

KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA CẠN ĐỊA PHƯƠNG (*Oryza sativa* L.)

Nguyễn Thị Ngọc Lan¹, Nguyễn Như Khanh², Chu Hoàng Mậu¹

¹ Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên; ² Trường đại học Sư phạm Hà Nội

Email*: ntnl2008@gmail.com

Ngày gửi bài: 28.07.2014

Ngày chấp nhận: 18.09.2014

TÓM TẮT

Tình trạng hạn hán gia tăng ở nhiều nơi trên thế giới trong đó có Việt Nam là nguyên nhân chính thúc đẩy các dự án, nghiên cứu phát triển các loại cây trồng có khả năng chống chịu hạn tốt mà vẫn đảm bảo được năng suất cao. Nhiều nghiên cứu tập trung vào việc xác định các đặc điểm hình thái và các chỉ số sinh lý, hóa sinh. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về bản chất của tính chịu hạn ở mức độ phân tử đã và đang được các nhà khoa học quan tâm đến. Khả năng chịu hạn của 25 giống lúa cạn địa phương ở thời kỳ mạ đã được xác định, giống Giàng bau là giống có khả năng chịu hạn tốt nhất, còn giống có khả năng chịu hạn thấp nhất là giống Khẩu lầy khao. Chúng tôi đã thiết lập sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 25 giống lúa cạn và xác định hệ số tương đồng giữa các giống lúa cạn là 79% đến 92% bằng kỹ thuật RAPD với 20 mồi ngẫu nhiên. Gen mã hoá LTP của hai giống lúa cạn địa phương có khả năng chịu hạn khác nhau đã được phân lập và xác định được chính xác trình tự nucleotide. Kết quả so sánh và phân tích trình tự gen mã hoá LTP của hai giống lúa cạn nghiên cứu và giống lúa Yukihihikari của Nhật Bản cho thấy, độ tương đồng về trình tự gen LTP của giống Giàng bau với giống Yukihihikari là 100%, giữa giống Giàng bau với giống Khẩu lầy khao có độ tương đồng là 98,1%. Còn khi đối chiếu trình tự amino acid của protein LTP giữa ba giống lúa này thì thấy giống Khẩu lầy khao có sự gia tăng lượng amino acid valine, giống Giàng bau là loại amino acid leucine.

Từ khóa: Chịu hạn, lúa cạn, LTPs.

Study on Drought Tolerance of Some Local Upland Rice Varieties (*Oryza sativa* L.)

ABSTRACT

Increased drought in many parts of the world is a major cause of promoting the projects and researches to develop drought-resistant crops with high productivity. A great deal of researches focused on identifying morphological characteristics, biochemical and physiological parameters. Besides, studies on the nature of drought tolerance at the molecular level have been scientists' interest. Drought tolerance of 25 local upland rice varieties at the seedling stage was identified, wherein Giang Bau was found to show the best drought tolerance variety while Khau lay khao exhibited lowest degree of drought tolerance. The use of RAPD marker with 20 random primers revealed genetic relationship of 25 local upland rice varieties with the coefficients of similarity among upland rice cultivars ranging from 79% to 92%. LTP coding genes of two local upland rice varieties with different drought resistance was isolated and identified. The comparison and analysis of LTP gene sequences among two local upland rice varieties (Giang bau and Khau lay khao) and a Japanese rice variety (Yukihihikari) showed that the genetic similarity of LTP gene sequences between Yukihihikari and Giang bau is 100% and the genetic similarity of LTP gene sequences between Giang bau and Khau lay khao is 98.1%. Comparing amino acid sequences of LTP proteins among these three varieties showed an increase of amino acid valine residue in Khau lay khao's LTP protein and an increase of the amino acid leucine residue in Giang bau's LTP protein.

Keywords: Drought tolerance, LTPs, upland rice.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa cạn là cây trồng truyền thống và là nguồn lương thực quan trọng của người dân miền núi. Cây lúa cạn Việt Nam phân bố chủ yếu ở vùng núi phía Bắc, vùng duyên hải Trung bộ và Tây Nguyên của Việt Nam (Trần Văn Đạt, 2005). Hiện nay, các giống lúa cạn địa phương trong sản xuất đang bị mất đi nhanh chóng do ảnh hưởng của sự biến đổi khí hậu, tập quán canh tác và nhiều nguyên nhân khác. Vì thế việc sưu tập, bảo tồn và đánh giá nguồn gen cây lúa cạn địa phương là một việc cấp thiết góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng nguồn gen cây lúa.

Tình trạng hạn hán gia tăng ở nhiều nơi trên thế giới trong đó có Việt Nam là nguyên nhân chính thúc đẩy các dự án, nghiên cứu phát triển các loại cây trồng có khả năng chống chịu hạn tốt mà vẫn đảm bảo được năng suất nhằm đáp ứng với nhu cầu ngày càng gia tăng của con người trong khi nguồn nước cung cấp cho sản xuất nông nghiệp đang dần khan hiếm (Longenberger et al., 2007), (Somerville et al., 2001), (Zhang et al., 2004). Nhiều nghiên cứu tập trung vào việc xác định các đặc điểm hình thái và các chỉ số sinh lý, hóa sinh đặc trưng cho các giống cây trồng chịu hạn như đặc điểm bộ rễ, lá... (Trần Nguyên Thập, 2001), M. Hassanzadeh et al., (2009) đã đề nghị có thể dựa vào hàm lượng diệp lục b và diệp lục tổng số để tuyển chọn giống chịu hạn và có năng suất cao. Khi nghiên cứu về tính chịu hạn ở cây lạc (*Arachis hypogaea* L.), Arunyanark, A et al., (2008) đã khẳng định sự ổn định của diệp lục là một chỉ tiêu đặc trưng cho tính chịu hạn ở lạc.

Các nghiên cứu về bản chất của tính chịu hạn ở mức độ phân tử đã và đang được các nhà khoa học quan tâm đến. Tuy nhiên, hiện nay các nhà khoa học vẫn chưa xác định được gen điều khiển tính chịu hạn, mà chỉ xác định được các gen liên quan đến tính chịu hạn. Nhiều nhóm gen liên quan đến khả năng chịu mất nước của tế bào đã được đọc trình tự và công bố như: gen chaperonin (Trần Thị Phương Liên và cs., 2003), gen dehydrin (Chu Hoàng Mậu và cs., 2007)... Gen mã hóa lipid transfer proteins (LTPs) thuộc họ gen pathogenesis - related protein, có khả

năng tổng hợp protein thúc đẩy quá trình vận chuyển phospholipid tới màng. LTP còn hỗ trợ việc tạo ra lớp sáp hoặc lớp biểu bì giúp thực vật bảo vệ, phản ứng và đáp ứng lại những thay đổi của môi trường (Kader, 1996). Gen mã hóa LTPs lần đầu tiên được Tchang et al., phân lập từ mRNA và đọc trình tự cDNA ở cây ngô vào năm 1988, sau đó là nhiều trình tự trên các đối tượng khác nhau được công bố như ở cà chua (Torres Schumann et al., 1992), *Arabidopsis thaliana* (Thoma et al., 1994), thuốc lá (Masuta et al., 1992) và ở cây đậu xanh (Chu Hoàng Mậu và cs., 2009).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu về khả năng chịu hạn của một số giống lúa cạn địa phương trên cơ sở kết hợp giữa việc đánh giá chỉ số chịu hạn tương đối, xác định mối quan hệ di truyền của 25 giống lúa cạn và so sánh trình tự gen LTP giữa giống lúa có khả năng chịu hạn tốt với giống lúa có khả năng chịu hạn kém.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

25 giống lúa cạn địa phương do Trung tâm Tài nguyên Di truyền thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Tên địa phương, kí hiệu của các giống nghiên cứu và địa điểm thu mẫu được thể hiện ở bảng 1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của các giống lúa cạn địa phương ở giai đoạn mạ theo phương pháp của Lê Trần Bình và cs., (1998). Chỉ số chịu hạn được xác định theo công thức:

$$S = \frac{1}{2\sqrt{2}} (ab + bc + \dots + ga)$$

Trong đó: S là chỉ số chịu hạn tương đối; a là phần trăm cây không héo sau để hạn 1 ngày; b là phần trăm cây phục hồi sau 1 ngày tưới nước; c là phần trăm cây không héo sau để hạn 3 ngày; d là phần trăm cây phục hồi sau 3 ngày tưới nước; e là phần trăm cây không héo sau để hạn 5 ngày; g là phần trăm cây phục hồi sau 5 ngày tưới nước.

Bảng 1. Danh sách các giống lúa cận nghiên cứu

TT	Kí hiệu	Tên địa phương	Nguồn gốc	TT	Kí hiệu	Tên địa phương	Nguồn gốc
1	Bcc	Blào cô cá	Sơn La	14	Kp	Khẩu pe	Sơn La
2	Bcs	Blào chinh sái	Hoà Bình	15	Kpl	Khẩu pe lạnh	Sơn La
3	Bct	Blào cong ton	Hoà Bình	16	Kt	Khẩu thên	Bắc Kạn
4	Bic	Biều chim trí	Bắc Kạn	17	Kx	Khẩu xe	Sơn La
5	Blt	Blề tở	Lai Châu	18	Ln	Lúa nương	Hà Giang
6	Blx	Ble xen xi	Sơn La	19	Lo	Lúa ổi	Hoà Bình
7	Bsn	Blào sa ngay	Sơn La	20	Ltn	Lúa tẻ nương	Hà Giang
8	Gb	Giăng bau	Quảng Ninh	21	Md	Mồ dầm	Bắc Kạn
9	Kk	Khẩu kén	Cao Bằng	22	Mt	Mộ trắng	Lào Cai
10	Kld	Khẩu lầy deng	Cao Bằng	23	Nn	Nếp nương	Hoà Bình
11	Klk	Khẩu lầy khao	Cao Bằng	24	Nro	Ngo rí ợ	Lai Châu
12	Km	Khẩu mô	Sơn La	25	Ss	Soam sí	Tuyên Quang
13	Kn	Khẩu ghé	Tuyên Quang				

Tách chiết ADN tổng số theo phương pháp Gawel and Jarret (1991). Chúng tôi tiến hành thực hiện phản ứng PCR với 20 môi RAPD (Bảng 2). Mỗi phản ứng PCR có tổng thể tích là 20µl bao gồm: 1µl dung dịch ADN 10 ng/µl, 2µl buffer PCR 10X, 2µl MgCl₂ 25mM, 1,2µl dNTPs 10mM, 1,6µl primer 10 pmol/µl, 0,5µl Taq polymerase 1u/µl, 11,7µl nước khử ion. Chu trình nhiệt của phản ứng là 1 chu kỳ 94°C trong 1 phút; 45 chu kỳ: 92°C trong 30 giây, 36°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 10 phút và lưu giữ mẫu ở 4°C. Điện di sản phẩm RAPD trên bản gel agarose 2% trong đệm

TAE 1X. Nhuộm gel bằng ethidium bromide và chụp ảnh. Sử dụng phần mềm NTSYSpc (USA, 1998) để phân tích các kết quả nghiên cứu.

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp môi LTPrF - LTPrR được thiết kế dựa trên trình tự cDNA phân lập từ giống lúa Yukihikari (Nhật Bản) được công bố bởi Mukai et al., (2003) ở GenBank với mã số AY466108, cặp môi được tổng hợp tại hãng Invitrogen, trình tự cặp môi là:

LTPrF: 5'ATGGCCGGCAAGAAGGTGC3'

LTPrR: 5'TTAGAGAGGGCAGGTGAAGTC3'

Bảng 2. Kí hiệu và trình tự các nucleotide của 20 môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

Kí hiệu môi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Kí hiệu môi	Trình tự nucleotide (5'-3')
M1	AACCGACGGG	M11	CGGCCCACGT
M2	GGGGGTCGTT	M12	AACGCGTAGA
M3	TACCACCCCG	M13	GCCACGGAGA
M4	GGCGGACTGT	M14	TAGGCGAACG
M5	TCGGCGATAG	M15	CACGGCTGCG
M6	GTGTCTCAGG	M16	GTATGGGGCT
M7	CAGCACCCAC	M17	GCGAACCTCG
M8	GGAAGTCGCC	M19	CCTGCTCATC
M9	CCTCCAGTGT	M20	GACAGGAGGT
M10	CTATGCCGAC	TRA4	CACCGTAGCG

Chu trình nhiệt của phản ứng là 94°C trong 3 phút; 30 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 56°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút), 72°C trong 10 phút và lưu giữ mẫu ở 4°C. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel bằng ethidium bromide và chụp ảnh.

Tách dòng gen được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ hoá chất DNA Gel Extraction và được dòng hoá vào vector pBT DH α sử dụng bộ kit Rapid DNA Ligation. Sau khi biến nạp, chọn lọc khuẩn lạc theo phương pháp chỉ thị màu và kháng sinh.

Trình tự gen LTP được đọc trên thiết bị tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Sử dụng phần mềm DNASTAR để phân tích kết quả.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng chịu hạn của các giống lúa cạn ở giai đoạn mạ 3 lá

Trong quá trình sinh trưởng phát triển của cây lúa, thời kỳ mạ và thời kỳ trổ bông là thời kỳ cây lúa dễ bị tổn thương do những tác động bất lợi của điều kiện ngoại cảnh. Đối với cây lúa cạn, sự sinh trưởng phát triển chủ yếu dựa vào nguồn nước tự nhiên là nước mưa, ở thời kỳ cây mạ, hạn có ảnh hưởng lớn hơn so với các thời kỳ sau trong chu trình sống của cây lúa cạn. Bởi lẽ,

cây lúa cạn thường được gieo vào đầu mùa mưa, khi đó nguồn cung cấp nước cho cây lúa cạn chưa được ổn định như các thời kỳ sinh trưởng phát triển tiếp theo của chúng, khi đã vào thời điểm giữa mùa mưa trong năm. Do đó, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn ở thời kỳ cây mạ dựa trên việc xác định chỉ số chịu hạn tương đối của từng giống lúa cạn nghiên cứu. Chỉ số chịu hạn tương đối được tính theo các chỉ tiêu là tỷ lệ phần trăm cây không héo và tỷ lệ phần trăm cây phục hồi sau 1, 3, 5 ngày gây hạn nhân tạo. Chỉ số chịu hạn tương đối càng lớn thì khả năng chịu hạn của cây càng cao và ngược lại. Đây là cơ sở để đánh giá và tuyển chọn nhanh giống lúa có khả năng chịu hạn. Kết quả xác định chỉ số chịu hạn của 25 giống lúa cạn địa phương được trình bày ở bảng 3.

Trong các giống lúa cạn nghiên cứu, đa số (12 giống) có chỉ số chịu hạn tương đối cao đạt trên 10.000, chiếm 48%. Các giống có chỉ số chịu hạn tương đối thấp hơn (khoảng 8141,37 - 9718,64), trong nghiên cứu này có thể xếp ở nhóm trung bình, có tỷ lệ là 28%. Còn lại là các giống có chỉ số chịu hạn thấp 24% (gồm có 6 giống: Blx, Kld, Klk, Kpl, Kt, Kx). Như vậy, đa số các giống lúa cạn nghiên cứu là có khả năng chịu hạn khá và trung bình chiếm tới 76% tổng số giống được đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn mạ. Điều này thể hiện đặc tính thích nghi

Bảng 3. Chỉ số chịu hạn tương đối

Giống	Chỉ số chịu hạn	Giống	Chỉ số chịu hạn
Bcc	11220,67	Kp	8718,02
Bcs	10055,22	Kpl	7831,56
Bct	9082,88	Kt	7859,19
Bic	8141,37	Kx	7606,85
Blt	10023,33	Ln	11544,18
Blx	7346,94	Lo	9531,10
Bsn	13296,71	Ltn	10322,50
Gb	13840,71	Md	12113,07
Kk	8457,94	Mt	10210,80
Kld	7814,57	Nn	11151,75
Klk	7217,72	Nro	9657,25
Km	9718,64	Ss	11980,60
Kn	12133,16		

với điều kiện sống khô hạn trên đất cao của cây lúa cận là tính chịu hạn - là khả năng của nó có thể chịu được một sự khô hạn nhất định trong các tế bào và mô, và khả năng phục hồi lại nhanh khi có nước.

Như vậy, có thể xếp khả năng chịu hạn theo thứ tự giảm dần của các giống lúa là: Gb > Bsn > Kn > Md > Ss > Ln > Bcc > Nn > Ltn > Mt > Bcs > Blt > Km > Nro > Lo > Bct > Kp > Kk > Bic > Kt > Kpl > Kld > Kx > Blx > Klk.

3.2. Sự phân nhóm của các giống lúa cận có khả năng chịu hạn khác nhau dựa trên kết quả phân tích bằng kỹ thuật RAPD

Dựa trên kết quả phân tích đa hình ADN bằng kỹ thuật RAPD (Hình 1), chúng tôi đã xác định mối quan hệ và khoảng cách di truyền của các giống lúa nghiên cứu (Hình 2).

Hình 2 cho thấy các giống lúa được chia làm hai nhánh chính với khoảng cách di truyền là 21% (1 - 0,79). Nhánh chính thứ nhất tập trung các giống thuộc loài phụ *Indica*, chỉ có Blt là giống thuộc loài phụ *Japonica*. Nhánh này chia làm hai nhóm I và II. Nhóm I chỉ có một giống Mt, nhóm II gồm 10 giống (Klk, Bic, Km, Blx,

Kx, Kld, Kk, Blt, Kp, Kpl), hai nhóm I và II có khoảng cách di truyền là 20% (1 - 0,8).

Nhánh chính thứ hai gồm 14 giống đều thuộc loài phụ *Japonica*. Nhánh này gồm nhánh phụ thứ nhất có 3 nhóm: nhóm III gồm hai giống Ln và Bsn, nhóm IV gồm 10 giống, (Bcc, Bct, Ltn, Bcs, Kt, Nro, Lo, Ss, Kn, Kd), trong đó hai giống lúa Bcc và Bct có khoảng cách di truyền thấp nhất (8%); nhóm V chỉ có một giống là Md. Nhánh phụ thứ hai có hai giống Gb và Nn, có khoảng cách di truyền với nhánh phụ thứ nhất là 18,75% (1 - 0,8125).

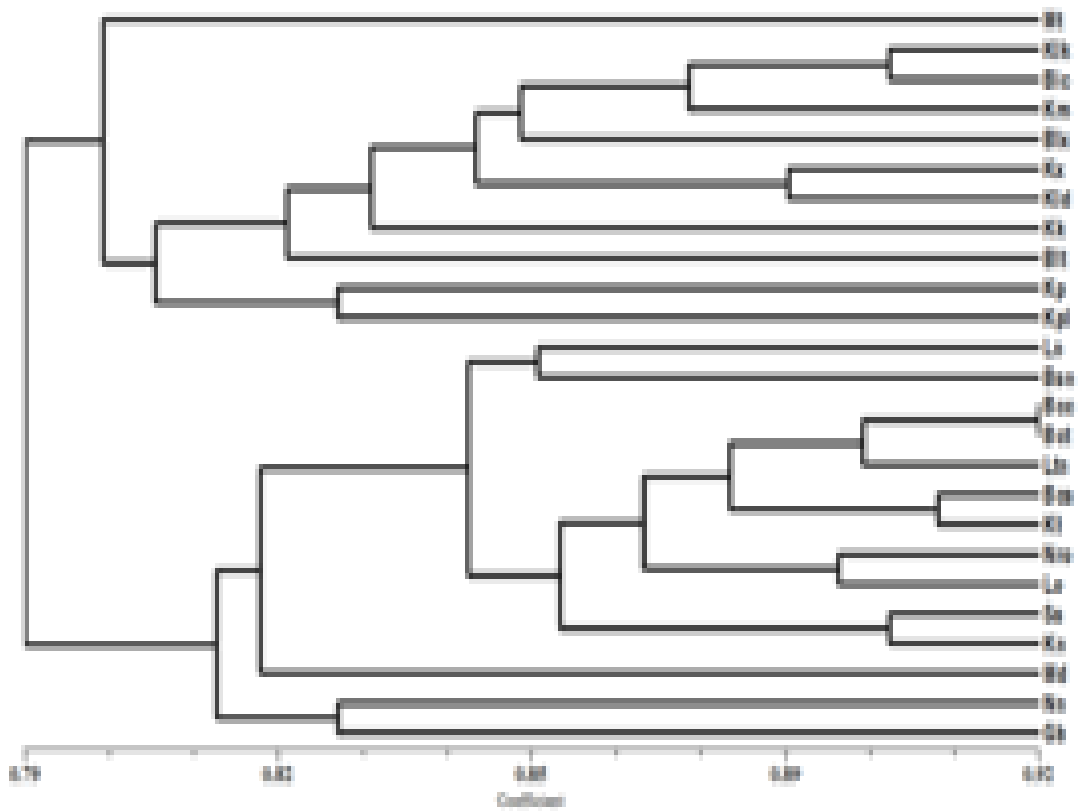
3.3. Kết quả so sánh gen liên quan đến khả năng chịu hạn

Để tìm hiểu mối liên quan giữa những thay đổi trong trình tự gen và trình tự protein với khả năng chịu hạn của cây lúa cận, chúng tôi đã chọn ra hai giống lúa có khả năng chịu hạn khác nhau để tiến hành phân tích và so sánh trình tự gen LTP cũng như trình tự protein LTP, trong đó giống Giàng bau (Gb) là giống thuộc nhóm có khả năng chịu mất nước tốt, còn giống Khẩu lấy khao (Klk) thuộc nhóm kém về khả năng chịu mất nước.

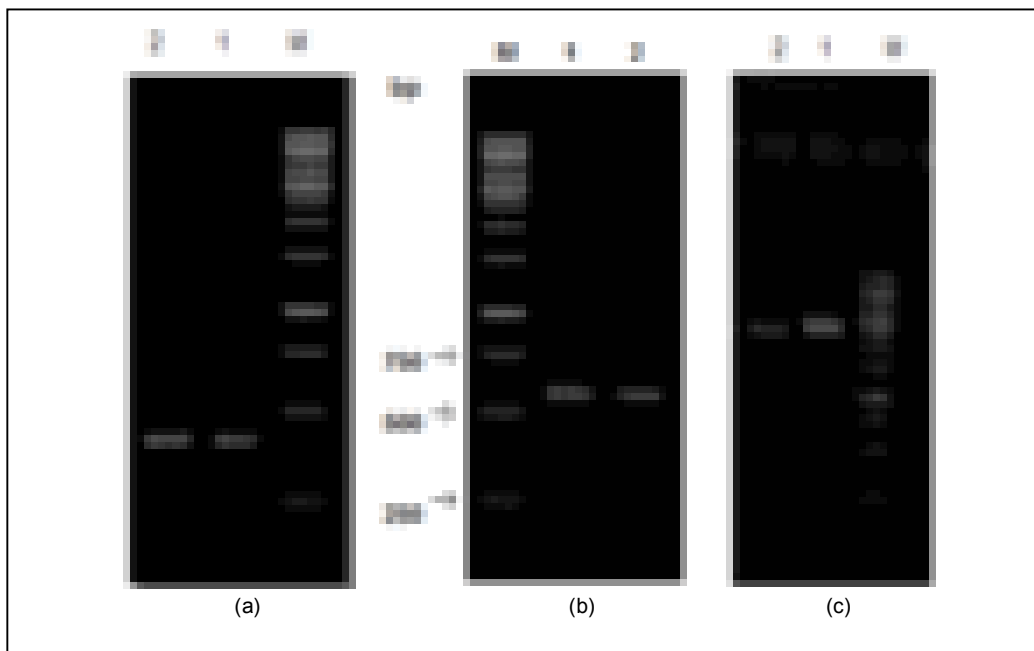


Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD với mỗi M7

Ghi chú: M-marker, 1- Mt, 2- Klk, 3- Kk, 4- Blt, 5- Ln, 6- Bcc, 7- Km, 8- Ltn, 9- Blx, 10- Kp, 11- Kpl, 12- Kx, 13- Kld, 14- Nn, 15- Nro, 16- Lo, 17- Bct, 18- Bcs, 19- Kt, 20- Bic, 21- Ss, 22- Kn, 23- Md, 24- Bsn, 25- Gb



Hình 2. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ di truyền của 25 giống lúa cạn



Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm PCR (a), (b) và plasmid (c)

Ghi chú: M: thang AND chuẩn, 1. Giàng bau, 2. Khẩu lấy khao

Khả năng chịu hạn của một số giống lúa cận địa phương (*Oryza sativa* L.)

					
	10	20	30	40	50
Giangbau	ATGGCCGGCA	AGAAGGTGCA	GGTTTGTGCG	CTGTTCCCT--	-TGCCCTCAA
Khaulaykhao	ATGGCCGGCA	AGAAGGTGCA	GGTTTGTGCG	GTGTTCCGTG	TTGCTCTGAA
Yukihikari	ATGGCCGGCA	AGAAGGTGCA	GGTTTGTGCG	CTGTTCCCT--	-TGCCCTCAA
					
	60	70	80	90	100
Giangbau	TGTGCTCTTC	ACCATGCAGA	TGGGTGCAGT	AGTGCAGGCA	TGCGAGCCCT
Khaulaykhao	TATGCTCATC	TCCATGCAGA	TGGGTGCAGT	AGTGCAGGCA	TGCGAGCCCT
Yukihikari	TGTGCTCTTC	ACCATGCAGA	TGGGTGCAGT	AGTGCAGGCA	TGCGAGCCCT
					
	110	120	130	140	150
Giangbau	ACTGCCCCAC	ACCGACGCCG	CCGGTGACGC	CGCCTCCGTC	GCCGCCGTGCG
Khaulaykhao	ACTGCCCCAC	ACCGACGCCG	CCGGTGACGC	CGCCTCCGTC	GCCGCCGTGCG
Yukihikari	ACTGCCCCAC	ACCGACGCCG	CCGGTGACGC	CGCCTCCGTC	GCCGCCGTGCG
					
	160	170	180	190	200
Giangbau	GGTGGAGGGA	ATAAGTGCCC	GATCGACGCG	CTGAAGCTGA	GCGTGTGCGC
Khaulaykhao	GGTGGAGGGA	ATAAGTGCCC	GATCGACGCG	CTGAAGCTGA	GCGTGTGCGC
Yukihikari	GGTGGAGGGA	ATAAGTGCCC	GATCGACGCG	CTGAAGCTGA	GCGTGTGCGC
					
	210	220	230	240	250
Giangbau	CAACGTGCTC	AACCTGCTGA	AGCTGAAGAT	CGGCGTGCCG	GAGAGCGAGC
Khaulaykhao	CAACGTGCTC	AACCTGCTGA	AGCTGAAGAT	CGGCGTGCCG	GAGAGCGAGC
Yukihikari	CAACGTGCTC	AACCTGCTGA	AGCTGAAGAT	CGGCGTGCCG	GAGAGCGAGC
					
	260	270	280	290	300
Giangbau	AGTGCTGCCC	GTGGCTGGGT	GGCCTCGTCG	ACCTCGACGC	CGCCGTCTGC
Khaulaykhao	AGTGCTGCCC	GTGGCTGGGT	GGCCTCGTCG	ACCTCGACGC	CGCCGTCTGC
Yukihikari	AGTGCTGCCC	GTGGCTGGGT	GGCCTCGTCG	ACCTCGACGC	CGCCGTCTGC
					
	310	320	330	340	350
Giangbau	CTCTGCACCG	CCATCAAGGC	CAACATCCTC	GGCATCAATC	TCAACATCCC
Khaulaykhao	CTCTGCACCG	CCATCAAGGC	CAACATCCTC	GGCATCAATC	TCAACATCCC
Yukihikari	CTCTGCACCG	CCATCAAGGC	CAACATCCTC	GGCATCAATC	TCAACATCCC
					
	360	370	380	390	400
Giangbau	CGTCGATCTC	TCTCTCCTTC	TCAACTACTG	CCACAAGACC	TGCCCCCTCCG
Khaulaykhao	CGTCGATCTC	TCTCTCCTTC	TCAACTACTG	CCACAAGACC	TGCCCCCTCCG
Yukihikari	CGTCGATCTC	TCTCTCCTTC	TCAACTACTG	CCACAAGACC	TGCCCCCTCCG
					
	410	420			
Giangbau	ACTTCACCTG	CCCTCTCTAA			
Khaulaykhao	ACTTCACCTG	CCCTCTCTAA			
Yukihikari	ACTTCACCTG	CCCTCTCTAA			

Hình 4. Trình tự gen LTP của 3 giống Giàng bau, Khẩu lầy khao và Yukihikari

Sau khi đã nhân được đoạn gen mã hoá LTP (Hình 3a), chúng tôi tiến hành thôi gel để thu được sản phẩm PCR tinh sạch và tiếp tục dòng hoá vào vector pBT DH α , sau đó biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5 α . Các khuẩn lạc trắng được chọn nuôi trong môi trường dinh dưỡng lỏng. Để kiểm tra sản phẩm chọn dòng, chúng tôi sử dụng cặp mồi pUC18 cho phản ứng PCR. Đây là loại mồi thiết kế chung cho các vector tách dòng giúp nhân đoạn gen vừa biến nạp cùng với đoạn vector ở hai đầu nối với gen biến nạp nên kích thước của sản phẩm sẽ cao hơn đoạn gen mã hoá LTP. Kết quả kiểm tra cho thấy kích thước của sản phẩm PCR với mồi pUC18 vào khoảng 0,52Kp (hình 3b) đã chứng tỏ gen mã hoá LTP được biến nạp vào vector và đã chọn được dòng mang gen LTPs. Plasmid tái tổ hợp được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET™ Plasmid Miniprep, sản phẩm ADN plasmid được kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 3c).

Kết quả giải trình tự gen LTP được thể hiện trên hình 4. Gen LTP của giống Giăng bau gồm có 417 nucleotide và bằng với số nucleotide của giống lúa Yukihihikari (trình tự gen của giống Yukihihikari là lấy từ Ngân hàng gen quốc tế); còn ở giống Khẩu lấy khao, gen LTP gồm 420

nucleotide, nhiều hơn hai giống Giăng bau và Yukihihikari 3bp (CGT) ở các vị trí nucleotide số 39, 40 và 41.

So sánh trình tự gen của giống Giăng bau với giống Yukihihikari cho thấy tỷ lệ tương đồng của hai giống này là 100%. Giống Khẩu lấy khao có tỷ lệ tương đồng đạt 98,1% so với hai giống Giăng bau và Yukihihikari, trong đó có 12 vị trí nucleotide thay đổi cụ thể là ở các điểm: 31, 37, 39, 40, 41, 45, 48, 52, 55, 58, 61 và 263 (Hình 4).

Trình tự gen LTP của hai giống lúa cận Giăng bau và Khẩu lấy khao là những trình tự gen đầu tiên được phân lập từ ADN hệ gen, so với trình tự gen LTP hoàn chỉnh được phân lập từ mARN của giống Yukihihikari cho thấy hai trình tự gen LTP mà chúng tôi phân lập và đọc trình tự đều không mang đoạn intro.

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn trong protein do gen LTP mã hoá cho thấy có 7 điểm thay đổi loại amino acid giữa giống Khẩu lấy khao với hai giống Giăng bau và Yukihihikari (Hình 5). Trong đó, có bốn vị trí chuyển từ loại amino acid leucine của protein LTP của giống Giăng bau thành loại amino acid

					
	10	20	30	40	50
Giangbau	MAGKKVQVCA	LF-LALNVLF	TMQMGAVVQA	CEPYCPTPTP	PVTTPPPSPPS
Khaulaykhao	MAGKKVQVCA	VFVVALNMVI	SMQMGAVVQA	CEPYCPTPTP	PVTTPPPSPPS
Yukihihikari	MAGKKVQVCA	LF-LALNVLF	TMQMGAVVQA	CEPYCPTPTP	PVTTPPPSPPS
					
	60	70	80	90	100
Giangbau	GGGNKCPIDA	LKLSVCANVL	NLLKLKIGVP	ESEQCCPLL	GLVDLDAAVC
Khaulaykhao	GGGNKCPIDA	LKLSVCANVL	NLLKLKIGVP	ESEQCCPLL	GLVDLDAAVC
Yukihihikari	GGGNKCPIDA	LKLSVCANVL	NLLKLKIGVP	ESEQCCPLL	GLVDLDAAVC
					
	110	120	130		
Giangbau	LCTAIKANIL	GINLNIPVDL	SLLLNYCHKT	CPSDFTCPL	
Khaulaykhao	LCTAIKANIL	GINLNIPVDL	SLLLNYCHKT	CPSDFTCPL	
Yukihihikari	LCTAIKANIL	GINLNIPVDL	SLLLNYCHKT	CPSDFTCPL	

Hình 5. So sánh trình tự amino acid suy diễn trong protein do gen LTP mã hoá

valine ở protein LTP của giống Khẩu lấy khảo, cụ thể là ở các vị trí amino acid số: 11, 13, 14 và 19. Sự chuyển loại amino acid khác nhau của protein LTP của hai giống lúa cận nghiên cứu dẫn tới kết quả là giống Khẩu lấy khảo có sự gia tăng lượng amino acid valine, còn ở giống Giăng bau là loại amino acid leucine. Các thay đổi loại amino acid ở ba vị trí còn lại của giống Giăng bau là sự chuyển đổi từ Val ở vị trí 18 thành Met, ở vị trí 20 Phe → Ile và Thr → Ser ở vị trí 21 so với giống Khẩu lấy khảo. Như vậy, sự sai khác về trình tự nucleotide và trình tự amino acid giữa các giống lúa có khả năng chịu hạn tốt và chịu hạn kém có thể làm thay đổi mức độ biểu hiện của gen LTP. Và sự thay đổi đó làm cho các giống chịu hạn tốt có mức độ biểu hiện gen cao hơn so với các giống chịu hạn kém

4. KẾT LUẬN

Khả năng chịu hạn của 25 giống lúa cận địa phương ở giai đoạn mạ đã được xác định. Trong đó, giống Gb là giống có khả năng chịu hạn tốt nhất còn thấp nhất là giống Klk.

Đã thiết lập sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 25 giống lúa cận và xác định hệ số tương đồng giữa các giống lúa cận là 79% đến 92% bằng kỹ thuật RAPD với 20 mẫu ngẫu nhiên.

Đã phân lập và xác định được chính xác trình tự gen mã hoá LTP từ hai giống lúa cận địa phương có khả năng chịu hạn khác nhau. Độ tương đồng về trình tự gen LTP của giống Giăng bau với giống Yuki hikari của Nhật Bản là 100% và giữa giống Giăng bau với giống Khẩu lấy khảo có độ tương đồng là 98,1%. Trong trình tự amino acid của protein LTP của giống Khẩu lấy khảo có sự gia tăng lượng amino acid valine, còn ở giống Giăng bau là loại amino acid leucine.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arunyanark, A; Jogloy, S; Akkasaeng, C; Vorasoot, N; Kesmala, T; Nageswara Rao, R. C; Wright, G. C; Patanothai, A. (2008). Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2): 113-125.

Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998). Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội.

Trần Văn Đạt (2005). Sản xuất lúa gạo thế giới: Hiện trạng và khuynh hướng phát triển trong thế kỷ 21. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Gawel N.J. and Jarret R.L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 262-266.

M. Hassanzadeh, A. Ebadi, M. Panahyan-e-Kivi, A.G. Eshghi, Sh. Jamaati-e-Somarin, M. Saeidi and R. Zabihi-e-Mahmoodabad. (2009). Evaluation of Drought Stress on Relative Water Content and Chlorophyll Content of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Genotypes at Early Flowering Stage. *Research Journal of Environmental Sciences*. (3): 345-350.

Jean-Claude Kader (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Reviews. Plant Physiology*, 47: 627-654.

Trần Thị Phương Liên, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Đăng Tôn, Cao Xuân Hiếu, Nông Văn Hải, Lê Thị Muội, Trần Đình Long (2003). Nghiên cứu sự đa dạng của gen chaperonin CCT8 ở cây đậu tương. *Tạp chí Sinh học*, 25(3): 77-82.

Longenberger, Polly; Smith, Wayne; Burke, John; McMichael, Bobbie (2007). Drought tolerance classification via chlorophyll fluorescence in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Characterization and enhancement of plant resistance to water-deficit and thermal stresses. *Plant Stress and Germplasm Development. ASA-CSSA-SSSA Annual Meeting Abstracts*.

Masuta, C., Furuno, M., Tanaka, H., Yamada, M. and Koiwai, A. (1992). Molecular cloning of a cDNA clone for tobacco lipid transfer protein and expression of the functional protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 311 (2): 119-123

Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Thu Hiền (2007). Đánh giá khả năng chịu hạn và tách dòng gen mã hoá protein dehydrin (LEA-11) của một số giống đậu tương (*Glycine max* L.) địa phương miền núi. *Tạp chí Sinh học*, 29 (4): 31-41.

Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Trần Thúy Liên, Nguyễn Thị Mai Lan (2009). Tách dòng gen LTP (Lipid transfer proteins) của cây đậu xanh, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Thái Nguyên*, 52 (4): 94-98.

Mukai, T., Sakaki, T. and Akiyama, T. (2003). A gene coding for putative lipid transfer protein (LTP) is down-regulated by drought stress, ABA and methyl jasmonate in rice (*Oryza sativa* L.). *Oryza sativa (japonica* cultivar-group) lipid transfer protein-like protein (LTP1) mRNA, complete cds. AY466108. [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

- Rohlf FJ, (2000). *NTSYS-pc*: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York.
- Sambrook J., Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Cold Spring Haror Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Somerville C, Briscoe J (2001). Genetic engineering and water. *Science*, 292: 2217.
- Tchang, F., This, P., Stiefel, V., Arondel, V., Morch, M.-D., Pages, M., Puigdomenech, P. Grellet, F., Delseny, M., Bouillon, P., Huet, J.-C., Guerbette, F., Beauvais-Cante, F., Duranton, H., Pernollet, J.-C. and Kader, J.-C. (1988). Phospholipid transfer protein: full-length cDNA and amino acid sequence in maize. Amino acid sequence homologies between plant phospholipid transfer proteins. *J. Biol. Chem.*, 263 (32): 16849-16855
- Trần Nguyên Tháp (2001). Nghiên cứu xác định một số đặc trưng của các giống lúa chịu hạn và chọn tạo giống lúa chịu hạn CH5. *Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp*. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam.
- Torres-Schumann, S., Godoy, J.A. and Pintor-Toro, J.A. (1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol*, 18 (4): 749-757.
- Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J., De Vries, S. and Somerville, C. (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 105 (1): 35-45
- Zhang JZ, Creelman RA, Zhu J-K. (2004). “From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops”. *Plant Physiol*, 135: 615-621.