

NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỘNG DI TRUYỀN TRÊN QUẦN THỂ LAI HỒI GIAO CỦA GIỐNG CHỐNG CHỊU ĐỘ ĐỘC CỦA SẮT TRÊN CÂY LÚA (*ORYZA SATIVA* . L).

GS. TS. Bùi Chí Bửu¹, GS. TS. Nguyễn Thị Lang²

1. Mở đầu

Độ độc sắt có thể làm giảm nghiêm trọng năng suất hạt. Trong đất phèn trồng lúa ở Đồng Bằng Sông Cửu Long, độ độc sắt được xem là yếu tố hạn chế chính, cùng với hàm lượng hữu cơ cao, phản ứng với ion sắt trong điều kiện đất ngập nước. Trong điều kiện canh tác cây trồng cạn, thí dụ lúa được canh tác trên đất có điều kiện thoáng khí, rất khó tìm hiện tượng ngộ độc do sắt (Quijano và Mendoza, 1994). Trong các biểu loại đất có vấn đề, độ độc sắt thường gặp khi điều kiện pH đất thấp, khả năng trao đổi cation (CEC) thấp, trạng thái base thấp, cung cấp Mn thấp và mức độ thoát nước kém (Ponnaperuma 1974, Ponnaperuma và Solivas 1982). Độ độc sắt thường được tìm thấy trên đất phèn trẻ (*Sulfaquepts*), đất phù sa cổ và đất phù sa cát kém thoát nước (*Hydraquepts*, *Fluvaquepts*) ở các thung lũng, đất acid phù sa và phù sa cổ *Tropaquepts* và *Tropaquents*, đất than bùn (Quijano và Mendoza, 1994). Độ độc sắt trong cây lúa biểu thị ra bên ngoài các triệu chứng như sau: những đốm nâu nhỏ li ti ở lá thứ hai sau lá trên cùng, dần dần các vết nhỏ này lan rộng làm lá có màu nâu, tím, vàng cam tùy theo giống lúa. Có khi lá lúa cuộn tròn lại. Trong trường hợp ngộ độc sắt quá nặng, lá thứ hai trở xuống sẽ trở nên nâu sậm rồi chết. Mức độ tăng trưởng và khả năng đẻ nhánh sẽ bị ức chế, hệ thống rễ trở nên thô cứng và có màu nâu sậm. Nếu hiện tượng ngộ độc sắt xảy ra muộn, khả năng tăng trưởng không bị ảnh hưởng, nhưng năng suất hạt sẽ bị giảm do tính chất bất thụ. Rễ lúa kém phát triển, đen, thối và có sắt bao bọc bên ngoài.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Thanh lọc 93 giống cải tiến từ ngân hàng gen của Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long. Giống chuẩn kháng Pokkali.

Giống chuẩn nhiễm IR28.

Tổ hợp lai: OM 1490/ AS 996; OM 6073/ OMCS 2004; AS 998/ jasmine 85

2.2 Phương pháp

Thanh lọc độ độc của sắt, Đánh giá tính chống chịu 4 tuần sau khi gieo cấy

% lá khô	Điểm	Mức độ	Quan sát
0-20	1	Kháng	Cây phát triển bình thường, không có triệu chứng gì trên lá
21-35	2	Kháng	Đẻ chồi bình thường, trên chóp lá hay phần trên nửa lá có điểm trắng và cuộn tròn.
36-50	3	Kháng	Phát triển và đẻ chồi chậm lại, một số lá bị cuộn tròn.
51-70	5	Hơi kháng	Chồi kém phát triển và hầu hết bị cuộn tròn, chỉ vài lá phát triển.
71-90	7	Hơi nhiễm	Sự phát triển hầu như ngưng lại, hầu hết các lá bị khô, một vài cây chết.
91-100	9	Nhiễm	Tất cả cây đều chết.

Đánh giá bằng chỉ thị phân tử theo Lang 2002

¹Viện KHKTTN miền Nam, ²Viện lúa ĐBSCL

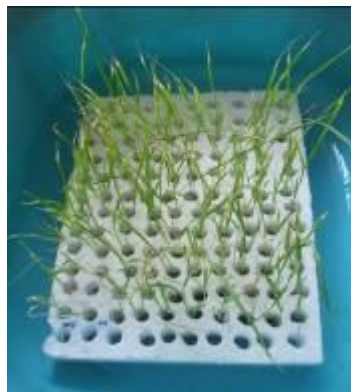
3. Kết quả và Thảo luận

3.1 Thanh lọc lúa chống chịu độ độc sắt

Tại Viện Lúa ĐBSCL, các vật liệu tạo giống được chọn lọc để đánh giá, phát triển được 3 quần thể con lai, chọn theo phương pháp phủ hệ, với 307 dòng chống chịu độ độc của nhôm (được thống kê từ F₂ đến F₆). Chọn được 12 dòng ưu tú trong quần thể F₆. Quần thể hồi giao (BC) được phát triển với 30 tổ hợp lai, được theo dõi từ BC₁F₁ đến BC₃F₃, với 354 dòng chống chịu phèn trong quần thể phân ly và cuối cùng ở thế hệ BC₃F₃ chọn được 50 dòng.



Hình A. Cây lúa 2 tuần tuổi (0 ppm)



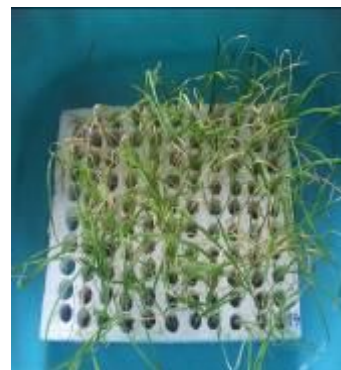
Hình B. Cây lúa 2 tuần tuổi (20 ppm)



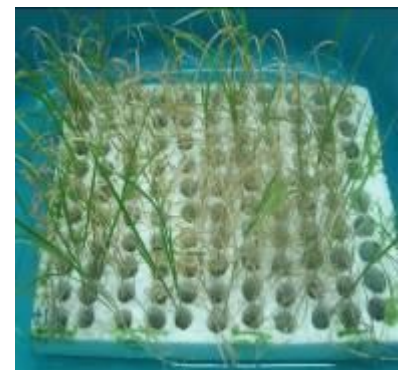
Hình C. Cây lúa 2 tuần tuổi (100 ppm)



Hình D. Cây lúa 4 tuần tuổi (0 ppm)



Hình E. Cây lúa 4 tuần tuổi (20 ppm)



Hình F. Cây lúa 4 tuần tuổi (100 ppm)

Hình 1. Thanh lọc lúa chống chịu độ độc sắt

3.2 Đánh giá hệ số di truyền của 3 tổ hợp ghi nhận cho hệ số di truyền cao trên ba tổ hợp lai

Kết quả ước lượng các hệ số di truyền theo nghĩa hẹp (h^2_{NS}) trình bày trên bảng 1. Nhìn chung hệ số di truyền có giá trị rất cao cho tính trạng chống chịu độ độc của sắt trên cả ba tổ hợp lai. Cho thấy các tính trạng này được kiểm soát chủ yếu bởi yếu tố di truyền bên trong khả năng di truyền tính trạng này cho tiếp tục chọn lọc thế hệ tiếp theo.

Bảng 1: Phương sai kiểu gen, phương sai kiểu hình, hệ số di truyền, và hiệu quả chọn lọc so với giá trị trung bình của các tổ hợp lai tên sự chống chịu độ độc của sắt

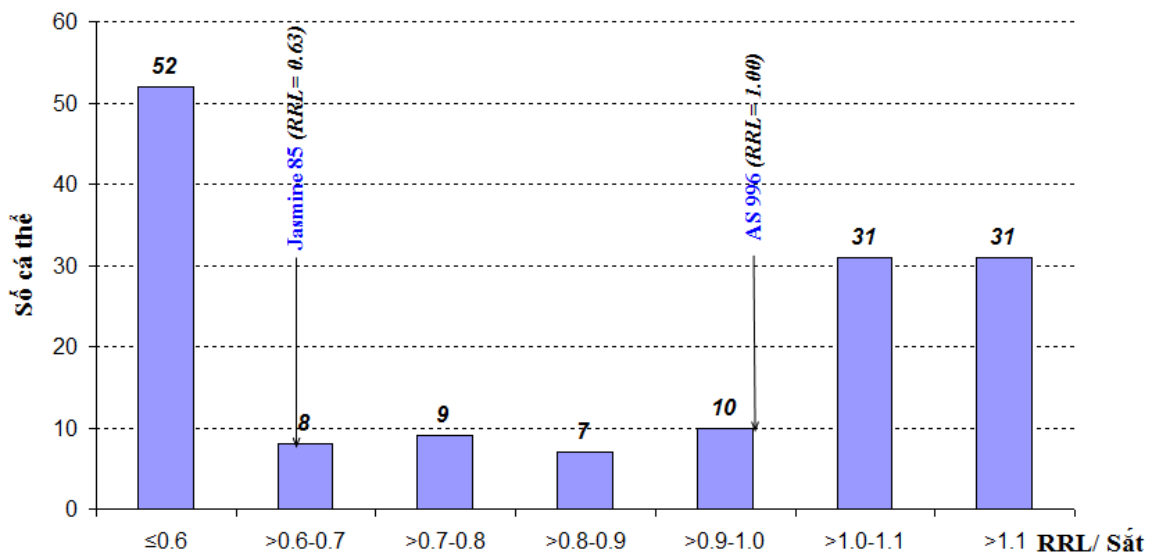
STT	Tổ hợp lai RRL/ Sắt	Σ^2_G	σ^2_P	Hệ số di truyền (h^2)	GA / trung bình
1	OM 1490/ AS 996	0.0853	0.0854	0.9993	0.514103
2	OM 6073/ OMCS 2004	0.1037	0.1037	0.9994	0.566645
3	AS 996/ Jasmine 85	0.0878	0.0879	0.99925	0.521492

Nồng độ 300-500 ppm Fe hòa tan trong vùng rễ là có thể gây độc cho lúa.

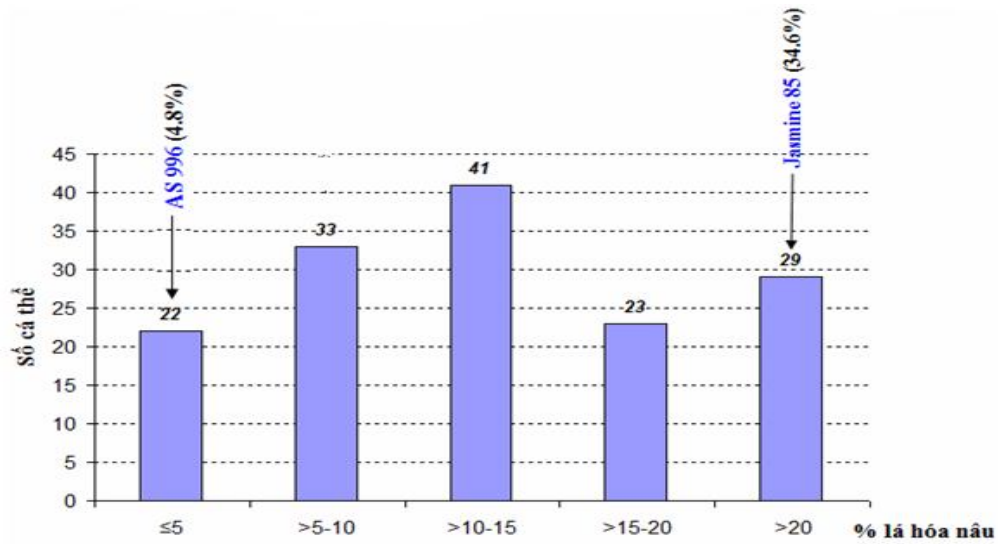
Tanaka và ctv. (1966) ghi nhận hàm lượng sắt gây độc cho lúa biến thiên rất rộng 10 - 1000 ppm.

Van Breeman (1978) ghi nhận mức gây độc này là 20-40 mg/L trong đất có mức độ dinh dưỡng thấp hoặc bị ức chế hô hấp. Trong đất cát, độ độc sắt xảy ra khi hàm lượng sắt ở mức 40-100 mg/L (Van Breeman và Moorman 1978)

Thanh lọc chống chịu độ độc sắt trong dung dịch được khuyến cáo là 100 ppm Fe^{++} ở pH = 4 (Fageria và Robelo 1987); 200 ppm Fe^{++} ở pH = 5 (Yamaguchi và Yoshida 1981), 500 ppm Fe + sucrose làm chất “anti-oxidant” (Aranda và Ortico 1978).

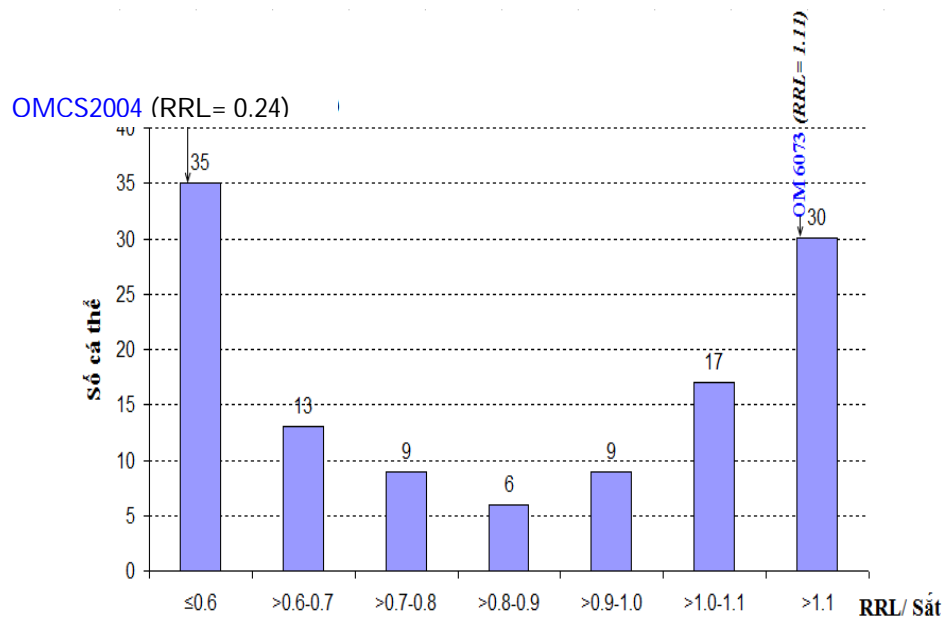


Hình 2: Sự biến động chiều dài rễ tương đối (RRL) trên phản ứng độ độc của sắt 100ppm trên quần thể AS996 / Jasmine 85

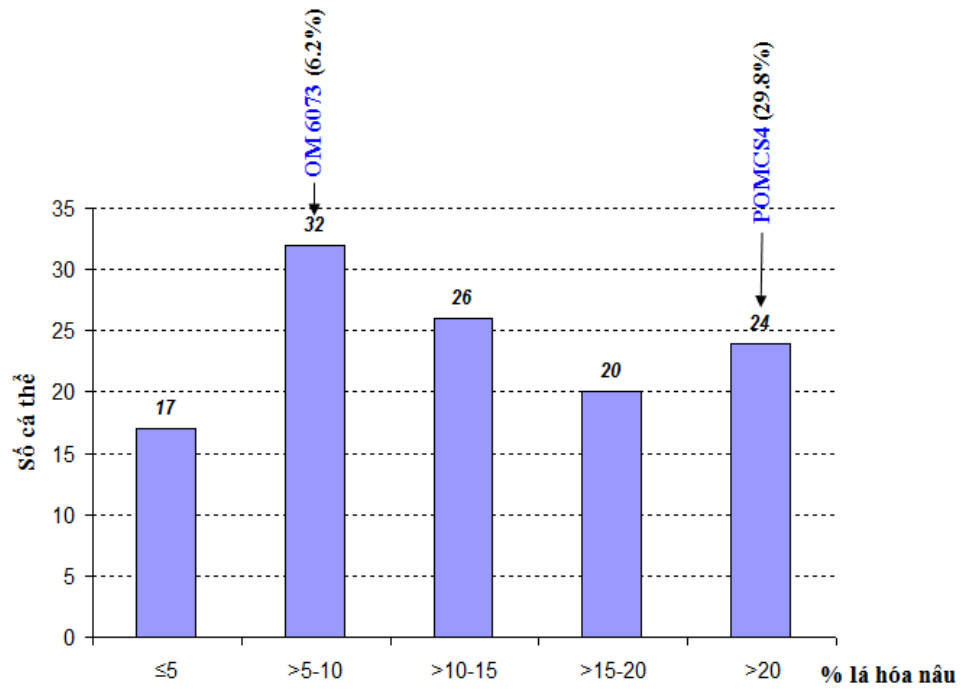


Hình 3: Sự biến động LBI (chỉ số hóa nâu) do phản ứng với độ độc của sắt 100ppm trên quần thể AS996 / Jasmine 85

TỔ HỢP OM6073/ OMCS2004

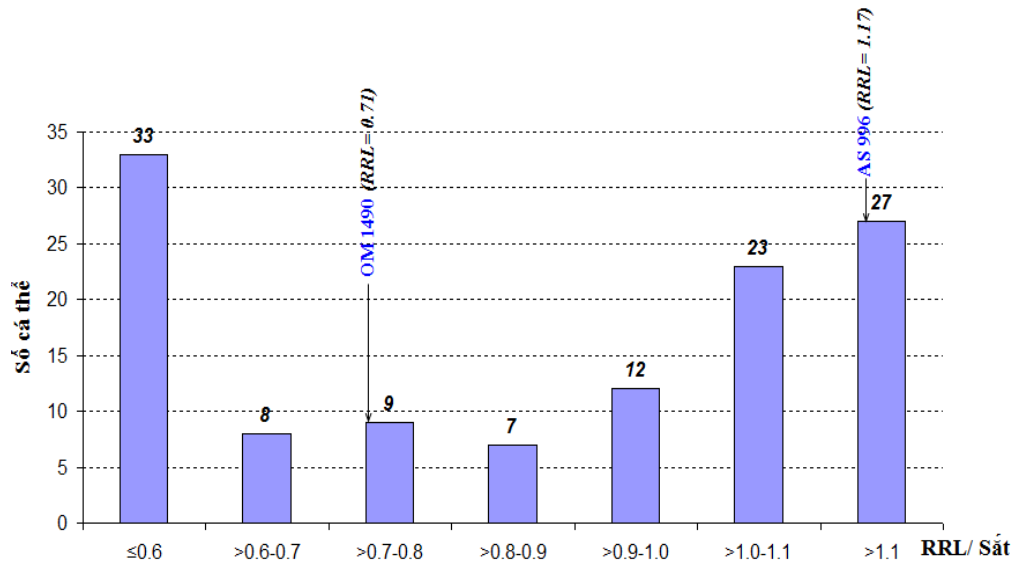


Hình 4: Sự biến động chiều dài rễ tương đối (RRL) trên phản ứng độ độc của sắt 100ppm trên quần thể F₂ OM 6073/OMCS2004

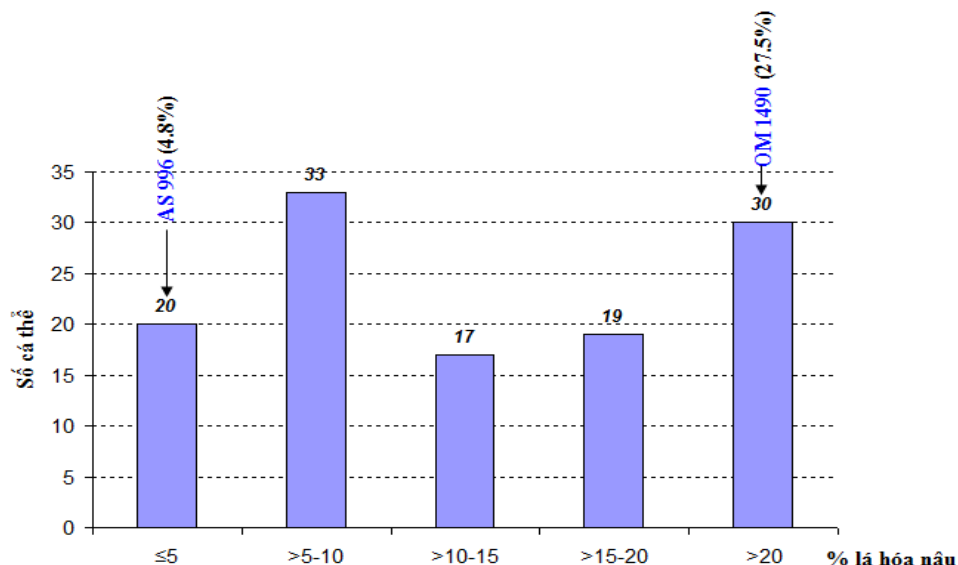


Hình 5: Sự biến động của LBI trên phản ứng độ độc của sắt 100ppm trên quần thể F₂ OM 6073/OMCS2004

TỔ HỢP OM1490 / AS996



Hình 6: Sự biến động chiều dài rễ tương đối (RRL) trên phản ứng độ độc của sắt 100 ppm trên quần thể F₂ của OM1490 / AS996



Hình 7: Sự biến động của LBI trên phản ứng độ độc của sắt 100 ppm trên quần thể F_2 của OM1490 / AS996

Bảng 2 cho thấy, hiệu quả chọn lọc tổ hợp lai AS996/Jasmine 85 và OM6073/OMCS2004 biểu thị khá nhất đối với cả hai tính trạng chống chịu độ độc sắt. Giống AS996 là giống dẫn suất (derivative) từ IR64 / lúa hoang *Oryza rufipogon* (được thu thập tại Tràm Chim, ĐTM, 1991). Giống được công nhận chính thức vào năm 2003, biểu thị tính chịu phèn mặn rất tốt ở ĐBSCL.

3.3 Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn lọc dòng chống chịu độ độc sắt

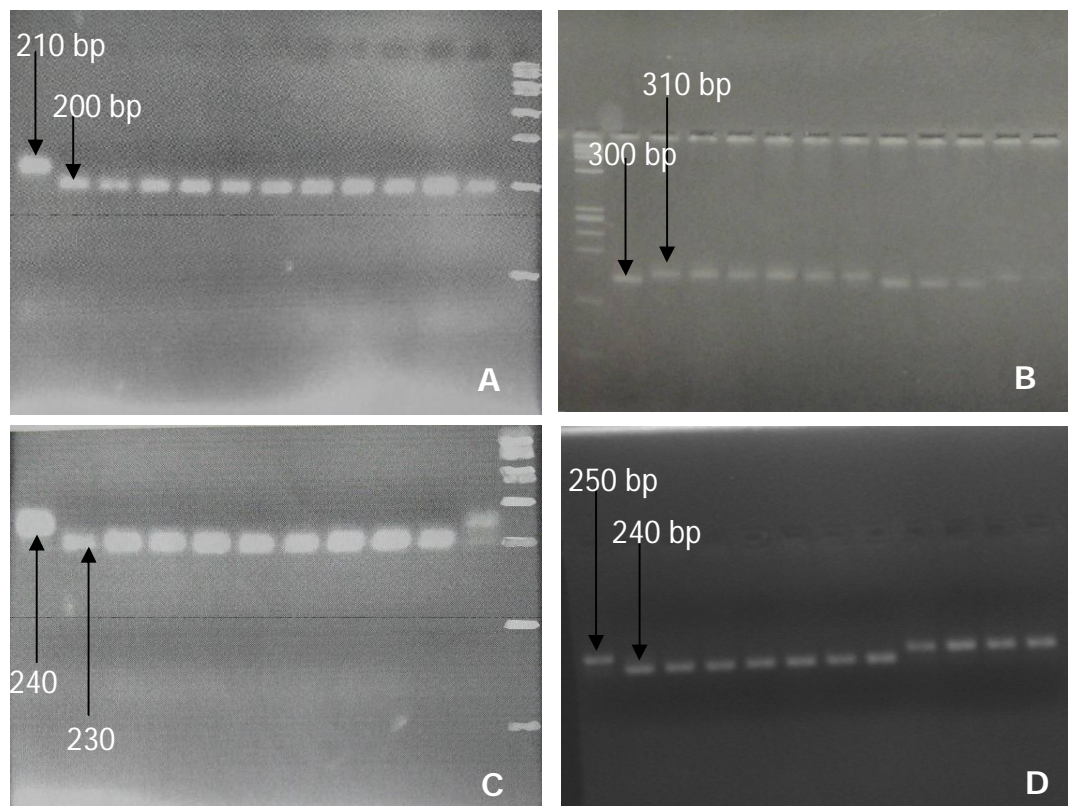
Phản ứng làm nâu (bronzing) màu lá được xem như phương pháp xác định mức độ chống chịu đã được biết rất sớm (IRRI 1965, Ota 1968), nhưng người ta biết rất ít về cơ sở di truyền của cơ chế chống chịu tương ứng với mức độ “nâu”. Kỹ thuật marker phân tử đang giúp các nhà nghiên cứu tìm hiểu cơ sở di truyền trên cả hai phương diện: tính trạng đơn gen và tính trạng đa gen, tương tác epistasis (Tanksley, 1993). Khả năng áp dụng bản đồ liên kết gen rất khả thi trong việc phân tích tính trạng này (Causse và ctv. 1994, Kurata và ctv. 1994). Trong báo cáo này việc ghi nhận sàng lọc PCR lần thứ nhất tại thế hệ BC_2F_2 của OM1490/ AS996, có 10 cây mang gen liên quan đến tính trạng LBI (chỉ số hóa nâu của lá), kết hợp với tính trạng nông học mong muốn. Xác định được có sự hiện diện của gen chống chịu độ độc sắt trên 10 dòng. Trong vụ Đông Xuân 2009, 10 dòng này được trồng với các vật liệu làm bố mẹ để đánh giá ngoài đồng. Tiến hành đánh dấu, thu mẫu lá, xét nghiệm PCR lần thứ hai để chọn tiếp các cá thể mang gen chống chịu độ độc sắt.

Kiểu hình có liên quan nhiều nhất là chiều dài tương đối của rễ khi thử nghiệm độ độc sắt trong dung dịch Yoshida. Tổng số 15 cây BC_3F_2 của 2 quần thể hồi giao (OM1490 /AS996 và IR28/AS996) được chọn. Riêng tổ hợp OMCS2000/Kiên Giang lộn chưa ghi nhận sự kiện chống chịu độ độc sắt biểu hiện trên lá thông qua LBI. Còn lại hai tổ hợp lai tất cả các cá thể tuyển chọn đều được đánh dấu, thu mẫu lá phục vụ cho việc xác định sự hiện diện của gen chống chịu thông qua xét nghiệm PCR.

Sau khi tách chiết, định lượng DNA tổng số, tiến hành chạy PCR với những cặp mồi chuyên biệt liên quan đến gen chống chịu độ độc sắt. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên agarose 3% cho thấy có biểu hiện một đoạn đặc hiệu của gen với kích thước 210- 220 bp tại locus RM 6 và kích thước 300-310 bp tại locus RM240 trên nhiễm sắc thể số 4.

Bên cạnh đó, tại locus RM6 cũng cho kết quả đa hình trên quần thể BC₁với mẹ (OM1490) mang alen A, biểu thị ở kích thước phân tử 220bp và alen B (bố AS996) biểu thị ở kích thước 210 bp. Tại locus RM240, alen B của mẹ nằm vị trí 300bp và alen A của bố nằm ở vị trí 310bp.

Phân tích 10 cây mang gen liên quan đến tính trạng LBI thuộc tổ hợp OM1490/ AS996 cũng cho kết quả đa hình tại locus RM252. Chỉ thị phân tử RM252 biểu thị alen A của mẹ nằm vị trí 240bp và alen B nằm ở vị trí 230bp. Tại locus RM451, kết quả alen B của mẹ nằm ở vị trí 240bp và alen A của bố nằm ở vị trí 250bp.



Hình 8: Sản phẩm khuếch đại PCR tại loci RM6 (A), RM240 (B), RM252 (C) và RM451 (D) trên quần thể BC₂F₂ của OM1490 /AS996

Số liệu kiểm tra PCR được tổng hợp cho thấy trong số 10 cây hồi giao nghiên cứu có 7 cây mang gen chống chịu độ độc của sắt trên tổ hợp OM 1490/ AS 996 đối với chỉ thị phân tử RM 6. Tính chất đa hình này (polymorphism) được minh họa rõ nét trong kỹ thuật phân tử SSR chỉ thị phân tử RM 6 và RM 240 (trên nhiễm sắc thể số 6) và RM 252 trên nhiễm sắc thể số 4.

Phân tích QTL theo phương pháp SMA, nhằm phát hiện gen điều khiển tính chống chịu với độ độc sắt trên tổ hợp BC₃F₂ của OM1490/AS996; những chỉ thị phân tử RM6, RM240, RM252 và RM451 cho kết quả đa hình với sản phẩm PCR có kích thước cách nhau 10 bp giữa alen kháng và alen nhiễm. Những cây thể hiện bằng đồng hợp tử alen kháng trên cả 4 chỉ thị phân tử được ghi nhận là G5 (BC3-1-2), G11 (BC3-1-3), G16 và

G17 (BC3-2-1), G21 và G24 (BC3-2-2). Các cá thể này thể hiện chống chịu được độ độc sắt ở nồng độ 100 ppm FeCl₂.

Bảng 2: Tổng hợp kết quả PCR với RM6, RM240, RM252 và RM451. Tìm kiếm gen chống chịu độ độc sắt trên tổ hợp BC₃F₂ của OM1490/AS996

Ký hiệu dòng hồi giao	Mã số cây chọn	Ký Hiệu	Kích thước sản phẩm PCR (bp)				Phản ứng với độ độc của sắt
			RM6	RM240	RM252	RM451	
Tổ hợp OM1490 / AS996							
OM1490		P1	220	300	240	240	S
AS996		P2	210	310	230	250	T
BC3-1-1	1	G1	220	300	240	250	S
	2	G2	210	310	230	240	T
	3	G3	210	310	230	240	T
BC3-1-2	1	G4	210	310	230	240	T
	2	G5	210	310	230	250	T
	3	G6	210	310	230	240	T
	4	G7	210	310	230	240	T
BC3-1-3	5	G8	210	300	230	250	T
	1	G9	210	300	230	250	T
	2	G10	210	300	230	250	T
	3	G11	210	310	230	250	T
	4	G12	210	310	230-240	240	T
BC3-2-1	5	G13	220	310	240	240	S
	1	G14	210	310	230	240	T
	2	G15	210	310	230	240	T
	3	G16	210	310	230	250	T
	4	G17	210	310	230	250	T
BC3-2-2	5	G18	210	310	230	240	T
	1	G19	210	310	230	240	T
	2	G20	210	310	230	240	T
	3	G21	210	310	230-240	250	T
	4	G22	210	310	230	240	T
	5	G23	210	310	230	240	T
	6	G24	210	310	230	250	T

Bảng 3: So sánh kiểu gen và kiểu hình trên 4 chỉ thị phân tử RM6, RM240, RM252 và RM451

Chỉ thị phân tử	Số cá thể	Kháng	Nhiễm	Dị hợp	Ước đoán Mức độ chính xác (%)
RM6	24	22	2	0	91,67
RM240	24	16	8	0	66,67
RM252	24	20	2	2	83,33
RM451	24	12	12	0	50,00

Việc xét nghiệm PCR, sàng lọc các cây hồi giao mang gen kháng, các dòng này dùng như là vật liệu lai với giống tái tục; tiến trình kéo dài đến BC₄. Các dòng BC bắt đầu thuần với kiểu hình và kiểm tra với việc xét nghiệm PCR ghi nhận trên thế hệ BC₄F₂ khẳng định việc hồi giao đã thành công, chuyển được gen mục tiêu từ giống cho vào giống nhận một cách ổn định. Có 20 dòng được tuyển chọn để đánh giá và chọn lọc tiếp tục; đưa các dòng này sang so sánh sơ khởi, so sánh hậu kỳ và khảo nghiệm quốc gia. Kết quả một số dòng đạt rất tốt có thể đưa vào sản xuất trong tương lai.

4. Kết luận

- Kết hợp phương pháp chọn tạo giống truyền thống và chỉ thị phân tử để rút ngắn thời gian chọn giống; áp dụng GRAMENE để tìm kiếm nhiều chỉ thị có liên kết chặt hơn trong vùng giả định với LOD >3,0. Có 7 chỉ thị phân tử mới được áp dụng, biểu thị đa hình (4 của sắt: RM252, RM211, RM315, RM212).
- Kiểu hình phân tích chống chịu sắt là 0, 30, 100 ppm FeCl₂ trên dung dịch dinh dưỡng Yoshida. Kết quả chủ yếu dựa trên chiều dài tương đối của rễ (RRL) và độ hóa nâu của sắt.
- Đề nghị chọn lọc tiếp đánh giá các tính trạng có liên quan đến hiệu quả kinh tế để đưa vào sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Lang 2002. Những phương pháp cơ bản trong công nghệ sinh học. NXBNN
- Ponnamperuma FN, JL Solivas. 1982. Field amelioration of an acid sulfate soil with manganese dioxide and lime. Pages 213-222 in Proc of Bangkok Symp on Acid Sulfate Soils. H Dost and N van Breemen (eds.), IILRM, Wageningen.
- Ponnamperuma FN. 1974. Problem rice soils. Proc. IRRI Conf., April 22-25, 1974, LosBanos, Philippines, 11p.
- Quijano C, R Mendoza. 1994. Mineral Toxicities in rice. Breeding rice for flood-prone and problem soil areas. IRRI 1994. pp 99-116
- Tanaka A, SA Navasero. 1966. Interaction between iron and manganese in the rice plant. Soil Sci Plant Nutr 12:29-33
- Van Breemen N. 1978. Landscape, hydrology and chemical aspects of some problem soils in the Philippines and in Sri Lanka. A terminal report submitted to IRRI, Los Banos, Philippines pp. 247-282
- Yamaguchi M, S Yoshida. 1981. Physiological mechanism of rice tolerance for iron toxicity. IRRI, Saturday Seminar, June 6.