

SỰ ĐA HÌNH HÌNH THÁI HẠT VÀ ĐA HÌNH PHÂN TỬ TRONG QUẦN THỂ F3 CỦA CẶP LAI LÚA CR203 VÀ BẮC THƠM SỐ 7

Nguyễn Thị Kim Liên¹, Phan Thị Bầy¹, Đặng Thị Minh Lệ¹, Trần Thị Lương², Nguyễn Đức Thành¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

TÓM TẮT

Hình thái hạt là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến việc sản xuất lúa gạo. Hình thái hạt còn đóng vai trò quan trọng việc xác định chất lượng (hàm lượng sắt và protein) và năng suất hạt lúa. Vì vậy, nghiên cứu này tiến hành nhằm đánh giá sự phân ly tính trạng hình thái hạt và những thay đổi về phân tử dựa trên các chỉ thị SSR của quần thể F3 gồm 150 cá thể của cặp lai giữa CR203 và Bắc thơm số 7 làm cơ sở cho lập bản đồ QTL. Nghiên cứu đã sử dụng 102 cặp mồi SSR để đánh giá đa hình giữa bố mẹ, kết quả cho thấy tỷ lệ đa hình giữa bố mẹ là khá cao đạt 26% (28 cặp mồi trên 102 cặp mồi). Đánh giá đa hình trên quần thể với 22 cặp mồi đã cho đa hình ở bố mẹ cũng cho thấy trong quần thể F3 sự biến động về mặt phân tử ở các locus chỉ thị SSR là rất cao. Đối với tính trạng chiều dài hạt, các dòng có xu hướng giữ nguyên hình dạng như giống làm mẹ (CR203), trong khi tính trạng chiều rộng hạt có sự phân bố đồng đều hơn và tỷ lệ dài hạt/rộng hạt có xu hướng nằm ở trung gian giữa hai giống bố và mẹ. Bước đầu xác định được chỉ thị RM229 liên quan đến tỷ lệ dài hạt/rộng hạt.

Từ khóa: chỉ thị phân tử, lúa, QTL, SSR, tính trạng hình thái hạt

MỞ ĐẦU

Chất lượng gạo là một đặc điểm rất phức tạp, chủ yếu được xác định bởi bốn thành phần: chất lượng xay (xát, đánh vè bên ngoài, chất lượng nấu và ăn, chất lượng dinh dưỡng (Li *et al.*, 2003). Trong số này chất lượng nấu, chất lượng ăn và vè bên ngoài của hạt tạo thành yếu tố kinh tế quan trọng ảnh hưởng đến việc sản xuất lúa ở nhiều vùng sản xuất lúa gạo trên thế giới. Về bề ngoài của hạt gạo chủ yếu được định bởi các tính trạng như độ dài, độ rộng, tỷ lệ dài/rộng và độ đục của nội nhũ (Zhang, 2007). Thêm vào đó, độ rộng và độ dài hạt có thể ảnh hưởng rất lớn đến những tính trạng chất lượng quan trọng khác của lúa như độ đục của hạt, hiệu quả xay xát, chất lượng nấu và ăn. Đồng thời độ rộng và hình dạng hạt cũng đóng vai trò quan trọng trong xác định chất lượng và năng suất hạt (Wan *et al.*, 2008). Đặc điểm hình thái hạt cũng được xem là đóng vai trò đáng kể trong biến đổi di truyền về hàm lượng Fe trong hạt gạo trắng. Promuthai và cs (2007) đã nghiên cứu mối quan hệ giữa hình thái hạt, mức độ xay xát và sự mất Fe trong suốt quá trình đánh bóng hạt của 17 giống lúa đại diện cho 6 loại hình thái hạt khác nhau. Mức độ hao hụt Fe thấp nhất ở loại gạo hạt tròn ngắn so với các loại hình dạng hạt khác. Điều này gợi ý rằng hai đặc điểm này ở hạt có thể xem như một chỉ tiêu sàng lọc đầu tiên khi chọn lọc giống cho hàm lượng sắt cao trong sản xuất gạo. Đây là các tính trạng

số lượng được kiểm soát bởi nhiều gen (QTLs), vì vậy rất khó khăn cho các nhà chọn giống trong việc sử dụng các biện pháp truyền thống để cải tiến hay chọn lọc.

Tuy nhiên, các nghiên cứu về tính trạng hình thái hạt (độ dài hạt, độ rộng hạt ...) còn rất hạn chế. Kang và đồng tác giả (1999) đã xác định 15 QTLs cho kích thước hạt và hình dạng hạt của quần thể 164 dòng thế hệ F11 từ cặp lai giữa Milyang 23 và Gihobyeeo: 5 QTLs cho chiều dài hạt trên nhiễm sắc thể (NST) 1, 3, 5, 10, 12; 3 QTLs cho độ rộng hạt trên NST số 2, 8, 12, 3 QTLs cho tỷ lệ dài/rộng trên NST số 2, 10, 12 và 2 QTLs cho độ dày hạt trên NST số 2, 10. Yoshida và cs (2002) đã lập bản đồ liên kết ở lúa với 145 chỉ thị (RAPD, AFLP, SSR). Kết quả cho thấy một số QTLs đồng thời ảnh hưởng lên trọng lượng hạt, chiều rộng hạt và độ dày hạt, trong khi QTLs cho độ dài hạt ảnh hưởng độc lập lên kích thước hạt. Một QTL trên NST số 4 làm giảm hàm lượng protein trong gạo được đánh bóng có một mối tương quan thuận với độ dài hạt. Như vậy, QTL độ dài hạt trên NST số 4 có thể kiểm soát không chỉ hình dạng hạt mà còn cả cấu trúc bên trong liên quan đến hiệu quả xay xát hay vị trí tích lũy protein.

Vì vậy, nghiên cứu này đưa ra những đánh giá về sự đa hình về hình thái của một số tính trạng hình thái hạt cũng như những thay đổi về phân tử trong

quần thể F3 gồm 150 dòng của cặp lúa lai giữa CR203 và Bắc thơm số 7 làm cơ sở cho việc lập bản đồ QTL.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Quần thể F3 gồm 150 cá thể của cặp lai giữa CR203 và Bắc thơm số 7 để đánh giá sự phân ly về tính trạng dài hạt. Trong đó giống mẹ CR203 là giống lúa thường có thể gieo cấy được cả hai vụ, hạt hơi bầu, chiều dài hạt trung bình 5,84 mm, tỷ lệ dài trên rộng 2,5, ít bạc bụng, hàm lượng amylose 25%. Lúa CR203 có nhiều gen quý như tính chống chịu rầy nâu Biotip 1 và 2, tính thích ứng rộng, năng suất ổn định và khả năng chống đổ trung bình (<http://www.vaas.org.vn>). Giống bố Bắc thơm số 7 là giống nhập nội có chất lượng, có thể gieo cấy cả hai vụ, hạt thon dài, chiều dài hạt trung bình 7,17, tỷ lệ dài trên rộng 3,2, gạo và cơm rất thơm, cơm mềm, sức kháng bệnh tốt đối với một số bệnh như bạc lá, sâu cuốn lá và sâu đục thân (<http://www.haiduongdost.gov.vn>). Đây là một quần thể mới xây dựng và đáp ứng được các yêu cầu của một quần thể cho việc lập bản đồ QTL sau này về mức độ đa dạng di truyền đối với tính trạng quan tâm như: độ dài hạt, tính thơm, hàm lượng amylose...

Các cặp mỗi SSR (102 cặp mỗi) trong đó có một số cặp mỗi liên quan đến chiều dài hạt như RM21, RM131, RM204, RM229, RM246, RM255, RM259, RM332 và hai cặp mỗi STS RZ284, RZ452 đã được một số tác giả công bố (Redona, Mackill, 1998; Yoshida *et al.*, 2002), được mua từ hãng Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada),

Các hoá chất sử dụng trong nghiên cứu được mua từ các hãng Sigma và Fermentas.

Phương pháp

Tách chiết DNA hệ gen: tiến hành theo phương pháp của Saghai - Maroof và đồng tác giả (1984).

Phân tích SSR: Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 13,5 µl nước, 2 µl đệm 10XPCR, 1 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl dNTP (2,5 mM), 0,5 µl mỗi xuôi (50 ng/ml), 0,5 µl mỗi ngược (50 ng/ml), 0,5 µl Taq polymerase (5 U/µl), 1 µl DNA (25 ng/ml).

Chu kỳ nhiệt cho phản ứng: 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (94°C trong 1 phút, bắt cặp ở nhiệt độ từ 55°C - 61°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút), 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% hoặc trên gel polyacrylamide 5% và nhuộm bạc để phát hiện bằng tiến hành theo phương pháp của Panaud và đồng tác giả (1996).

Đánh giá sự đa hình về hình thái hạt

Đánh giá sự đa hình về hình thái hạt của các dòng trong quần thể bằng phương pháp đo độ dài, độ rộng của hạt gạo đã được tách vỏ trấu. Chiều dài và chiều rộng hạt của một cây được xác định bằng trung bình của năm hạt từ mỗi nhánh của một bông đại diện cho cây này (Kato, 1998).

Mối liên quan giữa tính trạng hình thái và chỉ thị phân tử SSR

Sử dụng phương pháp phân tích từng chỉ thị bằng phần mềm vi tính SAS (Statistic Analysis System) (SAS Institute, North California) để phân tích mối liên quan giữa các tính trạng hình thái hạt với chỉ thị phân tử.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá sự đa hình của bố mẹ với các cặp mỗi SSR

Để đánh giá sự đa hình của quần thể với các chỉ thị SSR trước hết chúng tôi đánh giá sự đa hình của bố mẹ với 102 cặp mỗi để chọn ra những cặp mỗi SSR cho sự sai khác giữa bố mẹ.

Kết quả thu được cho thấy sự đa hình giữa bố và mẹ đạt tỷ lệ 26% (28 cặp mỗi trên tổng số 102 cặp mỗi đã sử dụng. Đây là tỷ lệ đa hình tương đối cao chứng tỏ có sự khác biệt rõ rệt về phân tử giữa hai giống bố mẹ và quần thể là thích hợp cho việc lập bản đồ QTL. Vì theo tác giả Đặng Quý Nhân và cs (2009) đã sử dụng 2000 chỉ thị SSR chỉ thu được 154 chỉ thị (10%) có sự đa hình giữa bố mẹ của cặp lúa lai Koshihikari và Sensho. Tuy nhiên, trong số các cặp mỗi đã công bố có liên quan đến tính trạng hình thái hạt, thì ở đây chỉ có cặp mỗi RM21, RM229 và RM259 là cho đa hình giữa bố và mẹ. Hai mươi hai trong số cặp mỗi đã cho đa hình giữa bố mẹ (RM1, RM17, RM19, RM21, RM38, RM72, RM102, RM153, RM159, RM161, RM169, RM190, RM206, RM211, RM229, RM241, RM259, RM270, RM276, RM277, RM310, RM311) được dùng để đánh giá đa hình cho quần thể.

Đánh giá sự đa hình của quần thể với các cặp mồi SSR

Dựa trên những kết quả đánh giá sự đa hình với bố mẹ ở trên, các cặp mồi SSR đã cho đa hình được dùng để đánh giá trên quần thể. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% hoặc gel polyacrylamide 5% để phát hiện băng đa hình. Kết quả điện di của một số mồi SSR trên quần thể được thể hiện trên

hình 3.

Kết quả đánh giá đa hình của hai mươi hai cặp mồi với quần thể F3 cho thấy mức độ đa hình ở các locus chỉ thị trong quần thể là khá cao thể hiện qua bảng 1. Qua bảng 1 cho thấy, ở thế hệ F3 sự biến động về mặt phân tử trong quần thể là rất lớn. Số cá thể mang chỉ thị giống bố hoặc mẹ giao động từ 14% đến 60% và số cá thể mang chỉ thị giống cả bố và mẹ dao động từ 0% đến 52% tùy theo từng chỉ thị SSR.

Bảng 1. Mức độ đa hình của các cặp mồi SSR trong quần thể cây F3.

TT	Mồi	Số cá thể mang chỉ thị giống cây mẹ (%)	Số cá thể mang chỉ thị giống cây bố (%)	Số cá thể mang chỉ thị giống cả bố và mẹ (%)
1	RM1	35 (23,33)	52 (34,67)	62 (41,33)
2	RM17	41 (27,33)	35 (23,33)	74 (49,33)
3	RM19	51 (34,00)	34 (22,67)	65 (43,33)
4	RM21	40 (26,67)	32 (21,33)	78 (52,00)
5	RM38	37 (24,67)	78 (52,00)	35 (23,33)
6	RM72	22 (14,67)	55 (36,67)	73 (48,67)
7	RM102	55 (36,67)	69 (46,00)	26 (17,33)
8	RM153	49 (32,67)	51 (34,00)	50 (33,33)
9	RM159	38 (25,33)	34 (22,67)	78 (52,00)
10	RM161	60 (40,00)	27 (18,00)	63 (42,00)
11	RM169	21 (14,00)	88 (58,67)	41(27,33)
12	RM190	59 (39,33)	62 (41,33)	29 (19,33)
13	RM206	39 (26,00)	43 (28,67)	68 (45,33)
14	RM211	90 (60,00)	26 (17,33)	34 (22,67)
15	RM229	42 (28,00)	33 (22,00)	75 (50,00)
16	RM241	101(67,33)	46 (30,67)	0
17	RM259	53 (35,33)	62 (41,33)	30 (20,00)
18	RM270	110 (73,33)	40 (26,66)	0
19	RM276	39 (26,00)	56 (37,33)	55 (36,67)
20	RM277	30 (20,00)	33 (22,00)	78 (52,00)
21	RM310	58 (38,67)	86 (57,33)	4 (2,67)
22	RM311	57 (38,00)	71 (47,33)	21 (14,00)

Đánh giá sự đa dạng về hình thái hạt của các dòng trong quần thể

Một số đặc điểm hình thái hạt như: chiều dài, chiều rộng và tỷ lệ dài/rộng hạt được đánh giá trên quần thể cây F3. Đối với quần thể F3 từ cặp lai CR203 x Bắc thơm số 7 có thể chia ra thành 5 loại hình thái hạt: hạt ngắn nhỏ, hạt ngắn bầu, hạt trung bình, hạt dài nhỏ và hạt dài bầu (Hình 2) xuất phát từ hai loại hình thái hạt của bố mẹ là ngắn nhỏ và dài nhỏ.

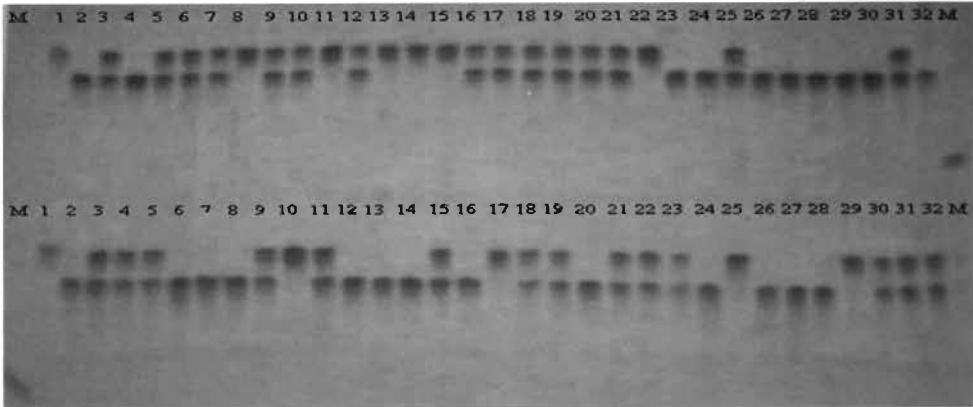
Sự đa dạng về các đặc điểm hình thái hạt của các dòng trong quần thể được thể hiện qua hình 3, 4, 5. Qua biểu đồ của sự biến động có thể nhận thấy tất cả các chỉ tiêu hình thái hạt đều thể hiện phân bố chuẩn liên tục theo dạng hình chuông một đỉnh. Tuy nhiên, đối với tính trạng chiều dài hạt, các dòng có xu hướng giữ nguyên hình dạng như giống làm mẹ (CR203). Trong khi tính trạng chiều rộng hạt có sự phân bố đồng đều hơn và tỷ lệ dài/rộng hạt có xu hướng nằm ở trung gian giữa hai giống bố và mẹ.

Kết quả này cũng phù hợp với kết quả thu được của các tác giả Wan và đồng tác giả (2008).

Mối liên quan giữa tính trạng hình thái hạt và các chỉ thị phân tử SSR

Số liệu đa hình với các chỉ thị SSR và số liệu về hình thái hạt của quần thể cây F3 được xử lý thống kê bằng chương trình phần mềm máy tính SAS để

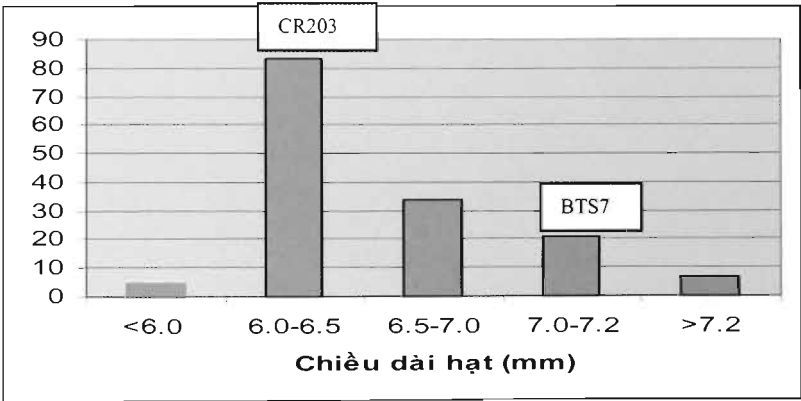
tim mối liên quan giữa chỉ thị phân tử và hình thái. Theo tính toán các chỉ thị có chỉ số R^2 đạt từ 0,1 trở lên và có $p \leq 0,005$ được xem là có sự liên quan đến một tính trạng hình thái được nghiên cứu. Trong số chỉ thị SSR nghiên cứu xác định được chỉ thị RM229 có liên quan đến tỷ lệ dài hạt/rộng hạt với $R^2 = 0,76$ và độ tin cậy $p \leq 0,001$. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Yoshida và đồng tác giả (2002).



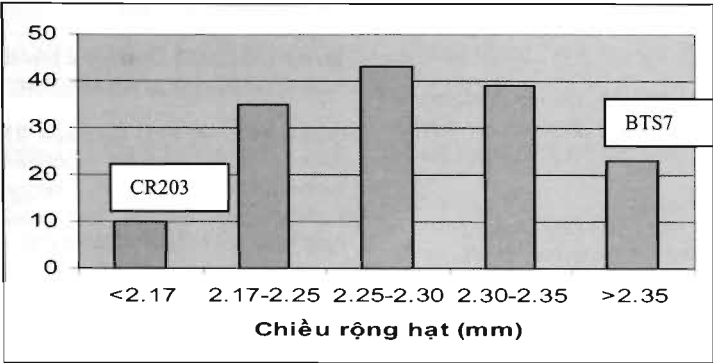
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide 5% của một số dòng trong quần thể với cặp mồi RM229: M – Marker 100 bp, 1 – BTS7, 2 – CR203, 3 – 32: một số dòng.



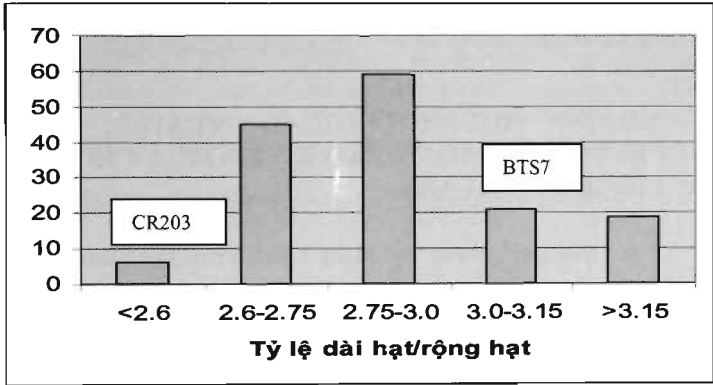
Hình 2. Hình thái 5 loại hạt trong quần thể F3. Từ trái sang phải: hạt ngắn nhỏ, hạt ngắn bầu, hạt trung bình, hạt dài nhỏ và hạt dài bầu



Hình 3. Biểu đồ sự biến động về chiều dài hạt của các dòng trong quần thể.



Hình 4. Biểu đồ sự biến động về chiều rộng hạt của các dòng trong quần thể.



Hình 5. Biểu đồ sự biến động về tỷ lệ dài hạt/rộng hạt của các dòng của quần thể.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Qua các kết quả thu được trong nghiên cứu có thể rút ra một số kết luận sau:

Mức độ đa hình của cây bố mẹ với các cặp môi SSR là khá cao đạt 26% (28 cặp môi cho đa hình trên tổng số 102 cặp môi được kiểm tra).

Đối với tính trạng chiều dài hạt, các dòng có xu hướng giữ nguyên hình dạng như giống làm mẹ (CR203), trong khi tính trạng chiều rộng hạt có sự phân bố đồng đều hơn và tỷ lệ dài hạt/rộng hạt có xu hướng nằm ở trung gian giữa hai giống bố và mẹ.

Ở quần thể F3 cho thấy sự biến động về mặt phân tử ở các locus chỉ thị SSR là rất cao, trong số 22 cặp môi nghiên cứu xác định được chỉ thị RM229 liên quan đến tỷ lệ dài hạt/rộng hạt.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành nhờ kinh phí của đề tài cơ sở Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đặng Quý Nhân, Ikuro Ando, Toshihiro Mochizuki (2009) Lập bản đồ QTLs (Quantitative trait loci) cho một số tính trạng rẽ lúa (*Oryza sativa* L.). *Kỷ yếu hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*: 279-283.

Kang HJ, Cho YG, Lee YT, Kim HS, Eun MY, Shim JU (1999) Detection of putative QTL conferring grain size and shape in rice. *Korean J Breed* 31(4): 330-335.

Kato T (1998) Isolation of individual quantitative trait loci causing long grain in rice. *JARQ* 32(4): 233-238.

Koutroubas SD, Mazzini F, Pons B, Ntanos D (2004) Grain quality variation and relationships with morphophysiological traits in rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources in Europe. *Field Crop Res* 86(2-3): 115-130.

<http://www.haiduongdost.gov.vn>

<http://www.vaas.org.vn>

Li Z, Wan J, Xia J, Yano M (2003) Mapping of quantitative trait loci controlling physico chemical properties of rice grains (*Oryza sativa* L.). *Breed Sci* 53: 209-215.

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.

Promuthai C, Sanchai C, Rerkasem B, Jamjod S, Fukai S, Godwin D, Huang L (2007) Effect of grain morphology on degree of milling and ion loss in rice. *Cereal Chemistry* 84(4): 384-388.

Redona ED, Mackill DJ (1998) Quantitative trait locus analysis for rice panicle and grain characteristics. *Theor*

Appl Genet 96: 957-963.

Zhang QF (2007) Strategies for developing Green Super Rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16402-16409.

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

Wan X, Weng J, Zhai H, Wang J, Lei C, Liu X, Guo T, Jiang L, Su N, Wan J (2008) Quantitative trait loci (QTL) analysis for rice grain width and fine mapping of identified QTL allele gw-5 in a recombination hotspot region on chromosome 5. *Genetics* 179: 2239-2252.

Yoshida S, Ikegami M, Kuze J, Sawada K, Hashimoto Z, Ishii T, Nakamura C, Kamijima O (2002) QTL analysis for plant and grain characters of Sake-brewing rice using a doubled haploid population. *Breed Sci* 52: 309-317.

VARIATION OF GRAIN MORPHOLOGICAL TRAITS AND MOLECULAR POLYMORPHISM IN F3 POPULATION DERIVED FROM A CROSS BETWEEN CR203 AND BAC THOM N° 7 RICE CULTIVARS

Nguyen Thi Kim Lien^{1,*}, Phan Thi Bay¹, Dang Thi Minh Lua¹, Tran Thi Luong², Nguyen Duc Thanh¹

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

SUMMARY

Grain morphology is the one of factors affected the production of rice. It have an important role in determination of the quality (Fe and protein content) and yield. The purpose of this research is to assess the variation of grain morphology traits and molecular polymorphism using SSR markers in a F3 population that derived from a cross between CR203 and Bac Thom N° 7 rice cultivars. 102 SSR primer pairs were used to determine polymorphism and 28 (26%) SSR primer pairs gave polymorphism between parents. 22 primer pairs were used to screen with the population. The results showed that the variation of the SSR loci in the investigated population was rather high. Grain morphology analysis showed that the grain length of the most of lines was similar to that of CR203, while the grain width was segregated evenly and the grain length to width ratio was in between CR203 and Bac Thom N° 7. Among the polymorphic SSR markers, RM229 was found to be linked to the grain length to width ratio.

Keywords: molecular marker, rice, QTL, SSR, grain morphology trait

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