

Cải tiến giống lúa chống chịu thiếu lân thông qua phương pháp chọn giống truyền thống và chỉ thị phân tử

Bùi Chí Bửu^{1*}, Nguyễn Lương Minh¹, Phạm Thị Bé Tư²,
Nguyễn Trọng Phước², Nguyễn Bảo Toàn², Nguyễn Thị Lang²

¹Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam

²Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

Ngày nhận bài 6/3/2017; ngày chuyển phản biện 8/3/2017; ngày nhận phản biện 28/3/2017; ngày chấp nhận đăng 31/3/2017

Tóm tắt:

Chọn tạo giống lúa cao sản có khả năng chống chịu thiếu lân (P) là yêu cầu cấp thiết ở vùng canh tác lúa trên đất phèn. Giống AS996 là nguồn cho gen chống chịu thiếu P được ghi nhận. Quần thể F_2 và RIL_7 của cặp lai OM2395/AS996, OM2717/AS996 được phân tích QTL với 126 chỉ thị SSR đa hình. Tính trạng có liên quan đến hiện tượng chống chịu thiếu P là khả năng đẻ nhánh tương đối (RTA), khối lượng khô tương đối của thân (RSDW), khối lượng khô tương đối của rễ (RRDW), chiều dài tương đối của thân (RSL), chiều dài tương đối của rễ (RRL). Có 5 nhiễm sắc thể (NST) cần được ghi nhận có sự hiện diện của những QTL giả định, đó là NST số 1, 2, 5, 9 và 12, trong đó NST 12 quan trọng nhất với loci mục tiêu có gen *Pup-1* (P-uptake số 1) hoặc *PSTol*.

Từ khóa: Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử, gen *PSTol*, gen *Pup-1*, khả năng đẻ nhánh tương đối, lúa chống chịu thiếu P, QTL.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Hiện tượng thiếu lân (P) do khả năng cố định P của đất, bởi sắt, nhôm trong đất phèn, đất acid với biểu hiện chung là hàm lượng P dễ tiêu và P tổng số quá thấp trong đất. Từ năm 2010 đến nay, Viện Lúa quốc tế (IRRI) đã và đang triển khai chương trình hợp tác với quy mô rộng để khai thác thành công gen *PSTol-1* (chống chịu sự đói P của cây lúa).

Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giống lúa chống chịu hay không chống chịu với điều kiện thiếu P đã được ghi nhận với hai dạng hình khác nhau: (1) Giống chống chịu điều kiện hàm lượng P trong đất bị cố định khá lớn bởi môi trường đất, nhờ khả năng hấp thu P rất mạnh của cây lúa; (2) Giống chống chịu điều kiện hàm lượng P trong đất rất thấp do khả năng của cây tự điều tiết khi đói P. Trong cây lúa dạng hình cải tiến, năng suất cao, sự thiếu P thể hiện các yếu tố hạn chế rất nghiêm trọng cho sự tăng trưởng, đặc biệt trong vụ hè thu. Hiện tượng phổ biến là giảm khả năng đẻ nhánh, kéo dài thời gian tăng trưởng và năng suất thấp.

Mục tiêu của nghiên cứu này là chọn tạo được giống lúa cao sản có khả năng chống chịu tốt với điều kiện thiếu P trên đất phèn trồng lúa bằng sự kết hợp giữa chỉ thị phân tử SSR và phương pháp chọn giống truyền thống.

Tổng quan nghiên cứu

Thiếu P trong đất canh tác là vấn đề có tính chất toàn cầu, ảnh hưởng đến 50% diện tích đất canh tác lúa [1]. Hàm lượng P trong đất thấp có thể do nguồn P trong vật chất cấu tạo đất thấp, hoặc pH thấp, đất chua; hoặc có hoạt động cố định P trong đất xảy ra mạnh mẽ do tương tác với nhiều nguyên tố khác [2].

Gen *Pup-1* đã được xác định từ giống lúa Kasalath [1] và các dòng gần như đẳng gen NILs (near isogenic lines) mang QTL này cho thấy *Pup-1* có liên quan đến năng suất cao khi so sánh với dòng mẹ tái tục Nipponbare [3]. Giải trình tự vùng gen đích trong giống lúa Kasalath cho thấy đây là một locus cực kỳ phức tạp (complex locus), bao gồm sự có mặt của đoạn InDel giàu tính chất transposon có kích thước phân tử khoảng 90 kb mà nó không có trong genome của giống Nipponbare [4].

Gen mã hóa protein có cơ chế chức năng chống chịu sự đói P thuộc họ kinase đã được phân lập - gen có tên là *OsPSTOL1* [5].

Các chỉ thị phân tử chuyên biệt với gen *Pup1* đã được người ta phát triển nhằm tiếp cận với phương pháp *Pup-1* haplotype trong những giống lúa có sự đa dạng khác nhau, và nhằm cải thiện sự chống chịu thiếu P có hiệu quả của

*Tác giả liên hệ: Email: buu.bc@iasvn.org

Improvement for rice genotypes with phosphorous deficiency tolerance using conventional and marker-assisted selective breedings

Chi Buu Bui¹, Luong Minh Nguyen¹,
Thi Be Tu Pham², Trong Phuoc Nguyen²,
Bao Toan Nguyen², Thi Lang Nguyen²

¹Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam

²Cuu Long Delta Rice Research Institute (CLMRI)

Received 6 March 2017; accepted 31 March 2017

Abstract:

High-yielding rice genotypes with phosphorous (P) deficiency tolerance have been a key demand in the rice production on acid sulfate soils. A derivative line namely AS996 from *Oryza rufipogon* is the donor of P-deficiency tolerance in the study. Populations of F₂ and RIL₇ from the crosses viz. OM2395/AS996 and OM2717/AS996 were tested to analyse QTLs through 126 polymorphic SSRs. Agronomical traits related to P-deficiency tolerance could be concluded as relative tillering ability (RTA), relative shoot dry weight (RSDW), relative root dry weight (RRDW), relative shoot length (RSL), and relative root length (RRL). The putative QTLs were identified on the chromosomes 1, 2, 5, 9, and 12. Among them, the chromosome 12 was considered the most important one because of the presence by *Pup-1* or/and *PSTol* loci.

Keywords: Marker-assisted selection, P-deficiency tolerance, *PSTol* gene, *Pup-1* gene, QTL, relative tillering ability.

Classification number: 4.6

những giống lúa ở châu Á [6].

Nghiên cứu của Bùi Chí Bửu và cs (2005) [7] cho thấy, khả năng đẻ nhánh được xem như tiêu chuẩn chọn lọc rõ nhất được điều khiển bởi hoạt động của gen không cộng tính (non-additive).

Giá trị dự đoán hoạt động của gen cộng tính được tính theo hệ số di truyền H² và công thức $2\sigma^2_{gca}/(2\sigma^2_{gca} + \sigma^2_{sca})$ cho thấy xu thế hoạt động của gen không cộng tính mạnh hơn gen cộng đối với các tính trạng có liên quan đến

chống chịu thiếu P, ngoại trừ thời gian sinh trưởng [8].

Chỉ thị RM235 và RM247 trên NST 12 được sử dụng để chọn dòng lúa chống chịu thiếu P, trên quần thể hồi giao giữa AS996 và OM2395 [8].

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

200 mẫu giống lúa mùa địa phương và 36 mẫu quần thể lúa hoang *Oryza rufipogon* tại ngân hàng gen của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

Quần thể F₂ và RIL F₇ của cặp lai OM2395/AS996, OM2717/AS996, IR20 là đối chứng chống chịu và IR36 là đối chứng nhiễm.

Hai tổ hợp lai: OMCS 2000 x IR64 Pup1 và OM1490 x AS996. Quần thể con lai F₂ được khảo sát cùng với bố mẹ và giống đối chứng.

Đánh giá kiểu hình thông qua 2 phương pháp: (1) Trong phòng thí nghiệm với môi trường Yoshida bổ sung 0,5 ppm P và Yoshida + 10 ppm P; (2) Trên đồng ruộng với nghiệm thức có bón P và không bón P, nền đất trắng sau 8 vụ không bón bất cứ loại phân nào theo kiểu lô phụ, 3 lần lặp lại (với 2 yếu tố: Phân P và giống lúa).

Điện di trên agarose gel (0,9%) với dung dịch 1X TAE. Phân tích PCR với 126 chỉ thị SSR đa hình; sử dụng nguồn chỉ thị trên lục lạp là 12 SSR + 8 Indel phục vụ phân tích lúa hoang *Oryza rufipogon*.

Chỉ tiêu đẻ nhánh tương đối RT% (relative tiller %) là tỷ số giữa số chồi đẻ nhánh tích cực của lô không bón P so sánh với lô có bón P theo IRRI.

RT%	Thang điểm SES	Hiệu quả đáp ứng với P
80-100	1	Cao
60-79	3	Hiệu quả
40-59	5	Trung bình
20-39	7	Không hiệu quả
0-19	9	Rất không hiệu quả

Kết quả và thảo luận

Đánh giá kiểu hình

Sự biến động trên quần thể F₂ được đánh giá trên 8 tính trạng nông học của 3 tổ hợp lai OM2717/AS996, OM2395/AS996 và K47/OM4495 đã được phân tích. Số bông/bụi và khối lượng sinh khối của các tổ hợp lai đều có ý nghĩa. Để thiết lập bản đồ di truyền tính trạng chống chịu thiếu P, 4 tính trạng liên quan đã được phân tích là: chiều dài rễ và thân, khối lượng khô của rễ và thân, trong điều kiện thiếu P và có P, từ đó suy ra giá trị tương đối theo tỷ lệ (%) (bảng 1).

Bảng 1. Giá trị trung bình của 8 tính trạng liên quan đến chống chịu thiếu P của con lai F₂ thuộc 3 tổ hợp lai.

OM2717/AS996	Khối		Thế hệ	
	-P	+P	-P	+P
Chiều cao	120,55ns	182,82*	36,37ns	35,36ns
Số bông/bụi	15,62**	15,266*	9,46*	4,657ns
Dài bông	0,87ns	0,75*	0,95*	0,79ns
Hạt chắc/bông	611,66*	576,42*	225,47ns	134,55ns
% hạt lép	17,66***	9,80**	38,16ns	10,72ns
Khối lượng 1.000 hạt	21,26**	21,25*	17,88ns	20,72ns
Sinh khối	226,25**	221,82	238,95ns	221,17ns
Năng suất	1,21ns	1,84	1,99ns	1,18ns

OM2395/AS996	Khối		Thế hệ	
	-P	+P	-P	+P
Chiều cao	27,48ns	25,26ns	55,80ns	38,99ns
Số bông/bụi	4,86**	5,60ns	3,58ns	10,00ns
Dài bông	0,15ns	0,62ns	0,40*	0,68ns
Hạt chắc/bông	117,42ns	118,28ns	114,79ns	115,42*
% hạt lép	26,02ns	28,68*	37,75ns	39,11ns
Khối lượng 1.000 hạt	21,064ns	29,88*	26,78ns	21,77ns
Sinh khối	53,03*	5,11*	59,78ns	2,44*
Năng suất	4,04**	4,80ns	3,37ns	3,56*

K47/OM4495	Khối		Thế hệ	
	-P	+P	-P	+P
Chiều cao	31,42ns	25,35	18,79ns	20,46ns
Số bông/bụi	22,46*	7,62	5,03ns	4,06ns
Dài bông	0,68ns	0,08	0,92ns	1,02ns
Hạt chắc/bông	130,48ns	123,48	78,59ns	79,68ns
% hạt lép	17,15ns	19,62	17,51ns	23,61ns
Khối lượng 1.000 hạt	127,55*	113,58	114,88ns	112,31ns
Sinh khối	96,52*	6,63*	29,14	1,68*
Năng suất	5,33ns	4,36	4,45ns	11,9*

* và **: Khác biệt có ý nghĩa mức độ 0,05 và 0,01; ns: Không ý nghĩa thống kê; +P: Có P; -P: Không P.

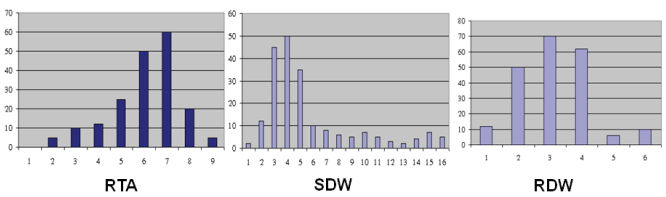
Phương sai kiểu gen và phương sai kiểu hình trên cả 2 nghiệm thức bón và không bón P được thu thập. Hệ số di truyền theo nghĩa rộng (H^2_{BS}) của OM2717/AS996 trong hầu hết các tính trạng đều thấp.

Trong tổ hợp OM2395/AS996, H^2_{BS} của hầu hết các tính trạng mục tiêu cũng thấp, chứng tỏ ảnh hưởng của môi trường khá lớn (bảng 2).

Bảng 2. Phương sai kiểu gen, phương sai kiểu hình và hệ số di truyền của các tính trạng nông học trong quần thể F₂ của OM2717/AS996 và OM2395/AS996.

	Trung bình		Phương sai kiểu gen		Phương sai kiểu hình		H^2_{BS}	
	-P	+P	-P	+P	-P	+P	-P	+P
OM2717/AS996								
Chiều cao (cm)	91,16*	91,22*	7,89**	10,61	52,16**	58,99	0,151	0,17
Số bông/bụi	9,51*	10,13*	1,87*	0,58	5,71**	3,48	0,328	0,16
Dài bông (cm)	20,33	20,88	0,16	0,13	0,625	1,069	0,261	0,13
Hạt chắc/bông	96,0**	96,44**	0,32	32,70	224,82**	199,95	0,001	0,16
% hạt lép/bông	16,51*	12,86*	2,212**	4,92	34,23**	20,13	0,064	0,24
Khối lượng 1.000 hạt (g)	24,25*	25,33*	0,275	0,12	8,432**	10,98	0,032	0,01
Sinh khối (g)	20,49*	24,28*	4,897**	0,08	29,162**	1,35	0,167	0,05
Năng suất (g/bụi)	23,88*	24,28*	0,162	0,08	2,317**	1,35	0,070	0,05
OM2395/AS996								
Chiều cao (cm)	90,15	94,2	6,68**	6,13	201,16**	26,73	0,033	0,23
Số bông/bụi	8,4	9,66	0,01	0,27	5,21**	10,54	0,002	0,02
Dài bông (cm)	21,04	21,08	0,007	0,18	0,942	1,057	0,008	0,17
Hạt chắc/bông	97,44*	100,17*	0,32	6,78	18,16**	1,70	0,017	0,03
% hạt lép/bông	17,84*	16,97*	1,229*	4,01	12,42**	31,08	0,098	0,13
Khối lượng hạt/bụi (g)	17,22*	17,87*	0,271	5,002**	2,68	16,40	0,054	0,16
Năng suất (g/bụi)	20,40*	24,24*	2,36*	24,42**	0,99	0,17	0,96	0,97

Tóm lại, các tính trạng mục tiêu của 2 tổ hợp lai này đều biểu hiện mức biến động do ảnh hưởng môi trường khác nhau (có bón P và không bón P). Ngoại trừ năng suất và sinh khối trên tổ hợp OM2395/AS996. Hình 1 cho thấy phân bố chuẩn của 3 tính trạng có liên quan đến chống chịu thiếu P. Kết quả như vậy cho phép tiếp tục phân tích QTL.



Hình 1. Phân bố chuẩn trong con lai F₂ của OM2395/AS996 đối với tính trạng chỉ số tương đối của RTA, khối lượng khô chồi thân (SDW) và khối lượng khô rễ (RDW) cho phép thực hiện phân tích QTL.

Bảng 3. Khả năng hấp thu P và các thông số của quần thể RIL₇ thuộc tổ hợp lai OM2395/AS996.

Thông số	Đơn vị	Quần thể RIL ₇			Chọn lọc kiểu gen		Bố	Mẹ
		Trung bình	SD	Khoảng biến thiên	Kháng	Nhiễm	AS996	OM2395
RTA	%	90,5	14,5	45-90	100,0	60,0	98,2	45,0
RSDW	%	55,2	13,2	35-89	70,2	45,2	60,9	37,5
RRDW	%	112,0	25,6	56-210	132,1	89,6	135,6	100,5

SD: Độ lệch chuẩn.

Bảng 3 cung cấp số liệu trung bình của con lai RIL₇ của 3 tính trạng có liên quan đến chống chịu thiếu P. Giá trị RTA, RSDW và RRDW không tỏ ra vượt trội (transgressive) so với giống cho AS996.

Đánh giá kiểu gen

Bảng 4. Phân tích QTL tính trạng chiều dài chồi thân thông qua chỉ thị phân tử đơn (single marker) với 218 dòng RIL₇ của quần thể con lai thuộc OM1490/AS996.

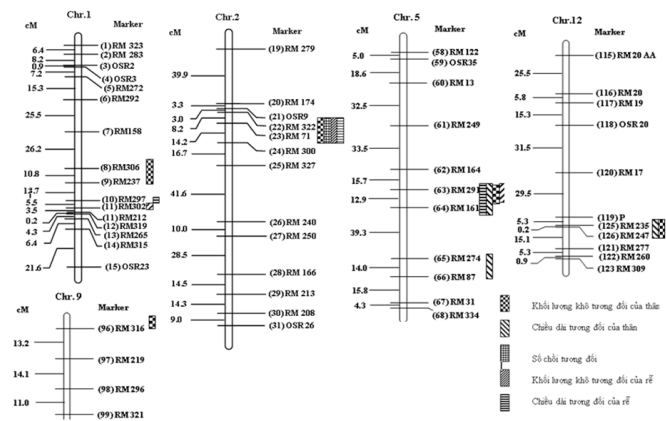
Chỉ thị	NST	Kiểu gen	Alen trung bình	F	P	R ² (%)	DPE
RM306	1	A B	16,50±0,44	5,80	0,001	11,21	B
RM322	2	A B	22,40±0,45	3,16	0,006	11,28	B
RM291	5	A B	22,40±0,45	2,57	0,054	11,67	B
RM316	9	A B	16,50±0,45	3,32	0,020	11,56	A
RM247	12	A B	16,5±0,44	5,80	0,001	11,21	B
RM235	12	A B	16,50±0,44	5,80	0,001	11,01	A

R^2 : Chỉ thị phân tử liên kết với QTL giải thích được bao nhiêu phần trăm biến thiên kiểu hình; DPE: Xu hướng chống chịu thuộc về kiểu gen nào (B: Donor; A: Dòng mẹ).

Chiều dài chồi thân được phân tích SMA (chỉ thị phân tử đơn) định vị trên NST 1, 2, 5, 9 và 12, tại 6 QTL, với biến thiên kiểu hình được giải thích > 10% (bảng 4), cho phép tiếp tục thực hiện phân tích bản đồ cách quãng (IM) nhằm minh chứng quãng giữa hai marker chủ đích. RSL do 5 QTL điều khiển, định vị trên NST số 1, 2, 5, 9 và 12 (hình 2). RRL do 2 QTL nằm trên NST số 1 và 2 điều khiển. RSDW do 4 QTL điều khiển. RRDW do 2 QTL điều khiển, định vị trên NST 2 và 5. QTL giải thích sự biến thiên kiểu hình của RSL thay đổi từ 11,0 đến 11,67%. Các tính trạng còn lại biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL từ 2,37 đến 9,19%. Ba vùng RM306-RM237, RM291-RM261 và RM235-RM247 có ảnh hưởng rất ý nghĩa với hai tính trạng RSDW và RSL.

Bảng 5. Phân tích QTL thông qua bản đồ cách quãng (IM).

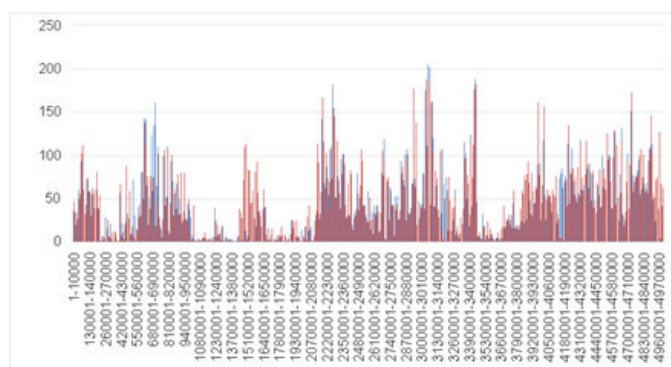
Index	Quãng giữa hai chỉ thị	NST	P	cM
8-9 (RSL)	RM306-RM237	1	0,001	10,8
63-64 (RSDW)	RM291-RM261	5	0,000	12,9
125-126 (RSDW) (RSL)	RM235-RM247	12	0,001	0,2



cs (2014) [9] trên quần thể con lai đang phân ly để chọn dòng lúa cao sản triển vọng, chống chịu được thiếu P.

Người ta hiện rất quan tâm đến nguồn vật liệu từ lúa hoang và lúa bản địa. Bởi vì, ngoài giống lúa Kasalath, loại hình *aus*, chưa có vật liệu nào được nghiên cứu sâu về locus *Pup-1* hoặc *PSTol*.

AS996 là dòng dẫn xuất từ tổ hợp lai IR64 x *Oryza rufipogon* (số mẫu giống đăng ký là acc.106412-IRRI GeneBank, thu thập tại Tràm Chim tháng 1/1990 được so sánh với giống lúa IR64 bằng kỹ thuật SNP oligochip cho thấy tần suất alen hữu ích của AS996 gấp nhiều lần hơn khi so sánh với IR64 (hình 4). Khả năng khai thác nguồn vật liệu dẫn xuất từ lúa hoang mọc trên đất phèn Đồng Tháp Mười rất đáng được chú ý trong cải tiến giống lúa chống chịu thiếu P.



Hình 4. Mức độ che phủ SNPs trên NST 12, vùng giả định có gen *Pup-1* của AS996 hiển thị màu đỏ cam và của IR64 hiển thị màu xanh dương.

Kết luận và đề nghị

Giống AS996 là nguồn cho gen chống chịu thiếu P được ghi nhận.

Tính trạng có liên quan đến hiện tượng chống chịu thiếu P là RTA, RSDW, RRDW, RSL, RRL. Hệ số di truyền thấp của các tính trạng này rất cần những phương

pháp phân tích chính xác hơn.

Có 5 NST được ghi nhận có hiện diện của những QTL giả định, đó là NST số 1, 2, 5, 9 và 12, trong đó NST 12 quan trọng nhất với loci mục tiêu có gen *Pup-1* hoặc *PSTol*.

Tiếp tục thực hiện “fine mapping” và khảo nghiệm tại nhiều điểm trong pha 2 để chọn dòng lúa cao sản có triển vọng chống chịu thiếu P trên đất phèn ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Wissuwa, J. Wegner, N. Ae, M. Yano (2002), “Substitution mapping of *Pup-1*: A major QTL increasing phosphorous uptake of rice from a phosphorous-deficient soil”, *Theor. Appl. Genet.*, **105**(6-7), pp.890-897.
- [2] T.J. Rose, M. Wissuwa (2012), “Rethinking internal phosphorus utilization efficiency: A new approach is needed to improve PUE in grain crops”, *Adv. Agron.*, **116**, pp.183-215.
- [3] M. Wissuwa (2005), “Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake”, *Plant Soil*, **269**, pp.57-68.
- [4] S. Heuer, X. Lu, J.H. Chin, J. Pariasca-Tanaka, H. Kanamori, T. Matsumoto, T. De Leon, V.J. Ulat, A.M. Ismail, M. Yano, M. Wissuwa (2009), “Comparative sequence analyses of the major QTL *Pup-1* reveal a complex genetic structure”, *Plant Bio-technol. J.*, **7**, pp.456-471.
- [5] R. Gamuyao, J.H. Chin, J. Pariasca-Tanaka, P. Pesaresi, S. Catausan, C. Dalid, I. Slamet-Loedin, E. Mae Tecson-Mendoza, M. Wissuwa, S. Heuer (2012), “The protein kinase *PSTol* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency”, *Nature*, **488**, pp.535-541.
- [6] H.J. Chin, X. Lu, S.M. Haefele, R. Gamuyao, A.M. Ismail, M. Wissuwa, S. Heuer (2010), “Development and application of gene-based markers for the major rice QTL *Pup1*”, *Theor. Appl. Genet.*, **120**, pp.1073-1086.
- [7] Bui Chi Buu, Nguyen Thi Lang (2005), “Association of quantitative trait loci for phosphorous (P) deficiency tolerance in rice”, *The Fifth International Rice Genetics Symposium*, pp.117-118.
- [8] Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2006), “Nghiên cứu di truyền liên quan đến tính chống chịu thiếu P trên cây lúa (*Oryza sativa* L.)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **5**, tr.45-49.
- [9] A. Mukherji, S. Sarkar, A.S. Chakraboti, R. Yelne, V. Kavishetti, T. Biwass, N. Mandal, M. Bhattacharyya (2014), “Phosphate acquisition efficiency and phosphate starvation tolerance locus *PSTol* in rice”, *Journal of Genetics*, **93**(3), pp.683-688.