Tạp chí Công nghệ Sinh học 7(3): 349-355, 2009

PHÁT TRIỂN CHỈ THỊ STS DỰA TRÊN CÁC PHÂN ĐOẠN AFLP LIÊN KẾT VỚI MỘT SỐ TÍNH TRẠNG HÌNH THÁI RỄ TRONG CHỌN DÒNG LÚA CHỊU HẠN

Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Thúy Hạnh, Trần Quốc Trọng, Phạm Quang Chung, Nguyễn Đức Thành

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Phương pháp chọn lọc nhờ sự trợ giúp của các chỉ thị phân tử (MAS - Marker Assisted Selection) là một phương pháp chọn giống hiện đại đang được áp dụng rộng rãi hiện nay. Dựa vào vị trí chính xác các gen trên bản đồ và mối liên kết chặt giữa các chỉ thị với gen được quan tâm có thể đánh giá kiểu gen của các cá thể trong quần thể. Các chỉ thị phân tử (RAPD, AFLP, RFLP) được sử dụng trong lập bản đồ liên kết nhưng không thể trực tiếp trong chọn giống mà cần phát triển thành các chỉ thị STS mới có thể sử dụng. Để có thể ứng dụng MAS cần phát triển rất nhiều các chỉ thị STS mang tính đặc trưng và dễ sử dụng liên kết chặt với gen kiểm soát các tính trạng đang được quan tâm. Từ các kết quả đạt được trong việc xây dựng bản đồ QTL bằng các chỉ thị AFLP liên kết với một số tính trạng hình thái rễ liên quan đến tính chịu hạn trước đây, chúng tôi đã phát triển chỉ thị STS từ các phân đoạn AFLP liên kết nhằm ứng dụng chúng trong chọn dòng lúa chịu hạn. Chúng tôi đã phân lập và đọc trình tự của sáu phân đoạn AFLP liên kết với tính trạng số lượng rễ, đường kính rễ, độ dài rễ, tỷ lệ khối lượng rễ/thân và tỷ lệ khối lượng rễ sâu/thân. Dựa trên trình tự đọc được, chúng tôi đã thiết kế sáu cặp mồi STS. Chúng tôi đã tìm được điều kiện thích hợp cho các cặp mồi STSAVM62, STSAVM22 và STSAVM87 với nhiệt độ bắt cặp tương ứng là 54, 53 và 60°C. Tuy nhiên, sản phẩm PCR chưa có sự đa hình. Vì vậy, để tạo ra sự đa hình giữa các dòng chúng tôi đã tiến hành nhân PCR với mồi STS đơn. Kết quả bước đầu khi nhân PCR với mồi STSAVM62 ngược đã thu được phân đoạn DNA đa hình giữa các dòng ở vị trí 1000 bp. Với tính ổn định cao trong quần thể qua các thế hệ, phân đoạn DNA thu được có thể sử dụng trong chọn dòng lúa chịu hạn sau khi có đánh giá thêm về mối liên hệ giữa chỉ thị và khả năng chịu hạn của các dòng lúa.

Từ khóa: *AFLP, lúa, MAS, STS, tính chịu hạn*

MỞ ĐẦU

Chọn dòng nhờ sự trợ giúp của các chỉ thị phân tử là một phương pháp chọn giống hiện đại đang được áp dụng rộng rãi hiện nay. Trong quá trình chọn lọc tính trạng mong muốn được phát hiện dựa vào các chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen kiểm soát tính trạng đó. Vì vậy, loại bỏ ngay ở giai đoạn sớm một cách chính xác những cá thể không có triển vọng, rút ngắn thời gian chọn lọc đặc biệt là đối với các tính trạng hình thái khó xác định như các tính trạng hình thái rễ. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng MAS cần phát triển rất nhiều các chỉ thị liên kết chặt với gen kiểm soát các tính trạng đang được quan tâm. Các chỉ thị sử dụng trong chọn giống phải mang tính đặc trưng và phải dễ sử dụng.

Trong số các chỉ thị được sử dụng hiện nay, các chỉ thị phân tử như RAPD, AFLP, RFLP được sử dụng nhiều trong lập bản đồ liên kết phân tử. Tuy nhiên, các chỉ thị này dùng trực tiếp trong chọn giống do đòi hỏi về kỹ thuật cao (RFLP) (Tragoonrung *et al.*, 1992) hoặc do có quá nhiều các phân đoạn DNA đa hình (RAPD, AFLP) dẫn đến việc khó xác định phân đoạn DNA liên kết được quan tâm. Vì vậy, các kỹ thuật này được dùng trong lập bản đồ liên kết, sau đó các phân đoạn DNA liên kết muốn sử dụng được trong chọn giống phải phát triển thành các chỉ thị STS mới có thể sử dụng được trong chọn giống.

STS là các trình tự xác định, có vị trí duy nhất trên bản đồ có thể sử dụng như các chỉ thị cho lập bản đồ những gen quan trọng trên nhiễm sắc thể (NST). STS được ứng dụng như một chỉ thị DNA trong chọn giống vì đây là kỹ thuật thực hiện nhanh, thuận tiện, chắc chắn và giá thành thấp trong phân tích di truyền. Nhưng những ứng dụng của chỉ thị STS hiện nay còn rất hạn chế vì số lượng chỉ thị STS được phát triển còn rất thấp.

Việc phát triển các chỉ thị phân tử STS và ứng dụng chúng trong chọn dòng đã được Komatsuda và đồng tác giả (1998) tiến hành dựa trên sự phát triển 3 phân đoạn RAPD và 6 phân đoạn RFLP liên kết chặt

với locus *vrs1* (locus kiểm soát sự phát triển và độ hữu thụ của các bông chét ở lúa mạch) thành các chỉ thị STS. Heznandez và đồng tác giả (1999) cũng tiến hành phát triển được 12 phân đoạn RAPD thành 11 chỉ thị STS trong chọn dòng ở lúa mỳ. Meksem và đồng tác giả (2001) đã phát triển thành công 6 chỉ thị STS liên quan đến gen kháng tuyến trùng *cyst nematode* từ 10 phân đoạn AFLP ở đậu tương.

Ở Việt Nam, việc phát triển và ứng dụng chỉ thị phân tử STS trong chọn tạo giống lúa chịu hạn đã được tiến hành dựa trên trình tự gen được công bố trên ngân hàng gen lúa (Rice DB, Rice Gene) (Lê Thị Bích Thủy, 2002). Tuy nhiên, số lượng các chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn ở lúa còn rất ít chưa đáp ứng được nhu cầu về chọn giống chịu hạn nhờ sự trợ giúp của các chỉ thị phân tử. Vì vậy, dựa trên các kết quả đạt được trong việc xây dựng bản đồ QTL bằng các chỉ thị AFLP liên kết với một số tính trạng hình thái rễ liên quan đến tính chịu hạn (Thanh *et al.*, 2004), chúng tôi đã tiến hành phát triển chỉ thị STS từ các phân đoạn AFLP liên kết nhằm ứng dụng chúng trong chọn dòng lúa chịu hạn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

DNA của 14 dòng lúa (31, 36, 39, 57, 64, 68, 69, 70, 74, 75, 94, 123, 126, 127) từ quần thể F6, F9 của cặp lai giữa hai giống lúa cạn RDB09 (*Japonica*) x 2021 (*Indica*) được lai tạo từ Phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

Các cặp mồi AFLP (Bảng 1) mua của hãng Key Stone (Mỹ).

Các chỉ thị AFLP liên kết với một số tính trạng rễ quan trọng trong tính chịu hạn.

Vector tách dòng pCR2.1 TOPO được cung cấp từ hãng Invitrogen.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được mua từ hãng Sigma (Mỹ).

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi AFLP.

TT	Tên cặp mồi	Trình tự mồi *Eco*RI	Trình tự mồi *Mse*I
1	AVM8	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CT - 3'	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CTC - 3'
2	AVM22	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CT - 3'	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CTT - 3'
3	AVM38	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C AG - 3'	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CAG - 3'
4	AVM62	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C ACG- 3'	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CA - 3'
5	AVM84	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C GT - 3'	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CAC - 3'
6	AVM87	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C GT - 3'	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CTC - 3'

Bảng 2. Các phân đoạn AFLP liên kết với một số tính trạng hình thái rễ.

TT	Phân đoạn AFLP[1]	NST[2]	Khoảng cách[3]	Kích thước[4]	Tính trạng liên kết
1	AVM8.1	2	10.0	200 - 300	tỷ lệ khối lượng rễ/thân
2	AVM22.7	1	5.0	200 - 300	số lượng rễ
3	AVM38.9	2	5.0	100 - 200	tỷ lệ khối lượng rễ sâu/thân
4	AVM62.5	9	0.0	100 - 200	độ dài rễ, tỷ lệ khối lượng rễ sâu/thân
5	AVM84.19	3	5.0	100 - 200	số lượng rễ
6	AVM87.13	4	9.5	100 - 200	đường kính rễ

Ghi chú: 1. Phân đoạn AFLP liên kết; 2. Nhiễm sắc thể chứa phân đoạn AFLP liên kết; 3. Khoảng cách di truyền tính bằng cM giữa chỉ thị AFLP và gen kiểm soát tính trạng trên bản đồ; 4. Độ dài tính bằng cặp base (bp) của phân đoạn AFLP dựa vào marker phân tử.

Phương pháp

Tách DNA genome: chúng tôi đã sử dụng phương pháp tách chiết DNA của Saghai Maroof và đồng tác giả (1984) để tách chiết DNA genome của các dòng lúa.

Thôi gel: các phân đoạn AFLP liên kết được cắt từ bản gel polyacrylamide và sử dụng phương pháp thôi gel của Sambrook và đồng tác giả (1989) để thu lại đoạn DNA cho các bước đọc trình tự.

Tách dòng và đọc trình tự: Sản phẩm thôi gel thu được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi AFLP và gắn trực tiếp vào vector pCR 2.1. Sau đó plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Các kỹ thuật dùng trong tách dòng gen đối với vật chủ là *E. coli* được tiến hành theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001). Để xác định những dòng khuẩn lạc mang đoạn biến nạp, plasmid thu được được cắt với enzyme *Eco*RI. Phản ứng cắt enzyme thực hiện với hỗn hợp phản ứng bao gồm: 11,8 ∝l nước cất, 3 ∝l dung dịch đệm, 0,2 ∝l enzyme, 15 ∝l plasmid, sau đó ủ ở 37°C trong 3 h. Sản phẩm cắt được kiểm tra trên gel agarose 1%.

Việc xác định trình tự của phân đoạn AFLP được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học. Trình tự nucleotid được xác định bằng sử dụng đoạn mồi đã gắn huỳnh quang của bộ hóa chất chuẩn xác định trình tự DNA. Sau đó sản phẩm được phân tích trên máy xác định trình tự DNA tự động (ABI 3100 - Avant Genetic Analyzer) với bộ Kit của hãng Applied Biosystems.

Thiết kế mồi STS: các cặp mồi STS thiết kế dựa trên trình tự của phân đoạn AFLP đã đọc được và phần mềm Gene Fisher Version 1.3.

PCR: Kỹ thuật PCR được thực hiện trên máy PCR PTC - 100 (MJ Research Inc, Mỹ). Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

- PCR nhân các đoạn AFLP: Phản ứng PCR với các cặp mồi AFLP được tiến hành theo phương pháp của Panaud và đồng tác giả (1996).

- PCR với các mồi STS: Phản ứng PCR với các mồi STS được tiến hành với 30 ∝l hỗn hợp trong đó có: 3 ∝l đệm 10x PCR, 1 ∝l $MgCl_2$ (50 mM), 2 ∝l dNTP (2,5 mM), 1 ∝l mồi mỗi loại, 0,5 ∝l *Taq*, 2 ∝l DNA.

Quá trình nhân đoạn gồm các bước sau: một chu kỳ 94°C trong 4 phút, 40 chu kỳ lặp lại các bước 94°C trong 1 phút, 54°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút, một chu kỳ 72°C trong 7 phút sau đó sản phẩm được giữ lạnh ở 4°C.

- PCR với các mồi STS đơn: Phản ứng PCR với các mồi STS được tiến hành với 25 ∝l hỗn hợp trong đó có: 2,5 ∝l đệm 10x PCR, 1 ∝l $MgCl_2$ (50 mM), 2 ∝l dNTP (2,5 mM), 2 ∝l mồi, 1 ∝l *Taq*, 3 ∝l DNA.

Quá trình nhân đoạn gồm các bước sau: một chu kỳ 94°C trong 4 phút, 45 chu kỳ lặp lại các bước 94°C trong 1 phút, 42°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút, một chu kỳ 72°C trong 7 phút sau đó sản phẩm được giữ lạnh ở 4°C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chỉ thị AFLP đã được sử dụng trong việc lập bản đồ nhiều gen quan trọng, các phân đoạn AFLP có thể được xác định vị trí trên bản đồ vật lý và di truyền của genome (Klein *et al.*, 2000; Zobrist *et al.*, 2000). Tuy nhiên, chỉ thị AFLP không được dùng nhiều trong xác định kiểu gen như đối với chỉ thị STS đặc biệt là trong phân tích tính trạng số lượng (QTL), định vị và chọn giống phân tử đòi hỏi các chỉ thị trình tự đặc trưng, dễ sử dụng. Vì vậy, việc phát triển các chỉ thị STS với một số lượng lớn đòi hỏi phòng thí nghiệm có quy mô có khả năng đọc được trình tự DNA (Germer *et al.*, 2000).

Một giải pháp đặt ra nhằm khắc phục những trở ngại này là phương pháp biến đổi các phân đoạn AFLP thành chỉ thị STS bằng sự kéo dài mồi (Meksem *et al.*, 1995) hoặc Bradeen và Simon (1998) sử dụng PCR ngược như một phương thức để biến đổi AFLP trội thành chỉ thị STS đồng trội.

Kết quả tách dòng các phân đoạn AFLP liên kết

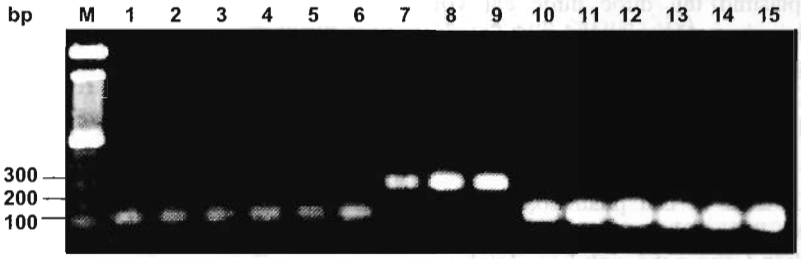
Thôi gel là phương pháp được sử dụng để thu lại DNA từ các bản gel. Hiện nay, trong các phương pháp có hai phương pháp được dùng chủ yếu là: thôi gel agarose và thôi gel polyacrylamide. Phương pháp thôi gel agarose thường được sử dụng để thu lại các đoạn DNA có kích thước trong khoảng 500 bp đến 5 kb. Đối với các đoạn DNA nhỏ hơn 500 bp phương pháp thôi gel thường được sử dụng là thôi gel polyacrylamide bởi hiệu quả công việc đạt được là cao hơn. Các phân đoạn AFLP liên kết được thôi từ gel polyacrylamide. Tuy nhiên, sản phẩm thôi gel thu

được có nồng độ thấp, chưa đáp ứng được yêu cầu nghiên cứu. Vì vậy, DNA thu được sau khi thôi gel được dùng làm khuôn nhân PCR lên số lượng lớn với các cặp mồi AFLP tương ứng để sản phẩm có nồng độ cao hơn có thể biến nạp một cách có hiệu quả.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ các mẫu DNA thôi gel trên gel agarose cho thấy các phân đoạn DNA sau khi thôi và nhân lại bằng PCR với cặp mồi AFLP tương ứng có độ dài như phân đoạn nhận được trên gel polyacrylamide và có số lượng cũng như chất lượng tốt đủ điều kiện để biến nạp.

Sản phẩm PCR sau khi nhân lên được gắn vào vector pCR2.1 TOPO, và được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α. Sau đó, tế bào biến nạp được cấy trải đều trên đĩa thạch LB có bổ sung Xgal, và kháng sinh Amp nồng độ 40 mg/l để chọn lọc những khuẩn lạc mang đoạn biến nạp. Trong môi trường chọn lọc xuất hiện những khuẩn lạc xanh và khuẩn lạc trắng. Những khuẩn lạc trắng ở trên đĩa thạch theo giả thiết là đã được gắn đoạn DNA quan tâm, được dùng để thu nhận plasmid. Để xác định những dòng khuẩn lạc mang đoạn biến nạp, dựa vào bản đồ vector pCR2.1 có hai điểm cắt của enzyme *Eco*RI nằm trong vùng cắt gắn đa vị ở hai đầu của sản phẩm PCR. Chúng tôi đã tiến hành xử lý các khuẩn lạc trên với enzyme *Eco*RI để cắt thành đoạn vector mạch thẳng và đoạn DNA ngoại lai.

Kết quả cắt enzyme cho thấy, plasmid sau khi cắt enzyme có một phân đoạn DNA có kích thước tương ứng với kích thước các đoạn DNA đã biến nạp, do vậy, chúng tôi khẳng định những khuẩn lạc trên đã mang đoạn DNA quan tâm. Các khuẩn lạc mang đoạn DNA quan tâm được nhân lên với số lượng lớn để tách plasmid phục vụ cho việc đọc trình tự.



Hình 1. Kết quả nhân PCR sản phẩm thôi gel. M: Marker 100 bp; 1 - 6. Kết quả nhân PCR sản phẩm thôi gel từ đoạn AVM87.13; 7 - 9. Kết quả nhân PCR sản phẩm thôi gel từ đoạn AVM22.7; 10 - 15. Kết quả nhân PCR sản phẩm thôi gel từ đoạn AVM62.5.

Kết quả đọc trình tự

Các phân đoạn AFLP sau khi đọc có trình tự:

Đoạn AVM8.1: 236 bp

GACTGCGTACCAGTTCCTTCCATTGGTCATCTTGT
NGATATAAACATGAATTGTAGATCATGAATCCACA
ATTCACTTGTATTTAGTAATAAAGAATCAAGTTTG
AAGCTTGACTAATTTTTCTGTTCCGNNGATTGTGA
ATGTNATTGATGTACTTACCTACCTGTGATTAGGA
TGATTCNNATCCTGGACAGCTCACATCAGCACAAT
TGGAGTTGANTTTGTAAGCAATATAT

Đoạn AVM22.7: 297 bp

GACTGCGTACCAATTCCTTTGTGTCACCATACATT
GTTGGCCAGAAGAATCCACTCTGCCAGATCTTTGC
GTGTGTTCTAAATGCTCCATAGTGACTTCCATATG
GGGCAACACGATACTTCTCAATGATCTCCATGCCT
TCATCTGCCGGAACGCATCTTCGTAGTAGACTGTC
TGAACAGACTCTGTACAGGTAAGGTGCATCCCACA
AGCGCTTGCGGCTCTCGTAGCTCAACCTCTTCTTA
TTTTCTCCCGGTGGTACATGCCACGCGACCATGAA
GTTACTCAGGACTCATC

Đoạn AVM38.9: 173 bp

GACTGCGTACCAATTCAGGAGAAGGAAATTTCTGC
CGAAGAATTGTCCGCAGAACATCTACGAATCAGTT
AGATCCTCTTCTCAGCTTAGCCGCCAAGTAGCTTT
CACACAATCTCCATGCATAAACATAATAGAAACAT
AGTAGAGGAACAGACTGTTACTCAGGACTCATC

Đoạn AVM62.5: 185 bp

GATGAGTCCTGAGTAACAGAGTGGAGAAATAAGAA
CATAATCTATTTCTAGAGCTCGTCCTCCCAATCGA
GCCATGGAAGACATGCTCCATCTATTGTGAGAGGG
GACGGCATGGAGTAGATGGATGACATGCTCCTCCT
CTCATCTCTGATCCACCATGAAAGAGCGTGAATTG
GTACGCAGTC

Đoạn AVM84.19: 112 bp

GACTGCGTACCAATTCGTGTTCTAGGGGTTCATGA
TGTGTGTTGGATCCAAACATGAACTGTTGTTTGTA
ATGTGGTGACTTTCGTGTCGTTTGTGTTACTCAGG
ACTCATC

Đoạn AVM87.13: 141 bp

GATGAGTCCTGAGTAACTCACCATGAACATATATA
TAAAAGTTTTATTTACAAATTATATTTTGATCGCT
AATAAGCACTAGAGCTTATAATCAGTTATATGTGA
AATGATGGGATTGTTAGCACGAATTGGTACGCAGT
C

Thiết kế mồi STS và nhân các vùng QTLs

Từ trình tự thu được ở trên và dựa trên phần mềm GeneFisher1.3 (http://bibiserv.techfak.uni-bielefel.../) chúng tôi thiết kế các cặp mồi STS có trình tự như trong bảng 3.

Tiến hành PCR với các cặp mồi thiết kế được ở trên nhằm tìm điều kiện nhân PCR thích hợp. Kết quả bước đầu cho thấy, với nhiệt độ bắt cặp là 54°C đã nhận được đoạn DNA có kích thước (khoảng 200 bp) tương đương với đoạn AVM62.5 phân lập được ở tất cả các mẫu. Ở nhiệt độ bắt cặp là 53°C nhận được đoạn DNA có kích thước (gần 300 bp) tương đương với đoạn AVM22.7 đã phân lập được ở tất cả các mẫu. Ở nhiệt độ bắt cặp là 60°C nhận được đoạn DNA có kích thước (hơn 100 bp) tương đương với đoạn AVM87.13 đã phân lập được ở tất cả các mẫu.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả điện di thu được một phân đoạn DNA duy nhất cho thấy không có sự sai khác giữa các dòng cây vì vậy chưa có ý nghĩa trong chọn giống.

Kết quả này tương tự kết quả mà tác giả Lê Thị Bích Thủy (2002) thu được với các mồi G20 và RG143 đều cho những phân đoạn DNA giống hệt nhau ở cả hai cây bố và mẹ. Điều này cũng phù hợp với nhận xét của Inoue và đồng tác giả (1994) từ thông tin trình tự của các STS có thể phân lập được các gen đặc trưng. STS là một đoạn ngắn trong trình tự genome, một mồi cho một phân đoạn DNA đơn. STS dựa trên PCR có ưu điểm tạo ra một mẫu đơn giản có thể biểu hiện trên gel agarose, được đọc dễ dàng và là chỉ thị đồng trội ở hầu hết các trường hợp (Robeniol *et al.*, 1996). Lizuka và đồng tác giả (1992) cho rằng mặc dù khả năng khám phá DNA 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 enzyme hạn chế.

Chúng tôi đã cắt enzyme sản phẩm PCR để tạo sự đa hình. Tuy nhiên, do kích thước của phân đoạn AFLP trong nghiên cứu của chúng tôi quá nhỏ nên việc cắt bằng enzyme không có kết quả. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nhân PCR với các mồi đơn của cặp mồi STS. Với mồi STSAVM62, kết quả điện di sản phẩm PCR chúng tôi nhận được khi nhân với mồi xuôi không cho sự đa hình. Khi nhân với mồi mồi ngược ở nhiệt độ bắt cặp là 42°C, chúng tôi nhận thấy ngoài các phân đoạn DNA phụ có kích thước nhỏ không có sự sai khác thì phân đoạn DNA 1000 bp đã cho sự khác nhau giữa các dòng.

Kết quả cho thấy, các dòng 31, 36, 64, 69, 70, 74, 75, 94, 126 có một phân đoạn DNA xấp xỉ 1000 bp giống với cây mẹ (p1 - RDB09 - *Japonica*) được xác định là có rễ dài như vậy cây này có thể có tính chịu hạn tốt. Các dòng 39, 57, 68, 123, 127 không có phân đoạn DNA xấp xỉ 1000 bp giống với cây bố (p2 - 2021 – *Indica*) được xác định là có rễ ngắn hơn, các cây này có thể có tính chịu hạn kém hơn. Tuy nhiên, kết quả này cần được kiểm định trên đồng ruộng để có thể khẳng định mối liên quan giữa các chỉ thị này với khả năng chịu hạn thực tế của các dòng.

Bảng 3. Trình tự mồi STS thiết kế dựa trên trình tự phân đoạn AFLP đã đọc được.

Tên mồi	Trình tự mồi xuôi	Trình tự mồi ngược
STSAVM8	5'- CTG ATG TGA GCT GTC CA - 3'	5'- CGT ACC AGT TCC TTC CA- 3'
STSAVM22	5'- GCG TAC CAA TTC CTT TGT G - 3'	5'- GAG TCC TGA GTA ACT TCA TG - 3'
STSAVM38	5'- GCA TGG AGA TTG TGT GA - 3'	5'- CTG CGT ACC AAT TCA GGA - 3'
STSAVM62	5'- TTC ACG CTC TTT CAT GG - 3'	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA G - 3'
STSAVM84	5'- GCG TAC CAA TTC GTG - 3'	5'- CAC AAA CGA CAC GAA - 3'
STSAVM87	5'- GCG TAC CAA TTC GTG CTA - 3'	5'- GTC CTG AGT AAC TCA CCA - 3'

Kiểm tra tính ổn định của mồi STS

Để phát triển một chỉ thị có thể sử dụng được trong chọn giống các chỉ thị phải có sự lặp lại cao giữa các lần thí nghiệm khác nhau, không chịu sự ảnh hưởng của điều kiện PCR. Một chỉ thị dùng trong chọn giống cũng phải có tính ổn định cao trong quần thể qua các thế hệ, đảm bảo nó tồn tại ổn định trong hệ gen của cây qua nhiều thế hệ khác nhau. Để kiểm tra tính ổn định của cặp mồi chúng tôi đã tiến hành PCR trên hai quần thể là quần thể F6 và quần thể F9. Kết quả cho thấy, ở các mẫu trong hai quần thể đều thu được phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1000 bp, điều này cho thấy cặp mồi có tính ổn định cao. Kết quả này cũng cho thấy QTLs cho độ dài rễ và tỷ lệ khối lượng khô của rễ sâu/thân đã di truyền ổn định qua các thế hệ.

Kết quả cho thấy, ở dòng 69 và dòng 123 có sự sai khác giữa hai thế hệ, dòng 69 ở thế hệ F6 giống cây bố không có phân đoạn DNA 1000 bp nhưng ở F9 lại xuất hiện phân đoạn DNA 1000 bp giống mẹ. Ngược lại dòng 123 ở thế hệ F6 có một phân đoạn DNA 1000 bp giống mẹ nhưng ở F9 phân đoạn DNA đó lại mất đi. Tuy nhiên, tỷ lệ sai khác này là khá nhỏ, ở các dòng còn lại có độ ổn định cao. Như vậy, sự nhân đoạn DNA với mồi STS đơn có sự ổn định cao có thể sử dụng chỉ thị này trong chọn giống lúa chịu hạn sau khi có những đánh giá thêm về mối liên quan giữa chỉ thị và khả năng chịu hạn thực tế của các dòng này.

KẾT LUẬN

Đã phân lập và đọc trình tự sáu phân đoạn AFLP (AVM8.1, AVM22.7, AVM38.9, AVM84.19 và AVM87.13) liên kết với một số tính trạng hình thái rễ liên quan đến tính chịu hạn và đã thiết kế được sáu cặp mồi STS tương ứng.

Bước đầu thử nghiệm đã tìm được các điều kiện PCR thích hợp cho một số cặp mồi STS: STSAVM62, STSAVM22 và STSAVM87 với nhiệt độ bắt cặp là 54°C, 53°C và 60°C, chúng tôi đã nhận được các phân đoạn DNA có kích thước tương đương với các phân đoạn AFLP ban đầu ở tất cả các dòng.

Để tạo ra sự đa hình cần thiết giữa các dòng, chúng tôi đã tiến hành nhân PCR với các mồi STS đơn. Kết quả bước đầu khi nhân PCR với mồi STSAVM62 ngược chúng tôi đã nhận được phân đoạn DNA đa hình giữa các dòng ở vị trí 1000 bp.

Sản phẩm nhân PCR với mồi STSAVM62 ngược có tính ổn định cao giữa các lần thí nghiệm và trong quần thể qua các thế hệ. Có thể sử dụng phân đoạn DNA này như một chỉ thị trong chọn dòng chịu hạn sau khi có những đánh giá thêm về mối liên hệ giữa chỉ thị và khả năng chịu hạn của các dòng.

Lời cảm ơn: *Công trình được hoàn thành do sự tài trợ từ nguồn kinh phí cho đề tài cấp cơ sở của Viện Công nghệ sinh học. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học đã hỗ trợ cho việc đọc trình tự DNA.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Thị Bích Thủy (2002) Phát triển và ứng dụng chỉ thị phân tử STS trong chọn tạo giống lúa chịu hạn. *Luận án Thạc sỹ sinh học.* Viện Sinh Thái và Tài nguyên sinh vật.

Bradeen JM, Simon PW (1998) Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple codominant PCR-based marker form. *Theor Appl Genet* 97: 960-967.

Germer S, Holland MJ, Higuchi R (2000) High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res* 10: 258-266.

Hernandez P, Hemmat M, Weeden NF, Dorado G, Martin A (1999) Development and characterization of *Hordeum chilense* chromosome-specific STS marker suitable for wheat introgression and marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 98: 721-727.

Inoue T, Zhong HS, Miyao A, Ashikawa I, Monna L, Fukuoka S, Miyadera N, Nagamura Y, Kurata N, Sasaki T, Minobe Y (1994) Sequence-tagged sited (STSs) as standard landmarkers in the rice genome. *Theor Appl Genet* 89: 728-734.

Klein PE, Klein RR, Cartinhour SW, Ulanch PE, Dong J, Obert JA, Morishige DT, Schlueter SD, Childs KL, Ale M, Mullet JE (2000) A high-throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Res* 10: 789-807.

Komatsuda T, Nakamura I, Takaiwa F, Oka S (1998) Development of STS markers closely linked to the *vrs1* locus in barley, *Hordeum vulgare*. *Genome* 41: 680-685.

Lizuka M, Mashiyama S, Sekiya T, Hiyashi K (1992) Cloning and polymerase chain reaction single strand confirmation analysis of anonymous *Alu* repeats on chromosome 11. *Genomics* 12: 139.

Meksem K, Leister D, Peleman J, Zabeau M, Salamini F, Gebhardt C (1995) A high-resolution map of the vicinity

of the *Rl* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol Gen Genet* 249: 74-81.

Meksem K, Ruben E, Hyten D, Triwitaykorn K, Lightfoot DA (2001) Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol Genet Genomics* 265: 207-214.

Panaud O, Chen X, McCouch SR (1996) Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet* 252: 597-605.

Robeniol JA, Constantino SV, Resurrection AP, Villareal CP, Ghareyazie B, Lu BR, Katyar SK, Menguito CA, Angeles ER, Fu HY, Reddy S, Park W, McCouch SR, Khush GS, Bennett J (1996) Sequence-tagged sites and low-cost DNA markers for rice. *Rice Genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium*, 16-20 Oct, 1996. Manila.

Saghai-Maroof A, Biyashew RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RQ (1984) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in baley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466-5470.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Thanh ND, Lien NTK, Chung PQ, Hanh NT, Trong TQ, Hai DX, Henry T Nguyen (2004) Mapping QTLs associated with root traits related to drought resistance in Vietnamese upland rice. *Resilient Crops for Water Limited Environments Proceedings of a Workshop* Held at Cuernavaca Mexico, 24 - 28 May, 2004. 234-236.

Tragoonrung S, Kanazin V, Hayes PM, Blake TK (1992) Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor Appl Genet* 84: 1002-1008.

Zobrist K, Meksem K, Wu C, Tao Q, Zhang H, Lightfoot DA (2000) Intergrated physical mapping of the soybean genome: a tool for rapid identification of economically important genes. *Soybean Genet Newslett* 27: 10-15.

DEVELOPMENT OF STS MARKERS BASED ON AFLP FRAGMENTS LINKED TO THE ROOT TRAITS FOR BREEDING DROUGHT RESISTANCE RICE LINES

Nguyen Thi Kim Lien*, Nguyen Thuy Hanh, Tran Quoc Trong, Pham Quang Chung, Nguyen Duc Thanh

Institute of Biotechnology

SUMMARY

MAS is the mordern breeding used commonly nowaday. MAS based on estimating exactly sites of genes on the map and the tightly relationships between the markers and the interested genes to estimate genotype of individuals in population. Molecular markers such as RAPD, AFLP, RFLP have been used for mapping but they cannot be directly used in breeding. These markers, they must be developped to STS markers so that they can be used for MAS. To apply MAS need a lots of easy and typical STS markers linked to genes controlling interested traits. Following the results on the QTLs mapping by AFLP markers for some root traits related to drought resistance, we have developped STS markers from AFLP fragments for the use in MAS. We have cloned and sequenced six AFLP fragments linked to root number, root thickness, root length, root weight to shoot ratio and deep root weight to shoot ratio. From these sequences we designed six pairs of STS primers. We found out the PCR conditions for STSAVM62, STSAVM22, STSAVM87 primers with respective annealing temperature 54^{0}C, 53^{0}C and 60^{0}C. However, the PCR products were not polymorphic. To create the polymorphism between lines, we attemped to use a single STS primer. As the results when amplified forward primer of STSAVM62, the polymorphic band of 1000bp was obtained. This band, proved to be stable in the population and inherited through progenies so it can be used in breeding of drought resistance rice lines.

Keywords: *AFLP, drought resistance, MAS, rice, STS*

* *Author for correspondence:* Tel: *84-4-38363470;* Fax: *84-4-38363144;* E-mail: *nguyenkimlien2001@yahoo.com*