

TUYỂN GEN PHỤC VỤ CHỌN GIỐNG CHỐNG CHỊU ĐIỀU KIỆN KHÔ HẠN CHO CÂY LÚA (*Oryza sativa.L*)

Nguyễn Thị Lang¹, Bùi Chí Bửu²

SUMMARY

Gene selection for breeding of draught tolerant rice variety (*Oryza sativa.L*)

SSR technique combined with selective genotyping was used to map quantitative trait loci (QTLs) associated with tolerance for drought tolerance in rice. Two hundred twenty nine (BC₂F₂) derived from the cross between OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB were evaluated. BC lines were evaluated for drought at flowering (DRF), dry root weigh (DR), root length (RL). Microsetellite map of this population was used with 232 markers to detect the linkage to target traits. A linkage map was constructed from 12 - linkage groups based on the population. The map covers 2,553.7 cM with an average interval of 10.97 cM between marker loci. Markers associated with drought tolerance were located mostly on chromosomes 2, 3, 4, 8, 9, 10 and 12. Quantitative trait loci (QTL) mapping was used to determine effects of QTLs associated with drought tolerance traits. We also mapped QTLs for morphological attributes drought tolerance. Chi - square tests (χ^2), single maker analysis (SMA), interval mapping (IM) were combined in QTL analysis procedure. All approaches are similar to QTL detection result. candidate genes for drought tolerance with use BAC (bacterial artificial chromosome) libraries are the large dna insert libraries of choice and valuable tools for map - based cloning of target quantitative trait loci. DNA and focus in chromosome 9. Fine QTLs were identified for DRR, two QTLs for length root, two QTLs for dry root weight. The proportion of phenotypic variation explained by each QTL ranged from 20.73% to 30.766% for DR, and from 6.23 to 3.39% for morphological characters at drought flowering.

This study has provided much more detailed informations on the relative importance marker assisted selection of drought tolerance.

Key words: BAC (bacterial artificial chromosome), drought, SSR, Quantitative trait loci (QTL).

I. MỞ ĐẦU¹

Mới đây, bản đồ cloning đã thành công trên vài genes như Rây nâu trên nhiễm sắc thể số 12 (Lang và *ctv.*, 2005). Xa - 1 (Monna và *ctv.* 1997; Yang, 1997). Đối với phương pháp map - baesd cloning có các bước sau:

- Thứ nhất là tìm marker liên kết với gen mục tiêu.

- Thứ hai, những marker có thể dùng để sàng lọc các BAC để tìm sự chông của các clones. Nhờ vào sự chông các clones này mới thiết kế bản đồ vật lý cho gen mục tiêu. Mặc khác từ bản đồ vật lý để phân lập các gen thông qua hậu cloning. landing nhiễm sắc thể hoặc phương pháp cloning. Thêm vào đó có thể phát triển phân tử BAC để tạo marker mới. Tìm các marker này để giúp cho chọn giống bằng MAS.

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).

Mục tiêu nghiên cứu cụ thể:

- Xác định tính đa hình DNA của vật liệu lai trong ngân hàng gen của Viện Lúa ĐBSCL.

- Xác định chỉ thị phân tử liên kết với QTL điều khiển chống chịu khô hạn, tập trung chủ yếu trên nhiễm sắc thể số 9.

- Chọn được dòng lúa mang gen chịu hạn thông qua phương pháp hồi giao (BC).

¹ Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

² Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn vật liệu được sử dụng làm bố, chịu hạn WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB, WAB881 SG9, IR65195 - 3B - 2 - 2 - 2 - 2 có nguồn gốc từ Viện lúa Quốc tế.

Nguồn vật liệu được sử dụng làm mẹ: OM1490, OM4495 có nguồn gốc từ Viện Lúa ĐBSCL. Thực hiện lai hồi giao tạo quần thể BC₂F₂ để thiết lập bản đồ.

Đánh giá kiểu hình

Đánh giá các chỉ tiêu nông học, năng suất và thành phần năng suất dựa trên chỉ tiêu của IRR (SES, 1996), tính trạng theo dõi bao gồm: Cấp độ cuộn lá (lá cuộn ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng), cấp độ khô lá: Lá khô ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng, khả năng thụ tinh của hạt lúa ở giai đoạn sinh trưởng sinh thực, đánh giá kiểu hình cây (PA).

Phân tích thống kê trên SAS, NTSYSpc.

Đánh giá kiểu gen

Thiết lập bản đồ SSR biểu thị sự liên kết nhóm trên nhiễm sắc thể, sử dụng MAPMARKER (Lander, 1987). Sử dụng 234 SSR đa hình phủ trên 12 nhiễm sắc thể.

Thiết lập BAC thư viện

Chuẩn bị BAC thư viện: Thư viện BAC IR64 từ IRR được duy trì tại Viện Lúa ĐBSCL phục vụ cho nghiên cứu này.

Chuẩn bị BAC DNA theo phương pháp mini của Lang (2002).

Chuẩn bị BAC clone bằng TAIL - PCR theo Liu và *ctv.* (2005).

Chứng minh vị trí chồng BAC clones theo phương pháp của Yang (1998).

Bản đồ fine mapping: Đánh giá quần thể của cây F₂.

Phân tích Amplicon length polymorphism (ALP): Sản phẩm đa hình được phân tích theo MAPMARKER 3.).Lod Score là 3.0 và log - likelihood là - 130.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khi phân tích quần thể OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB ở thế hệ F₁, có 86,6% cá thể nghiêng lệch về bố và 15,3% nghiêng lệch về mẹ OM1490 (cấp 7). Trong thế hệ F₂, cá thể con lai biểu hiện cấp 1 vẫn chiếm cao hơn 62,2% so với cá thể biểu hiện ở cấp 5 và cấp 7. Ở thế hệ F₃, số cá thể con lai diễn biến như sau: Cấp 1 và cấp 7 giảm, cấp 5 tăng lên.

Trong quần thể lai hồi giao, số cá thể của thế hệ BC₁ và BC₂ biểu thị cấp 1 cao hơn số cá thể biểu hiện trong F₂ và F₃, nhưng vẫn thấp hơn F₁.

Trong quần thể con lai OM1490/WAB881 SG9; Cá thể của thế hệ con lai cho phân ly nghiêng lệch về tính chống chịu cấp 3. Trong thế hệ F₂, số cá thể biểu thị cấp 1 chiếm 62,2%. Tuy nhiên trong F₁, số cá thể nghiêng lệch theo bố là 53,33% và nghiêng lệch theo mẹ (cấp 7) chiếm 46,6%. Số cá thể ở thế hệ F₂ nghiêng lệch theo bố về chống chịu khô hạn là 64,4%. Số cá thể ở F₃ nghiêng lệch theo bố về chống chịu khô hạn giảm xuống còn 44,4%. Con lai ở các thế hệ trung gian lại tăng lên 46,66%.

Phân tích cấp độ chống chịu khô hạn trên các cặp lai BC

Quan sát các giá trị trung bình của các thế hệ được ghi nhận trên tổ hợp OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB, hầu hết cá thể biểu thị cấp 1 chống chịu khô hạn ở BC₁ đạt 86,6%. Tuy nhiên, sang thế hệ BC₂, biểu hiện này suy giảm. Riêng đối với quần thể BC₁F₂, các cá thể biểu hiện tính chống chịu khô hạn chiếm 65%. Tuy nhiên, biến thiên trong thế hệ phân ly của BC₂F₂ phân bố khá rõ từ cấp 0 cho tới cấp 9. Quần thể con lai đang phân ly có xu hướng nghiêng lệch về mẹ nhiều hơn bố (nghiêng về bố chiếm 2,18%, nghiêng về mẹ 15,18%). Tần suất phân ly trong quãng giữa bố mẹ là 73,36%, phân ly vượt trội theo hướng bất lợi là 8,2%, phân ly vượt trội theo hướng có lợi là 0,04%.

Đối với tính trạng héo lá, trong quần thể BC, cá thể biểu hiện chống chịu khô hạn nghiêng về bố là 13,97%, vượt trội so với bố mẹ là 4,8%. Còn lại dị hợp tử có tần suất là 70,30%.

Đánh giá tính trạng chiều dài rễ của các giống lúa chịu khô hạn: Đối với các dòng có khả năng

chống chịu khô hạn và có khả năng rễ mọc dài, biến thiên từ 26 cm tới 10 cm (30 ngày sau khi cấy). Khả năng vượt trội so với bố mẹ rất thấp 0,04% (so với bố AB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB); Ghi nhận vượt trội so với mẹ là 20,6%.

Phân tích tỷ lệ bất thụ trên quần thể cặp lai phân tích tỷ lệ thụ trên quần thể ghi nhận nghiên về bố chiếm 6,69%, nghiêng về mẹ 3,12%; Khả năng vượt trội theo hướng có lợi là 2,2% và bất lợi là 2,37%. Dị hợp tử đạt 61,60%. Sự khác biệt về kiểu gen của tính trạng rễ mọc sâu, khả năng thụ tinh, sự nảy mầm hạt phấn, hiện tượng trổ thoát cổ bông, sự mở bao phấn đã được các nhà khoa học của IRRI quan tâm, đặc biệt trong đánh giá kiểu hình, với hiện tượng đối trọng nhau giữa hàm lượng ABA do khô hạn kích thích với hàm lượng GA khi lúa trổ bông. Phân tích ở mức độ proteomic và transcriptomic cho thấy: Người ta có thể phân biệt sự thay đổi có tính chất một chiều hoặc hai chiều của hiện tượng thể hiện gen. Trong lúa mì và lúa mạch, người ta sử dụng phân tích sinh tổng hợp fructan để xem xét tính chống chịu khô hạn ở giai đoạn trổ bông, tuy nhiên cây lúa không tích tụ fructan trong thời kỳ này (Bửu và Lang, 2003).

Như vậy cả bốn tính trạng ghi nhận trên quần thể BC₂F₂ đều biểu thị sự biến thiên theo phân bố chuẩn. Việc chọn cá thể theo hướng có lợi rất thấp (2,00 - 6,69%). Do đó, cần tìm ra chỉ thị phân tử để xác định nhanh chóng các cá thể con lai theo mục tiêu mong muốn.

Phân tích QTL tính chống chịu điều kiện khô hạn

Phân tích QTL marker theo phương trình tuyến tính theo phương pháp Lander (1987). Điện di trên agarose gel, các băng đa hình không thể hiện rõ giữa các cá thể. Bốn tính trạng mục tiêu có liên quan đến chống chịu khô hạn là X₁: Mức độ khô lá và héo lá, X₂: Chiều dài của rễ tương đối, X₃: Tỷ lệ thụ phấn, X₄: Năng suất hạt/khóm lúa.. Tính trạng số lượng này bị ảnh hưởng rất lớn bởi môi trường, do đa gen điều khiển. Markers liên kết với tính chống chịu hạn chủ yếu trên nhiễm sắc thể số 1, 3, 8, 9 và 12. Phân tích QTL thông qua phép thử χ^2 , phân tích marker đơn (SMA), lập bản đồ cách quãng (IM), LOD score ≥ 3 .

Ảnh hưởng QTL và hoạt động của gen điều khiển chịu hạn

Khả năng phát hiện QTL tùy thuộc vào điều kiện có thể được của marker loci, sự kết hợp trong phân tích thống kê giữa những alen tại các loci của marker phân tử và những alen tại các loci có tính chất số lượng (QTL). Tần suất biến thiên của tính trạng DRR trong phân bố chuẩn. Locus RM201 trên nhiễm sắc thể số 9 được xác định liên kết chặt chẽ với tính trạng mục tiêu DRR, với giá trị $R^2 = 20,73\%$. Kết quả này phù hợp với kết quả của Steel và *ctv.* (2006).

Đối với tính trạng chiều dài của rễ, biến thiên của kiểu hình được giải thích thấp hơn 5,01% tại locus RM189 và 23,80% tại locus RM316 trong tổ hợp lai OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB. Trong quần thể OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB, biến thiên này được giải thích chủ yếu tại locus RM189.

Ở tổ hợp lai OM1490/WAB881 SG9, biến thiên của kiểu hình được giải thích bởi quãng giữa RM201 - RM238 là 32,28%, rất đáng chú ý. Quãng giữa này đều được ghi nhận trong cả hai quần thể của OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB và OM1490/WAB881 SG9.

Các tính trạng năng suất và tỷ lệ hạt thụ tinh chưa ghi nhận được kết quả liên kết giữa QTLs và tính trạng trong cả ba tổ hợp lai nói trên.

Thực hiện fine mapping

Tổng số 229 cây BC₂F₂ của OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB đã được dùng để thiết lập bản đồ chống chịu điều kiện khô hạn giai sau khi cấy 30 ngày. Sử dụng 20 microsatellite marker đa hình phục vụ cho phân tích. Marker đa hình nghiêng lệch về bố chiếm tỷ lệ 20,5%. Điều này khá thuận lợi khi phân tích và đánh giá kiểu gen cho chọn giống chống chịu điều kiện khô hạn. Nhiễm sắc thể (NST) mục tiêu là NST số 9.

Tổng chiều dài được bao phủ bởi marker đa hình trên nhiễm sắc thể số 9 là 290,4 cM. Trung bình khoảng cách giữa hai marker là 16,13 cM, Sản phẩm PCR được khuếch đại với primer RM201 trên nhiễm sắc thể số 9, có trình tự DNA như sau:

F - 5'CTCGTTTATTACCTACAGTACC - 3'
R - 5'CTACCTCCTTTCTAGACCGATA - 3'

Thiết kế primer

Nguyên tắc thiết kế primer

Việc chọn lọc một primer nào đó là một thử thách cực kỳ quan trọng khi chúng ta muốn ứng dụng PCR có hiệu quả và độ trung thực cao.

Nhằm đạt được thành công trong việc khuếch đại của PCR, chúng ta phải thiết kế chính xác “oligonucleotide primer”.

Mỗi được thiết kế đúng giúp chúng ta tránh tạo ra những sản phẩm PCR không chuyên tính, giống như hiện tượng phân biệt giữa cDNA và DNA của bộ gen trong RNA - PCR.

Các nguyên tắc trong thiết kế primer được Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang (2004) nghiên cứu như sau:

Primer nên có chiều dài chuỗi trình tự khoảng 17 - 28 base.

Hàm lượng G + C khoảng 50 - 60%.

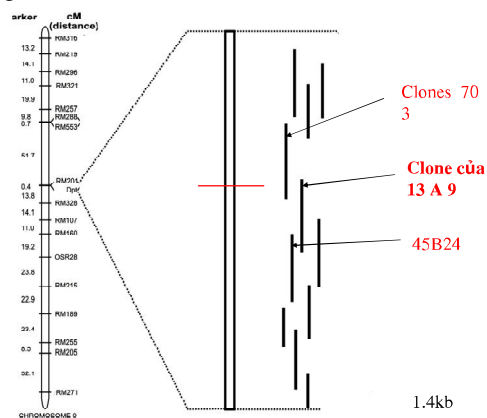
Nhiệt độ Tm khoảng 55 - 80°C.

Ở đầu 3' primer có một G hoặc C, hoặc CG hoặc GC nếu nhiều hơn sẽ thúc đẩy hiện tượng “priming” nhằm ở các trình tự giàu G hoặc C nên được tránh.

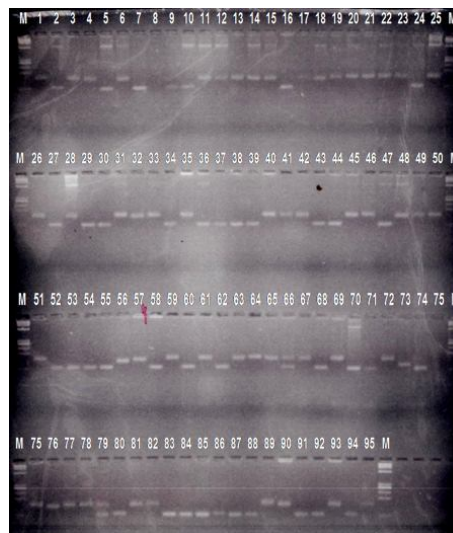
Giá trị Tm trong khoảng 56 - 62°C tạo ra điều kiện để quá trình “annealing” đạt kết quả tốt. Nhưng trong phản ứng PCR nhiệt độ Tm của mỗi có thể biến thiên trong vòng 2 - 3°C (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2004).

Kiểm tra vị trí của marker thông qua phần mềm BLAST. Xác định vị trí BAC Clone DNA nằm trên nhiễm sắc thể số 9. Điều này tiếp tục dùng marker trên để xây dựng bản đồ vật lý ds9e63 tìm sự liên kết của markers với gen khô hạn.

Với ba clone được tìm trên nhiễm sắc thể số 9. Tuy nhiên chỉ có 1 clone 13 A9 liên kết chặt với gen khô hạn.



Hình 4. Kết quả bản đồ vật lý được thiết lập trên hình



Hình 5. Markers 13A9f - R trên quần thể F2 của OM4102/WAB 8818G9

Bản đồ vật lý của gen khô hạn của BAC đã được chứng minh. Một clone 13A 9 mang gen khô hạn được chứng minh. Clone 13A 9 được giải mã và thiết kế primer. Markers này dùng để thực hiện bản đồ Fine mapping và chứng minh rằng contig chứa locus khô hạn trên quần thể F2 của tổ hợp OM4102/WAB 8818G9.

IV. KẾT LUẬN

Trong phân tích các cặp lai đơn và hồi giao đều ghi nhận khả năng chống chịu khô hạn khá tốt của cá thể con lai trong tổ hợp lai BC₂F₂.

Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi liên kết giữa QTL mục tiêu và marker RM201 là 32,28%, 20,73% và 9,95%, theo thứ tự đối với cặp lai OM1490/WAB881 SG9, OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - HB và OM4495/IR65195 - 3B - 2 - 2 - 2 - 2. Đối với tính trạng chiều dài của rễ, kết quả này biểu hiện thấp hơn 5,01% tại locus RM189 đối với OM1490/WAB880 - 1 - 38 - 18 - 20 - P1 - H. và tại locus RM316 kết quả đạt 23,80% đối với OM1490/WAB881 SG9.

Nhìn chung tại locus RM201 của nhiễm sắc thể số 9, cả 3 quần thể con lai được nghiên cứu đều cho kết quả đa hình đáng tin cậy. Do đó, RM 201 được đề nghị sử dụng cho nội dung chọn tạo giống lúa chống chịu khô hạn nhờ chỉ thị phân tử (MAS)

Bản đồ vật lý của gen khô hạn của BAC đã được chứng minh. Một clone 13A 9 mang gen khô hạn được chứng minh. Clone 13A 9 được

giải mã và thiết kế primer. Markers này dùng để thực hiện bản đồ Fine mapping và chứng minh rằng contig chứa locus khô hạn trên quần thể F2 của tổ hợp OM4102/WAB 8818G9.

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả cảm ơn Bộ Nông nghiệp và PTNT đã cấp kinh phí cho đề tài này được tiến hành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bừu 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.
- Daichang Yang (1997), Contruction of A Bacterial Artifical Chromosome (BAC) Library and initial physical map of rice genome thesis for degree of Doctor.
- 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
- genic plants, *Plant Physiol* 108:1387 - 1394.
- Lander ES, P Green, J Abrahamson, A Barlow, MJ Daly, SE Lincoln, L Newburg (1987), Mapmarker: An interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations, *Genomics* 1:174 - 181.
- 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, Bùi Chí Bửu (2003), Genetic and physical maps of gene Bph - 10 controlling brown plant hopper resistance in rice (*O. sativa*) Omon rice 11: 35 - 41.
- Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004), Nghiên cứu di truyền gen kháng mặn trên quần thể trồng đôn của cây lúa, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* (6: 824 - 826).
- 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.
- 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.
- 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.