

Ngày nhận bài: 28/3/2014

ngày 8/4/2014

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý, Ngày duyệt đăng: 18/6/2014

SÀNG LỌC GEN CHỐNG CHỊU MẶN TRÊN BỘ LÚA NGẮN NGÀY Ở GIAI ĐOẠN MẠ

Nguyễn Thị Lang, Bùi Phước Tâm,
Phạm Thị Chúc Loan, Nguyễn Trọng Phước,
Trần Bảo Toàn, Bùi Chí Bửu,
Abdelbagi M. Ismail, Glenn Gregorio,
Russell Reinke, Reiner Wassmann

SUMMARY

Screening gene tolerant to salinity on the short-term rice in the seedlings stage

Screening 92 high-yielding rice varieties in Cuu Long Delta Rice Research Institute have inbred to evaluate the response level tolerant to salinity with three different concentrations of salt EC=0 dS/m, 8 dS/m, 15 dS/m can be divided into 3 distinct groups: group of saline tolerant varieties, slightly susceptible varieties and susceptible varieties.

The ability to react to salt of varieties is significant difference. However, in view of the growth of the varieties showed: the higher salt concentrations is, the lower survival day is, the percentage of height reduction, the more root length increased, the more dry weight of stems and roots decreased. The indices also closely positive correlated each other. These suggest that the saline conditions greatly affect the survival, growth and development of rice.

The varieties are proposed including: Pokkali, OM6677, OM10252, OM6707, OM5629, OM6379, OM5239, OM6832, OM819 DB-1, OM5953, OM819 DB-11, OM5886,... the varieties also tested with molecular markers RM223 and RMSal 1 were recorded with the linkage between genotype and phenotype. The varieties can be tested in may salinity areas be limited from salinity concentration 2-4 ‰.

Keywords: Salt, seedling stage, tolerance.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự thay đổi khí quyển với hiệu ứng nhà kính, nhiệt độ khí quyển ấm dần lên, băng tan ở hai cực sẽ tạo sự ngập lụt ở những vùng đất thấp. Nước biển xâm nhập vào đất liền ngày càng nhanh, việc sản xuất lúa tại đồng bằng sông Cửu Long cũng gặp không ít khó khăn ảnh hưởng đến nền sản xuất lúa, gạo hàng hóa ở Việt Nam cũng như các nước khác trên thế giới.

Nghiên cứu phát triển giống cây trồng chống chịu mặn đã được đặt lên hàng đầu trong các dự án quốc tế về công nghệ di truyền. Với sự tiên bộ của công nghệ sinh học người ta có thể sử dụng chỉ thị (marker) phân tử trong chọn giống. Dựa vào marker phân tử liên kết với gen kháng mặn, người chọn giống có thể xác định được kiểu gen kháng và nhiễm ở ngay từ giai đoạn đầu.

Chiến lược tạo chọn giống chống chịu mặn và canh tác mùa vụ thích hợp xem như là cách làm kinh tế và có hiệu quả nhất để gia tăng sản lượng thóc ở vùng bị nhiễm mặn (Bùi Chí Bửu *et al*, 1995).

Do đó, đề tài “*Ứng dụng chỉ thị phân tử để đánh dấu gen chống chịu mặn của cây lúa (Oryza sativa L.)*” nhằm mục đích sàng lọc được các giống lúa chống chịu mặn trong điều kiện đất trồng bị nhiễm mặn. Qua đó, nguồn gen từ các giống lúa cao sản có triển vọng được đề xuất trong công tác chọn tạo giống mới,

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Gồm 92 giống lúa cao sản, từ ngân hàng gen của Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long. Giống chuẩn kháng Pokkali. Giống chuẩn nhiễm IR29.

2. Phương pháp nghiên cứu

Thanh lọc mặn theo Gregorio 1997. Phương pháp cải tiến (Nguyễn Thị Lang và ctv, 2001).

Phương pháp ly trích DNA và chạy PCR theo Lang 2002.

Chuỗi mã trình tự primers theo Trường Cornel của Hòa Kỳ. Chuỗi trình tự của RM223 như sau:

F 5'-GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC-3'
và R 5'-GAAGGCAAGTCTTGGCACTG-3': RM3252-S-1-1 có chuỗi mã trình tự:
F-5' GGTAACCTTTGTTCCCATGCC-3'
và R-5' GGTCAATCATGCATGCAAGC -3'

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thanh lọc mặn (đo lường kiểu hình) giai đoạn mạ

Dùng 92 giống lúa cao sản, ngăn ngày để đánh giá tính chống chịu với điều kiện bất lợi (mặn).

Tính trạng đơn gen rất dễ đo đếm và quan sát, nhưng không phải trong mọi trường hợp. Kiểu hình là kết quả của ảnh hưởng giữa kiểu gen và môi trường. Do đó, điều quan trọng là phải đo đếm một cách chính xác kiểu hình. Người ta sử dụng một quần thể trong đó cho phép kiểu hình được lặp lại, điều này có lợi là làm tăng độ chính xác khi đo đếm, đặc biệt đối với những tính trạng mẫn cảm với sự thay đổi do môi trường. Bất kỳ trường hợp nào, việc phân tích kiểu hình phải là công việc được đầu tư nhiều nhất (Nguyễn Thị Lang và ctv, 2006).

Số ngày sống sót: Ngày sống sót của cây mạ được tính dựa trên cơ sở sau khi thanh lọc 30 ngày cây mạ còn sống sót sẽ

được ghi nhận và đánh giá số ngày sống sót từ khi cây bắt đầu khô lá.

Phân tích ngày sống sót của các giống sau khi thanh lọc mặn với nồng độ 8dS/m và 15dS/m cho thấy ngày sống sót của các giống khác nhau có ý nghĩa thống kê mức 99% (**). Độ biến động giữa 3 lần lặp lại có ý nghĩa ở môi trường 8dS/m là 2,59 và ở môi trường 15dS/m là 4,37.

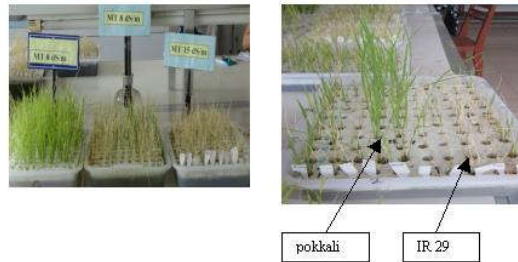
Qua kết quả thanh lọc của 92 giống lúa cao sản có sự khác nhau rõ rệt về thời gian sống sót ở môi trường 8dS/m và 15dS/m. Thời gian sống sót cao nhất ở môi trường 8dS/m là 29,5 ngày còn ở môi trường 15dS/m là 28,8 ngày. Thời gian sống sót thấp nhất ở môi trường 8dS/m là 22,1 ngày và ở môi trường 15dS/m là 21 ngày.

Ở môi trường 0dS/m tất cả các giống sống sót qua 30 ngày thanh lọc. Còn ở môi trường 8dS/m và 15dS/m có sự khác biệt về thời gian sống sót.

Môi trường 8dS/m thời gian sống sót 21-23 ngày có 9 giống, 23-25 ngày có 24 giống, 25-27 ngày có 38 giống, 27-29 ngày có 19 giống, 29-30 ngày có 1 giống.

Môi trường 15dS/m thời gian sống sót từ 21-23 ngày có 24 giống, 23-25 ngày có 33 giống, 25-27 ngày 22 giống, 27-29 ngày 13 giống.

Nhìn chung, các giống sống sót ở môi trường 0 dS/m nhiều hơn ở 8 dS/m, và ở 15 dS/m các giống chết hầu hết khi qua 30 ngày thanh lọc mặn trong môi trường dinh dưỡng.



Hình 1: Kết quả thanh lọc mặn ở các nồng độ 0dS/m, 8dS/m và 15dS/m

Môi trường mặn làm cho cây lúa sinh trưởng và phát triển không bình thường, những cá thể lúa chịu ảnh hưởng của stress mặn biểu hiện tình trạng cháy đầu lá, thân rễ kém phát triển hơn bình thường, nếu nhiễm nặng hơn có thể làm cây lúa bị vàng úa, thậm chí cháy khô và chết (Gregorio và ctv 2002).

Ở môi trường mặn 8 dS/m, qua 30 ngày thanh lọc có rất nhiều cây lúa bị cháy khô, phần xanh của cây chỉ còn lại <30%, thậm chí nhiều giống bị chết 100%. Đa số các giống qua 30 ngày thanh lọc trong môi trường mặn đều biểu hiện cấp độ khô lá ở cấp 9 (68 giống, chiếm tỷ lệ 73,91%). Có 21 giống ở cấp khô lá cấp 7 (OM10252, OM6707, OM4900, OM5629, MNR 1,...). Đặc biệt giống OM6832, OM6677 biểu hiện cấp khô lá là cấp 5, Pokkali (chuẩn kháng) biểu hiện cấp 3.

Ở môi trường mặn 15 dS/m, các giống bị cháy khô và chết rất nhiều so với môi trường 8 dS/m, chỉ có một vài giống sống sót, tuy nhiên chúng cũng bị cháy lá nhiều. Đa số các giống trong môi trường này đều biểu hiện cấp độ khô lá rất cao, cấp 9 với 78 giống, chiếm tỷ lệ 84,78%. Ở cấp khô lá cấp 7 có 13 giống (OM6677, OM6832, OM10252, OM6707, OM5629,...). Chỉ có giống Pokkali là biểu hiện ở cấp 5 (51-70% lá bị khô).

Qua đó, các giống chống chịu tốt được đề nghị bao gồm: OM6677, OM6832, OM10252, OM6707, OM5629, OM819ĐB-1, OM6379, OM5894, OM5239, OM5740, OM819ĐB-11, OM5886, OM5953.

2. Chiều cao cây

Phân tích chiều cao cây của các giống sau khi thanh lọc mặn ở các môi trường

0dS/m, 8dS/m, 15dS/m có sự khác nhau khá rõ rệt ở các nồng độ, biểu hiện khác biệt có ý thống kê ở mức 99% (**). Ở nồng độ muối càng cao thì chiều cao cây càng giảm, ở nồng độ muối 15dS/m hầu hết các giống có chiều cao cây giảm so với ở nồng độ 8dS/m, và ở nồng độ 8dS/m hầu hết các giống có chiều cao cây giảm so với ở nồng độ 0dS/m.

Ở môi trường 0 dS/m, chiều cao cây đa số tập trung trong khoảng 14-16cm, trong khi đó ở 8 dS/m là trong khoảng 12-14cm, ở 15 dS/m là 8-12cm. Điều này cho thấy điều kiện mặn sẽ hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa. Để thích nghi với điều kiện mặn, cây lúa chống chịu được stress sẽ có sự sinh trưởng rất nhanh để thoát ra khỏi giai đoạn mẫn cảm với mặn, thích nghi dần với môi trường khắc nghiệt. Còn những giống nhiễm mặn sẽ sinh trưởng kém, dần khô cháy và chết.

3. Chiều dài rễ

Qua phân tích thống kê chiều dài rễ của các giống ở các nồng độ 0dS/m, 8dS/m và 15dS/m biểu hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê 99% (**). Các giống có chiều dài rễ khác nhau giữa các nồng độ. Ở nồng độ muối càng cao thì chiều dài rễ càng giảm. Chiều dài rễ rất mẫn cảm với mặn, do đó chúng biến động rất phức tạp, đặc biệt là thanh lọc trong môi trường dinh dưỡng.

4. Trọng lượng khô của thân

Ở nồng độ 15dS/m trọng lượng khô thân từ 7-10mg có 41 giống, 10-13mg có 44 giống, 13-16mg có 6 giống, 19-22mg có 1 giống.

Cũng giống như chiều cao cây và chiều dài rễ, trọng lượng khô thân chịu ảnh hưởng rất nhiều bởi môi trường mặn. Mặn làm cho khả năng tích lũy chất khô trong cây lúa giảm đi do quá trình dịch chuyển chất dinh

dưỡng bị chậm lại, khả năng hình thành và tích lũy chất khô trong giảm dẫn đến trọng lượng khô của cây cũng giảm đi. Tuy nhiên đối với những giống chống chịu thì quá trình hình thành và tích lũy chất khô vẫn diễn ra bình thường nên có trọng lượng khô không bị giảm sút nhiều.

5. Trọng lượng khô của rễ

Qua phân tích trọng lượng khô rễ ở các nồng độ 0dS/m, 8dS/m và 15dS/m cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 99% (**), trọng lượng khô của rễ khác nhau ở các giống và ở các nồng độ muối. Trọng lượng khô của rễ cũng ảnh hưởng đến khả năng chống chịu mặn, ở nồng độ 0dS/m trọng lượng khô của rễ lớn hơn trọng lượng khô của rễ ở nồng độ 8dS/m và trọng lượng khô của rễ ở nồng độ 8dS/m lớn hơn trọng lượng khô của rễ ở nồng độ 15dS/m.

5. Đánh giá tương quan các chỉ tiêu ở môi trường 0,8 và 15 dS/m

Đối với stress mặn, cây lúa cho phản ứng rất khác nhau tùy vào đặc tính từng giống. Tuy nhiên, khi xét về mối tương quan của các đặc tính nông sinh học của các giống cũng cho thấy chúng có sự tương quan chặt chẽ với nhau.

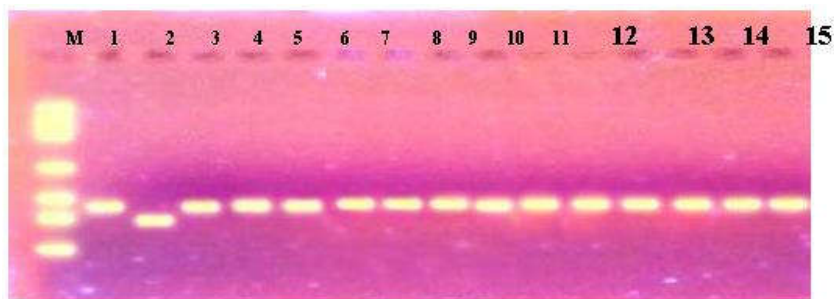
Sau khi đánh giá mối tương quan giữa các đặc tính cho thấy ở môi trường mặn

0,8 và 15 dS/m, đặc tính ngày sống sót, chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô thân, trọng lượng khô rễ đều tương quan chặt chẽ với nhau, và mối tương quan này là tương quan thuận. Điều này có nghĩa là nồng độ muối càng cao, ngày sống sót càng giảm, chiều dài thân và rễ cũng ngắn hơn, trọng lượng khô thân và rễ cũng nhẹ hơn.

7. Khuếch đại DNA bằng phương pháp PCR -SSR với marker RM223

Gene mục tiêu được chọn để thực hiện thí nghiệm này là gen kháng mặn trên nhiễm sắc thể số 8 (salto). Gene liên kết chặt trên nhiễm sắc thể số 8 được đánh dấu bởi marker phân tử RM223. Gene này có liên kết với gen mùi thơm và với gen chống chịu mặn ở giai đoạn mạ và phát dục (Nguyễn Thị Lang và ctv, 2001). Marker RM223 được sử dụng làm marker đánh dấu, marker này có kích thước là (200-220bp) và được dùng làm khuôn DNA để thiết lập các cặp primer đặc hiệu. Các cặp primer này sẽ khuếch đại được các đoạn DNA nhỏ hơn nhờ phương pháp PCR. Các đoạn DNA nhỏ này được gọi là SSR.

Sau đó tiến hành kiểm tra việc khuếch đại trên gel agarose 3% trong dung dịch TBE 1X. Kết quả thể hiện trên hình 2.



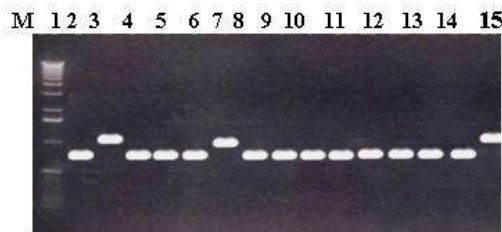
Hình 2: Sản phẩm PCR của các giống lúa cao sản tại locus RM223 liên kết với gen kháng mặn trên nhiễm sắc thể số 8, vị trí hai băng 220bp và 200bp, trên gel agarose 3%,

Ghi chú: M: là marker chuẩn; 1: pokkali; 2: IR 29; 3: OM6677; 4: Om10252; 5: OM6707; 6: OM6379; 7: OM5629; 8: OM5239; 9: OM5740; 10: OM6840; 11: OM819-ĐB1; 12: OM5953; 13: OM819ĐB-11; 14: OM5886; 15: OM5894

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở tất cả các cột đều có dạng đơn hình, xuất hiện với hai băng có kích thước 200bp tương ứng với IR28 và 220bp tương ứng với Pokkali cho gen kháng mặn.

Tương tự phân tích kiểu alen của chỉ thị RM3252-S-1-1 ghi nhận kích thước phân tử cho vị trí của Pokkali là Marker RM3252-S-1-1

được sử dụng làm marker đánh dấu, marker này có kích thước là (220-230 bp) và được dùng làm khuôn DNA để thiết lập các cặp primer đặc hiệu. Điều này cũng phù hợp với G. Mohammadi và ctv 2010. Kết quả ghi nhận đa số các giống khác biệt với giống Pokkali: là giống số 6: OM6379 và giống OM5894 không ghi nhận mang gen saltol.



Hình 3: Sản phẩm PCR của chỉ thị phân tử RM3252-S1-1 trên 15 giống chống chịu mặn

Ghi chú: M: là marker chuẩn; 1: pokkali; 2: IR 29; 3: OM6677; 4: OM10252; 5: OM6707; 6: OM6379; 7: OM5629; 8: OM5239; 9: OM5740; 10: OM6840; 11: OM819-ĐB1; 12: OM5953; 13: OM819ĐB-11; 14: OM5886; 15: OM5894.

Kiểm tra mức độ chính xác giữa việc đánh giá giống theo kiểu hình và dựa vào marker phân tử.

Phương pháp SSR marker với marker RM223 đã được Nguyễn Thị Lang (2004) kiểm tra, với mức độ chính xác đến 82% giữa kiểu gen và kiểu hình trên giai đoạn phát dục và 92% ở giai đoạn mạ (Lang và ctv, 2004).

Tiến hành việc kiểm tra mức độ chính xác của phương pháp SSR marker với marker RM223. Trước hết xác định kiểu hình thanh lọc đối với gen kháng mặn chọn ra các giống kháng và nhiễm rõ rệt để đánh giá kiểu hình và kiểu gen nhanh bằng marker phân tử.

Kết quả ghi nhận về sự liên hệ giữa kiểu hình và kiểu gen của các giống lúa được

kiểm tra cho thấy: Trong 13 giống chống chịu mặn tốt về kiểu hình thì 13 giống đều mang kiểu gen kháng (T), chiếm 100%.

Quá trình biểu hiện từ kiểu gen ra kiểu hình là một quá trình phức tạp gồm nhiều nhân tố quyết định trong đó quan trọng nhất là sự tương tác giữa kiểu gen và môi trường.

Phương pháp này cho thấy khả năng dự đoán kiểu gen chống chịu và kiểu hình chống chịu rất cao, do đó có thể áp dụng để chọn lọc những giống chống chịu cho điều kiện mặn, làm nguồn vật liệu lai cho những chương trình lai tạo giống lúa mới hiện nay.

IV. KẾT LUẬN

Qua đánh giá kiểu hình của 92 giống lúa cao sản về mức độ phản ứng chống chịu mặn với ba nồng độ muối khác nhau EC=0 dS/m, 8 dS/m, 15 dS/m có thể chia thành 3 nhóm khác nhau: Nhóm các giống chống chịu mặn, nhóm giống hơi nhiễm và nhóm giống nhiễm.

Khả năng phản ứng với mặn của giống lúa có sự khác biệt rất lớn. Tuy nhiên xét về sự sinh trưởng của các giống cho thấy: Nồng độ muối càng cao thì ngày sống sót càng thấp, chiều cao cây, chiều dài rễ, trọng lượng khô thân, rễ càng giảm. Các chỉ tiêu này đồng thời tương quan thuận rất chặt chẽ với nhau. Điều này cho thấy điều kiện mặn ảnh hưởng rất lớn đến sự sống sót, sinh trưởng và phát triển của cây lúa.

Các giống chống chịu mặn Pokkali, OM6677, OM10252, OM6707, OM5629, OM5239, OM5740, OM6832, OM819ĐB-1, OM5953, OM819ĐB-11, OM5886,... Các giống này có kiểu hình thống nhất kiểu gene, có khả năng chống chịu tốt với điều kiện mặn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang (1997), *Đánh giá quỹ gen cây lúa nhờ marker phân tử*. Kết quả nghiên cứu khoa học Viện lúa ĐBSCL.83-86.
2. Gregorio, G.B. (1997), *Tagging salinity tolerance genes in rice using amplified fragment Length polymorphism*.
3. (AFLP). Ph.D. Thesis, University of the Philippines Los Baños. Laguna, Philippines. Gregorio, G.B., Senadhira, D., Mendoza, R.D. (1997), *Screening rice for salinity tolerance*, IRRI Discussion paper
4. Series No.22. International Rice Research Institute, Los Baños. Laguna, Philippines. Gregorio, G.B., Senadhira, D., Mendoza, R.D., Manigbas, N.L., Roxas J.P., Guerta, C.Q. (2002), *Progress in breeding for salinity tolerance and other abiotic associated stresses in rice*. Field Crops Res. 76: 91-101
5. G. Mohammadi-Nejada, R.K. Singhb, A. Arzanic, A.M. Rezaiee, H. Sabourid,*, G.B. Gregoriob (2010), *Evaluation of salinity tolerance in rice genotypes*. International Journal of Plant Production 4 (3), July 2010 ISSN: 1735-6814 (Print), 1735-8043 (Online).www.ijpp.info
6. Nguyen Thi Lang, Seiji, Yanhanagihara and Bui Chi Buu (2001), *A microsatellite marker for a gene conferring salt tolerance on rice at the vegetative and reproductive stages*. SABRAO:Breeding & genetic 1-10
7. Nguyễn Thị Lang, Hoàng Thị Ngọc Minh (2006), *Đánh giá khả năng chống chịu mặn của các giống lúa ngắn ngày*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn: 24: 32-36.
8. Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2004), *Nghiên cứu di truyền cho gen kháng mặn trên quần thể trồng dòn của cây lúa*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (6: 824-826).

Ngày nhận bài: 18/4/2014

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,

ngày 25/4/2014

Ngày duyệt đăng: 18/6/2014