáo hàng năm). 15 p. (www.clrri.org)
- Cumming AC. 1999. LEA protein. In Shewry PR, R Casey (eds) *Seed proteins*. Kluwer, Dordrecht, pp 753-780
- Dure LIII, M Crouch, J Harada, T-H Ho, J Mundy, RS Quatrano, T Thomas, ZR Sung. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* 12:475-486
- Garay-Arroyo A, JM Colmenero, A Garciarrubio, AA Covarrubias. 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol Chem* 275:5668-5674
- Garg AK, JK Kim, TG Owen, AP Ranwala, YD Choi, LV Koichian, RJ Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15898-15903
- Goyal K, LJ Walton, A Tunnacliffe. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388:151-157

- Grelet J, A Benamar, E Teyssier, MH Avelange-Macherel. 2005. Identification in pea seed mitochondria of late embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol* 137: 157-167
- Hayashi H, Alia, L Mustardy, P Deshniem, M Ida, N Murata. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J* 12:133-142
- Hoisington D, C Jiang, M Khairallah, JM Ribault, M Bohn, A Melchinger, M Willcox, D Gonzalez-de-Leon. 1996. QTL for insect resistance and drought tolerance in tropical maize: prospects for marker-assisted selection. *Sym Soc Exp Biol* 50:39-44
- Ingram J, D Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377-403
- Karaba A, S Dixit, R Greco, A Aharoni, KR Trijatmiko, N Marsch-Martinez, A Krishnan, KN Nataraja, M Udayakumar, A Pereira. 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *PNAS* 1-6 (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707294104)
- Kishor P, Z Hong, GH Miao, C Hu, D Verma. 1995. Over-expression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108:1387-1394
- Lander ES, P Green, J Abrahamson, A Barlow, MJ Daly, SE Lincoln, L Newburg. 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Lilley JM, MM Ludlow, SR McCouch, JC O'Toole. 1996. Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* 47:1427-1436
- Maqbool B, H Zhong, Y El-Maghraby, A Ahmad, B Chai, W Wang, R Sabzikar, B Sticklen. 2002. Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing *hva1*. *Theor Appl Genet* 105:201-208
- Milan MAR, DA Aswey, HR Boerma. 1998. An additional QTL for water-use-efficiency in soybean. *Crop Sci.* 38:390-393
- Ndong C, J Danyluk, KE Wilson, T Huner NP, F Sarhan. 2002. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins: molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol* 129:1368-1381
- Nguyễn Thị Lang 2002. Những phương pháp cơ bản trong công nghệ sinh học. Nhà Xuất bản Nông Nghiệp TP Hồ Chí Minh 200 trang
- Nguyễn thị Lang và Bùi Chí Bửu. 2004. Nghiên cứu di truyền gen kháng mặn trên quần thể trồng dòn của cây lúa. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn* (6: 824-826)
- Quarries S, V Lazic-Jancic, M Ivanovic, C Pekic, A Heyl, P Landi, C Lebreton, A Steed. 1997. Molecular marker methods to dissect drought tolerance in maize. In: Tsaftaris A, editor. *Genetics, biotechnology and breeding of maize and sorghum*. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry. P. 52-58
- Raynal M, J Guilleminot, C Guyguen, R Cooker, M Delseny, V Gruber. 1999. Structure, organization and expression of two closely related novel *Lea* (late embryogenesis abundant) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 40:153-165
- Shen B, RG Jensen, HJ Bohnert. 1997. Increase resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113:1177-1183
- Shen L, B Courtois, K McNally, SR McCouch, Z Li. 1999. Developing near-isogenic lines of IR64 introgressed with QTLs for deeper and thicker roots through marker-aided selection. In: *Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments*. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 275-289
- Soltis DE, PS Soltis. 2003. The role of phylogenetics in comparative genomics. *Plant Physiol* 132:1790-1800
- Steele KA, AH Price, HE Shashidhar, JR Witcome. 2006. Marker assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an indian upland rice varieties.
- Thomashow MF. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* 118:1-8
- Thomashow MF. 1999. Plant Cold Acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571-599
- Wang H, H Zhang, F Gao, J Li, Z Li. 2007. Comparison of gene expression between upland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. *TAG* 115:1109-1126
- Wise. 2003. Leaping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* 4:52
- Xiao B, Y Huang, N Tang, L Xiong. 2007. Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *TAG* 115:35-46

- Xiong L, KS Schumaker, JK Zhu. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14 (Suppl):S165-183
- Xu D, X Duan, B Wang, B Hong, T Ho, R Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110:249-257
- Xu JL, HR Lafitte, YM Gao, BY Fu, R Torres, and Z Kang. 2005. QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theor Appl Genet* (2005) 111:1642-1650
- Zhang J, HG Zheng, ML Ali, JN Triparthi, A Aarti, MS Pathan, AK Sorial, S Robin, Thuy Thanh Nguyen, RC Babu, Bay duy Nguyen, S Sarkarung, A Blum, Henry T Nguyen. 1999. Progress on the molecular mapping of osmotic adjustment and root traits in rice. In: *Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments*. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 307-317
- Zhang X, S Zhou, Y Fu, Z Su, X Wang, C Sun. 2006. Identification of a drought tolerant introgression line derived from Dongxiang common wild rice (*O. rufipogon* Griff.). *Plant Mol Biol* 62:247-259
- Zhao SH, FZ Wang, L Lu, HY Zhang, XY Zhang. 2000. Breeding and selection of drought resistant and salt tolerant wheat variety Cang 6001. *Acta Agric Boreall Sin* 15:113-117