

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ CHỌN LỌC CÁ THỂ MANG LOCUS GEN SUB1 Ở QUẦN THỂ BC₂F₁ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA BẮC THƠM 7 CHỊU NGẬP

Tạ Hồng Lĩnh, Lê Hùng Lĩnh, Trần Đăng Khánh,
Lê Thị Thu, Nguyễn Văn Luận, Lê Huy Hàm

SUMMARY

Using molecular markers to select plants carrying Sub1 in BC₂F₁ population for improving Bac Thom 7 tolerance of submergence

Vietnam is one of the most vulnerable countries to climate change in Asia. Rice is a principle food in Vietnam and plays an important role as an economic activity in this country. Rice yield in the Red River Delta can be significantly reduced by climate change. Sea level rise and flash flooding occur at various degrees which cause directly adverse effects to hundreds ha of growing rice. To improve rice tolerance with submergence is a vital work to minimize the risks from climate change. Successful application of MABC methods to select a line namely No 19 in BC₂F₁ populations which have genetic background up to 89,8%. The submergence tolerance rice line should be developed in the frequent flooding areas in the Red River Delta to cope with climate change.

Keywords: Bac Thom 7 (BT7), Marker-assisted backcrossing (MABC); submergence tolerance.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa là cây trồng quan trọng nhất ở Việt Nam đồng thời cũng là nguồn thức ăn chính cho hơn một nửa dân số thế giới. Việt Nam là nước xuất khẩu gạo đứng thứ 2 trên thế giới sau Thái Lan, chiếm khoảng 50% tổng sản lượng gạo thương mại trên thế giới. Lúa gạo là nguồn thu ngoại tệ lớn nhất của nền nông nghiệp xuất khẩu Việt Nam và cũng là nguồn thức ăn chính của gần 90 triệu dân số trong nước. Đồng bằng sông Hồng có sản lượng gạo chiếm 17% sản lượng gạo trong toàn quốc. Sản lượng gạo Việt Nam có thể giảm đáng kể do biến đổi khí hậu gây ngập lụt. Do đó, đáp ứng sản lượng lúa ở vùng đồng bằng sông Hồng thông qua công tác chọn tạo giống lúa có khả năng chịu ngập, năng suất cao là hết sức cần thiết và có ý nghĩa cho an toàn lương thực và tăng thu nhập của nông dân tại vùng chịu ảnh hưởng của biến đổi khí hậu.

Phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC) đã được ứng

dụng thành công tại Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI) trong việc quy tụ QTL/gen chịu ngập vào một số giống lúa hiện đang trồng phổ biến ở các nước Nam và Đông Nam châu Á. Phương pháp MABC thiết thực, hiệu quả trong việc quy tụ locus gen quy định tính trạng di truyền số lượng (QTL) hay gen vào giống mới cho phép rút ngắn quá trình chọn lọc. Việc ứng dụng chỉ thị phân tử kết hợp lai trở lại từ 2 đến 3 thế hệ có thể thu được cá thể với nền di truyền của giống mẹ và mang gen chuyển. Các dòng này cho tự thụ, thu hạt để tiến hành thử nghiệm trên đồng ruộng. Từ những thành công trên cho thấy việc ứng dụng chỉ thị phân tử xác định cá thể mang QTL/gen *Sub1* trong chọn tạo giống lúa Bắc thơm 7 chịu ngập là hết sức cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- IR64-*Sub1*: Giống lúa thuần được nhập nội từ IRRI mang locus gen *Sub1* chịu ngập được dùng là dòng bố.

- Bắc thơm 7 là giống lúa được sử dụng làm giống mẹ nhận locus gen *Sub1* chịu ngập. Bắc thơm 7 hiện là giống lúa đang được trồng khá phổ biến tại một số tỉnh đồng bằng sông Hồng có năng suất cao, chất lượng gạo khá.

- Các chỉ thị phân tử SSR tại vị trí vùng locus gen và trên 12 nhiễm sắc thể.

- 6 cá thể thế hệ F₁ (BT7/IR64-*Sub1*) được xác định và chọn lọc bằng 2 chỉ thị phân tử ART5 và RM25181.

- 18 cá thể thế hệ BC₁F₁ (BT7/IR64-*Sub1*) mang locus gen *Sub1* đã được sàng lọc thông qua 2 chỉ thị phân tử SC3 và ART5.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp chọn giống bằng chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC - Marker Assisted Backcrossing).

- Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý thông kê trên máy tính thông qua chương trình EXCEL2007, Graphical genotypes 2.0 (GGT2.0) và các phương pháp phân tích thống kê khác.

- Một số kỹ thuật trong phòng thí nghiệm (Kỹ thuật tách chiết và tinh sạch ADN, Phương pháp PCR với mồi SSR, Kỹ thuật phân tích kết quả trên gel polyacrylamide...).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Xác định chỉ thị phân tử đa hình tại vị trí vùng locus gen *Sub1* giữa giống lúa BT7 và IR64-*Sub1*

Sub1 là locus gen chịu ngập đã được lập bản đồ chi tiết trên nhiễm sắc thể 9 bằng quần thể F₂ gồm 4022 cá thể với khoảng cách 0,075 cM (Xu et al. 2006). Dựa vào kết quả lập bản đồ chi tiết locus gen *Sub1*, các chỉ thị phân tử liên kết với locus gen *Sub1* đã được sử dụng. Trong nghiên cứu này, 24 chỉ thị phân tử trên NST9 đã được khảo sát nhằm xác định chỉ thị phân tử đa hình giữa giống lúa Bắc thơm 7 và IR64-*Sub1*. Kết quả khảo sát đã xác định được 11 chỉ thị cho kết quả đa hình giữa giống Bắc thơm 7 và IR64-*Sub1* trong đó có 5 chỉ thị liên kết với vùng QTL/gen *Sub1* với các thông tin chi tiết được thể hiện ở bảng 1.

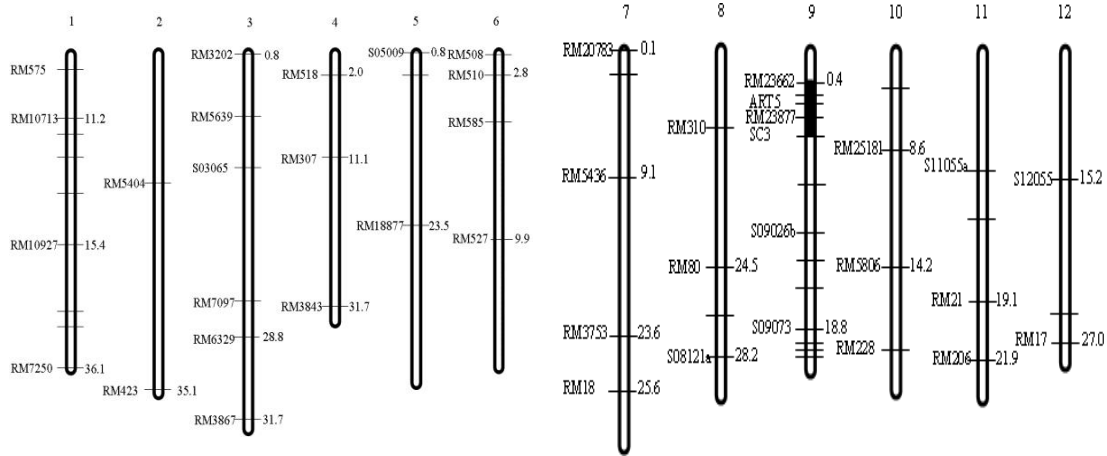
Bảng 1. Danh sách chỉ thị cho kết quả đa hình tại vị trí vùng QTL/gen *Sub1* trên NST9 giữa Bắc thơm 7 và IR64-*Sub1*

TT	Tên chỉ thị	Vị trí (Mb)	Trình tự xuôi/ngược	Độ dài đoạn nhân (bp)	Nhiệt độ gắn mồi (°C)
1	RM23662	0,4	GAGAGGACGATGGCACTATTGG CGAGGAACTTGATTCGCATGG	149	60
2	RM5688	1,7	GCAGTGTCCAACCATCTGTG ATCTGGTCACCCTTTGCTTG	150	55
3	ART5	2,6	CAGGGAAAGAGATGGTGGA TTGGCCCTAGTTGTTTCAG	124	55
4	SC3	6,8	GCTAGTGCAGGGTTGACACA CTCTGGCCGTTTCATGGTAT	217	55
5	RM23877	6,3	TGCCACATGTTGAGAGTGATGC TACGCAAGCCATGACAATTTCG	327	60

2. Xác định chỉ thị phân tử đa hình trên 12 nhiễm sắc thể giữa giống lúa BT7 và IR64-Sub1 phục vụ chọn lọc nền di truyền

Để xác định chỉ thị phân tử đa hình trên 12 nhiễm sắc thể phục vụ chọn lọc nền di

truyền, 378 chỉ thị phân tử được sử dụng khảo sát đa hình giữa giống lúa Bắc thom 7 và IR64-Sub1. Kết quả khảo sát xác định được 58 chỉ thị phân tử cho đa hình giữa IR64-Sub1 và BT7. Các chỉ thị đa hình và vị trí được thể hiện ở bản đồ hình 1.



Hình 1: Bản đồ các chỉ thị phân tử đa hình giữa giống BT7 và IR64-Sub1 trên 12 NST

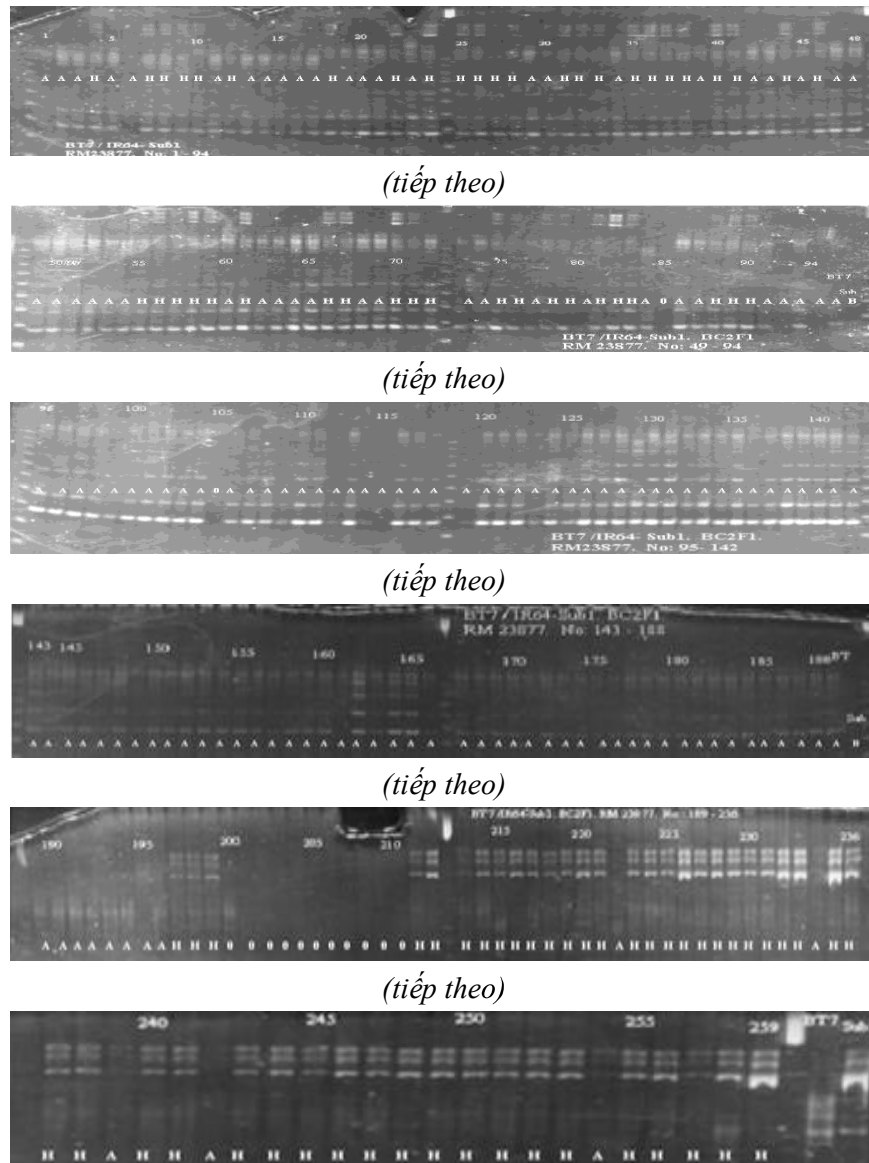
Ghi chú: Số các NST được biểu thị bằng số ở phía trên NST. Chỉ thị phân tử SSR đa hình ở phía bên trái các NST, tương ứng vị trí chỉ thị phân tử ghi bên phải NST. Vùng đen biểu thị vị trí QTL/gen Sub1. Vị trí và thứ tự chỉ thị phân tử được xây dựng dựa trên bản đồ Nipponbare (TIGR v. 3 pseudomolecules available at www.gramene.org and at sliver.plbr.cornell.edu/SSR).

3. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn lọc cá thể Bắc thom 7 mang QTL/gen Sub1 trong quần thể BC₂F₁

Quần thể BC₂F₁ sử dụng trong nghiên cứu được xây dựng từ tổ hợp lai trở lại (Backcross) giữa cá thể BC₁F₁-Sub1 và giống lúa BT7. Cá thể BC₁F₁-Sub1 đã được xác định mang locus gen Sub1 chịu ngập bằng hai chỉ thị phân tử SSR liên kết chặt với Sub1 là: ART5 và SC3.

Trong thí nghiệm này, cá thể BC₂F₁ đã được kiểm tra xác định mang locus gen Sub1 bằng hai chỉ thị phân tử ART5 và RM23877.

Kết quả đã xác định được 57 cá thể mang locus gen Sub1 bằng chỉ thị phân tử ART5 (hình 2) từ 235 cá thể BC₂F₁. Các cá thể mang locus gen Sub1 ký hiệu số 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 44, 46, 47, 48, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 70, 71, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 83, 88, 89, 90, 106, 107, 109, 110, 111, 114, 115, 117, 118. Trên hình 2 là kết quả kiểm tra di truyền các cá thể BC₂F₁, ký hiệu A là di truyền của giống lúa Bắc thom 7; B là di truyền của giống lúa IR64-Sub1 với chỉ thị phân tử ART5 và H là dị hợp tử.



Hình 3: Kết quả chạy điện di trên 259 cá thể BC₂F₁ (sử dụng chỉ thị phân tử RM23877)

BT: Bắc thom 7, Sub1: IR64-Sub1; 1-259: Các cá thể lai BC₂F₁;
A: Bắc thom 7, B:IR64-Sub1, H: Dị hợp tử, O: không có kết quả

Như vậy việc sử dụng 2 chỉ thị phân tử ART5 và RM23877 đã xác định được 42 cá thể mang QTL/gen *Sub1* phục vụ việc chọn lọc nền di truyền BC₂F₁ được ký hiệu: 4, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 44, 46, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 70, 71, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 83, 88, 89, 90.

Chọn lọc nền di truyền giống BT7 các cá thể trong quần thể lai BC₂F₁.

Để chọn lọc những cá thể mang nền di truyền giống nhận gen cao nhất, 53 chỉ thị phân tử đa hình giữa BT7 và IR64-Sub1 trên cả 12 NST được sử dụng để sàng lọc. Kết quả đã xác định được 8 cá thể có nền di

2. Đề nghị

Cần tiếp tục nghiên cứu phát triển cá thể đã chọn tạo được trong thí nghiệm ở các thế hệ tiếp theo (BC₃F₁, BC₄F₁...) đồng thời tiến hành đánh giá kiểu gen, kiểu hình của các cá thể để tạo giống mang locus gen *Sub1* nhưng vẫn giữ được nền di truyền hoàn toàn giống Bắc thơm 7.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Collard BCY, K.I., MJ Thomson, A Pamplona & DJ Mackill., (2008), “*An electronic manual on marker assisted backcrossing in rice*”, Theory and applications 1st edition.
2. Dongsu Choi (2011), “*Molecular Events Underlying Coordinated Hormone Action in Submergence Escape Response of Deepwater Rice*”, Journal Plant Biology.
3. Frisch Matthias and Albrecht E. Melchinger.(2005), “*Selection Theory for Marker-Assisted Backcrossing*”, Genetics Society of America.
4. Neeraja, C.N., Maghirang-Rodriguez, R., Pamplona, A., Heuer, S., Collard, B.C.Y., Septiningsih, E.M., Vergara, G., Sanchez, D., Ismail, A.M., Mackill, D.J (2007), “*A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars*”, Theor. Appl. Genet (115), pp 767-776.
5. Nguyen Thi Lang, Nguyen Van Tao, Bui Chi Buu, (2011), “*Marker-assisted Backcrossing for rice submergence tolerance in Mekong Delta*”, Omonrice 18:11-21.

Ngày nhận bài: 6/2/2012

Người phân biên: PGS. TS. Nguyễn Văn Viêt,
ngày 8/2/2012

Ngày duyệt đăng: 20/3/2012

TẠO MÔ SẸO VÀ TÁI SINH CÂY *IN VITRO* TỪ PHÔI NON MỘT SỐ GIỐNG LÚA *INDICA*

Nguyễn Văn Khiêm, Nguyễn Văn Cửu,
Phạm Hồng Quân, Phùng Thị Phương Nhung,
Vũ Thu Hằng, Lưu Thị Mỹ Dung, Đỗ Năng Vịnh

SUMMARY

In vitro plant regeneration from immature embryos of indica rice cultivars

In this study, immature embryos of 18 *indica* rice cultivars growing in Vietnam such as Khang Dan 18, Huong Xuyen 5, DT36, DT37, DT42, Phieu Huong 1, QR1, Xi-23, IR64, Bac Thom 7, Bac Thom 8, VS1, Lua Thom LT1, Lua Thom LT2, Lua Thom LT10, Tieu Huong 138, Khang Dan dot bien and IR56 were used for callus induction and plant regeneration. It took about 6 weeks to obtain whole regeneration plants that could be transferred to the greenhouse. Callus induction and plant regeneration were carried out on MS (1962) medium containing phytohormones. After 2 weeks of culture, 52.0-72.67% seeds induced embryogenic callus (depending on cultivars). The plant regeneration frequency ranged 10.0-37.14% (depending on cultivars). Frequencies of callus induction and plant regeneration derived from immature embryos depending on immature age and rice cultivars. Survival plant frequency was more than 95% in the greenhouse after 4 weeks. All regenerated plants were fertile and set seeds. There were no morphological variations observed.

Keywords: Embryogenic callus, immature embryos, plant regeneration, *indica*.