

PHÁT TRIỂN CHỈ THỊ STS TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỊU HẠN

LÊ THỊ BÍCH THỦY, NGUYỄN ĐỨC THÀNH

Viện Công nghệ sinh học

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Cặp lai giữa giống lúa nương R 1815 thuộc loài phụ *japonica* và giống lúa nước IR62266 thuộc loài phụ *indica* đã được dùng trong các thí nghiệm.

Các mối STS được sử dụng trong nghiên cứu gồm: STS RG381, STS RG143, STS G20, STS RG157, STS RG140, STS G173, STS RZ698, STS RZ 474 và STS RG385. Các mối được đặt tổng hợp tại hãng Keystone Lab. USA.

Các enzym đã được sử dụng là: Alu, Rsa, Hha, HinfI, TagI, HpaII. Các enzym được mua từ hãng New England Biolab.

2. Phương pháp

a) Phương pháp thiết kế mối STS

Mỗi STS được thiết kế dựa vào trình tự chuỗi đầu của các chỉ thị liên kết với các đặc điểm liên quan tới tính chịu hạn. Trong đó:

RG157 liên quan đến độ dài, độ dày và trọng lượng khô của rễ.

RG143, G20, RG381 liên quan đến độ dài của rễ.

RG140 liên quan đến điều hòa áp suất thẩm thấu.

G385 liên quan đến độ dày của rễ.

Các trình tự của các chỉ thị được lấy từ ngân hàng gen lúa (RiceDB) ([http:// bank.dna.affrc.gov.JP](http://bank.dna.affrc.gov.JP)) và RiceGene ([http:// genome.cornell.edu](http://genome.cornell.edu))

Các mối STS được thiết kế bằng chương

Khô hạn là một trong những nhân tố bất lợi nhất của môi trường làm hạn chế năng suất lúa. Vì vậy, việc nghiên cứu tính chịu hạn và chọn tạo những giống lúa có khả năng chịu hạn đã trở thành một trong những nghiên cứu quan trọng. Các phương pháp tạo giống truyền thống trong một thời gian dài đã mang đến những giá trị nhất định trong thực tiễn sản xuất. Tuy nhiên, với sự phát triển mạnh mẽ của các kỹ thuật sinh học phân tử, việc chọn dòng chịu hạn ở lúa sẽ có hiệu quả hơn khi có sự trợ giúp của chỉ thị phân tử [9]. Khi một chỉ thị phân tử được tìm ra là có liên kết với một đặc điểm hình thái và sinh lý được quan tâm, các nhà chọn giống có thể dùng chỉ thị phân tử này để chọn lọc các giống mới, giảm bớt được các thí nghiệm tốn kém ngoài đồng ruộng.

Cho đến nay, đã có rất nhiều chỉ thị phân tử được phát triển dựa trên cơ sở kỹ thuật PCR như AFLP, RAPD, SSR... Một kiểu chỉ thị di truyền hiện đang được sử dụng rất phổ biến là điểm trật tự được đánh dấu (Sequence Tag Site = STS). Nó cho phép xác định những vị trí được đánh dấu bằng cách sử dụng các trình tự nucleotit biết trước của các ADN chỉ thị [8]. Mỗi một STS được xác định tại một điểm trên bản đồ như là một mốc trong genôm. Ở cây lúa, các STS được coi như các mốc chuẩn. Nhờ vậy, việc tìm kiếm các gen kiểm soát hoặc liên quan đến một tính trạng di truyền nào đó có thể được tiến hành một cách dễ dàng.

Trong bài này, chúng tôi trình bày kết quả về việc phát triển các chỉ thị STS liên quan đến một số đặc điểm của rễ có lợi cho tính chịu hạn ở lúa, nhằm phục vụ cho việc đánh giá và chọn tạo các giống lúa chịu hạn.

Công trình được sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.

trình phần mềm Primer Premier 4.0 (Biosoft International, CA, Mỹ) và GeneFisher 1.3 ([http:// bibiserv.techfak. uni-bielefel.../](http://bibiserv.techfak.uni-bielefel.../)).

B) Phản ứng PCR với các môi STS

Các phản ứng PCR của ADN genôm của cây bố mẹ với 9 môi STS được thực hiện để nhận các vùng ADN liên quan đến một số đặc điểm đã nêu trên, được thực hiện trên máy PCR PTC 100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research inc, USA).

Cắt sản phẩm PCR bằng enzym cắt hạn chế và được xử lý với các enzym giới hạn theo hướng dẫn của các hãng cung cấp.

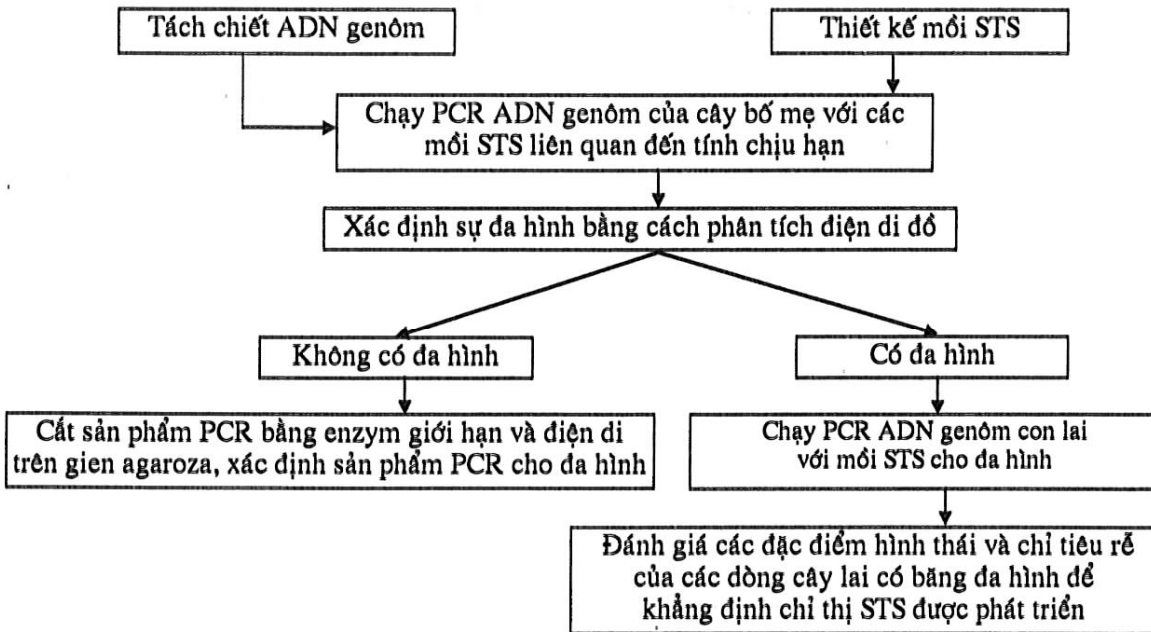
c) Phương pháp đo đếm chỉ tiêu rễ của các

dòng lúa

Để kiểm tra các đặc điểm hình thái của bố mẹ và các con lai, kết hợp với đánh giá dựa vào các môi cho đa hình khẳng định sự liên kết của chỉ thị STS với đặc điểm quan tâm. Các cá thể của cặp lai được trồng lặp lại ba lần trong các ống nhựa có chiều dài 1m và đường kính 160 mm, chứa đất. Sau 45-60 ngày tuổi, tiến hành đánh giá độ dài, rễ bằng cách rửa sạch và đo độ dài của rễ tính từ gốc đến đầu rễ dài nhất.

Các số liệu đo được tính toán và xử lý thống kê bằng chương trình phần mềm SAS (SAS institute, Inc, Cary, NC, 1990).

Chỉ thị STS được phát triển theo sơ đồ sau:



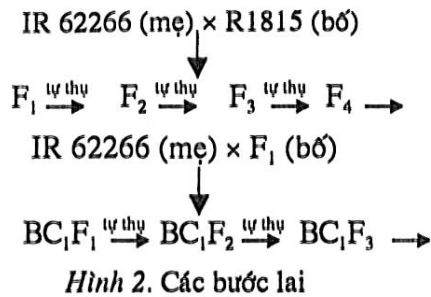
Hình 1. Các bước phát triển chỉ thị STS.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tạo cặp lai để phân tích đa hình dựa vào các môi STS

Bằng phương pháp lai cổ điển, chúng tôi đã tiến hành lai cây mẹ là giống lúa nước IR62266

với cây bố là giống lúa nương R1815 và đã thu được 44 hạt lai thế hệ F₁. Một số dòng lai F₁ này lại tiếp tục cho lai trở lại với cây mẹ, thu được 35 hạt lai (BC₁F₁). Các bước lai được thực hiện theo sơ đồ hình 2. Các dòng lúa lai thu được được sử dụng để tách chiết ADN từ lá dùng cho các thí nghiệm đánh giá quần thể cây lai.



2. Phát triển chỉ thị STS

a) Thiết kế mồi

Dựa trên 9 chỉ thị RFLP liên kết với các đặc điểm liên quan tới tính chịu hạn như đã trình bày ở trên, 9 cặp mồi đã được thiết kế dựa vào trình tự của đoạn cuối các chỉ thị tương ứng (bảng 1).

Bảng 1

Trình tự các mồi STS

Chỉ thị RFLP	Thể nhiễm sắc	Đặc điểm liên kết	Chỉ thị STS	Mồi STS 5'-----3'	Kích thước sản phẩm PCR (kb)
RG 381	1	Độ dài rễ	STS RG381	F AGTACTGGCCGGTGCAGGAG R TGCACGGTGTCCATCTATCT	2.2
RG157	2	Độ dài, độ dày, trọng lượng rễ	STS RG157	F CTAGAATGCCATCCGCGAGC R CTAGAATGCCATCCGCGAGC	1
RG140	2	Áp suất thẩm thấu	STS RG140	F CCTCAGGTATTTTGTAGCT R ACACCACCATATGCCCATGC	1.5
G385	9	Độ dày rễ	STS G385	F GAGATAGGAAGGAAGAGCAT R GGAAGATTATTTGTCAGGAA	0.196
G20	7	Độ dài rễ	STS G20	F CTCCAATTCITTTGATCGACA R AAGCACGAGAGGATGATTCT	0.85
RG143	4	Độ dài rễ	STS RG143	F AGACTGGCACAATGAATGCG R CAGCAACAGTCACTGCAATT	1.2
RZ698	9	Độ dày rễ	STS RZ698	F GCCAATGCCACACCACCAAC R AGCCTTTGGAAAGGTTGCAGT	0,4
RZ474	3	Độ dày rễ	STS RZ474	F TAAACGATGAGGGAATGCCAATGT R GCGGCAACGGGAAACAGAGC	0,7
RG173	12	Độ dày rễ	STS RG173	F AGCGACAGTGA CTGACCGTG R ATCCCGACCACCGCGCCGGA	0,9

b) Nhân các vùng liên quan đến tính chịu hạn

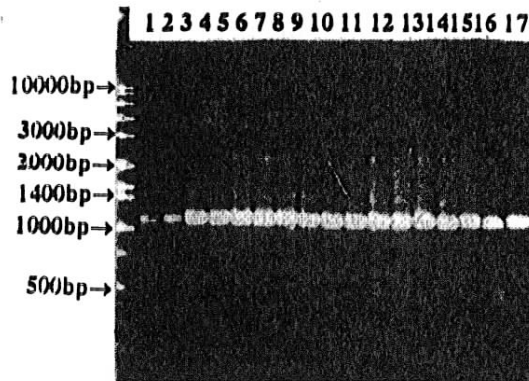
Các phản ứng PCR với các mồi thiết kế được thực hiện như đã nêu ở trên. Kết quả nhận được là các sản phẩm PCR với cả 9 mồi đều không cho đa hình ở các cây bố mẹ. Điều này phù hợp với nhận xét của Lizuka và cs. cho rằng, mặc dù khả năng khám phá ADN đa hình của các sản phẩm PCR với các mồi STS là thấp, nhưng sự đa hình của các mồi STS có thể

được cải thiện nếu tiếp tục cắt sản phẩm PCR bằng các enzym giới hạn [6]. Hình 3 và hình 4 là sản phẩm PCR ADN genôm của cây bố mẹ với các mồi G20 và RG143, mồi mồi đều cho những băng giống hệt nhau ở cả hai cây bố mẹ. Mồi STS G20 cho một băng ở vị trí 850bp, còn mồi STS RG143 cho băng ở vị trí 1200bp đúng như kích thước của hai đoạn chỉ thị này.



Hình 3. Sản phẩm PCR của mỗi STS G20 với cây bố mẹ và các cây lai

1. cây bố, 2. cây mẹ, 3. F₂10, 4. F₂14, 5. F₂17,
6. F₂23, 7. F₃2, 8. F₃3, 9. F₃9, 10. F₃31, 11. F₄2,
12. F₄3, 13. F₄7, 14. F₄15, 15. BC₁F₂3, 16. BC₁F₂9,
17. BC₁F₂21.



Hình 4. Sản phẩm PCR của mỗi STS RG143 với cây bố mẹ và các cây lai

1. cây bố, 2. cây mẹ, 3. F₂10, 4. F₂14, 5. F₂17, .
6. F₂23, 7. F₃2, 8. F₃3, 9. F₃9, 10. F₃31, 11. F₄2,
12. F₄3, 13. F₄7, 14. F₄15, 15. BC₁F₂3, 16. BC₁F₂9,
17. BC₁F₂21.

Bảng 2

Kết quả cắt sản phẩm PCR của các dòng bố mẹ với một số enzym hạn chế.

Enzym Môi	Alu	Rsa	Hpa	Hha	TagI	HinfI
STS RG157	0	0	1	0	0	0
STS RG143	0	0	0	0	1	0
STS G20	0	0	0	0	1	1
STS RG381	0	0	0	0	1	1
STS RG140	0	0	0	0	0	0
STS G385	0	0	0	1	0	0
STS RZ698	0	0	0	0	0	0
STS RG 173	0	1	0	0	1	0
STS RZ474	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: 1 - Cho đa hình, 0 - Không cho đa hình

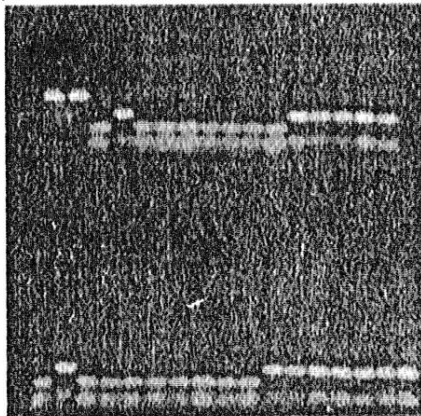
Các môi khác đều cho một băng có kích thước mong đợi (STS RG381, STS RG157, STS RG140, STS G173, STS RZ698, STS RZ 474 và STS RG385) nhưng không có đa hình giữa bố và mẹ. Vì vậy, các sản phẩm PCR được tiếp tục sử dụng với các enzym hạn chế để nghiên cứu đa hình.

c) Phân tích đa hình của bố mẹ trong cặp lai

Sau khi phản ứng PCR với các môi STS không nhận được đa hình, các sản phẩm PCR này được cắt với các enzym giới hạn Alu, Rsa, HpaII, Hha, TagI, HinfI. Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy, sau khi sản phẩm PCR được cắt bằng các enzym hạn chế, đã cho những băng đa hình, điều này cho thấy rõ sự khác nhau giữa cây bố và cây mẹ sau khi cắt sản phẩm PCR bằng enzym như TagI, HinfI, HpaII, Rsa. Các enzym này tiếp tục được cho cắt với sản phẩm PCR của các dòng cây lai các thế hệ sau.

d) Phân tích đa hình sản phẩm PCR của một số môi cắt bằng enzym giới hạn đã được chọn lọc với quần thể các cây lai

Sản phẩm PCR của quần thể cây lai với một F_1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



F_2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Hình 5. Sản phẩm PCR của mỗi STS G20 với cây bố mẹ và các cây lai F_1 , F_2 được cắt bằng enzym HinfI

Hàng trên là các cây F_1 :

- 1, 2. hai cây bố mẹ chưa cắt enzym,
- 3, 4. bố mẹ đã cắt enzym, 5. F_1 1, 6. F_1 2,
- 7. F_1 3, 8. F_1 4, 9. F_1 5, 10. F_1 6, 11. F_1 8,
- 12. F_1 8, 13. F_1 9, 14. F_1 12, 15. F_1 14, 16. F_1 31.

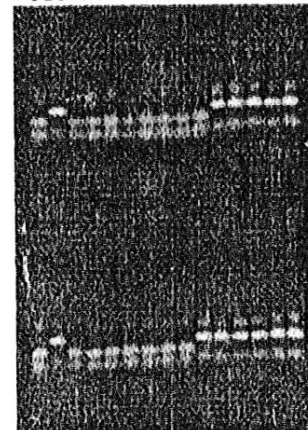
Hàng dưới là các cây F_2 : 1, 2. hai cây bố mẹ, 3. F_2 1, 4. F_2 2, 5. F_2 3, 6. F_2 4, 7. F_2 6, 8. F_2 8, 9. F_2 10, 19. F_2 23, 11. F_2 7, 12. F_2 9, 13. F_2 12, 14. F_2 14, 15. F_2 17, 16. F_2 31, 17. F_2 15.

số mỗi đã được cắt bằng các enzym cho đa hình nhận được ở trên. Kết quả chỉ có một enzym HinfI sau khi cắt sản phẩm PCR với mỗi STS G20 là cho đa hình rõ rệt nhất (hình 5 và hình 6) nên các phân tích tiếp theo chúng tôi chỉ sử dụng mỗi STS G20. Các phân tích đa hình sản phẩm PCR ADN genôm của các dòng lúa ở các thế hệ khác nhau (F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , BC_1F_2) với mỗi STS G20 cho thấy sự đa hình này ổn định và duy trì qua các thế hệ nghiên cứu (đến F_4).

Sản phẩm PCR của ADN genôm của các dòng cây lai, sau khi cắt bằng enzym, được chia làm ba nhóm: nhóm 1 có băng giống hạt cây bố, nhóm 2 có băng giống hạt cây mẹ và nhóm 3 có băng giống cả hai bố mẹ.

Chúng tôi chọn những cây có băng đa hình giống bố để tiếp tục sử dụng trong việc đánh giá chọn tạo giống chịu hạn sau này. Mỗi STS G20 như đã biết liên kết với gen quy định độ dài của rễ liên quan đến tính chịu hạn. Như vậy, có thể sử dụng để theo dõi locus này trong việc chọn giống chịu hạn với sự trợ giúp của các chỉ thị phân tử.

F_1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



BC_1F_1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

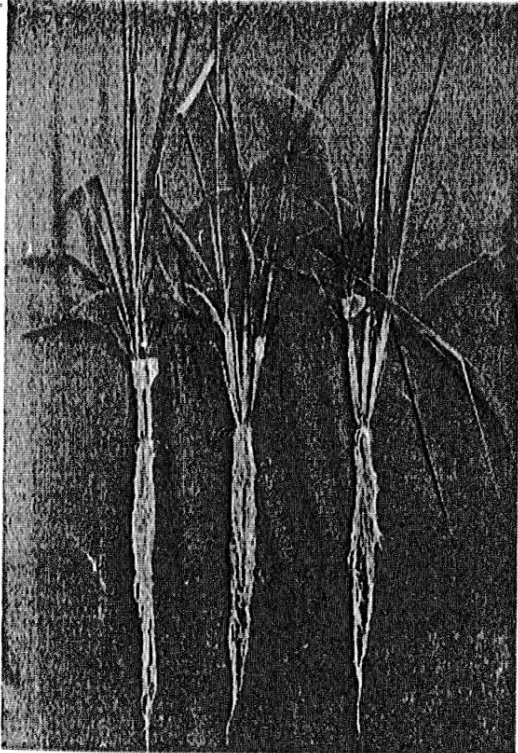
Hình 6. Sản phẩm PCR của mỗi STS G20 với cây bố mẹ và các cây lai F_1 , BC_1F_2 được cắt bằng enzym HinfI

Hàng trên là các cây F_1 : 1, 2. hai cây bố mẹ, 3. F_1 1, 4. F_1 2, 5. F_1 3, 6. F_1 4, 7. F_1 6, 8. F_1 8, 9. F_1 10, 10. F_1 16, 11. F_1 7, 12. F_1 9, 13. F_1 12, 14. F_1 14, 15. F_1 15.

Hàng dưới là các cây BC_1F_2 : 1, 2. hai cây bố mẹ, 3. BC_1F_2 2, 4. BC_1F_2 4, 5. BC_1F_2 7, 6. BC_1F_2 8, 7. BC_1F_2 9, 8. BC_1F_2 10, 9. BC_1F_2 21, 10. BC_1F_2 1, 11. BC_1F_2 3, 12. BC_1F_2 5, 13. BC_1F_2 6, 14. BC_1F_2 17, 15. BC_1F_2 19.

3. Đánh giá các chỉ tiêu rễ của các dòng lúa

Như phần phương pháp đã nêu ở trên, 18 dòng lúa của quần thể cặp lai đã được trồng lặp lại ba lần trong ống nhựa để theo dõi đo đếm chỉ tiêu rễ liên quan đến tính chịu hạn. Trong đó gồm hai cây bố mẹ và 4 cây F₂, 4 cây F₃, 4 cây F₄, 4 cây BC₁F₁.



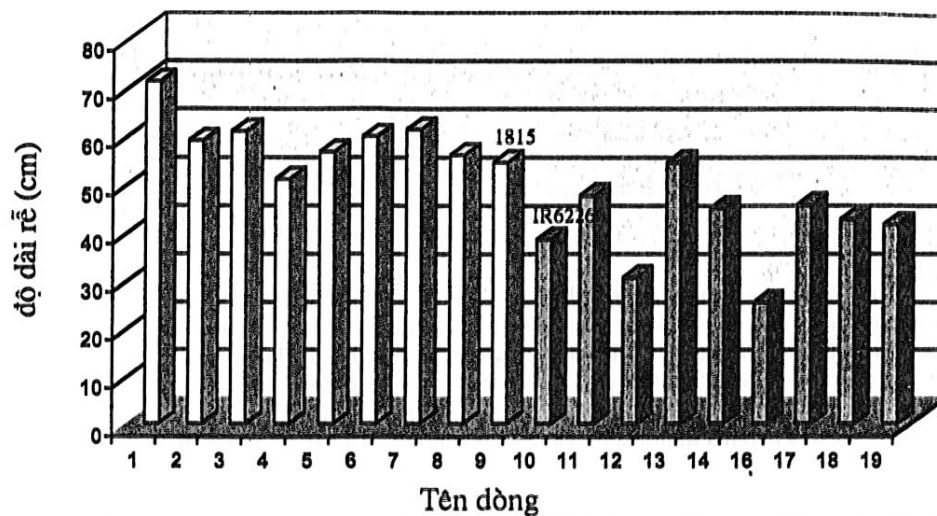
Hình 7. Hình thái rễ của một số cây lai.

Sản phẩm của mỗi STS G20 cắt bằng enzym HinfI cho đa hình ở các cây lai đã được biết là mối liên quan đến tính chịu hạn quy định độ dài rễ. Vì vậy, chúng tôi đi sâu đánh giá độ dài rễ trong quần thể cây lai. Kết quả đánh giá được thể hiện ở hình 8.

Trong số các dòng ghi trên hình 8 thì dòng 9 là cây bố, dòng 10 là cây mẹ, các dòng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 là các dòng đã chọn lọc được (có

bằng đa hình giống bố) còn lại là các dòng có bằng giống mẹ.

Qua hình 8, ta thấy độ dài của rễ của các dòng giống mẹ biến động từ 22- 51 cm, độ dài trung bình là 41 cm, thấp hơn sự biến động độ dài của rễ của các dòng giống bố từ 48-69 cm, có độ dài trung bình là 59 cm, đặc điểm này rất có ý nghĩa đối với khả năng chịu hạn của cây, hoàn toàn phù hợp với kết quả chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử ở trên. Các dòng có rễ dài sẽ có khả năng hút được nước và các chất dinh dưỡng trong các lớp đất sâu, tránh được sự thiếu nước đặc biệt trong thời kỳ khô hạn [5]. Theo Yambao và cs. (1992) thì thậm chí chỉ cần một vài rễ dài là có thể đáp ứng được nhu cầu thoát hơi nước ở mức tiềm năng nước trong lá cao tương ứng. Hệ thống rễ sâu được xem là một đặc điểm quan trọng, có mối tương quan với khả năng chịu hạn [1,7,11]. Nghiên cứu về bộ rễ lúa, Sharma và cs. nhận thấy kiểu hình của rễ lúa rất đa dạng [10]. Trong khi các giống lúa nương có bộ rễ khoẻ, to và có khả năng đâm xuyên sâu [2], thì các giống lúa vùng đồng bằng có bộ rễ lan rộng (nhiều rễ nhánh) và có nhiều mô thông khí. Trong số các tính trạng của bộ rễ nghiên cứu thì tính trạng chiều dài tổng số của rễ (total root length= TRL) có mối liên quan chặt chẽ tới tính chịu hạn ở vùng đất cao. Nhưng đối với những giống lúa sống ở vùng đồng bằng thì khả năng chịu hạn của bộ rễ lại không phụ thuộc nhiều vào chiều dài (chiều dài của rễ khoảng 10-30cm) mà liên quan nhiều đến mật độ của rễ (root length density= RLD) [4]. Chống lại sự thiếu hụt nước, trước hết vấn đề chính là đáp ứng được nhu cầu thoát hơi nước. Hầu hết lúa cạn có cơ chế chống chịu bằng hệ thống rễ dày và sâu hoặc cơ chế thích ứng của thân như sự mềm dẻo trong cuộn lá, đóng lỗ khí khổng và tầng cuticular chống lại sự mất nước khi hạn hán xảy ra [3]. Các giống lúa cạn có đặc điểm hình thái chung là có rễ sâu hơn và có đường kính rễ lớn hơn so với lúa nước [12], điều này giúp cây sinh trưởng được ở vùng đất cao bị rửa trôi và xói mòn do mưa và sự thiếu nước xảy ra thường xuyên ở đây. Kết quả đánh giá về độ dài rễ cho thấy sự phù hợp giữa hình thái rễ liên quan đến tính chịu hạn và việc đánh giá bằng chỉ thị phân tử STS G20 liên quan đến đặc điểm rễ (độ dài rễ). Như vậy, chỉ thị STS phát triển từ chỉ thị G20, có thể sử dụng để đánh giá và chọn tính chịu hạn ở lúa.



Hình 8. Biến động độ dài rễ trong các cây lai.

Ghi chú: 1. F₂17, 2. F₂14, 3. F₄15, 4. F₃9, 5. F₃3, 6. F₄7, 7. BC₁F₂(3, 8. BC₁F₂(17, 9. R1815, 10. IR62266, 11. F₂23, 12. F₃3, 13. F₂10, 14. F₃2, 16. F₄3, 17. BC₁F₂9, 18. F₄3, 19. BC₁F₂21.

III. KẾT LUẬN

Từ những kết quả nhận được, chúng tôi đi đến một số kết luận sau:

1. Đã phát triển được chỉ thị STS G20 từ chỉ thị RFLP G20 liên quan đến độ dài của rễ. Chỉ thị STS G20 này có thể sử dụng để đánh giá và chọn giống lúa chịu hạn liên quan đến bộ rễ.

2. Các dòng lai có đa hình phân tử giống bố (R1815) đều có đặc điểm độ dài của rễ có lợi cho tính chịu hạn. Điều này cho thấy sự phù hợp giữa chọn lọc theo chỉ thị phân tử và hình thái.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bashar M. E., Das R. K., Chang T. T., 1989: Journal of plant breeding and genetics. Bangladesh, 2 (1, 2): 55-58.
2. Chang T. T., Loresto G. C., 1986: Proceeding of the 1985 Jakacta Coference IRRI. Los Banos, Laguma, Philippines 199-212.
3. Ekanayake I. J. et al., 1985: Crop. Sci., 25: 927-933.
4. Ingram K. T. et al., 1994: Rice root traits for drought resistance and their genetic

variation. Rice roots: nutrient and water use. Manila Philippines, IRRI. 67-70.

5. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, 1998: Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa: NXB Đại học quốc gia Hà Nội, 9-10.
6. Lizuka M. et al., 1992: Genomics, 12: 139.
7. Nguyen H. T., Chandra Babu R., Blum A., 1997: Crop. Sci., 37: 1426-1434.
8. Nguyễn Đức Thành và cs., 2000: Ứng dụng chỉ thị phân tử RAPD và STS trong nghiên cứu đa dạng di truyền và chọn giống ở lúa. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học: 149-151.
9. Nguyễn Văn Uyển, 1995: Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật. NXB Nông nghiệp, 2: 64-69
10. Sharma P. K. et al., 1994: Rice root: Nutrient and water use. IRRI. Manila Philippines: 55-66.
11. Taylor H. M., Klepper B., 1978: Adv. Agron., 30: 99-128.
12. Yadav R. et al., 1997: Theor. Appl. Genet., 94: 619-632.

DEVELOPMENT OF THE STS MARKER FOR MARKER-ASSISTED SELECTION OF DROUGHT RESISTANCE IN RICE.

LE THI BICH THUY, NGUYEN DUC THANH

SUMMARY

The biotechnology has a great potential for plant breeding as it promises to reduce the time to be taken in breeding program. In recent years, new tools of the cellular and molecular biology such as the molecular marker techniques and the marker-aided selection have been extensively used. In this study, we attempt to develop the STS marker linked to the locus which are proved to be favored for the drought resistance, for the evaluation and the selection of the drought resistance in rice. Nine STS primers were used to amplify the genomic DNA from two parents and a segregating population. All the PCR products show no polymorphism between parents and progenies. Then the PCR products were digested with seven restriction enzymes, the obtained results showed that the STS G20 primer pairs developed the base on end sequences of the RFLP markers linked to maximum root length were, successfully, revealed polymorphism between parents and progenies. The results on the evaluation of root trait showed that all the progenies having HinfI restriction enzyme patterns as male parent have the root trait (maximum root length) favour for the drought resistance. Thus, the STS G20 could be an useful marker for the evaluation and selection of the drought resistance in rice.

Ngày nhận bài: 18-10-2002