

Molecular characterization of submergence tolerance genes and locus in the North-East Indian rice cultivars

Xác định đặc tính phân tử của các gen liên quan đến khả năng chống chịu ngập ở một số giống lúa vùng Đông Bắc Ấn Độ

NCS: NGUYỄN VĂN CỬU

Người hướng dẫn: Dr. Sadhu Leelavathi

Plant Transformation Group

International center for Genetic Engineering and Biotechnology,

New Delhi, India (ICGEB)

2012-2016

Ý tưởng chính toàn luận án:

- Các giống lúa chống ngập thông qua hình thức vươn lóng nhanh (cơ chế trốn thoát-escape strategies, lúa nổi), Cơ chế cảm ứng oxygen. Snorkel genes
 - các giống chống chịu,(cơ chế chịu đựng, flash flood). Sub1- Swarna, sub1 genes
 - Sau khi nước lũ rút đi, các giống lúa đổ gãy, hồi phục kém.... Dẫn đến năng suất thấp, rất thấp.
 - Thành công của việc ứng dụng gen bán lùn, semi- dwarf trong chọn tạo giống lúa cao sản.
- ➔ Tăng cường khả năng chống chịu ngập của các giống lúa, đồng thời ức chế các gen Snorkel, giảm chiều cao cây, tăng tiềm năng năng suất hạt ở các giống lúa nổi thông qua chuyển các gen Sub1 (Sub1A1 & Sub1B).

Đối tượng cây trồng, vật liệu, phương pháp



Swarna-Sub1 in UP (Faizabad, India), 2008



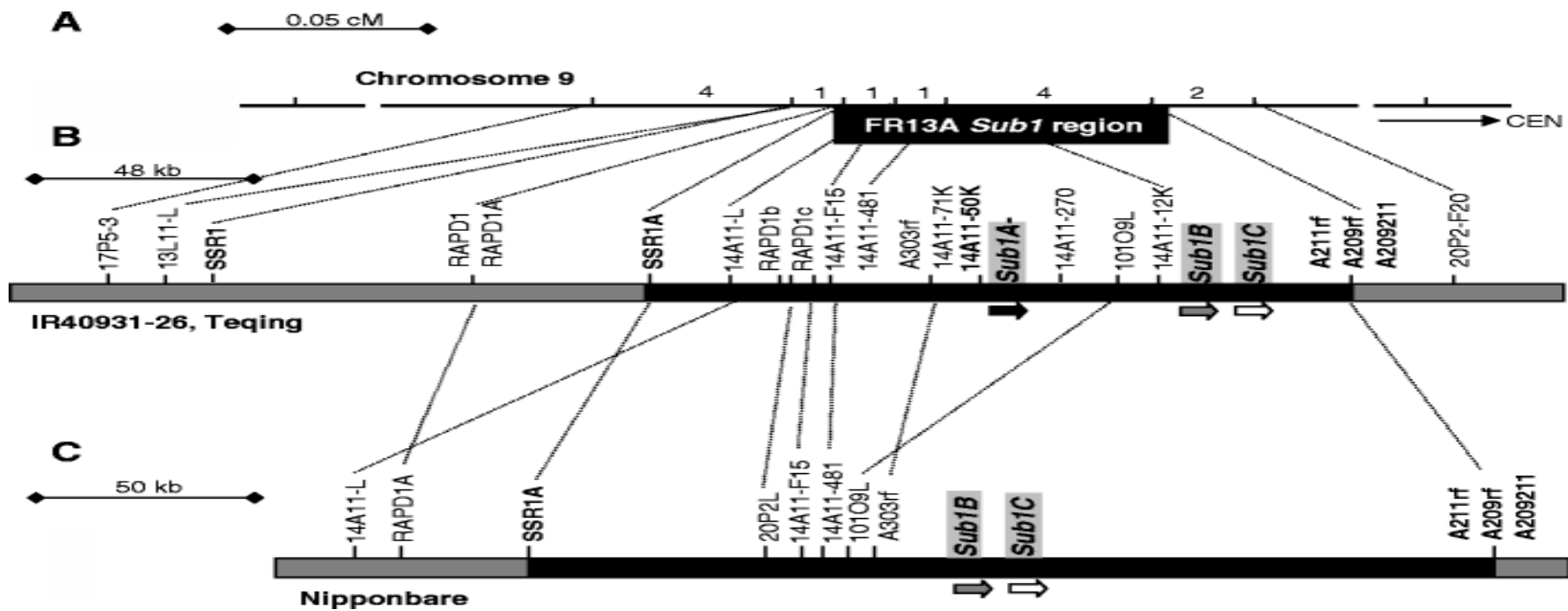
After flood, July 31

After recovery
October 31



L: Land races of rice growing on floating islands in Lake

R: One of the cultivar (Taothabi) growing in waterlogged areas at Loktak Lake of Manipur, India



Differences in the *Sub1* loci among the submergence tolerant and intolerant cultivars. The Major *Sub1* QTL is mapped onto rice chromosome 9. II) (From Bailey-Serres et al 2010)

Submergence tolerant (Sub1)	<i>aus Indica</i>	 SUB1A-1 SUB1B-1 SUB1C-1
Submergence Intolerant	<i>indica</i>	 SUB1A2 SUB1B-1,3,6,7 SUB1C-3,5,8
	<i>indica jponica</i> <i>O.nivara</i> <i>O.nivara</i>	 SUB1B-2,3,4,5,8 SUB1C-2,6

Differences within the *Sub1* genes among sensitive and tolerant cultivars (Adopted from Bailey-Serres et al 2010).

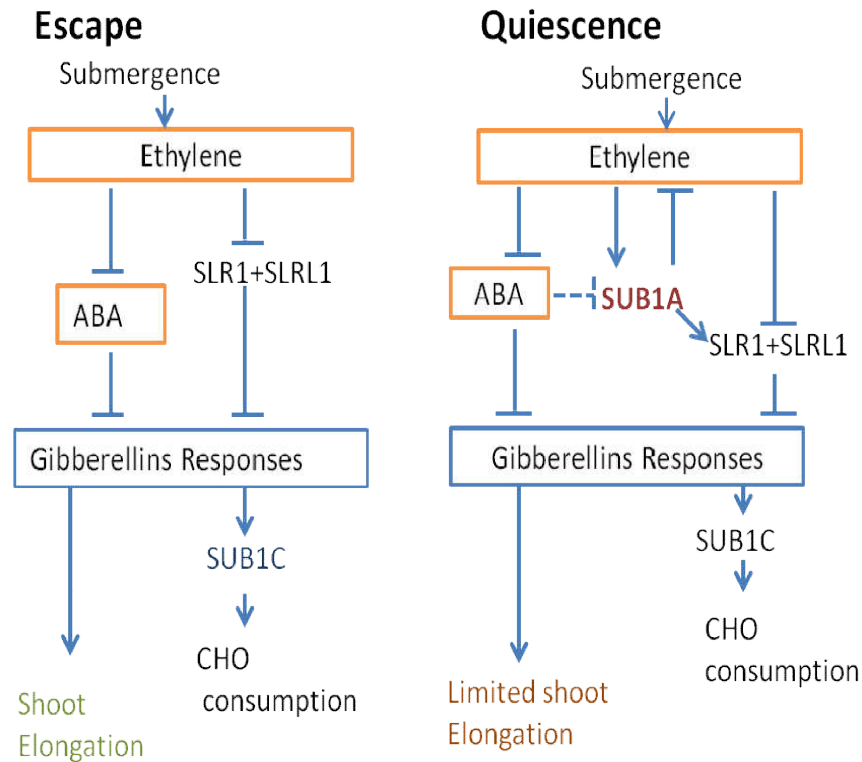


Figure . Role of ethylene in Escape and Quiescence mechanisms in submergence tolerant genotypes of rice (adopted from Bailey-Serres et al 2010).

Đặt vấn đề

Khí hậu toàn cầu đang nóng lên, làm ảnh hưởng tiêu cực đến sản xuất nông nghiệp, đặc biệt các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Sự nóng lên toàn cầu làm tan băng hai cực, làm mực nước biển dâng cao và gia tăng xâm lấn mặn, mất đất canh tác nông nghiệp

Theo tổ chức Nông Lương Thế giới (Food and Agricultural Organization) dự báo, mực nước biển sẽ dâng cao 1 m, khoảng những năm 50 của thế kỷ này, sẽ làm mất khoảng 70% đất vùng đồng bằng sông Mê Kông, 25% (2.6 triệu ha) đất Nông nghiệp Việt Nam và ảnh hưởng nặng nề tới các nước có vĩ độ thấp khác thuộc khu vực Nam và Đông Nam Châu Á. Theo IRRI, hàng năm hơn 20 triệu ha đất canh tác lúa trên toàn thế giới bị ảnh hưởng bởi ngập úng (flash flood).

Trong hơn ba mươi năm qua, chúng ta đã thành công trong việc tìm ra các cơ chế chống chịu điển hình, đã tìm ra các gen quy định (Sub1, Snorkel 1,2) hay các gen điều khiển, các gen liên quan đến khả năng chống chịu này (Adh, exp, pdc, sus,...). Các giống lúa chống chịu điển hình như FR13A, Sub1 Swarna, ... Tuy nhiên, các giống này có năng suất và khả năng chống chịu vẫn thấp so với nhu cầu của nông dân, của thực tiễn sản xuất. Mặt khác, cơ chế chống chịu và tương tác giữa gen, (những điều tưởng như đã biết) ... vẫn còn nhiều tranh cãi, cần giải đáp, cần ứng dụng thành công hơn nữa

Đặt vấn đề

- Các nghiên cứu gần đây cho thấy, các **giống lúa nổi** (deep-water rice) có cơ chế trốn thoát (escape), **vươn lóng nhanh** trong điều kiện ngập sâu, lâu ngày. Đặc tính này **được điều khiển bởi các gen Snorkel** (Hattori, 2009; Nagai, 2010; Nishiuchi, 2012)
- Mặt khác, các giống lúa chịu ngập trong vài tuần (7-14 ngày) mà không có sự vươn cao của lóng và thân, cơ chế chịu (quiescence). Đặc tính này được điều khiển bởi các gen Sub1 (Sub1A,B,C) (Xu et al, 2006)
- Trong luận án này, chúng tôi tập trung vào tăng cường biểu hiện của các gen Sub1 đồng thời ức chế hoặc bất hoạt các gen Snorkel (cao cây) làm giảm chiều cao cây nhờ đó làm giảm khả năng bị đổ sau ngập, tăng tỷ lệ sống sót, và cuối cùng nhằm tăng năng suất hạt cây lúa.
- Bằng phương pháp chuyển các gen Sub1 vào các giống lúa nổi thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Các mục tiêu chính

- So sánh đặc tính phân tử của các gen có liên quan đến khả năng chịu ngập ở các giống lúa vùng Đông Bắc với Swarna (negative control) và Sub1 Swarna (Positive control)
- Tăng cường biểu hiện các gen Sub1 và ức chế các gen Snorkel thông qua chuyển gen
- Xác định các đặc tính phân tử của các dòng chuyển gen, xác định và đánh giá biểu hiện Molecular characterization of transgenic plants for stable integration and expression of *Sub1* genes
- Đánh giá khả năng chống chịu ngập của cây lúa chuyển gen dưới các điều kiện ngập. Evaluation of transgenic rice for submergence tolerance under contained conditions

Phương pháp

KẾT QUẢ CHÍNH

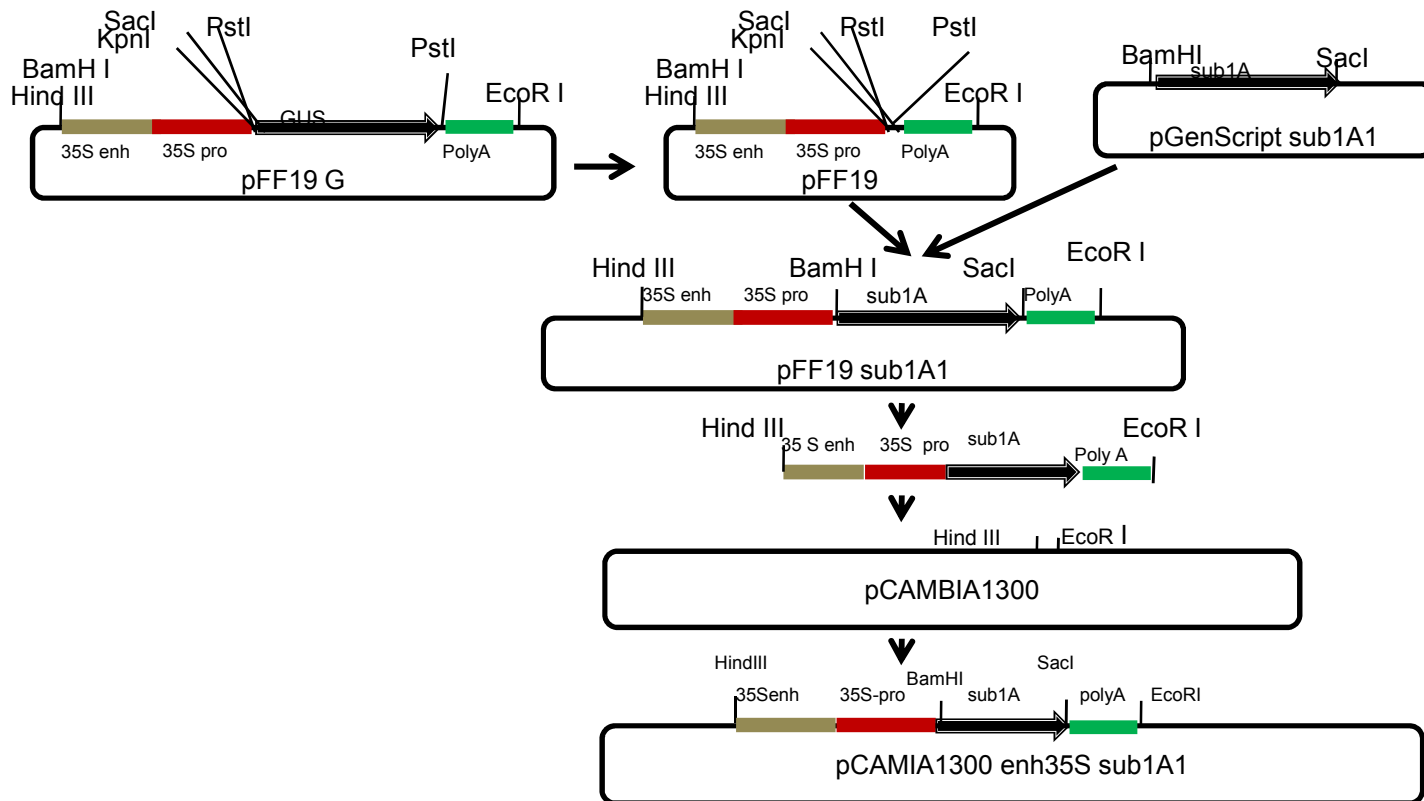


Figure 3. Construction of pCAMBIA1300enh35S Sub1A1

Plasmid pFF19G was digested with PstI and removed GUS (*uidA*) gene by relegation to create pFF19. Plasmid pGenscriptSub1A1 was digested with BamHI and SacI enzymes to release sub1A1 gene fragment and cloned into pFF19 plasmid digested with same (BamHI and SacI) restriction enzymes yielding pFF19 sub1A1.

The EcoRI - HindIII fragment containing 35S promoter:35S enhancer:*sub1A1* gene:35S polyA was taken from plasmid pFF19 sub1A1 and was cloned into pCAMBIA1300 at the same sites to give pCAMBIA1300 enh35S sub1A1 vector.

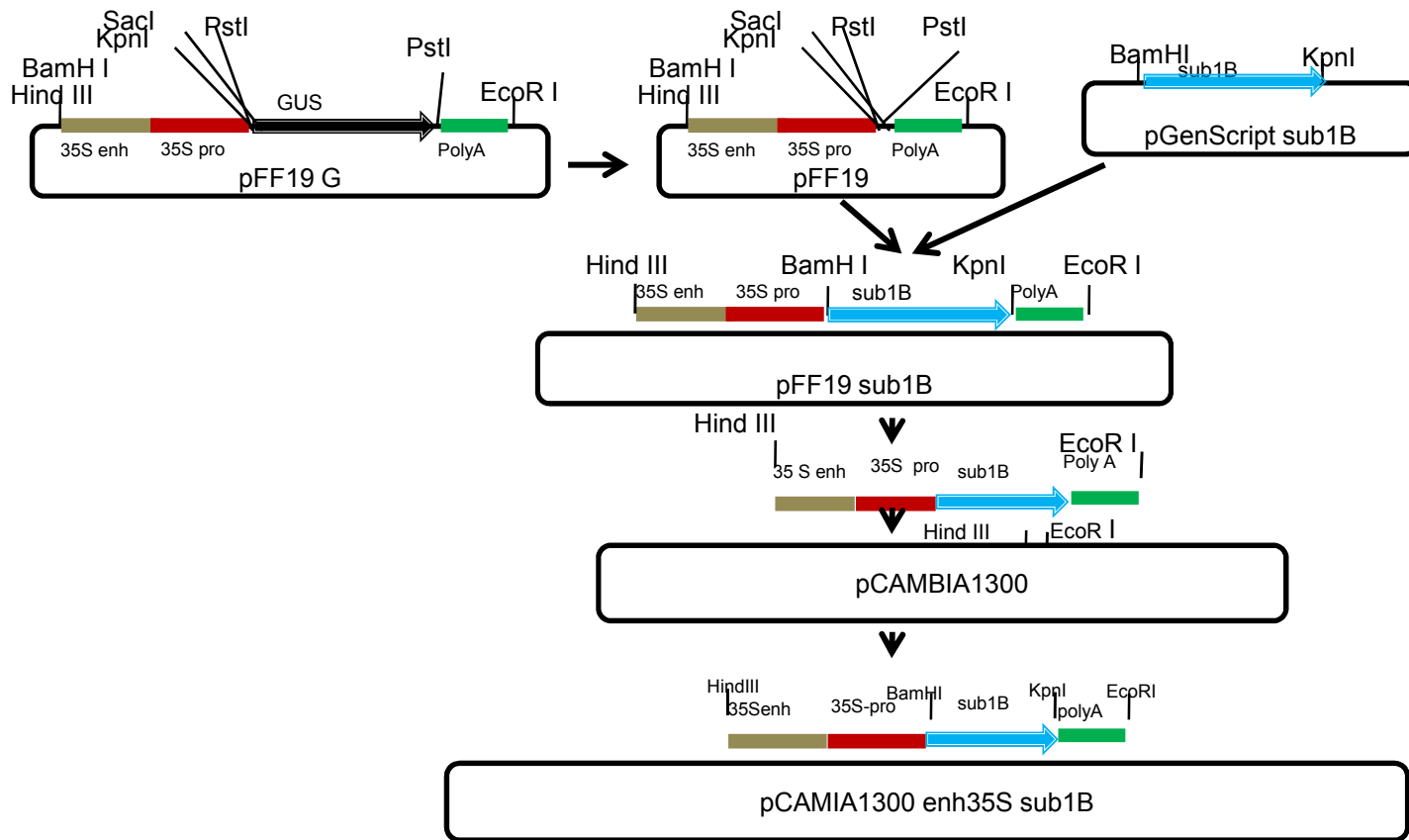


Figure 4. Construction of pCAMBIA1300enh35S Sub1B

Plasmid pFF19G was digested with PstI and removed GUS (*uidA*) gene by relegation to create pFF19. Plasmid pGenscriptSub1B was digested with BamHI and KpnI enzymes to release sub1B gene fragment and cloned into pFF19 plasmid digested with same (BamHI and KpnI) restriction enzymes yielding pFF19 sub1B.

The EcoRI + HindIII fragment of 35S promoter:35S enhancer:*sub1B* gene:35S polyA was taken from plasmid pFF19 sub1B and was cloned into pCAMBIA1300 at the same sites to give pCAMBIA1300 enh35S sub1B vector.

Characterization of *Sub1* locus in the North-East rice cultivars

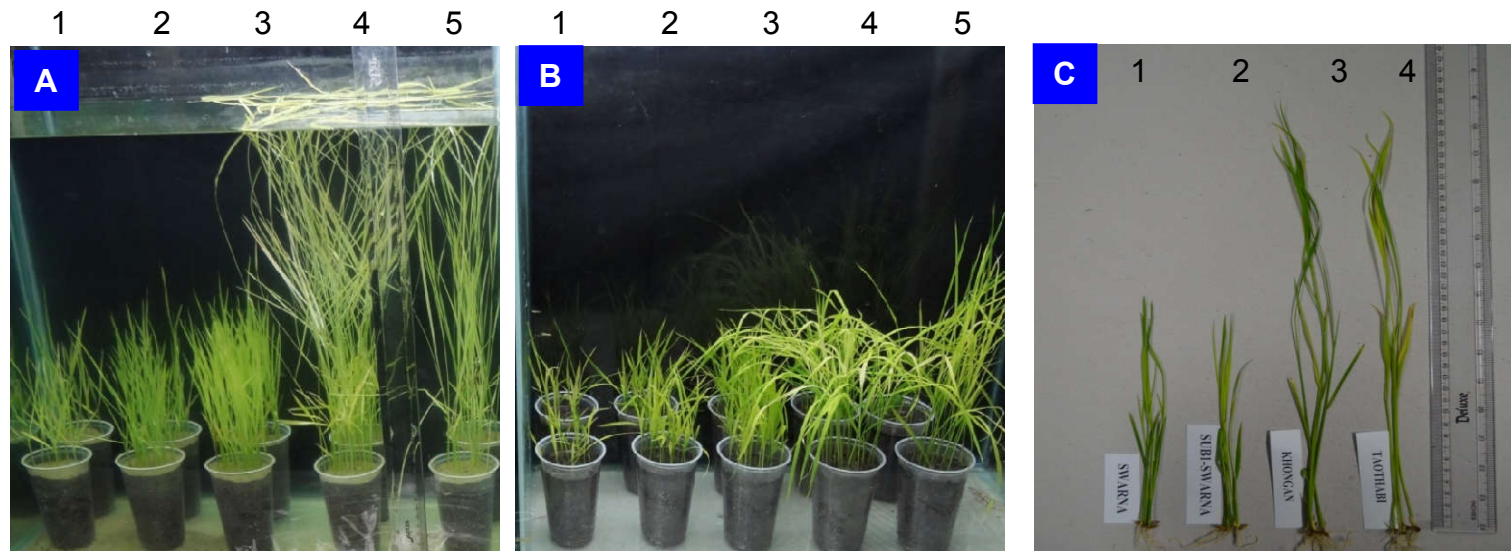


Figure 1.1 Comparison of growth among different rice cultivars grown in North-East region of India under (A) submergence conditions and (B) under normal conditions. 1). Swarna, 2). *Sub1 Swarna*, 3). Murshi, 4). Taothabi and 5). Khongan. (C) Submerged plant height of all rice varieties in the comparison

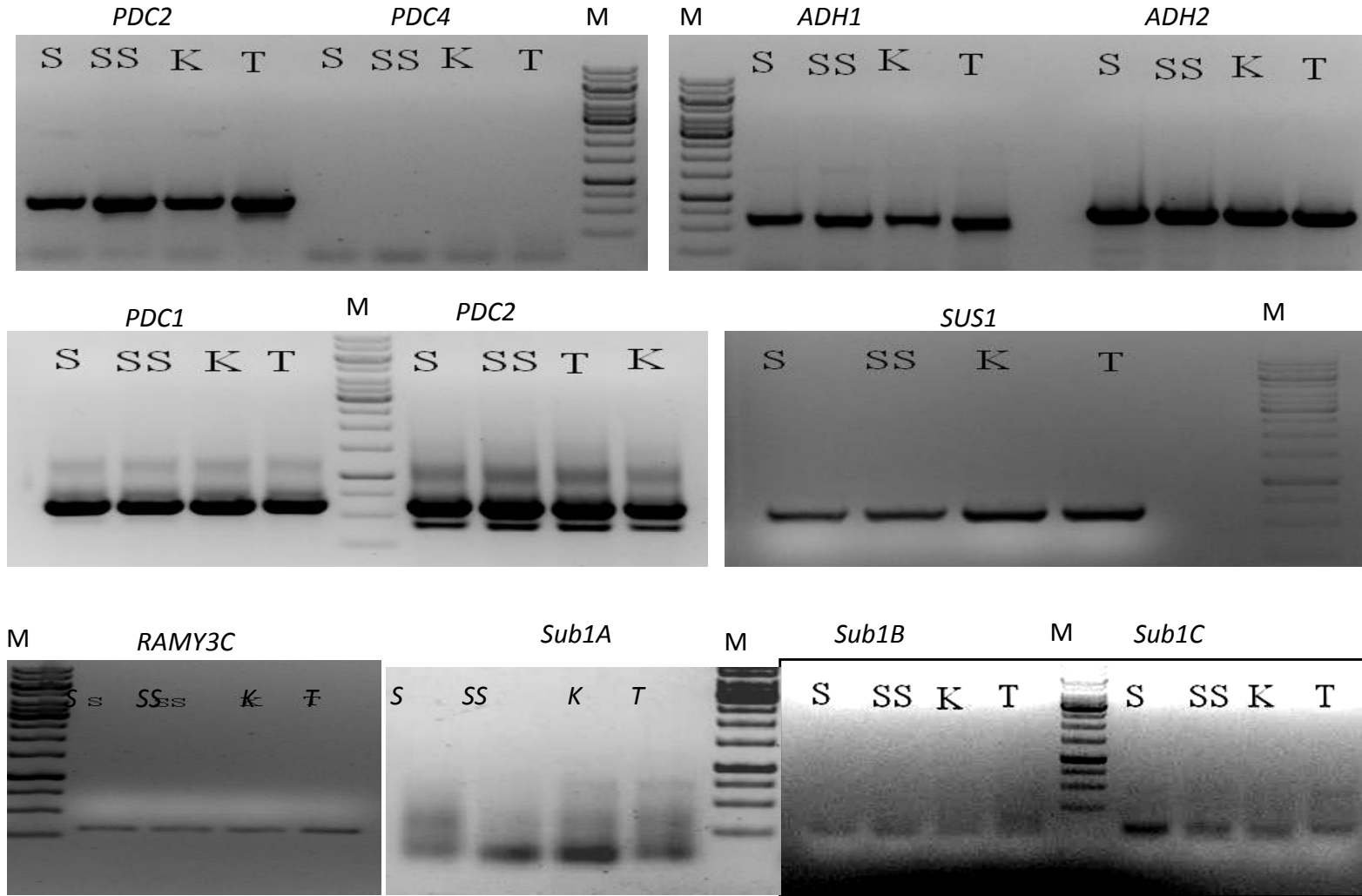


Figure 1.2. Agarose gels showing the PCR amplified products using certain gene specific primers

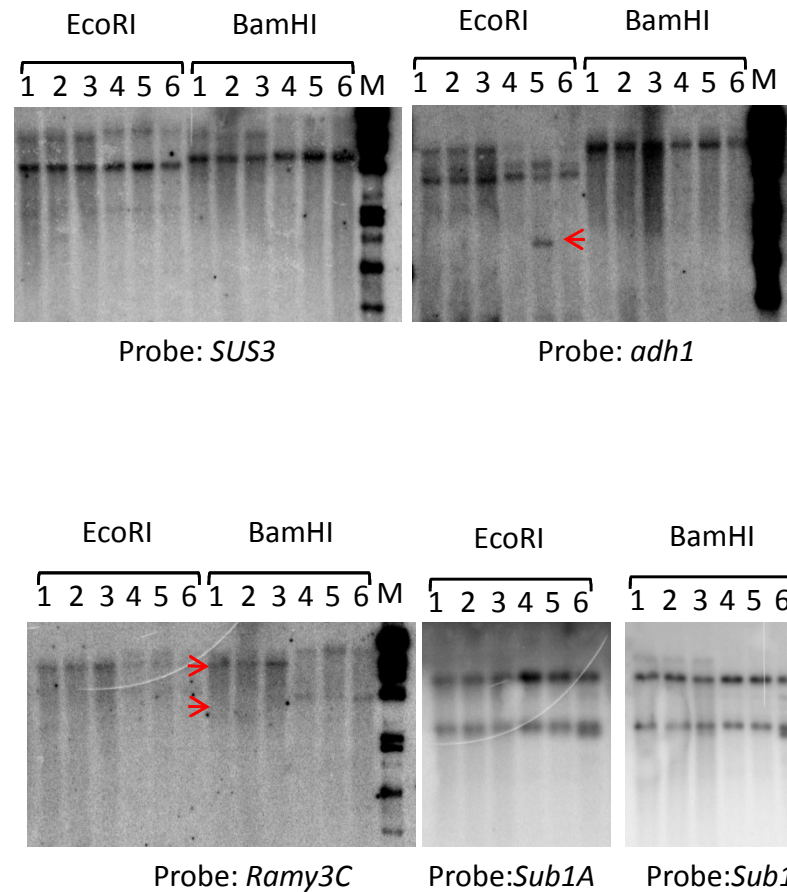
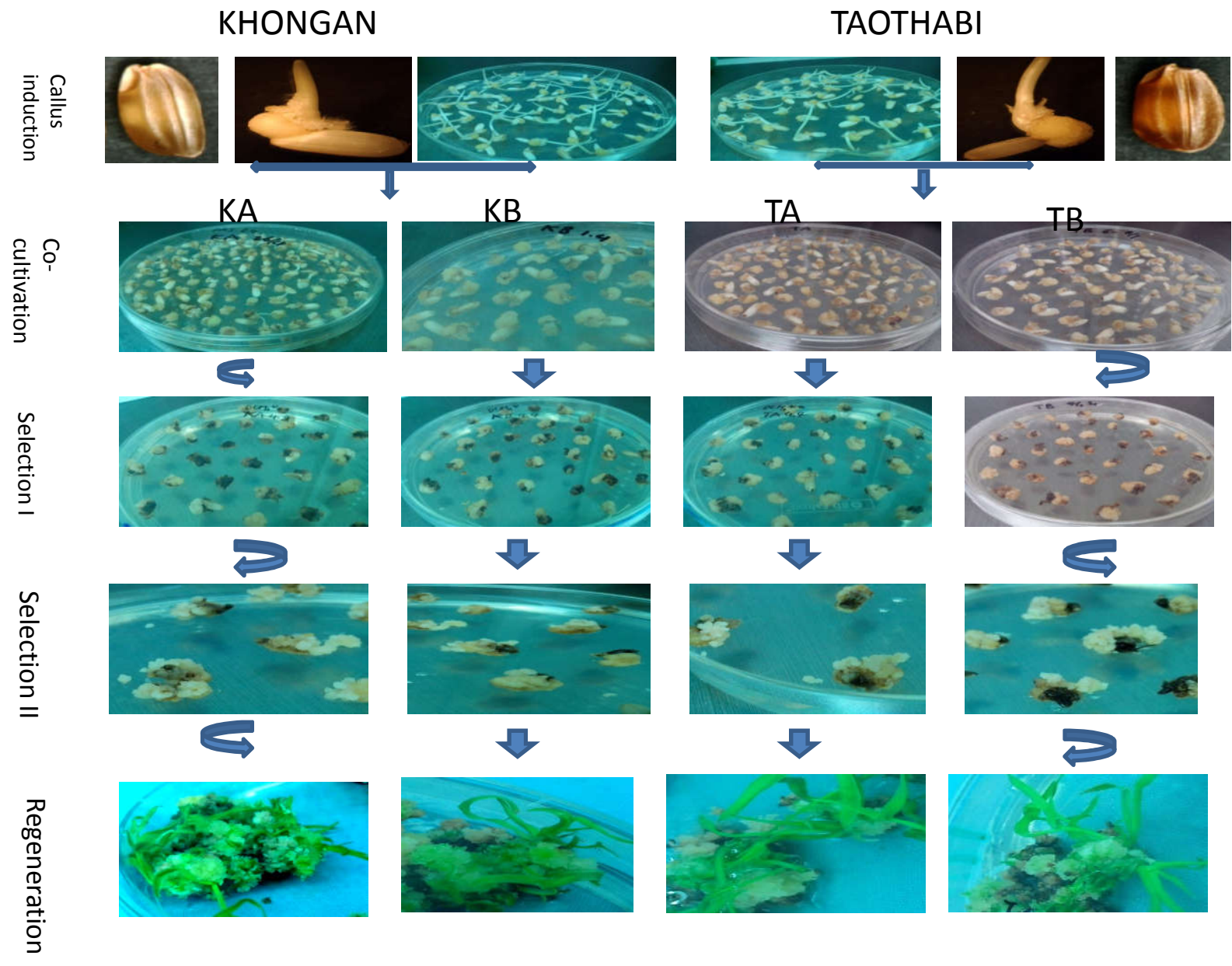


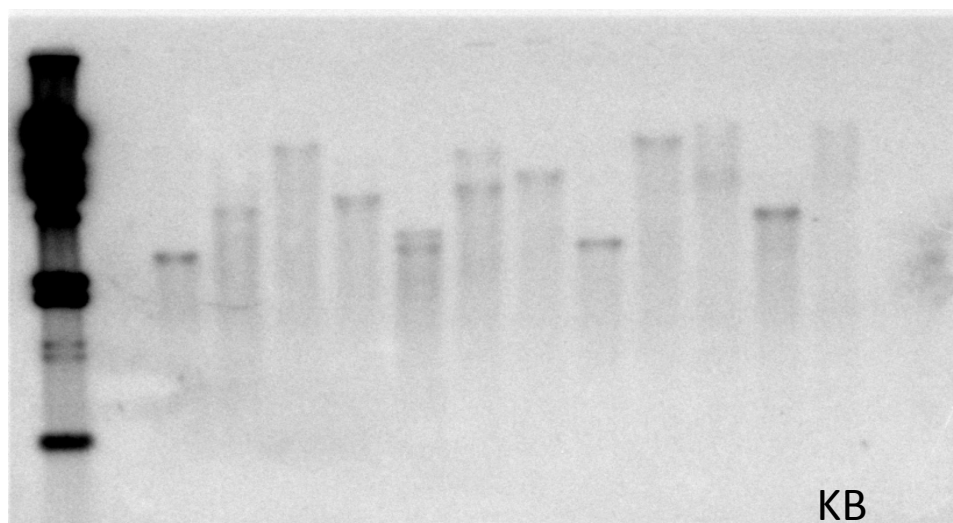
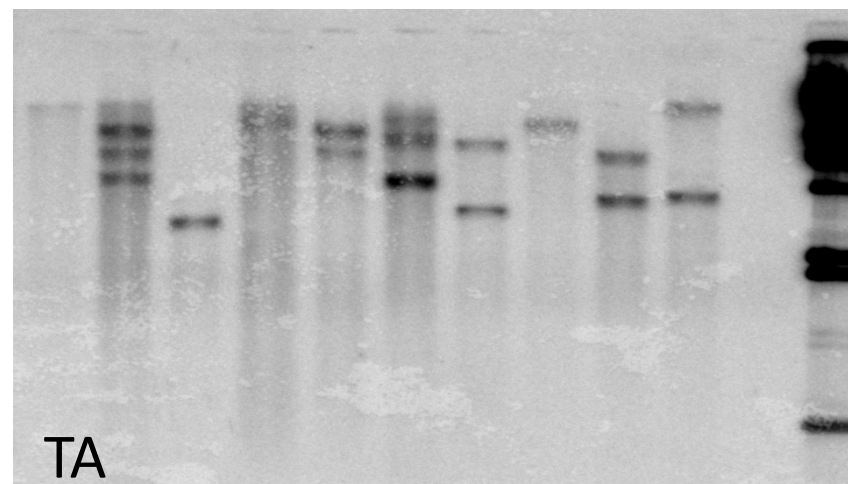
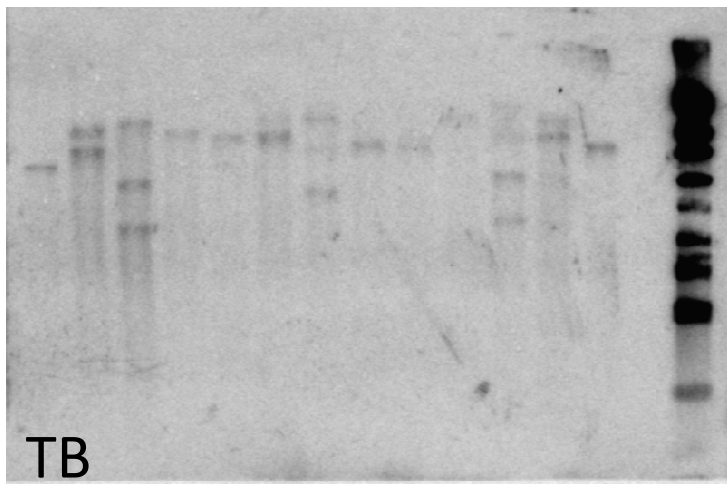
Figure 1.3. Southern hybridization analysis showing variations at the *Sub1* locus among rice cultivars where some are tolerant and others susceptible to submergence. 1). IR64, 2) Swarna, 3) Sub1-Swana, 4) Murshi, 5) Khongan, 6) Taothabi/ Enzymes:- E: EcoRI and B: BamH1 M: λ DNA Marker.

**Development of efficient *Agrobacterium* mediated transformation methods
for fast recovery of transgenic rice from North-East region of India**

Transformation of *Sub1A1* and *Sub1B* genes into Taothabi and Khongan cultivars and characterization of transgenic lines for submergence tolerance



Kết quả phân tích Southern Blot



Giải trình tự RNA (RNA sequencing)

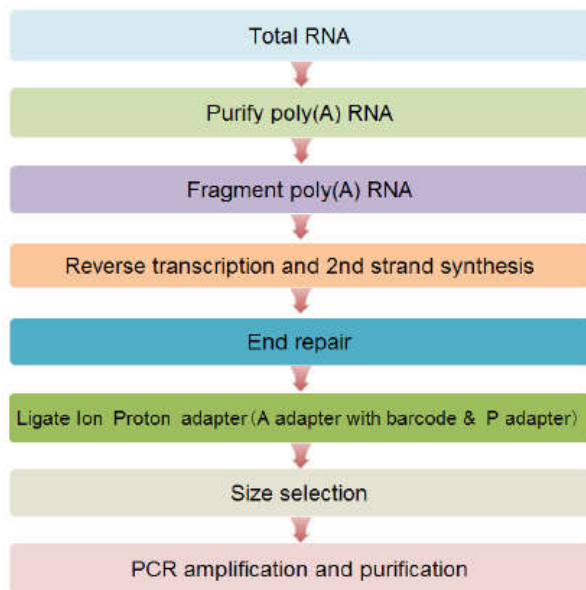
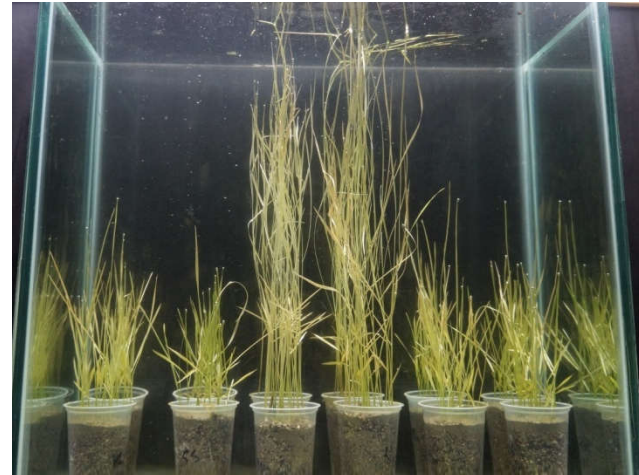
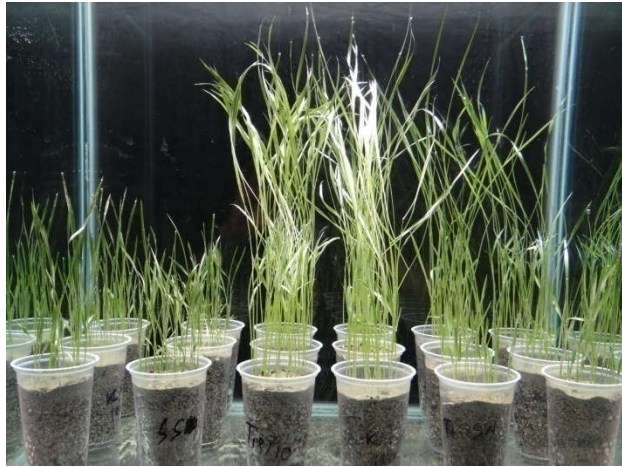


Figure 1. RNA-Seq experimental process

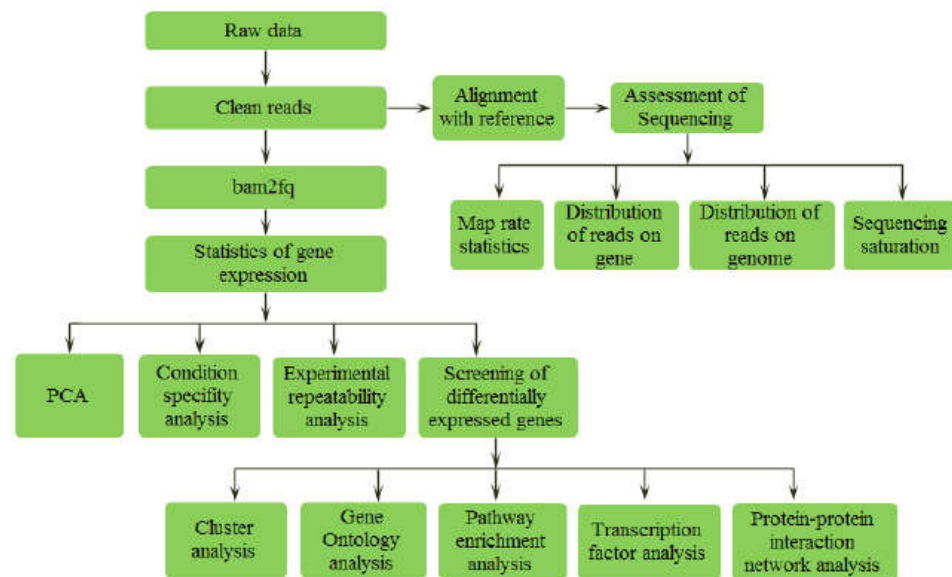
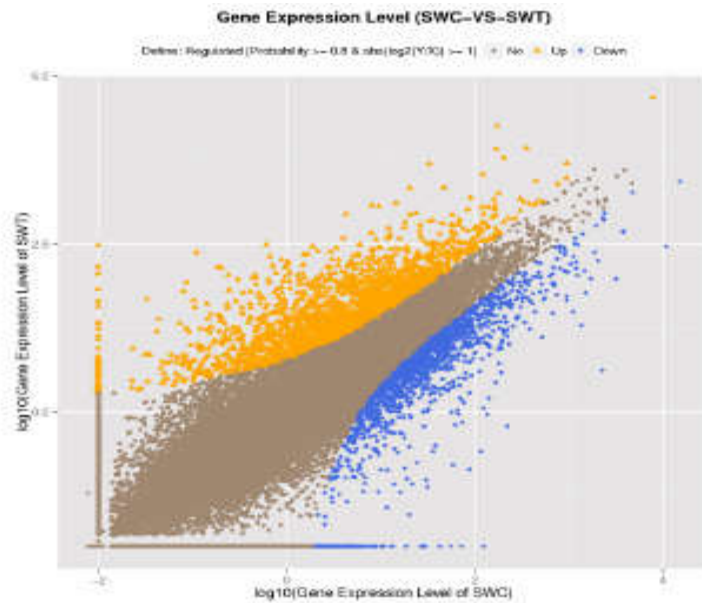
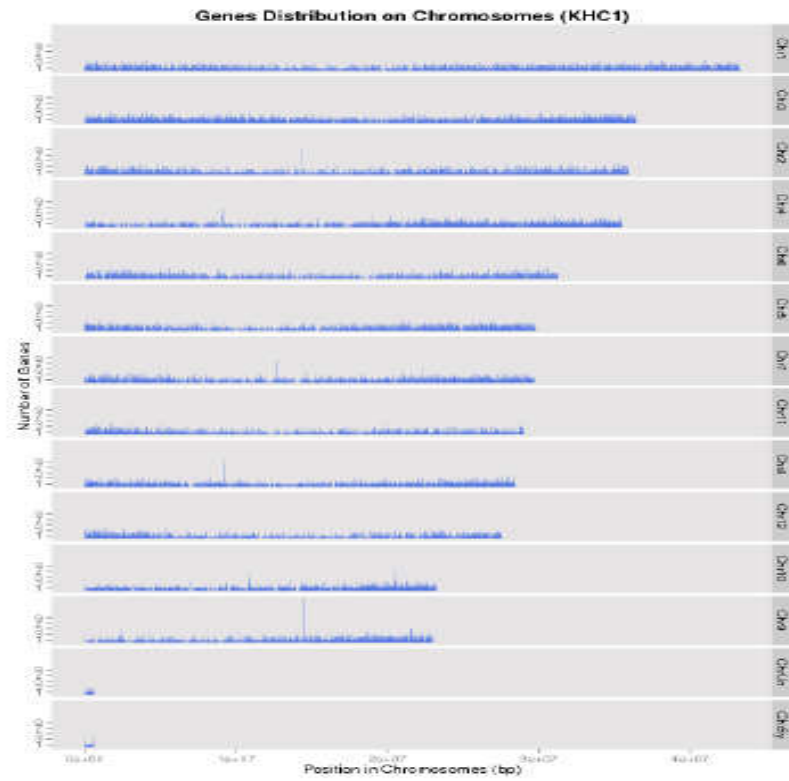
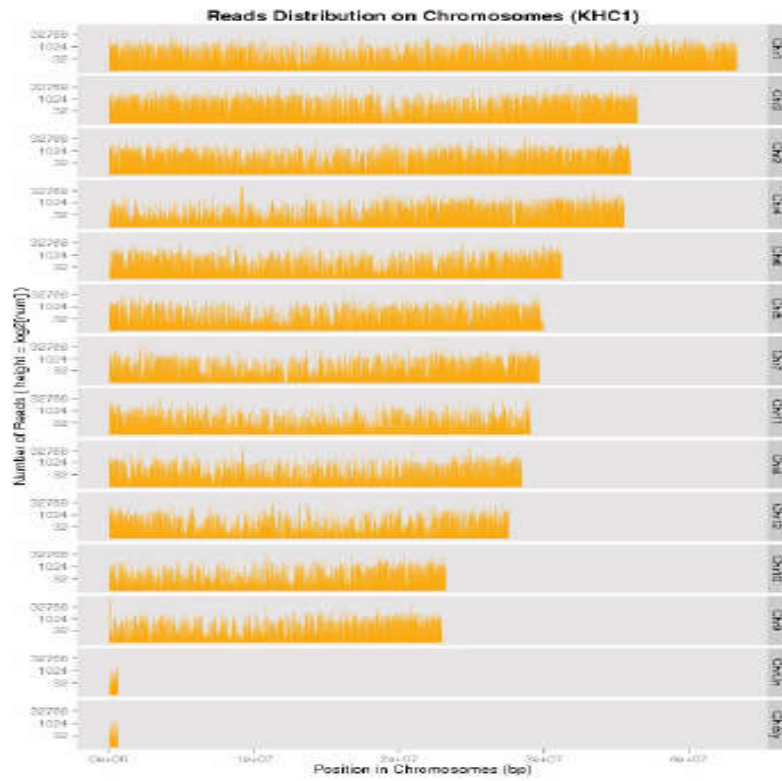


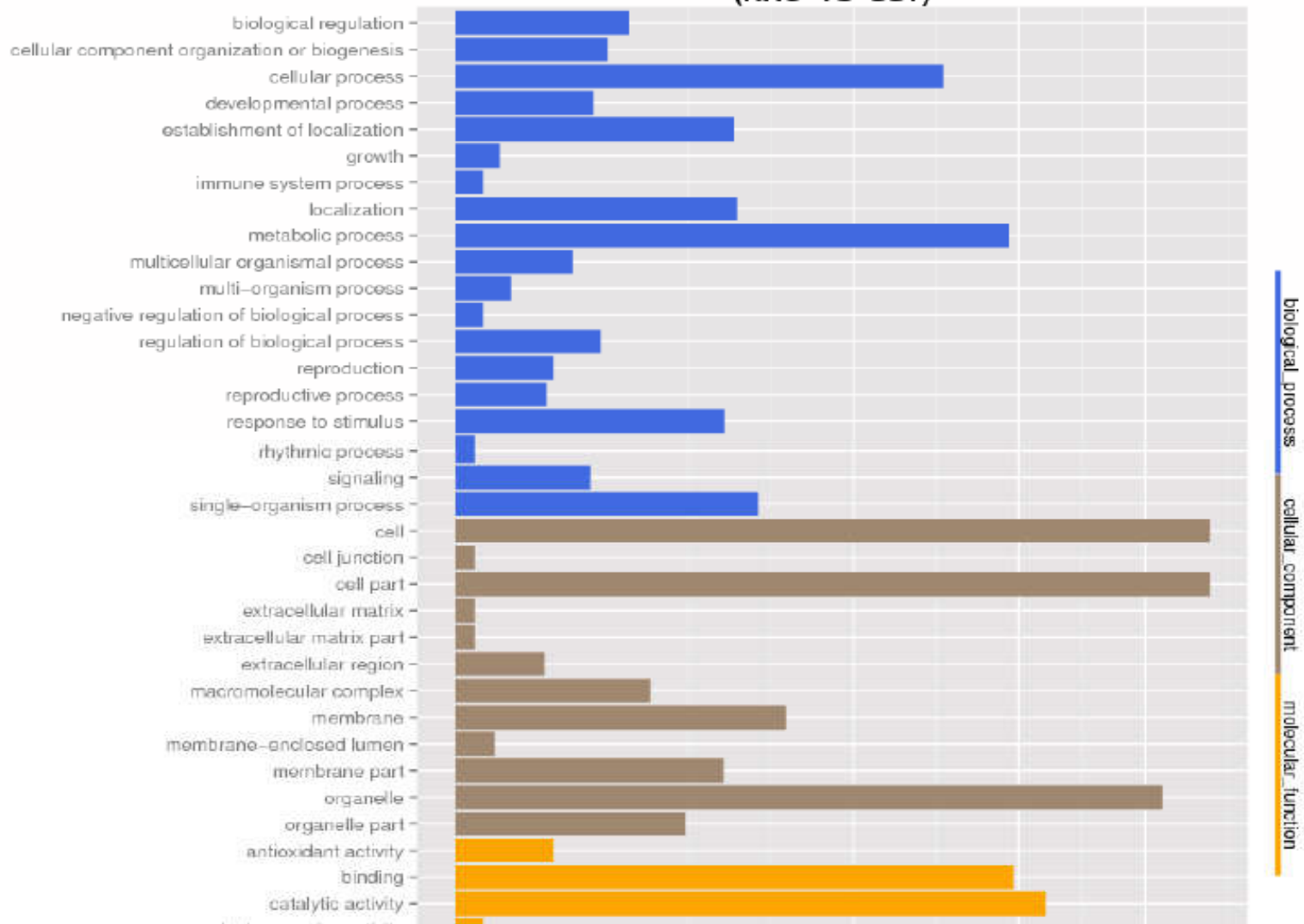
Figure 2. Bioinformatics analysis pipeline

Alignment statistics result with reference gene for all samples

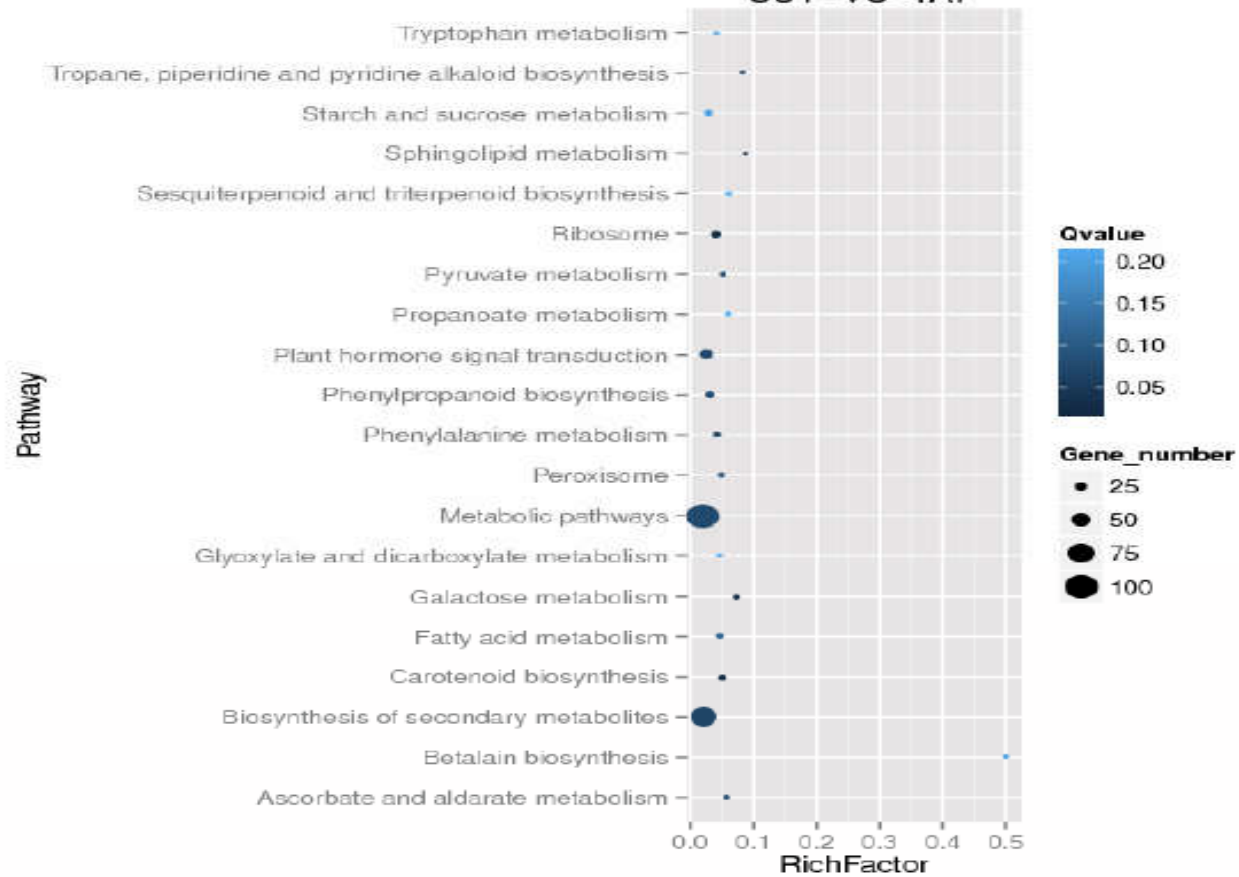
Sample	Total Reads	Total BasePairs	Total Mapped Reads	Perfect Match	Mismatch	Unique Match	Multi-position Match	Total Unmapped Reads
KHC1	26142978 (100.00%)	3594161085 (100.00%)	24912538 (95.29%)	11154817 (42.67%)	13757721 (52.62%)	24118168 (92.25%)	794370 (3.04%)	1230439 (4.71%)
KHC2	26604636 (100.00%)	3538962181 (100.00%)	25439587 (95.62%)	11788304 (44.31%)	13651283 (51.31%)	24674852 (92.75%)	764735 (2.87%)	1165048 (4.38%)
KHT1	24976702 (100.00%)	3239350555 (100.00%)	23662302 (94.74%)	9149430 (36.63%)	14512872 (58.11%)	22923959 (91.78%)	738343 (2.96%)	1314399 (5.26%)
KHT2	26122035 (100.00%)	3333624138 (100.00%)	24905600 (95.34%)	9882105 (37.83%)	15023495 (57.51%)	24131130 (92.38%)	774470 (2.96%)	1216434 (4.66%)
SSC1	26178116 (100.00%)	3481900609 (100.00%)	24896962 (95.11%)	11253849 (42.99%)	13643113 (52.12%)	24065844 (91.93%)	831118 (3.17%)	1281153 (4.89%)
SSC2	24440867 (100.00%)	3147851301 (100.00%)	23325207 (95.44%)	10574339 (43.26%)	12750868 (52.17%)	22557389 (92.29%)	767818 (3.14%)	1115659 (4.56%)
SST1	25067415 (100.00%)	3092787715 (100.00%)	23959137 (95.58%)	9130408 (36.42%)	14828729 (59.16%)	23236834 (92.70%)	722303 (2.88%)	1108277 (4.42%)
SST2	26175685 (100.00%)	3342384495 (100.00%)	24985873 (95.45%)	9654731 (36.88%)	15331142 (58.57%)	24237618 (92.60%)	748255 (2.86%)	1189811 (4.55%)
SWC1	24113722 (100.00%)	2951402929 (100.00%)	22883744 (94.90%)	7137802 (29.60%)	15745942 (65.30%)	22066367 (91.51%)	817377 (3.39%)	1229977 (5.10%)
SWC2	25847368 (100.00%)	3505061210 (100.00%)	24647045 (95.36%)	10698621 (41.39%)	13948424 (53.96%)	23814109 (92.13%)	832936 (3.22%)	1200322 (4.64%)



GO Functional Classification (KHC-VS-SST)



Top 20 Statistics of Pathway Enrichment for SST-VS-TAT

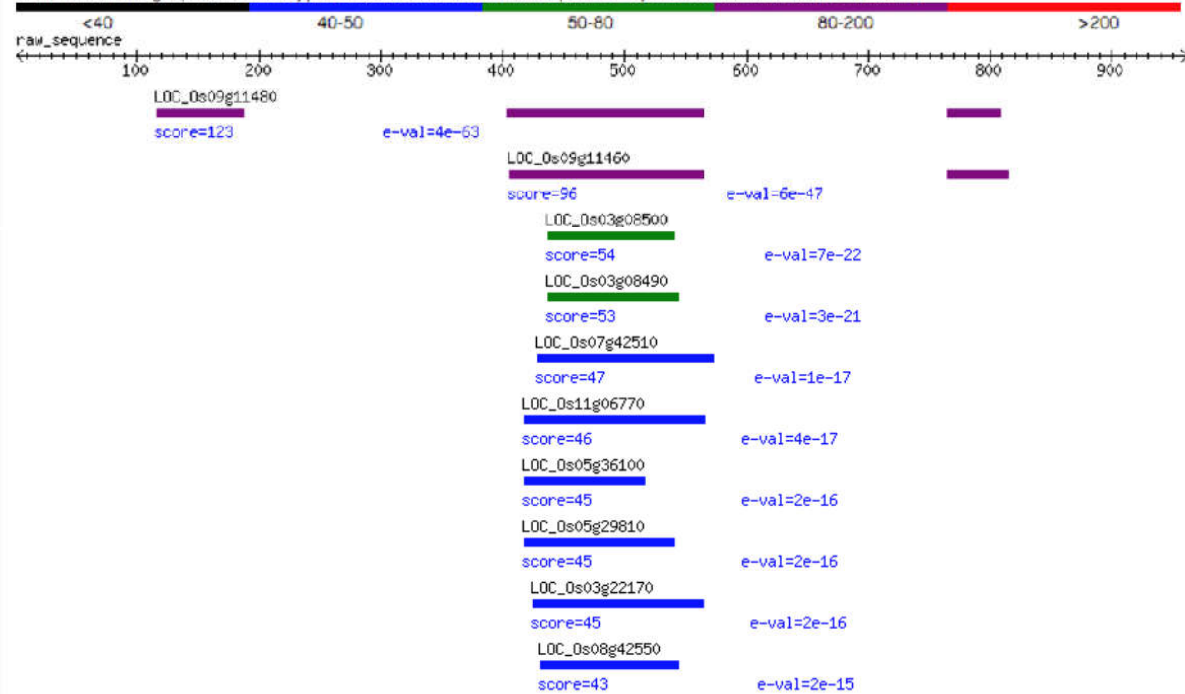


[Return](#)

BLAST Results

Graph

Each hit on the graph below is hyperlinked to its annotation report or equivalent information if available.



Hit Table

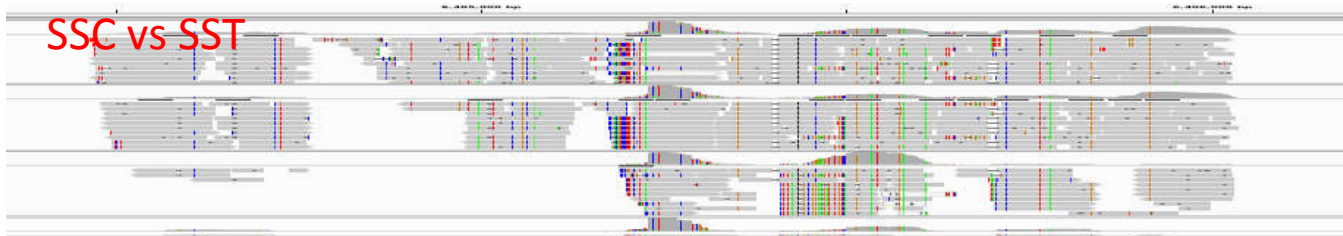
Sort by clicking (or double clicking) the column headers. The Accessions are linked to the annotation reports or equivalent information if available. The Hit Column is linked to the alignment between the query

Number	Name	Gene ID	Size (bp)	Sub-variety	Cultivar	Type
1	SNORKEL 1	AB510480.1	771	<i>Indica</i>	Bhadua	
2		AB510478.1	1487	<i>Indica</i>	C9285	
3		AB510482.1	771	<i>Rufipogon</i>	W0120	linear DNA
4		AB510484.1	771	<i>Nivara</i>	W0106	
5	SNORKEL 2	AB510481.1	1654	<i>Indica</i>	Bhadua	
6		AB510483.1	1653	<i>Rufipogon</i>	W0120	
7		AB510485.1	1371	<i>Nivara</i>	W0106	
8		AB510486.1	1991	<i>Glumipatula</i>	IRGC105668	
9		AB510487.1	1373	<i>Glumipatula</i>	IRGC105668	
10		AB510479.1	1179	<i>Indica</i>	C9285	
11	Sub1A-1	9653976				
12		FR720457.1	1663	<i>Nivara</i>	IRGC81882	
13		FR720458.1	1663	<i>Nivara</i>	IRGC101508	

Location	Formula	Varieties			
		TA	KH	SW	SS
Os12g 40960.1 (SNORKE2)	C1	8	13	1	0
	C2	4	4	0	0
	T1	2	0	3	0
	T2	0	0	3	0
Os9g 11480 (Sub1A1)	C1	1111	1435	958	785
	C2	1182	1345	1287	749
	T1	36	59	14	11
	T2	47	46	28	17
Os9g 11480 (Sub1B)	C1	1040	1152	963	1541
	C2	1124	1040	1417	2037
	T1	44	137	24	128
	T2	76	57	18	66

C1, C2: control 1,2 T1,T2: Treatment submergence 1,2

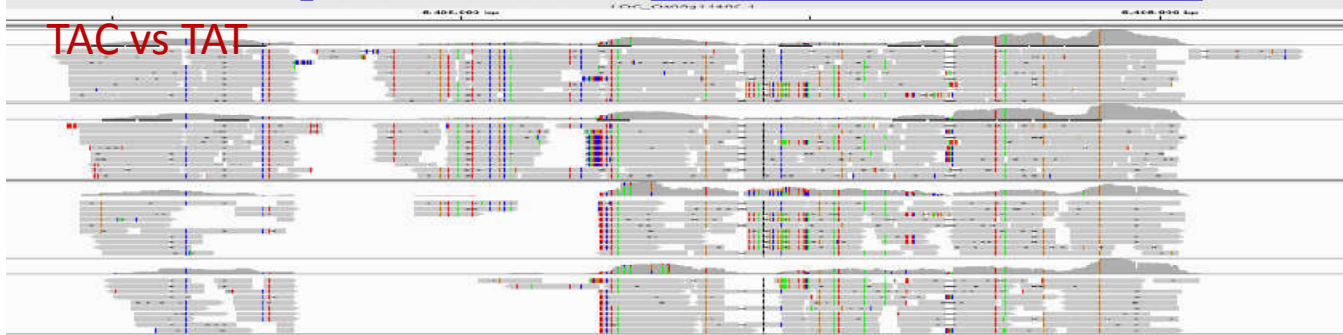
SSC vs SST



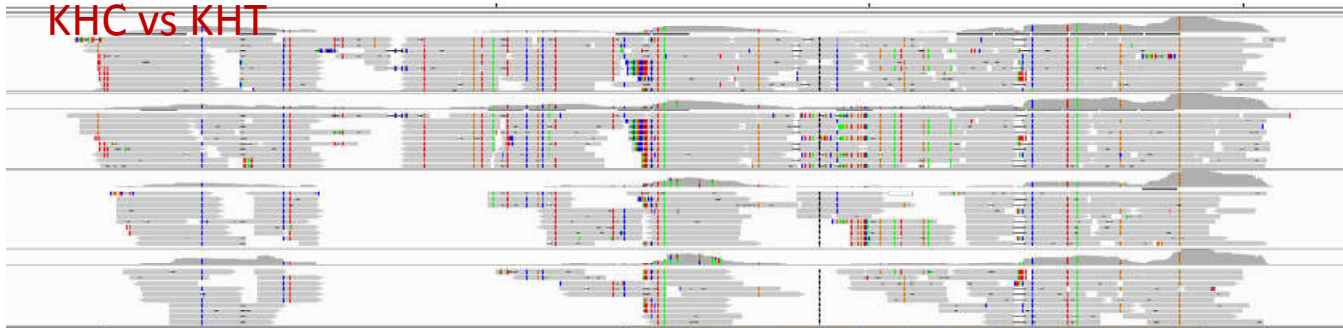
SWC vs SWT

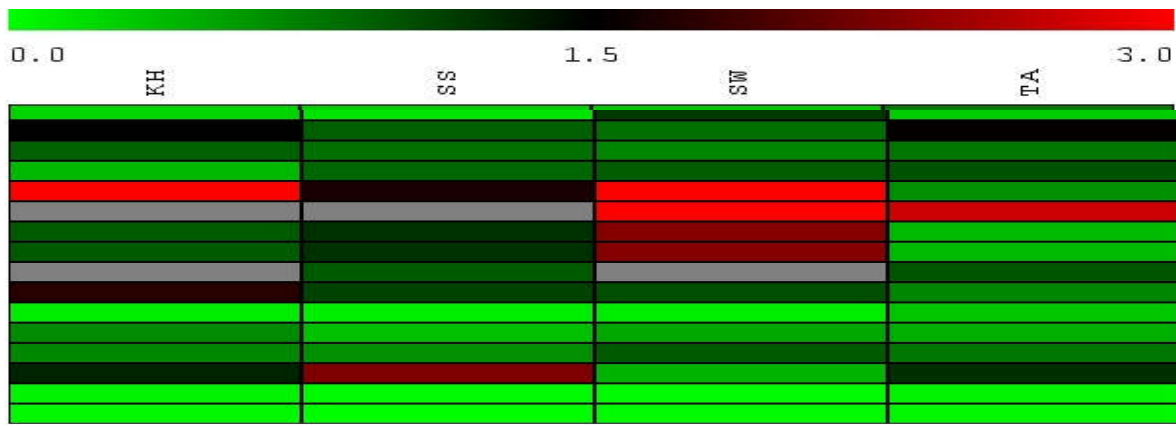


TAC vs TAT



KHC vs KHT





LOC_08012g 41030
 LOC_08012g 40950
 LOC_0803g 39640
 LOC_0811g 32280
 LOC_0808g 32780
 LOC_0812g 12860
 LOC_0810g 25130
 LOC_0804g 55730
 LOC_0801g 67350
 LOC_0807g 26740
 LOC_0808g 39370
 LOC_0803g 50510
 LOC_0805g 41780
 LOC_0805g 29810
 LOC_0809g 11480
 LOC_0809g 11460



LOC_0803g 08500
 LOC_0805g 41780
 LOC_0803g 08490
 LOC_0807g 42510
 LOC_0809g 11460
 LOC_0809g 20350
 LOC_0809g 26420
 LOC_0809g 11480
 LOC_0805g 25260
 LOC_0808g 31580
 LOC_0803g 08470
 LOC_0806g 09390
 LOC_0802g 54160
 LOC_0801g 21120
 LOC_0802g 43790
 LOC_0806g 47590
 LOC_0802g 43820
 LOC_0803g 08460
 LOC_0801g 64790
 LOC_0806g 03670
 LOC_0808g 44960
 LOC_0802g 32140
 LOC_0802g 09650
 LOC_0812g 41060
 LOC_0810g 30840
 LOC_0804g 34970
 LOC_0801g 12440
 LOC_0802g 52670
 LOC_0802g 34260
 LOC_0805g 29810
 LOC_0807g 47790
 LOC_0810g 25170
 LOC_0804g 32790
 LOC_0803g 64260
 LOC_0804g 18650
 LOC_0806g 06540
 LOC_0803g 05590
 LOC_0807g 38750
 LOC_0804g 46250
 LOC_0801g 10370

SNORKEL 1 (GenBank: AB510480.1)

Location	Formula	Varieties			
		TAOTHABI (TA)	KHONGAN (KH)	SWARNA (SW)	SWARNA- SUBI (SS)
Os3g 22170	C1	5	9	0	0
	C2	12	4	0	0
	T1	11	5	2	0
	T2	5	4	3	0
Os4g 57340	C1	423	498	247	270
	C2	566	224	358	439
	T1	665	686	490	586
	T2	578	779	590	527
Os5g 29810	C1	0	0	7	2
	C2	0	3	1	3
	T1	10	3	5	22
	T2	5	11	1	17
Os5g 41780	C1	1838	3680	0	2203
	C2	2582	1304	0	1730
	T1	2864	2095	2480	1462
	T2	1560	2489	1579	1727
Os12g 41030	C1	27	5	0	0
	C2	22	8	0	4
	T1	8	0	0	0
	T2	1	0	0	0

C1, C2: control 1,2 T1,T2: Treatment submergence 1,2

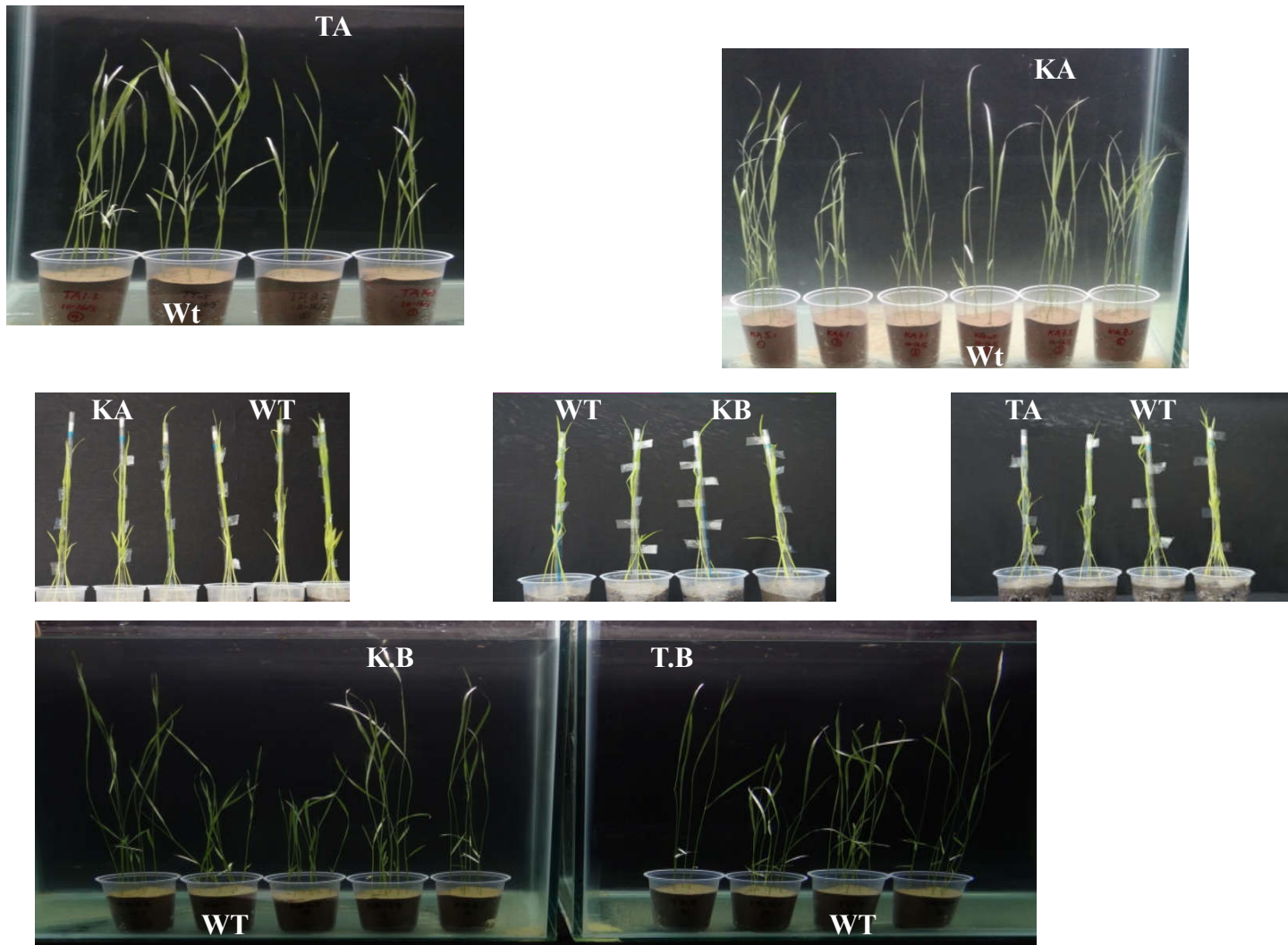


Figure 16. Submergence tolerance exhibited by transgenic Taothabi and Khongan T1 progeny plants, one week after submergence . Wt-Wild type, T.A-Taothabi transformed with *sub1A1*. K.A- Khongan transformed with *sub1A1*. T.B- Taothabi transformed with *sub1B*. K.B- Khongan transformed with *sub1B*.

KẾT LUẬN