

BÙI CHÍ BỬU - NGUYỄN THỊ LANG

**CƠ SỞ DI TRUYỀN
TÍNH CHỐNG CHỊU ĐỐI VỚI
THIỆT HẠI DO MÔI TRƯỜNG
CỦA CÂY LÚA**

**NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
Thành phố Hồ chí Minh 2003**

Bùi chí Bửu
Phó Giáo Sư, Tiến Sĩ
Viện Trưởng

Nguyễn thị Lang
Tiến sĩ
Trưởng Bộ môn Di truyền – Quý Gen

VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

LỜI TỰA

Những thiệt hại do môi trường bao gồm các yếu tố đất đai, nước, nhiệt độ (nóng hoặc lạnh) ảnh hưởng rất lớn đến năng suất cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng. Trên thế giới, các nhà khoa học đã sử dụng thuật ngữ “abiotic stress” để khái quát tất cả những stress do yếu tố không phải sinh học gây ra.

Phần lớn cơ chế chống chịu về sinh lý học của những thiệt hại như vậy đối với cây trồng đang được tập trung nghiên cứu với sự phối hợp giữa các nhà sinh lý, sinh hóa, di truyền, chọn giống. Nhưng đây là lĩnh vực rất khó, một số cơ chế chống chịu vẫn chưa được biết rõ, mặc dù người ta đã phân tích sự kiện ở mức độ sinh học phân tử. Việc cải tiến giống có năng suất cao kết hợp với khả năng chống chịu stress như vậy vẫn đang diễn biến rất chậm, vì những kiến thức cơ bản về di truyền và sinh lý thực vật còn hạn chế, kỹ thuật thanh lọc rất phức tạp và tốn kém.

Quyển sách này chủ yếu tập trung các vấn đề chính trên cây lúa, bao gồm: tính chống chịu khô hạn, tính chống chịu mặn, tính chống chịu ngập hoàn toàn, tính chống chịu độ đục nhôm, tính chống chịu thiếu lân, tính chống chịu độc sắt và tính chống chịu lạnh. Các phương pháp nghiên cứu di truyền được giới thiệu trong chương đầu tiên bao gồm những thành tựu về genomics, chức năng genome học, ứng dụng microarray, bản đồ đồng dạng trên cơ sở hiện tượng “synteny” của Tiên sĩ Gale (Rockefeller Foundation), và đặc biệt là phân tích QTL đối với những tính trạng di truyền số lượng, với các phần mềm rất có ích cho nhiều mục tiêu giải thích khác nhau.

Sự khan hiếm về nguồn nước tưới cho nông nghiệp hiện nay và trong tương lai là vấn đề ngày càng trở nên nghiêm trọng có tính chất toàn cầu. Do đó, các dự án nghiên cứu về cây trồng chống chịu khô hạn đang là hướng ưu tiên đầu tư của các dự án quốc tế và quốc gia. Giống lúa chống chịu khô hạn phải được nghiên cứu trên cơ sở hiểu biết rõ ràng về cơ chế chống chịu và khả năng di truyền của giống, trước nguy cơ khủng hoảng thiếu nước trong tương lai gần. Cơ chế tránh né, cơ chế thoát và cơ chế chống chịu được đề cập một cách hệ thống trên cơ sở di truyền số lượng với những QTL có tính chất giả định về gen điều khiển hiện tượng chống chịu rất phức tạp này. Bên cạnh đó, ảnh hưởng của môi trường tác động vào tính trạng di truyền số lượng như vậy cũng cần được giải thích.

Cơ chế điều tiết áp suất thẩm thấu và quá trình nhận tín hiệu của stress do khô hạn, mặn, và lạnh tương đối giống nhau về nguyên tắc chung. Người ta đặt ra một câu hỏi: tín hiệu ấy được sự cảm nhận của di truyền như thế nào để điều chỉnh gen mục tiêu đáp ứng với khả năng chống chịu của cây trong từng hoàn cảnh khác nhau như vậy? Đó là một hiện tượng khá thú vị trong thiên nhiên, khi chúng ta nghiên cứu sự điều tiết rất tinh vi của gen (gene regulation).

Di truyền tính chống chịu mặn đã được Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) tiến hành nghiên cứu từ di truyền cơ bản đến ứng dụng chọn tạo ra một vài giống đang phát triển trong sản xuất. Nhưng tương tác giữa kiểu gen x môi trường vẫn còn là một thử thách rất lớn, và ngưỡng chống chịu phải được xác định rõ (EC khoảng 4-6 dS/m). Tập thể tác giả rất cảm ơn sự hướng dẫn của TS Ning Huang (IRRI) về phân tích genome, sự cộng tác của TS Yanagihara (JIRCAS), TS Zhikang Li (IRRI) cung cấp vật liệu và phương tiện, TS Kenneth McNally (IRRI) trong phân tích mô hình toán để giải thích kết quả.

Di truyền tính chống chịu ngập hoàn toàn được thực hiện với số năm tham gia nghiên cứu lâu nhất của tập thể tác giả. Chúng tôi cảm ơn anh bạn người Thái Lan Sripongpankul đã cho phép sử dụng số liệu trong luận án Tiến sĩ để minh họa thêm trong tư liệu này, đặc biệt TS Senadhira, TS Derk HilleRisLamber (IRRI), TS Võ tông Xuân, TS Nguyễn văn Luật đã hướng dẫn chúng tôi trong những năm đầu tiên tham gia nghiên cứu, TS Puckridge đại diện của IRRI tại Thái Lan đã tạo điều kiện cho chúng tôi được khảo sát rất nhiều vùng lúa nước

sâu ở Châu Á và tiếp cận các nhà khoa học chuyên ngành về lĩnh vực này. Chúng tôi xin cảm ơn TS Mackill (IRRI) với những thảo luận rất lý thú về khả năng chọn tạo giống chống chịu.

Di truyền tính chống chịu độ độc nhôm được thực hiện với sự cộng tác của tập thể các nhà khoa học TS Brar (IRRI), TS Henry Nguyễn (ĐH Texas Tech), cùng các đồng nghiệp chúng tôi tại Viện Lúa ĐBSCL, nhằm khai thác nguồn gen mục tiêu từ giống lúa hoang *Oryza rufipogon* ở Đồng Tháp Mười. Anh Nguyễn duy Bảy đã nỗ lực hoàn thành luận án Tiến sĩ với công trình này, làm cơ sở khoa học cho các đồng nghiệp ở Ô Môn phát triển thành công giống lúa AS996 (giống quốc gia) chống chịu phèn và năng suất cao ở ĐBSCL. Chúng tôi cảm ơn TS HilleRisLamber, TS Akita, TS Chang (IRRI) đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện thanh lọc nhôm tập đoàn giống lúa bản địa của Việt Nam trong năm 1985, TS Vaughan Duncan (JIRCAS) trong quá trình thu thập lúa hoang với chúng tôi ở ĐBSCL để xác định vật liệu cho gen mục tiêu. Chúng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đối với TS John O'Toole đã giúp đỡ về kinh phí và chương trình đào tạo thông qua dự án công nghệ sinh học của Rockefeller Foundation.

Trong đất phèn, ngoài độ độc nhôm và sắt, ảnh hưởng thiếu lân cũng là vấn đề rất lớn cho cây lúa. Chúng tôi đã thực hiện công trình nghiên cứu này trên cơ sở một thí nghiệm dài hạn của Bộ Môn Canh tác thuộc Viện Lúa ĐBSCL. Khả năng đẻ nhánh có thể được xem là một tiêu chuẩn chọn lọc rất có giá trị, do đa gen điều khiển trong điều kiện thiếu lân, trong đó hoạt động của gen không cộng tính và gen cộng tính đều có ảnh hưởng quan trọng như nhau. Chúng tôi rất cảm ơn TS JJ Ni (Trung Quốc) đã cho phép chúng tôi sử dụng tư liệu của anh trong thuyết minh cơ sở di truyền của tính chống chịu và những thảo luận bổ ích trong thời gian cùng nhau làm việc tại IRRI. Tính chống chịu độ độc sắt rất ít được công bố và việc đánh giá kiểu hình có thể được xem như khó khăn nhất trong các tính trạng liệt kê, vì Fe^{++} chuyển đổi sang Fe^{+++} rất dễ dàng, làm sai lệch kết quả quan sát. Nhiễm sắc thể số 1 được xem như nhiễm sắc thể chứa nhiều gen ứng cử viên cho tính trạng liên quan đến hiện tượng chống chịu.

Tính chống chịu lạnh có rất nhiều kết quả ở nước ngoài được công bố được tổng hợp trên cơ sở di truyền và chọn giống, chưa có công trình cụ thể từ Viện Lúa ĐBSCL.

Chúng tôi hi vọng quyển sách này sẽ cung cấp những tư liệu cần thiết cho sinh viên, nghiên cứu sinh, các nhà nghiên cứu quan tâm đến những lĩnh vực chống chịu bất lợi do môi trường, những cán bộ nông nghiệp đang phục vụ trong lĩnh vực chọn tạo giống cây trồng.

Kính mong bạn đọc thông cảm những thiếu sót trong quá trình biên soạn, in ấn và đóng góp ý kiến cho tác giả.

Chủ biên
BÙI CHÍ BỬU
Viện trưởng
Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long

Lời tựa

Chương 1: Giới thiệu tổng quát

Ứng dụng công nghệ sinh học trong cải tiến giống cây trồng
chống chịu điều kiện bất lợi của môi trường

- 1-1. Khô hạn
- 1-2. Đất mặn
- 1-3. Đất acid và đất bạc màu
- 1-4. Nhiệt độ lạnh và nhiệt độ nóng
- 1-5. Bản đồ gen và sự phát triển marker phục vụ phân tích di truyền
- 1-6. Cơ chế sinh lý học và di truyền đối với hiện tượng chống chịu stress
- 1-7. Tiến độ cải tiến giống chống chịu
- 1-8. Kỹ thuật thanh lọc có tính khả thi với qui mô lớn
- 1-9. Genome học, ngành học di truyền mới
- 1-10. Hiện tượng synteny và genomics có tính chất so sánh
- 1-11. Ứng dụng genomics trong cải tiến giống cây trồng
 - 1-11-1. Thư viện DNA
 - 1-11-2. Kỹ thuật cloning các gen
 - 1-11-3. Microarray
 - 1-11-4. Quần thể knockout
 - 1-11-5. Kỹ thuật chuyển nạp gen
- 1-12. Phân tích QTL
 - 1-12-1. Những mô hình về di truyền số lượng
 - 1-12-1-1. Mô hình QTL đơn (single-QTL)
 - 1-12-1-2. Mô hình “multiple-locus”
 - 1-12-2. Phương pháp phân tích marker đơn (SMA)
 - 1-12-2-1. SMA trên quần thể hồi giao
 - 1-12-2-2. Kết hợp hiện tượng phân ly của QTL và marker
 - 1-12-2-3. Phép thử t đơn giản trong quần thể hồi giao
 - 1-12-2-4. Phân tích phương sai trong quần thể hồi giao
 - 1-12-2-5. Mô phỏng trong quần thể hồi giao
 - 1-12-3. Phương pháp SMA trong quần thể F₂
 - 1-12-4. Phân tích QTL trên cơ sở bản đồ cách quãng (interval mapping)
 - 1-12-4-1. Bản đồ cách quãng trong quần thể hồi giao (BC)
 - 1-12-4-2. Bản đồ cách quãng trong quần thể F₂
 - 1-12-5. Khả năng giải thích về thống kê sinh học của bản đồ QTL

Chương 2: Cơ sở di truyền tính chống chịu mặn

- 2-1. Đất mặn
- 2-2. Cơ chế chống chịu mặn
- 2-3. Di truyền tính chống chịu mặn
 - 2-3-1. Nghiên cứu di truyền số lượng tính chống chịu mặn
 - 2-3-2. Nghiên cứu di truyền phân tử tính chống chịu mặn
- 2-4. Sự thể hiện gen chống chịu mặn
 - 2-4-1. Phổ thể hiện transcript
 - 2-4-2. Phân tích microarray
 - 2-4-3. Đặc điểm thể transcript của giống lúa chống chịu mặn
trong điều kiện bị stress
 - 2-4-4. Vai trò của abscisic acid, jasmonate, proline

2-5. Nghiên cứu chuyên đề

Cải tiến giống lúa chống chịu mặn ở ĐBSCL

2-5-1. Vật liệu & phương pháp

2-5-2. Kết quả & thảo luận

2-5-2-1. Xác định vật liệu lai tạo

2-5-2-2. Nghiên cứu cơ chế chống chịu mặn

2-5-2-3. Phân tích bản đồ di truyền QTL tính chống chịu mặn

2-5-2-4. Chọn giống chống chịu mặn nhờ marker phân tử (MAS)

2-5-2-5. Phát triển giống lúa triển vọng cho vùng bị nhiễm mặn

Chương 3: Cơ sở di truyền tính chống chịu khô hạn

3-1. Xác định tính trạng thành phần trong chống chịu khô hạn

3-2. Những marker phân tử DNA và bản đồ QTL

3-3. Bản đồ QTL đối với tính trạng rễ lúa

3-4. Bản đồ QTL đối với tính trạng điều tiết áp suất thẩm thấu (OA)

3-5. Bản đồ QTL đối với tính trạng biểu hiện màu xanh cao lương (STG)

3-6. Bản đồ QTL các tính trạng hình thái quan trọng

3-7. Chuyển nạp gen mục tiêu

3-8. Cơ chế truyền tín hiệu

3-9. Gen & sự khám phá lộ trình thông qua genome học chức năng

Chương 4: Cơ sở di truyền tính chống chịu ngập úng

4-1. Tổng quan nghiên cứu trước đây

4-2. Hình thái học của cây lúa thích nghi với vùng bị lũ lụt

4-3. Khả năng vươn lóng

4-3-1. Di truyền về khả năng vươn lóng

4-3-2. Nghiên cứu lúa nổi ở ĐBSCL

4-4. Di truyền tính chống chịu ngập hoàn toàn

4-5. Cơ chế chống chịu ngập về sinh lý học

4-5-1. Diệp lục tố

4-5-2. Carbohydrate

4-5-3. Hàm lượng nitrogen

4-5-4. Hoạt động của peroxidase

4-6. Nghiên cứu bản đồ di truyền tính trạng vươn lóng

4-7. Clone hóa gen *OsGAPDH* điều khiển tính chống chịu ngập

4-7-1. Phân tích Southern

4-7-2. Phân tích Northern

4-7-3. Sự thể hiện dung hợp GST-OsGAPDH

Chương 5: Cơ sở di truyền tính chống chịu độ độc nhôm

5-1. Giống lúa nước sâu chống chịu độ độc nhôm ở ĐBSCL

5-2. Xác định QTL điều khiển tính chống chịu độ độc nhôm

5-2-1. Điều tra đa hình trong bố mẹ

5-2-2. Phân ly và thiết lập bản đồ

5-2-3. Bản đồ QTL

5-2-4. Phân tích epistasis

5-2-5. Ứng dụng marker trong chọn giống chống chịu và gen ứng cử viên

5-2-6. Tạo ra clone của những QTL chống chịu nhôm từ lúa hoang

5-3. Chọn tạo giống lúa chống chịu nhôm

Chương 6: Cơ sở di truyền tính chống chịu thiếu lân

6-1. Giới thiệu chung

6-1-1. Đất thiếu lân

6-1-2. Hiện tượng thiếu lân trên cây lúa

6-1-3. Biểu hiện của giống lúa chống chịu thiếu lân

6-1-4. Kỹ thuật thanh lọc

6-2. Cơ chế chống chịu thiếu lân

6-3. Di truyền tính chống chịu thiếu lân

6-3-1. Lập bản đồ QTL bằng AFLP

6-3-2. Lập bản đồ QTL bằng RFLP

6-3-3. Gen *Pup-1*: QTL chủ lực làm gia tăng khả năng hấp thu lân

6-4. Phân tích di truyền số lượng

Chương 7: Cơ sở di truyền tính chống chịu độ độc sắt

7-1. Giới thiệu chung

7-2. Kỹ thuật thanh lọc

7-3. Nghiên cứu di truyền phân tử tính chống chịu độ độc sắt

7-3-1. Tính chống chịu độ độc sắt trong quần thể đơn bội kép IR64/Azucena

7-3-2. Tính chống chịu độ độc sắt trong quần thể cận giao Nipponbare/Kasalath // Nipponbare

Chương 8: Cơ sở di truyền tính chống chịu nhiệt độ lạnh

8-1. Giới thiệu chung

8-2. Di truyền tính chống chịu lạnh

8-2-1. Bản đồ QTL trên nhiễm sắc thể số 4

8-2-2. Vị trí trên bản đồ của *Ctb-1* và *Ctb-2*.

8-2-3. Tính chống chịu lạnh và chiều dài túi phấn

8-2-4. Bản đồ QTL tính trạng chống chịu lạnh ở giai đoạn làm đòng

8-3. Sự truyền tín hiệu và phản ứng điều tiết áp suất thẩm thấu

8-3-1. Điều tiết phản ứng phát quang sinh học của *Arabidopsis*

8-3-2. Phân lập dòng đột biến có mức độ phát quang sinh học thay đổi

8-4. Sự biến đổi protein theo nhiệt độ, mặn & khô hạn

Bản chỉ dẫn (index)

Chương 1

GIỚI THIỆU TỔNG QUÁT

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG CẢI TIẾN GIỐNG CÂY TRỒNG CHỐNG CHỊU ĐIỀU KIỆN BẤT LỢI CỦA MÔI TRƯỜNG

Diện tích đất trồng trọt trên thế giới chiếm 10% trong tổng số 13 tỉ ha. Trong đó, 11,5 triệu ha đất đang được canh tác được xem như không thuận lợi cho nông nghiệp (FAO 2002). Hầu hết đất trồng trọt được xếp vào nhóm dưới mức tối hảo cho cây trồng. Bên cạnh những thiệt hại do sâu bệnh gây ra, người ta ước đoán có 70% tiềm năng về năng suất bị mất đi do điều kiện bất lợi của môi trường, ngay cả trong những quốc gia có nền nông nghiệp phát triển (FAO 2002)

Những thiệt hại do sâu bệnh gây ra được gọi với thuật ngữ "thiệt hại có tính chất sinh học" (biotic stresses). Những thiệt hại do điều kiện bất lợi của môi trường, thí dụ như khô hạn, ngập úng, mặn, phèn, nóng, lạnh, v.v., được gọi với thuật ngữ "thiệt hại có tính chất không phải sinh học (abiotic stresses)

Sự khan hiếm về nước tưới phục vụ cho nông nghiệp đã được báo động trong nhiều hội nghị khoa học của thế giới gần đây. Do sự thay đổi khí quyển với hiệu ứng nhà kính, nhiệt độ của khí quyển ấm dần lên, băng tan ở hai cực sẽ tạo sự ngập lụt ở các vùng đất thấp (như đồng bằng sông Cửu Long). Như vậy, lũ lụt và sự xâm nhập mặn sẽ trở thành vấn đề lớn trong nhiều năm sau. Với tầm quan trọng như vậy, người ta đã hoạch định một thứ tự ưu tiên trong đầu tư nghiên cứu tính chống chịu khô hạn và chống chịu mặn trên toàn thế giới, trong lĩnh vực cải tiến giống cây trồng, sau đó là tính chống chịu lạnh, chống chịu ngập úng, chống chịu đất có vấn đề (acid, thiếu lân, độ độc sắt, độ độc nhôm, thiếu kẽm, Mg, Mn và một số chất vi lượng khác như Cu,...)

1-1. KHÔ HẠN

Khô hạn sẽ là yếu tố quan trọng bậc nhất ảnh hưởng đến an toàn lương thực của thế giới, và điều này đã từng xảy ra trong quá khứ. Tài nguyên nước phục vụ cho nông nghiệp không phải vô tận, bên cạnh đó là áp lực dân số kèm theo sự phát triển đô thị, sự kiện ấy sẽ làm gia tăng nhu cầu nước phục vụ dân sinh và cho phát triển công nghiệp. Do đó, sự khan hiếm nước phục vụ nông nghiệp là vấn đề đang được dự báo rất cấp thiết trên qui mô toàn cầu. Hiện nay, nước phục vụ nông nghiệp chiếm 70% nguồn nước phục vụ dân sinh của toàn thế giới.

Muốn sản xuất được 1 kg thóc, người ta phải cần 5000 lít nước. Nhiều quốc gia như Ai Cập, Nhật Bản, Úc đã cố gắng cải tiến nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng nước, giảm xuống 1,3 m³ / kg thóc. Ở Trung Quốc, các nhà chọn giống đang thử nghiệm mô hình cây lúa canh tác trên đất thoáng khí, với thuật ngữ "aerobic rice", không phải như cây lúa ngập nước truyền thống. Bộ rễ lúa sẽ phát triển như cây trồng cạn, với chế độ tưới cải tiến, nhằm tiết kiệm nước tối đa.

Hạn hán được xem như một trong những hậu quả nghiêm trọng do sự suy giảm của nguồn nước. Do vậy, người ta đã qui định ngày 22 tháng 3 hàng năm là Ngày Nước Thế Giới. Hiện nay, mức đảm bảo nước trung bình cho một người trong một năm đã giảm từ 12.800 m³ / người vào năm 1990 xuống còn 10.900 m³ / người vào năm 2000 và có khả năng chỉ còn khoảng 8.500 m³ / người vào năm 2020. Theo Hội Nước Quốc Tế (IWRA), tiêu chuẩn công nhận quốc gia có mức bảo đảm nước cho một người < 4000 m³ / năm, được xem như thiếu nước, và < 2000 m³ / năm, thuộc loại hiếm nước. Kết quả đánh giá của chương trình KC12 ở

Việt Nam cho thấy: tổng lượng nước cần dùng cả năm của nước ta chiếm 8,8% tổng lượng dòng chảy, năm 1999, tăng lên 12,5% trong năm 2000, và được dự báo sẽ tăng 16,5% vào năm 2010. Tổng lượng nước phục vụ tưới trong nông nghiệp của Việt Nam: 41 km³ năm 1985, tăng lên 46,9 km³ năm 1999, và 60 km³ năm 2000. Lượng nước cần dùng cho mùa khô sẽ tăng lên 90 km³ vào năm 2010, chiếm 54% tổng lượng nước có thể cung cấp. Xét trên qui mô toàn cầu, nhiệt độ trái đất nóng lên sẽ có khả năng làm mất 1/3 nguồn nước đang sử dụng của thế giới trong 20 năm tới, như dự báo của Liên Hợp Quốc. Khủng hoảng thiếu nước trên thế giới hiện nay được nhận định không chỉ do nước quá ít so với nhu cầu mà còn do quản lý nguồn nước quá kém. Hàng năm có 2,2 triệu người chết do các căn bệnh liên quan đến nguồn nước ô nhiễm và điều kiện vệ sinh kém, với 12.000 km³ nước sạch hiện bị ô nhiễm nghiêm trọng. Do đó, từ năm 2000 trở đi, các dự án quốc tế về nông nghiệp thuộc hệ thống CGIAR đã nhân mạnh đến giống cây trồng chống chịu khô hạn, nước sạch cho nông thôn, đô thị, xem những nội dung này là một ưu tiên đặc biệt.

Các trung tâm nghiên cứu trên thế giới được FAO phân công phụ trách những cây trồng liên quan đến chống chịu khô hạn là:

- IITA phụ trách nghiên cứu đậu cowpea ở Sahel, đậu tương và ngô ở Dry Savana
- ICRISAT phụ trách nghiên cứu cao lương, kê, đậu chickpea, đậu phụng và đậu pigeon pea ở Ấn Độ và Sahel
- CIAT phụ trách nghiên cứu các loại đậu ở Mexico, Trung Mỹ và Đông bắc Brazil
- IRRI phụ trách nghiên cứu lúa ở Bangladesh, Đông Ấn Độ, Thái Lan và Indonesia
- CIP phụ trách nghiên cứu khoai tây ở Trung Quốc, Ấn Độ, Nam Phi, Kazakhstan, Afghanistan
- CIMMYT phụ trách nghiên cứu lúa mì ở Trung Á, Tây Á, Bắc Phi, cây ngô ở vùng cận Sahara

1-2. ĐẤT MẶN

Đất trồng trọt bị ảnh hưởng mặn ước khoảng 380 triệu ha, chiếm 1/3 đất trồng trên toàn thế giới. Nó thường đi kèm theo hiện tượng đất kiềm và ngập nước (Gale 2002). Trong đó, 60 triệu ha là đất mặn do thủy cấp đưa mặn lên đất mặt, người ta thường dùng thuật ngữ "inland salinity". Hiện tượng này do thiếu nước tưới, làm đất trở nên mặn hóa ở Châu Á, Châu Phi và Nam Mỹ.

Các trung tâm nghiên cứu trên thế giới được FAO phân công phụ trách những cây trồng liên quan đến chống chịu mặn là:

- IRRI phụ trách nghiên cứu lúa vùng ven biển ở Bangladesh, Orissa, Việt Nam, Philippines, vùng mặn trong đất liền ở châu thổ sông Hằng (Ấn Độ) và vùng Đông bắc Thái Lan
- ICARDA phụ trách nghiên cứu lúa ở Trung Á

1-3. ĐẤT ACID & ĐẤT BẠC MÀU

Đất acid chiếm 40% diện tích đất trồng trọt trên toàn thế giới, với pH < 5, trong đó yếu tố hạn chế chủ yếu cho cây trồng là hàm lượng cao của nhôm và manganese. Vấn đề này đặc biệt quan trọng tại Nam Mỹ (380 triệu ha), bao gồm khu vực châu thổ sông Amazone. Yếu tố hạn chế do hàm lượng sắt cao, gây độc cho cây được ghi nhận ở Tây Phi. Đất phèn ở Việt Nam và Thái Lan thuộc nhóm khác, rất đặc biệt, bởi vì độc chất thuộc hợp chất sulfate sắt, nhôm, cộng thêm hiện tượng thiếu lân, pH thấp, và rất giàu hữu cơ.

Các trung tâm nghiên cứu trên thế giới được FAO phân công phụ trách những cây trồng liên quan đến chống chịu đất acid và bạc màu là:

- IITA phụ trách nghiên cứu đậu cowpea, đậu tương ở vùng rừng ẩm ướt
- CIAT phụ trách nghiên cứu các loại đậu ở Châu Phi, Châu Phi La Tinh

- IRRI phụ trách nghiên cứu lúa ở Bangladesh, Indonesia, Philippines
- CIMMYT phụ trách nghiên cứu ngô ở Châu Mỹ La Tinh, Đông Nam Á và Châu Phi, phụ trách nghiên cứu lúa mì ở CWANA

1-4. NHIỆT ĐỘ LẠNH & NHIỆT ĐỘ NÓNG

Nhiệt độ quá nóng hoặc quá lạnh sẽ làm hạn chế tiềm năng phát triển của cây trồng. Hiện nay, 70% vùng đất trồng khoai tây của thế giới có khả năng bị rủi ro do nhiệt độ lạnh. Cây lúa trồng ở Hàn Quốc, Nepal thường bị thiệt hại do lạnh

Các trung tâm nghiên cứu trên thế giới được FAO phân công phụ trách những cây trồng liên quan đến chống chịu nhiệt độ bất thuận là:

- CIP phụ trách nghiên cứu khoai tây chịu lạnh ở Andes, chịu nóng ở Nam Á
- ICARDA phụ trách nghiên cứu lúa mạch, đậu chickpea, cây gai chịu lạnh
- IITA phụ trách nghiên cứu đậu cowpea chịu nóng ở Sahel

1-5. BẢN ĐỒ GEN & SỰ PHÁT TRIỂN MARKER PHỤC VỤ PHÂN TÍCH DI TRUYỀN

Bản đồ gen là yêu cầu trước hết cho phân tích di truyền tính trạng chống chịu các thiệt hại không phải sinh học, đồng thời nó cũng là tiêu chuẩn trong chọn giống cây trồng hiện đại. Nhóm Tư Vấn về Nghiên Cứu Nông Nghiệp Quốc Tế (CGIAR) của FAO đã chỉ đạo các Viện, Trung Tâm trực thuộc, hoàn thành các bản đồ ở mức độ phân tử đối với những loại cây trồng chính. Trong đó, có những công trình mang tính chất hợp tác quốc tế rất rộng như: bản đồ gen cây lúa, lúa mì, khoai tây có thể được sử dụng phổ biến. Những bản đồ căn bản đối với cây trồng có mức độ phổ biến thấp cũng được xem xét, và được sự phân công của CGIAR, tuy rằng chúng có tính chất quốc tế hóa rất thấp. Chỉ còn một vài loài chưa được xây dựng bản đồ. Bản đồ di truyền (genetic map) còn được hiểu như bản đồ liên kết (linkage map) giữa marker và gen mục tiêu. Bên cạnh đó, người ta đã thực hiện những hợp phần quan trọng để xây dựng bản đồ vật lý (physical map) của những gen này. Kỹ thuật xây dựng bản đồ đối với tính trạng số lượng (QTL) thường có rất ít thông tin về sự kiểm soát của gen, bởi vì nó dựa trên những giả định có tính chất toán học. Nhưng nó vô cùng quan trọng, vì hầu như các tính trạng chống chịu với "stress" đều yêu cầu "QTL mapping". Người ta cần phải quét từ đầu đến cuối bộ genome với những marker bao phủ toàn bộ các nhiễm sắc thể, với mật độ trung bình 10cM giữa 2 marker. Thông qua đó, người ta xác định những khu vực giả định có chứa các gen điều khiển tính trạng số lượng mà ta đang nghiên cứu. Người ta phải dựa trên cơ sở biến động của tính trạng kết hợp với sự thay đổi của marker tương ứng. Mật độ marker càng dày đặc, càng tốt cho sự giả định, với mức độ chính xác cao, trên một quần thể con lai nào đó đang được sử dụng để phân tích di truyền. Những vị trí được xác định như vậy vô cùng cần thiết cho chương trình chọn giống nhờ marker (MAS = marker-aided selection) đối với tính trạng chống chịu, và rất cần thiết cho kỹ thuật cloning trên cơ sở bản đồ di truyền (map-based cloning) của những gen thuộc về QTL

Những marker được ứng dụng trong chọn giống cây trồng phải liên kết chặt với gen mục tiêu, trên cơ sở bản đồ di truyền phân tử. Hiện nay, marker có hiệu quả đáng tin cậy là "microsatellite" viết tắt SSR. Người ta đang chuẩn bị đưa vào sử dụng rộng rãi marker SNP trong vài năm tới (chữ SNP được viết tắt từ thuật ngữ "single nucleotide polymorphisms" = các đa hình nucleotide đơn). Đối với cây lúa, thuận lợi lớn nhất trong ứng dụng marker là bản đồ genome của nó đã cơ bản được giải mã, marker không còn là vấn đề. Theo công trình của Goff và 30 tác giả khác trong năm 2002, chuỗi ký tự của SSR và SNP hiện được thiết kế ước khoảng 40.000 marker, kể cả những phân tử mất đoạn, hay xen đoạn. Đây là những chuỗi mã đồng nhất ở mức độ 1%, mật độ 24 / mỗi gen (Gale 2002)

1-6. CƠ CHẾ SINH LÝ HỌC VÀ DI TRUYỀN HỌC ĐỐI VỚI HIỆN TƯỢNG CHỐNG CHỊU STRESS

Cơ chế sinh lý giải thích hiện tượng đáp ứng của cây trồng đối với stress, và nhằm mục đích cải tiến cấu trúc, hoạt động sinh lý, sinh hóa của cây, giúp cây thoát khỏi, hoặc né tránh, hoặc chống chịu sự thiệt hại do stress gây ra. Có hai phương pháp liên quan đến cải tiến giống cây trồng chống chịu stress:

- (1) Phương pháp dựa trên kinh nghiệm (empirical approach) được bắt đầu từ việc khai thác biên dị di truyền, kết hợp với nguồn vật liệu cung cấp gen chống chịu tốt nhất của giống cây trồng, hoặc của loài hoang dại. Nguồn vật liệu lý tưởng nhất đối với tính trạng chống chịu được phân lập và xem xét gen điều khiển tính chống chịu thông qua phân tích QTL đối với quần thể dòng con lai đang phân ly, trên hai kiểu hình chống chịu cao và chống chịu thấp. Mặc dù cơ chế sinh lý vẫn được xem là cơ chế chính được ưu tiên nghiên cứu, nhưng sự di truyền tính trạng chống chịu này đến giống cây trồng mới là một tiến trình vô cùng cần thiết, với yêu cầu chọn lọc khắt khe và tích lũy những alen có lợi
- (2) Phương pháp lai tạo giống có kiểu hình lý tưởng (ideotype breeding approach), trong đó đặc điểm về hình thái học và sinh lý học đều phải có khả năng tham gia vào mục tiêu cải tiến giống trong điều kiện bị stress. Gen mục tiêu từ giống cây trồng và từ loài hoang dại đều được quan tâm khai thác, để chuyển nó vào giống cây trồng mới.

Khi thực hiện hai phương pháp này, người ta còn phải sử dụng những kỹ thuật lai, kỹ thuật chống gen kháng nhờ marker phân tử, nhằm xác định những alen có lợi.

Trường hợp stress là khô hạn, mặn và lạnh, những hiện tượng này có chức năng về sinh lý thực vật liên quan với nhau, trên cơ sở điều tiết áp suất thẩm thấu của tế bào. Nhiều chiến lược nghiên cứu nhằm cải tiến tính chống chịu này mang tính chất đa ứng dụng. Chúng bao gồm hiện tượng điều tiết áp suất thẩm thấu ở rễ, lá, nhằm duy trì nước, loại bỏ các yếu tố rào cản có tính chất kỵ nước (hydrophobic barriers) trong rễ và lá, cải tiến sự thông thương mạch dẫn, nhằm thúc đẩy sự di chuyển nước trong cây. Những cơ chế tránh né (avoidance), thoát (escape), và chống chịu (tolerance) có nét rất giống nhau đối với khô hạn, mặn và lạnh. Thí dụ như cải tiến tính trạng rút ngắn thời gian từ gieo đến trổ, tính trạng rễ phát triển mọc sâu hơn trong đất, tính trạng nhạy cảm trong phản ứng cơ nguyên sinh của tế bào khi gặp stress.

Di truyền tính chống chịu đối với stress không phải sinh học thường được kiểm soát bởi đa gen và rất phức tạp, các gen kiểm soát tính chống chịu có thể trùng lặp nhau đối với những stress khác nhau. Trong genome của lúa mì và lúa mạch, người ta nhận thấy các ảnh hưởng di truyền kiểm soát sự đáp ứng của cây đối với khô hạn, mặn và lạnh nằm trên cùng bản đồ di truyền nhiễm sắc thể tương đương. Có ít nhất 10 QTL được tìm thấy đối với từng tính trạng chống chịu này và chúng nằm chồng lên nhau tại một số vùng của nhiễm sắc thể.

Trường hợp sử dụng "phương pháp dựa trên kinh nghiệm" đối với tính trạng chống chịu độ độc nhôm, người ta ghi nhận kỹ thuật thanh lọc nhôm thường chỉ cải tiến sự phát triển của rễ và chồi trong môi trường dinh dưỡng Yoshida có chứa Al, ở điều kiện pH thấp, và đó là một hiện tượng di truyền rất phức tạp. Những gen kiểm soát tính trạng chống chịu này thường tập trung tại một locus có giá trị đóng góp vào tần suất biến dị di truyền cao nhất. Những kết quả như vậy xác định hướng ưu tiên của MAS (chọn giống nhờ marker phân tử), với sự cô lập gen có tính chất quyết định (key gene) thông qua cả hai biện pháp hỗ trợ, đó là "kỹ thuật cloning" và "sản xuất các dòng đẳng gen" (Gale 2002). Sự cô lập gen (gene isolation) và kiến thức về chuỗi mã của gen có thể được xem là những bước phát triển có tính chất quyết định làm rõ thêm cơ chế di truyền tính chống chịu này.

Không phải tất cả các tính trạng chống chịu stress do đa gen điều khiển. Một vài tính trạng chống chịu với stress được thể hiện do sự điều khiển của gen chủ lực. Thí dụ như tính trạng chống chịu ngập của cây lúa ở vùng Đông Nam Á, nơi có diện tích canh tác bị ảnh hưởng của lũ lụt là 25 triệu ha, do lũ đến bất ngờ làm cây lúa bị ngập hoàn toàn (7 đến 10

ngày), gen điều khiển *Sub1* định vị tại một locus giúp cho cây lúa chống chịu được ngập và phục hồi bình thường

Khả năng của các loài hoang dại có quan hệ gần với cây trồng được đánh giá rất cao, trong chiến lược du nhập gen mục tiêu từ loài hoang dại vào loài cây trồng, nhằm gia tăng tính chống chịu một cách có hiệu quả. Gen chống chịu mặn được ghi nhận từ một loài hoang dại *Porteresia coarctata* của Ấn Độ, Sri Lanka có thể chuyển vào lúa trồng. Gen chống chịu mặn của *Thinopyrum bessabaricum* giúp nó phát triển trong điều kiện mặn 250 mM NaCl, có thể được sử dụng trong chương trình cải tiến cây lúa mì. Đối với tính trạng chống chịu độ độ nhôm, loài cỏ lông tây, *Brachiaria decumbens*, thuộc vùng nhiệt đới, được xem là nguồn vật liệu trong chương trình cải tiến giống lúa mì ôn đới, giống ngô ôn đới (Gale 2002). Chiến lược cải tiến giống như vậy có tên là "crop replacement".

1-7. TIẾN ĐỘ CẢI TIẾN GIỐNG CHỐNG CHỊU (chậm nhưng khả thi)

Hiện nay, tiến độ cải tiến giống chống chịu đối với stress rất chậm bởi chúng ta chưa có sự hợp tác nghiên cứu một cách hiệu quả giữa nhà sinh lý thực vật, sinh hóa và nhà di truyền. Một vài tiến bộ được ghi nhận trong cải tiến giống chống chịu (tolerance) hoặc tránh né (avoidance) khô hạn, mặn, độ độc nhôm. Những hiểu biết về cơ chế chống chịu cho từng đối tượng còn quá hạn chế.

Những giống cây trồng được các cơ quan thuộc hệ thống CGIAR quan tâm đầu tư nghiên cứu và phát triển:

- Giống ngô nhiệt đới chống chịu đất acid: Corpoica H-108, H-111 phát triển tại Colombia, giống Pool 25 tại Brazil, giống ZM421, 521 và 621 vừa được công nhận cho phát triển tại Nam Phi, nó còn chống chịu hiện tượng đất nghèo N và khô hạn giữa vụ trồng. Các giống này do CYMMIT lai tạo và hợp tác với các địa phương nói trên
- Giống lúa chống chịu mặn PSBRc 84, 86 và 88 phát triển tại Bangladesh, trong đó PSBRc 88 có phẩm chất gạo tốt. Giống lúa này do IRRI lai tạo và hợp tác với các quốc gia trong mạng lưới
- Giống chuối chống chịu hạn FHIA 01 do INIBAP lai tạo và chọn lọc, hiện phát triển tại Honduras, Tanzania và 50 quốc gia khác
- Giống khoai tây chống chịu nóng Unica phát triển tại Peru do CIP lai tạo và chọn lọc

Tiến độ cải tiến giống cây trồng phục vụ mục tiêu chống chịu này hiện gặp trở ngại do tính trạng năng suất cao và tính trạng chống chịu có khả năng tương hợp thấp. Năng suất cao trong điều kiện bị stress cũng không tương hợp với năng suất cao trong điều kiện bình thường. Điều này cho thấy cần có một chương trình cải tiến giống độc lập nhằm tạo ra những giống có yêu cầu đặc biệt, đối với từng loại stress riêng biệt. Chúng ta vẫn chưa hiểu rõ: liệu có sự đối kháng giữa năng suất và tính chống chịu hay không? Gen điều khiển năng suất cao trong điều kiện bị stress và trong điều kiện bình thường cùng một nhóm như nhau. Nhưng sự tương tác giữa kiểu gen và môi trường (GxE) vẫn còn là điều chưa được hiểu một cách đầy đủ. Với sự phát triển của công nghệ sinh học, đặc biệt là kỹ thuật di truyền, người ta đang ưu tiên nghiên cứu giống chống chịu khô hạn và chống chịu mặn, với qui mô hợp tác quốc tế rất tích cực.

1-8. KỸ THUẬT THANH LỌC CÓ TÍNH KHẢ THI VỚI QUI MÔ LỚN

Việc đánh giá kiểu hình (phenotyping) các dòng con lai đối với các stress đòi hỏi chúng ta không ngừng hoàn thiện các kỹ thuật thanh lọc rẽ tiền, chính xác, dễ ứng dụng khi thực hiện với số lượng lớn của con lai.

Thanh lọc ngoài đồng ruộng thường gặp những vấn đề phát sinh do các yếu tố môi trường mà chúng ta chưa kiểm soát được, chúng có thể ảnh hưởng làm sai lệch kết quả thanh lọc. Muốn khắc phục hạn chế này, người ta cố gắng cải tiến phương pháp bố trí thí nghiệm đối với từng vấn đề stress khác nhau

Thanh lọc trong phòng thí nghiệm hoặc trong nhà lưới với các yếu tố tham gia thống nhất, có kiểm soát, thường bị hạn chế do qui mô bé, và rất tốn kém. Hơn nữa cơ chế chống chịu *in vitro* và cơ chế chống chịu ngoài đồng thường không thống nhất, thí dụ như tính chống chịu mặn, tính chống chịu khô hạn. Trường hợp thanh lọc với độ đục do sắt trong đất phèn, chúng ta rất khó kiểm soát sự chuyển đổi từ Fe⁺⁺ sang Fe⁺⁺⁺ trong môi trường dinh dưỡng. Trường hợp thanh lọc tính trạng chống chịu ngập hoàn toàn, chúng ta phải kiểm soát độ đục của nước sao cho gần giống như điều kiện ngoài đồng. Trường hợp thí nghiệm tính trạng chống chịu sự thiếu lân, phương pháp bố trí thí nghiệm phải giải quyết được hai vấn đề: (1) cơ chế phát triển trong điều kiện đất có hàm lượng lân ở ngưỡng thấp, có thể những giống nghiên cứu phát triển tốt trong điều kiện này, nhưng không chống chịu sự thiếu lân, (2) cơ chế phát triển trong điều kiện thiếu lân thực sự.

Ứng dụng công nghệ sinh học, người ta đề xuất phương pháp đánh giá kiểu gen (genotyping), với sự trợ giúp của marker phân tử để thanh lọc con lai có gen chống chịu với stress mục tiêu. Marker SSR hiện được khuyến cáo vì hiệu quả cao, đáng tin cậy, số lượng marker lớn. Vấn đề trở ngại lớn nhất của tính chống chịu với stress là đa gen điều khiển với những giả định QTL. Vì vậy, công việc "fine mapping" phải được thực hiện liên tục nhằm xác định marker đáng tin cậy nhất cho chiến lược MAS (marker-assisted selection) trên cơ sở phân tích với quần thể hồi giao cải tiến của vật liệu bố mẹ đã được chọn lọc cẩn thận.

1-9. GENOME HỌC - NGÀNH HỌC DI TRUYỀN MỚI

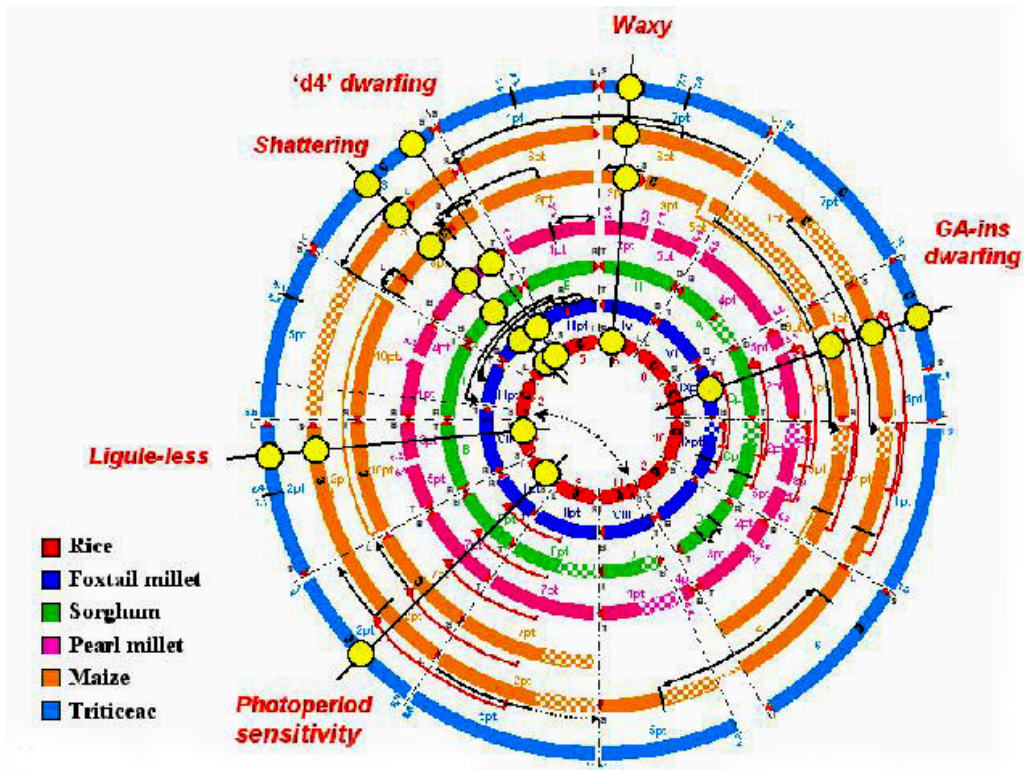
Từ năm 1998, người ta bắt đầu làm quen với thuật ngữ "Genomics" (genome học) thông qua chương trình nghiên cứu về genome của người. Trong thực vật, genome của cây *Arabidopsis thaliana* đã được giải mã cơ bản vào năm 2000. Genome cây lúa đã được công bố giải mã trong năm 2001 và hoàn thiện trong năm 2002 của nhóm nghiên cứu Bắc Kinh (Trung Quốc) và Tsukuba (Nhật Bản) cùng với những thông báo đáng chú ý của Syngenta và Monsanto. Khả năng genome của cây ngô sẽ là mục tiêu tiếp theo được giải mã, ít nhất là tại các vùng trên nhiễm thể tập hợp cao các gen (gene-rich regions) của bộ genome. Công nghệ bao trùm toàn bộ hoạt động của ngành genome học là: (1) đọc chuỗi mã DNA tự động, với khả năng đọc của máy là 2 triệu cặp base một ngày, với số kênh mao dẫn từ 16, đến hơn 98 kênh, và nó đang được tiếp tục cải tiến với tốc độ phát triển cực nhanh (2) microarray và chip sinh học DNA, trong đó 10.000 gen có thể được "scan" trong cùng một lần xem xét, các máy đánh giá kiểu gen tự động có khả năng xét nghiệm 10.000 điểm chẩn đoán DNA trong một ngày. Thực vậy, khả năng kiểm tra toàn bộ genome đối với những marker di truyền, hoặc sự thể hiện gen trên từng chip đơn lẻ là hiện thực trong một tương lai rất gần. Kỹ thuật chuyển nạp gen sẽ đơn giản và dễ dàng hơn nhờ các tiến bộ mới trong công nghệ sinh học, qua đó, việc cải biên di truyền trở nên hiệu quả hơn đối với mục tiêu cải tiến giống cây trồng, ở góc độ công nghệ có liên quan đến "genomics".

1-10. HIỆN TƯỢNG SYNTENY & GENOMICS CÓ TÍNH CHẤT SO SÁNH

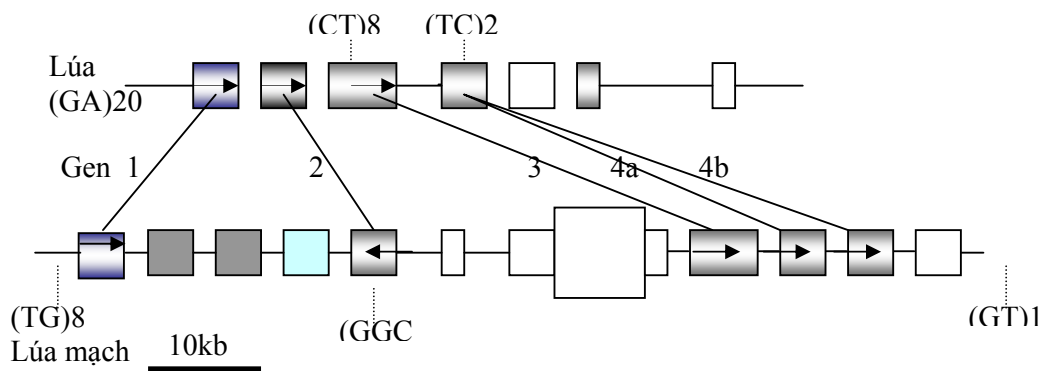
Trong cuối thập kỷ 1990, một sự kiện khoa học quan trọng rất đáng ghi nhớ đó là khám phá thành phần của gen, vị trí thứ tự của gen được ghi nhận có quan hệ rất chặt giữa các loài thực vật khác nhau. Đó là hiện tượng "synteny". Thuật ngữ "synteny" có nguồn gốc từ chữ Hi Lạp, trong đó "syn" có nghĩa là quan hệ với nhau, "taenia" có nghĩa là dải băng (ribbon)

Thuật ngữ này được dùng trong di truyền để ám chỉ sự hiện diện của hai hoặc nhiều hơn hai loci trên cùng một nhiễm sắc thể. Người ta còn sử dụng thuật ngữ lập bản đồ so sánh (comparative mapping) và xác định gen trên cơ sở "gen phát triển đồng dạng" (homeology-based gene isolation) để minh họa hiện tượng synteny có trong tự nhiên (McCouch 2001). Khái niệm "synteny" được mở rộng trên khái niệm đồng dạng của nhiễm sắc thể tương đồng. Nghiên cứu trên họ Solanacea, Bonierbale và ctv. (1998) đã chứng minh rằng cDNA markers trên 12 nhiễm sắc thể của cà chua và khoai tây có tính chất đồng tuyến (collinear), chúng chỉ khác nhau ở 5 đảo đoạn không ở vị trí trung tâm, trong khi đó, cây ớt có một sự sắp xếp tương

đồng nhưng to lớn hơn hai genome này. Trong họ Graminae, người ta nhận thấy chúng có mức độ phát triển có thể được đánh giá cao nhất về hiện tượng synteny, bởi vì sự thể hiện rất rõ ràng của các loài trong họ. Hầu hết các gen trong họ có chức năng được biết hay chưa được biết đều có những mật mã protein tương ứng với các gen của chuỗi mã cây lúa. Bản đồ genome của những loài thuộc họ Graminae bao gồm những cây mẽ cốc có thể được nối với nhau thành trục đường thẳng các gen mục tiêu định vị trên genome (với độ lớn khác nhau, theo vòng tròn đồng tâm) (hình I-1). Nếu một gen của một loài được biết về chức năng, người ta có thể dự đoán trên tất cả những loài còn lại. Theo hình I-1, cây lúa có genome nhỏ nhất, thể hiện vòng tròn ở trung tâm.



Hình I-1: Định vị các gen có quan hệ giữa các loài khác nhau bao gồm lúa (rice), kê đuôi chồn (foxtail millet), cao lương (sorghum), kê hạt ngọc (pearl millet), ngô (maize), nhóm lúa mì (Triticeae) theo nghiên cứu của Gale và Devos (2002). Gen waxy : amylose thấp, làm tinh bột dẻo, dính, photoperiod sensitivity: cảm quang, liguleless : không có tai lá, shattering: dễ rụng hạt, *d4-dwarfing*: gen lùn *d4*, *Ga-ins dwarfing*: gen lùn không mẫn cảm với gibberellin.



Hình I-2.: Thành phần gen và vị trí thứ tự gen được bảo tồn giữa hai cây lúa và cây lúa mạch. Một gen được nhân thành đôi trong một của hai genome. Gen của lúa mạch với kích thước genome lớn hơn lúa nước, định vị rải rác với những đoạn phân tử lặp lại khá lớn (Dubcovsky và ctv. 2001)

Chức năng của gen trong điều khiển tính trạng nào đó có thể được dự đoán trong tất cả các cây thuộc nhóm mễ cốc. Sự tương đồng giữa các genome như vậy qui kết những gen lại với nhau trong một giới hạn có thể biết được. Hình I-2 cho thấy các vùng có tính chất liên gen (intergenic) rất khác nhau giữa hai loài có quan hệ rất gần nhau, và rất khác nhau về kích thước genome

Chính nhờ hiện tượng synteny, việc ứng dụng những công cụ chính của genomics trở nên thuận tiện hơn, từ kết quả phân tích genome của cây lúa, người ta có thể ứng dụng trực tiếp trong phân tích di truyền genome của lúa mì, lúa mạch, kê, cao lương, và ngô. Bản đồ so sánh thể hệ một đã được công bố đối với cây lúa và tất cả những genome giống như vậy (Gale 2002). Một bộ sưu tập các phân tử "probe" đóng vai trò neo có số bản sao cDNA thấp (anchor probes) đã được sử dụng để làm ra bản đồ có tính chất so sánh trong các loài khác nhau (# 7 loài) của họ Hoà Bản. Các vùng có gen xếp theo thứ tự được bảo tồn có tính chất vị trí tương ứng với kiểu hình thể hiện ra bên ngoài đã được tư liệu hóa một cách hệ thống, thông qua sự đóng góp của các phân tử "mutant" và những QTL. Tuy nhiên, có rất nhiều trường hợp ngoại lệ thí dụ như marker liên kết không được thấy trên bản đồ ở vị trí dự đoán giữa hai đường thẳng xác định vùng mục tiêu, và đặt ra cho chúng ta nhiều câu hỏi chưa giải thích được. Kilian và ctv. (1997) lần đầu tiên đã cố gắng "clone" một gen trong một loài cây trồng trên cơ sở thông tin về chuỗi mã và thông tin có tính chất vị trí (positional) (thuật ngữ chuyên môn gọi đó là "microsynteny"), hiện nay người ta sử dụng thuật ngữ "vùng đồng dạng" (homeologue region) của một genus khác với genus đang nghiên cứu. Cho dù các đoạn tương ứng của nhiễm thể cây lúa mạch (*Hordeum vulgare*) và cây lúa (*Oryza sativa*) thể hiện khá rõ nét về tính chất đồng dạng tại vùng mà gen kháng bệnh rỉ sắt của lúa mạch *Rpg1* định vị, nhưng gen mục tiêu này không hề được tìm thấy ở vùng dự đoán trên genome cây lúa (McCouch 1997). Chương 5 minh họa hiện tượng synteny trong nghiên cứu giống lúa chống chịu độ độc nhôm

1-11. ỨNG DỤNG GENOMICS TRONG CẢI TIẾN GIỐNG CÂY TRỒNG CHỐNG CHỊU VỚI STRESS

1-11-1. Thư viện DNA (DNA library)

Nhằm đáp ứng mục tiêu ứng dụng genomics trong cải tiến giống cây trồng chống chịu với stress không phải sinh học, người ta rất quan tâm đến khả năng khai thác hiện tượng "synteny" và genomics có tính chất so sánh, hơn là nội dung đề ra các giải pháp trên cơ sở thiết kế chương trình lai tạo với database khá phong phú (modelling) giống như chương trình lúa dạng hình mới có năng suất vượt trần, bởi vì cơ chế chống chịu vẫn chưa được hiểu rõ ràng. Như vậy, người ta rất cần có một cơ sở vật chất về genome một cách căn bản và đầy đủ. Đó là thư viện các DNA clone. Yêu cầu tối thiểu phải có là (1) bản đồ liên kết gen ở mức độ phân tử trên từng nhiễm sắc thể, (2) một thư viện DNA đủ lớn, (3) một hệ thống chuyển nạp có khả năng mang một số lượng lớn gen mục tiêu chuyển vào các cây được cải biến về di truyền. Bản đồ phải đáp ứng điều kiện phù kín trên nhiễm thể với 2-3 cM giữa hai marker kế cận, và một số lượng lớn các loci mang tính chất "neo" (anchor). Bản đồ RFLP, EST, SSR, SNP sẽ cung cấp cho chúng ta những so sánh về kết quả áp dụng để chúng ta lựa chọn. Thư viện DNA sẽ có thể cho hiệu quả tốt hơn gấp đôi nếu đó là thư viện BAC với kích thước DNA gắn vào vectơ lớn hơn 100 kb (Gale 2002).

Người ta còn dự tính sẽ khai thác bộ sưu tập EST (những chuỗi ký tự của gen đã được chuyển mã), một bản đồ so sánh, và một quần thể có tên gọi chuyên môn là "knockout populations". Những EST thường là những sưu tập từ các mô thực vật bị stress, hoặc chưa bị stress. Đối với bản đồ có tính chất so sánh, người ta sẽ sắp xếp những nhiễm sắc thể có tính chất đồng dạng theo một "model" chuyên biệt nào đó. Đối với quần thể "knockout", người ta sẽ tạo ra thông qua thư viện DNA đột biến, hay thư viện DNA bị mất đoạn, trong đó các gen như vậy trở nên không bình thường một cách ngẫu nhiên. Hiện nay, người ta nghiên cứu T-

DNA được đánh dấu, hay transposon được đánh dấu (Burr 2002), kết quả được minh họa trong trường hợp cây lúa và cây *Arabidopsis thaliana*.

Lĩnh vực genomics của cây lúa, lúa mì và cây ngô hiện rất phong phú. Bên cạnh đó, CGIAR cũng khuyến khích phát triển nghiên cứu genome của cây kê, cao lương, đậu đỗ, khoai mì

1-11-2. Kỹ thuật cloning các gen

Có nhiều cách để clone những gen mục tiêu, tuy nhiên, chúng ta phải nhớ rằng nếu mọi hoạt động xác định một vị trí nào đó trên bản đồ của một gen mục tiêu điều khiển tính chống chịu stress, nhưng chúng ta chưa ghi nhận một chức năng cụ thể của nó, thì tiến trình phân lập gen ứng cử viên này sẽ gặp trở ngại, sự thể hiện gen trong một điều kiện nhất định sẽ không được hiểu rõ (nhất là tương tác của tính trạng chống chịu với môi trường). Chiến lược nghiên cứu “map-based cloning” đã được đề xuất. Người ta xếp hạng cây trồng theo quan hệ huyết thống và xác định những bản đồ có tính chất “kiểu mẫu” (model maps) chứa đựng các gen ứng cử viên định vị trong khu vực dự đoán, trên cơ sở phân tích QTL. Với tần suất khoảng 30 gen trên một đơn vị bản đồ của cây lúa, người ta sẽ có thể định vị một cách chi tiết hơn những QTL, mà những sàng lọc như vậy làm cho QTL được xem xét như những gen chủ lực trong di truyền Mendel. Do đó, có một thuật ngữ mới dùng để diễn tả sự kiện này được gọi là “Mendelisation”, trong một quần thể phân ly rất lớn. Những “BAC contig” chồng lấp nhau tạo ra series của những clone. Thông qua bản đồ vật lý và thông qua chuỗi ký tự có tính chất “model”, các series của clone mong muốn có thể được tạo ra.

Một kỹ thuật mới về “map-based cloning” được phát triển gần đây, đó là kỹ thuật “deletion tilling”. Kỹ thuật này bao gồm: (1) tạo ra số lượng phân tử bị mất đoạn, trong đó có gen mục tiêu, (2) sử dụng đoạn phân tử chồng lấp tối thiểu để xác định gen ứng cử viên trong khi mô phỏng (trường hợp genome lúa mì). Phương pháp này có thuận lợi là không cần biến dị của gen mục tiêu hoặc vùng kế cận của nó. Hiện nay CGIAR rất chú ý đến việc ứng dụng của kỹ thuật “tilling”

1-11-3. Microarray

Những gen ứng cử viên cũng có thể được thể hiện trong kỹ thuật phân tích microarray. Những gen nhạy cảm với stress, sự thể hiện gen xảy ra khi bị stress, trở nên rất lý tưởng cho nghiên cứu microarray. Thí nghiệm có tính chất điển hình về array của EST với RNA được ly trích trong mô cây bị tổn thương do stress, và mô cây không bị stress, đã được thiết kế để tìm hiểu về hiệu quả của phân tích microarray. Người ta dự đoán có khoảng 25.000 gen trong genome cây *Arabidopsis* và 50.000 gen trong genome cây lúa sẽ được phát hiện đầy đủ trong một tương lai gần (Gale 2002). Microarray được hình thành từ bộ sưu tập EST từ thư viện cDNA, hoặc cDNA được sưu tập trên mô bị stress (do khô hạn, mặn, thiếu lân, độ độc nhôm, v.v...). Thí dụ trong cây lúa, 10% gen sẽ điều tiết “up” hoặc “down” trong vòng 1 giờ sau khi chúng bị xử lý trong môi trường mặn (Kawasaki và ctv. 2001).

Người ta sẽ phát triển công nghệ tạo các "microarray" hay "gene chips" trong nghiên cứu genome về chức năng. Những chips sinh học này rất hữu dụng trong tương lai gần để tìm ra những gen mục tiêu có tính chất ứng cử viên (candidate genes) đối với từng tính trạng mong muốn. Đây là bước đột phá có tính chất lịch sử trong quá trình phát triển ngành di truyền phân tử của loài người. Nhiều dòng đột biến mất đoạn, dòng du nhập gen cho năng suất cao, có thể trồng ở nơi thiếu nước. Nhiều dòng thể hiện tính chống chịu hạn và mặn rất tốt. Những nghiên cứu về chức năng như vậy cho phép chúng ta hiểu rõ hơn: làm thế nào cây lúa có thể thích ứng với các stress, tìm ra các gen hữu ích cho công tác lai tạo giống lúa. Theo Tiến sĩ Leung, có hơn 100 gen giúp cây lúa kiểm soát tính kháng bệnh hại đã được tìm thấy để tạo ra giống lúa kháng bệnh tốt hơn. Kỹ thuật mới về "microarray" bao gồm một sự tập trung khoảng 20.000 gen trên một "slide". Người ta còn gọi đó là "chip" đóng vai trò như một "sensor" để tìm ra những thông tin di truyền cần thiết. Phương pháp này cho phép chúng ta có

thể lai cùng một lúc với rất nhiều "probe". "Probe" là những chuỗi ký tự của cDNA, có nguồn gốc từ các gen chống chịu với mức độ stress khác nhau. Phân tử mRNA đối với tình trạng chống chịu stress nào đó được chuyển mã ngược thành cDNA. Phân tử cDNA này được dùng để lai với "microarray", sau đó người ta xác định những "clone" dương tính. Thông qua nhiều giai đoạn phát triển, sau quá trình bình thường hóa, người ta phải đảm bảo rằng những chuỗi ký tự này đồng nhất, sẵn sàng được xác định trên slide hoặc trên màng. Chíp sinh học này có thể được đóng hoặc mở khi cây ở điều kiện bình thường hoặc bị stress. Phương pháp này không chỉ xác định gen ứng cử viên mà còn tìm hiểu cả quá trình thể hiện gen trong điều kiện bị stress

1-11-4. Quần thể “knockout”

Người ta đã thực hiện nhiều quần thể khác nhau được đánh dấu bởi transposon hoặc T-DNA để phục vụ cho nghiên cứu genome cây lúa và cây *Arabidopsis*. Những quần thể như vậy còn được gọi với thuật ngữ là “gene machines”. Những máy gen này với hình thức di truyền bị đảo ngược sẽ giúp chúng ta xác định bất cứ một gen nào đó rất cần cho mục tiêu nghiên cứu, trên cơ sở gen bị đột biến xen đoạn, hoặc gen nhảy. Những dòng trong quần thể “knockout” có thể được nghiên cứu theo một kiểu hình có quan hệ với chức năng của gen mục tiêu. Gần đây, người ta phát triển một phương pháp mới, đó là TILLING, thuật ngữ này được viết tắt từ chữ “targeted induced local lesions in genomes”. Phương pháp TILLING giúp chúng ta tạo ra những “knockout” mục tiêu và từ đó sáng tạo ra các series có tính chất alen với nhau của bất cứ gen nào đó cần nghiên cứu. Những quần thể TILLING hiện đã được thành lập để phục vụ cho nghiên cứu genome cây lúa và cây *Arabidopsis*.

Quần thể đột biến do hóa chất hay phóng xạ của cây trồng trở thành một yêu cầu cần thiết trong nghiên cứu di truyền trong tương lai. Những dòng chống chịu với stress như khô hạn, mặn, nhiệt độ lạnh, ngập úng đều có thể được xác định. Thử thách trước mắt đối với các nhà khoa học là liên kết kiểu hình với gen mất đoạn, ở đó chuỗi mã di truyền của gen ứng cử viên được xem như mốc khởi động rất tốt

1-11-5. Chuyển nạp gen

Kỹ thuật chuyển nạp gen hiện đã trở nên thông dụng cho hầu hết các loài cây trồng, nhưng hiệu quả của nó vẫn còn là vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu cải tiến. Đặc biệt đối với cây một lá mầm, hiệu quả chuyển nạp gen đạt được khó hơn so với cây hai lá mầm. Những cố gắng đầu tiên sẽ là công việc kiến trúc alen của gen mục tiêu gắn với promoter có chức năng kiến tạo, thí dụ CaMV35S trong quá trình chuyển nạp gen. Những xét nghiệm về “transgenic” đầu tiên sẽ là nội dung bao gồm kiến trúc dây “antisense”, sao cho thông tin được thể hiện như mong muốn. Những xét nghiệm sau cùng sẽ là xem xét khả năng của những alen đặc biệt của gen trong kiến trúc tương thích với những promoter thể hiện chức năng hoạt động ở mô, thí dụ mô rễ, mô hạt ở trong một giai đoạn phát triển cực trọng nào đó, nhằm đạt được yêu cầu chống chịu stress theo mục tiêu đề ra từ ban đầu.

Thiết kế theo mô hình cây mẫu

Genome cây *Arabidopsis thaliana* có thể được xem như mô hình cây làm mẫu (model species) trong nghiên cứu sinh học phân tử về tính chống chịu đối với stress không phải sinh học

Tính trạng chống chịu lạnh được điều khiển bởi *CBF1*, một “regulator” của genome cây *Arabidopsis*. Sự thể hiện gen *CBF1* làm kích hoạt mức độ hoạt động của hàng loạt các gen điều khiển tính chống chịu lạnh, bảo vệ cây chống lại sự thiệt hại do giá lạnh

Một yếu tố có tính chất giải mã khác là *DREB1A* điều tiết sự thể hiện hàng loạt các gen chống chịu với stress có trong genome cây *Arabidopsis*. Sự thể hiện *DREB1A* làm kích hoạt các gen chống chịu khô hạn, gen chống chịu mặn và chống chịu lạnh. Khi *DREB1A* được khởi động bởi CaMV35S, sự phát triển bình thường của cây trong điều kiện không có stress bị

đình trệ một cách nghiêm trọng (Gale 2002), nhưng khi nó được đặt trong môi trường có stress, tính trạng chống chịu sẽ được cải tiến rất tốt.

Thu thập quỹ gen - kỹ thuật “allele mining” và di truyền phối hợp

Việc thu thập ngân hàng gen, đa dạng nguồn vật liệu có gen điều khiển tính chống chịu với stress là một chiến lược lâu dài để cải tiến cây trồng.

Người ta rất chú ý một phương pháp có tên gọi là khai thác mỏ alen (allele mining). Phương pháp này bao gồm quá trình thực hiện PCR và đọc chuỗi ký tự DNA (sequencing) của hàng loạt các gen được tìm thấy trong giống cây trồng bản địa, trong các loài hoang dại có quan hệ huyết thống gần gũi. Biến dị trong chuỗi mã có thể cho chúng ta một kết quả tương ứng với tính chống chịu stress của mẫu giống, qua đó, chúng ta có thể xác nhận alen nào là tốt nhất cho những thí nghiệm về chuyển nạp gen sau này.

Người ta cũng đang cố gắng tiếp cận một phương pháp được gọi là “di truyền phối hợp” (association genetics). Đó là một thuật ngữ phát triển từ nội dung thu thập quỹ gen mà CGIAR đề nghị các nhà khoa học nên khai thác. Lĩnh vực mới của khoa học này, trên cơ sở thành tựu di truyền học của con người với mức độ phân tích cao trong những quần thể phân ly vô cùng to lớn, đã không cho phép chúng ta thực hiện nội dung như vậy. Người ta bèn nghĩ đến các gen được phối hợp với một tính trạng nào đó, những gen này được xác định thông qua tương quan giữa kiểu hình với những alen chuyên biệt ở mức độ marker phân tử liên kết chặt chẽ với gen. Trong thực vật, đó là sự thể hiện tổng quát của những mẫu giống được sưu tập trong ngân hàng gen đối với hiện tượng biến dị tại các loci của marker, phân bố rải rác trong genome (đánh giá kiểu gen). Người ta phát triển nội dung này bằng cách tìm mối tương quan giữa những kiểu gen trong điều kiện stress với hiện tượng không cân bằng của alen trong genome (allele dis-equilibrium). Đây là một ngành khoa học trẻ trong lĩnh vực sinh học thực vật, có tiềm năng rất lớn để khám phá ra các gen mới

Ngành học mới về sinh học phân tử của thực vật đang bắt đầu phát huy tác dụng trong lĩnh vực chọn tạo giống cây trồng chống chịu với những thiệt hại không phải sinh học. Genome học có tính chất so sánh là một ví dụ, nó rất có triển vọng để phát triển nhanh hơn nữa (Gale 2002).

Mục tiêu của Nhóm Tư Vấn về Nghiên Cứu Nông Nghiệp Quốc Tế (CGIAR) phải đạt là tạo ra các giống cây trồng phát triển rộng khắp trên đất có khả năng trồng trọt, năng suất cao ngay cả trên đất có vấn đề, vùng khí hậu bất thuận, đảm bảo yêu cầu an toàn lương thực, đặc biệt cho người nghèo trên toàn thế giới

Trong chương trình cải tiến giống cây trồng, người ta phân đầu áp dụng những thành tựu mới nhất của khoa học, với những công cụ tốt nhất để giải quyết các vấn đề khác nhau, đó là:

- Gen mới và gen cải tiến trong trường hợp tính chống chịu với stress không phải sinh học
- Công cụ cải tiến giống có hiệu quả cao trong khi đưa các gen này vào giống cây trồng mới, thí dụ phương tiện thanh lọc giống tốt hơn, marker phân tử liên kết với tính trạng mục tiêu chặt chẽ hơn, qui trình chuyển nạp gen hiệu quả hơn
- Chiến lược cải tiến giống cây trồng đối với tính chống chịu nào đó phải được thể hiện trong chương trình trọng điểm quốc gia
- Kiến thức cơ bản về sinh lý thực vật, sinh hóa đối với cơ chế chống chịu stress phải được cải tiến không ngừng

1-12. PHÂN TÍCH QTL

Phần lớn những tính trạng chống chịu với điều kiện bất lợi do môi trường là tính trạng di truyền số lượng. Do đó, phân tích những loci của tính trạng số lượng QTL (quantitative

trait locus-số ít, quantitative trait loci-số nhiều) đã được phát triển với nhiều mô hình nhằm đáp ứng yêu cầu nghiên cứu (Liu 1998)

Tính trạng số lượng được định nghĩa một cách kinh điển là tính trạng có phân bố liên tục (continuous distribution), tính trạng này được điều khiển bởi nhiều gen, mỗi gen có một ảnh hưởng nhỏ đối với tính trạng mục tiêu.

Bản đồ QTL bao gồm kiến trúc của những bản đồ genome và tìm kiếm mối quan hệ giữa tính trạng với những marker đa hình, minh chứng một QTL định vị kề cận những marker. Di truyền tính trạng số lượng rất phức tạp do với tính trạng đơn gen trong di truyền Mendel, bởi vì nó còn chịu sự tác động rất mạnh của môi trường.

Danh sách những tài liệu tham khảo về bản đồ QTL hiện nay khá phong phú, đặc biệt là công trình của

- Lander và Schork (1994)
- Lander và Zheng (1994)
- Stuber và ctv. (1992)
- Tanksley (1993)
- Weller (1998)

Những tác giả đã sử dụng phép thử T (t-test), phương trình tuyến tính, phương trình đa tuyến, phương trình phi tuyến tính và phép thử cách quãng để xây dựng mô hình.

Thành tựu nổi bật là phần mềm MAPMARKER/QTL của Lander và ctv (1987) QTLSTAT của Liu và Knapp (1992), QGENE của Tanksley và Nelson (1996) đã giúp cho việc nghiên cứu phân tích QTL được diễn giải một cách rõ ràng hơn

Bảng 1: Danh mục những “computer software” liên quan đến phân tích và lập bản đồ QTL

Phần mềm	Nguồn
MAPMARKER/QTL	Lander và ctv. 1987, Lander & Bostein 1989
QTLSTAT	Knapp và ctv. 1992
LINKAGE	Terwilliger & Ott 1994
PGRI	Liu 1998
QTL cartographer	Basten, Weir và Zeng 1996
MAPQTL	van Ooijen & Maliepard 1996
Map Manager QT	Manly & Cudmore 1996
QGENE	Tanksley & Nelson 1996, Nelson 1997

1-12-1. Những mô hình về di truyền số lượng

1-12-1-1. Mô hình QTL đơn (single-QTL)

Một trong những mục tiêu của bản đồ QTL là tìm kiếm trong toàn bộ genome nơi định vị của gen mục tiêu thông qua một trắc nghiệm giả định đối với một marker đơn hoặc một vị trí nhất định, sau đó, người ta sẽ xây dựng nó một model có tính chất “đa QTL” (multiple QTL)

Như vậy, ảnh hưởng tính cộng (a) và ảnh hưởng tính trội (d) đã được biểu thị trong bảng 2 trong mô hình quần thể phân ly F₂, và giá trị di truyền trong quần thể hồi giao, với các ảnh hưởng như sau: ảnh hưởng chính, ảnh hưởng tương tác 2 chiều, 3 chiều, 4 chiều và tương tác “i-way”. Cuối cùng là ảnh hưởng tổng quát.

Bảng 2: Mô hình QTL đơn trong quần thể hồi giao (backcross) và F₂, n_{QQ}, n_{Qq}, và n_{qq} biểu thị kiểu gen của QQ, Qq, và qq

Mô hình	Kiểu gen	Giá trị	Phương sai
Hồi giao (Qq x QQ)	QQ	μ_1	σ^2
	Qq	μ_2	σ^2
	Ảnh hưởng di truyền	$g = 0,5 (\mu_1 - \mu_2)$	$\sigma^2(1/n_{QQ} + 1/n_{Qq})/4$
F ₂ (Qq x Qq)	QQ	μ_1	σ^2
	Qq	μ_2	σ^2
	qq	μ_3	σ^2
	Ảnh hưởng tính cộng	$a = 0,5 (\mu_1 - \mu_3)$	$\sigma^2(1/n_{QQ} + 1/n_{qq})/4$
	Ảnh hưởng tính trội	$d = 0,5 (2\mu_2 - \mu_1 - \mu_3)$	$\sigma^2(1/n_{QQ} + 4n_{Qq} + 1/n_{qq})/4$

1-12-1-2. Mô hình “multiple-locus”

Mô hình di truyền tính trạng số lượng được định nghĩa theo số gen, các ảnh hưởng của gen, tần suất gen, tương tác giữa các gen, tương tác giữa gen x môi trường.

Giả định có n gen điều khiển một tính trạng số lượng nào đó. Hãy xem xét quần thể F₂, những ảnh hưởng di truyền có thể xảy ra: ảnh hưởng chính, ảnh hưởng tương tác 2 chiều, 3 chiều, 4 chiều và tương tác “i-way”. Cuối cùng là ảnh hưởng tổng quát.

Bảng 3: Các hệ số thuộc biến số *dummy* và ảnh hưởng của gen

Kiểu gen QTL	Tần suất	C1	C2	Ảnh hưởng
AA	f_1	1	1/2	a + d/2
Aa	f_2	0	-1/2	- d/2
Aa	f_3	-1	1/2	-a + d/2

1-12-2. Phương pháp phân tích marker đơn (SMA = single marker analysis)

Ứng dụng nguyên tắc trong phân tích liên kết gen, chúng ta có thể xác định cách thức của tính chất di truyền marker và vị trí mà nó hiện diện trong genome

- Gen điều khiển tính trạng số lượng có thể được lập bản đồ giống như bản đồ di truyền của marker
- Khi những marker phủ trên một đoạn khá lớn của genome, nó sẽ tạo ra khả năng rất tốt để chúng ta tìm ra những gen điều khiển tính trạng số lượng
- Nếu các gen và các marker đồng phân ly trong một quần thể di truyền, tương quan liên kết giữa chúng có thể được phát hiện

Phương pháp phân tích marker đơn là một bước khởi đầu, không những chỉ ra bản đồ QTL, mà còn phân tích được cụ thể các số liệu

Những khám phá đầu tiên của mô hình được căn cứ trên hàm tuyến tính

$$Y_j = \mu + f(\text{marker}_j) + \varepsilon_j$$

Trong đó Y_j là giá trị của tính trạng đối với cá thể thứ jth, và μ là giá trị trung bình của quần thể, f(marker_j) là hàm số của kiểu gen marker, ε_j là sai số

Thí dụ như một gen Q định vị gần marker A và tính trạng mục tiêu được điều khiển bởi gen Q có thể được mô phỏng thông qua marker A

$$Y_j = \mu + f(A) + \varepsilon_j$$

Bài toán là giải đáp “xác suất tin cậy được” của $f(A)$ có chứa giá trị di truyền của kiểu gen Q và giá trị liên kết giữa A và Q

Phương pháp SMA có thể được thực hiện dưới dạng

- phép thử t đơn giản
- phân tích phương sai
- phương trình tuyến tính
- phép thử tỉ lệ mô phỏng và ước đoán mô phỏng tối đa

Phương pháp SMA rất đơn giản trong phân tích số liệu và thực hiện các bước tính toán, người ta có thể sử dụng phần mềm SAS để thiết lập mô hình.

1-12-2-1. SMA trên quần thể hồi giao

Bố mẹ	AAQQ x aaqq		
	↓		
Hồi giao (BC)	aaqq x	AaQq x	AAQQ
	↓	↓	
Con lai BC	AaQq	AAQQ	0,5 (1 - r)
	Aaqq	AAQq	0,5 r
	aaQq	AaQQ	0,5 r
	aaqq	AaQq	0,5 (1 - r)

Giá trị r là tần suất tái tổ hợp giữa A và Q

Hình 1-3: Con lai hồi giao trong SMA

1-12-2-2. Kết hợp hiện tượng phân ly của QTL và marker

Bảng 4: Tần suất kiểu gen QTL hi vọng định vị kế cận marker trong quần thể hồi giao, không có hiện tượng quần chéo (Liu 1998)

Kiểu gen marker	Giá trị quan sát	Tần suất biên	Kiểu gen QTL		Giá trị lý thuyết
			QQ	Qq	
			Tần suất kết hợp		
AA	n_1	0,5	$0,5 (1-r)$	$0,5 r$	
Aa	n_2	0,5	$0,5 r$	$0,5 (1-r)$	
			Điều kiện kết hợp		
AA	n_1	0,5	$1-r$	r	$(1-r)\mu_1 + \mu_2$
Aa	n_2	0,5	r	$1-r$	$r\mu_1 + (1-r)\mu_2$

1-12-2-3. Phép thử t đơn giản trong quần thể hồi giao

Bảng 5: Phân tích phương sai SMA trong quần thể hồi giao với N là qui mô quần thể con lai, b là số lần lặp lại và c là hệ số dự đoán $c = N - [n_1^2 + n_2^2] / N$

Nguồn	df	MS	MS lý thuyết	F-test
Di truyền tổng quát	N-1	MSG		
QTL	1	MSQ	$\sigma_e^2 + b\sigma_{G(QTL)}^2 + bcg^2$	MSQ/MSG(Q)
G(QTL)	N-2	MSG(Q)	$\sigma_e^2 + b\sigma_{G(QTL)}^2$	
Số cặn	N(b-1)	MSE	σ_e^2	

$$t_Q = \frac{\mu_1 - \mu_2}{[s^2 [1/n_1 + 1/n_2]]^{1/2}}$$

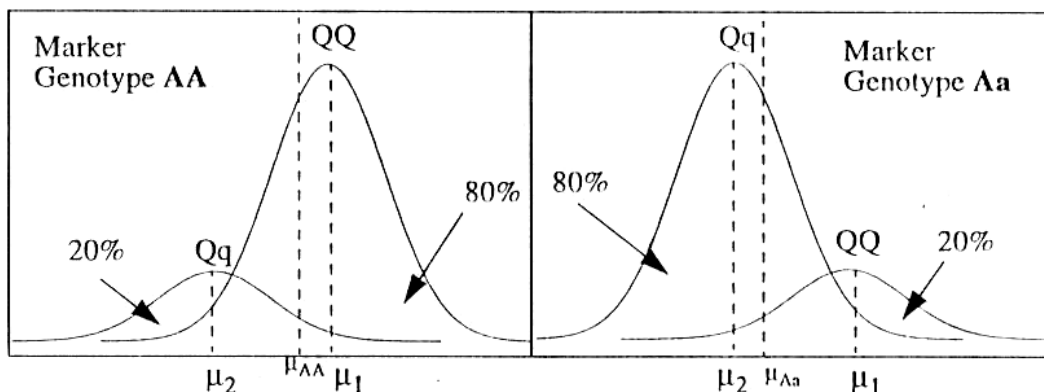
1-12-2-4. Phân tích phương sai trong quần thể hồi giao

Bảng 6: Phân tích phương sai SMA điển hình

Nguồn	df	MS	E(MS)
Di truyền	N-1	MSG	$\sigma_e^2 + b\sigma_G^2$
Marker	1	MSM	$\sigma_e^2 + b[\sigma_{G(QTL)}^2 + 4r(1-r)a^2] + bc(1-2r)^2 \cdot a^2$
G(marker)	N-2	MSG(M)	$\sigma_e^2 + b[\sigma_{G(QTL)}^2 + 4r(1-r)a^2]$
Số cặn	N(b-1)	MSE	σ_e^2

Phép thử F = MSM / MSG(M)

1-12-2-5. Mô phỏng trong quần thể hồi giao



Hình 1-4: Đường phân bố lý thuyết của giá trị tính trạng đối với kiểu gen QTL trong từng kiểu gen marker AA và Aa trên cơ sở quần thể hồi giao. Marker A liên kết với QTL với $r=0,2$ (Liu 1998)

Phương pháp tiếp cận theo kiểu mô phỏng (likelihood) được áp dụng trong SMA (Weller 1986). Một marker A nào đó được giả định liên kết với một QTL với tần suất tái tổ hợp $r = 0,2$. QTL này có một ảnh hưởng di truyền $g = 0,5$ ($\mu_1 - \mu_2$) = $0,5 \sigma$. Phương sai tính trạng của 2 kiểu gen QTL (QQ và Qq) là σ^2 . Đối với hai nhóm marker AA và Aa, phân bố đường biểu diễn của giá trị tính trạng là một kết hợp giữa hai đường chuẩn như vậy (Hình 1-4)

1-12-3. Phương pháp SMA trong quần thể F₂

Bố mẹ	AAQQ	x	aaqq
F1	↓ AaQq		
Tự thụ	↓		
			Tần suất lý thuyết
	AAQQ,	aaqq	0,25 (1-r) ²
	Aaqq,	aaQQ	0,25 r ²
Con lai F ₂	AAQq	AaQQ, Aaqq, aaQq	0,5 (1-r)
	AaQq		0,5 [r ² + (1-r) ²]

r là giá trị tái tổ hợp giữa A và Q

Hình 1-5: Quần thể con lai F₂ trong SMA

Bảng 7: Phân tích phương sai SMA điển hình trong quần thể F₂.

Nguồn	df	MS	F
Di truyền	N-1	MSG	
Marker	2	MSM	MSM/MSG(M)
A	1	MSA	MSA/MSG(M)
D	1	MSD	MSD(MSG(M))
G(marker)	N-3	MSE	
Số cặn	N(b-1)		

Bảng 8: Tương phản tuyến tính đối với những kiểu gen của marker trong quần thể F₂.

Tương phản	Kiểu gen marker		
	AA	Aa	Aa
Tính cộng	1	0	-1
Tính trội	1	-1	1
Tần suất lý thuyết	0,25	0,5	0,25

Codominant marker: $F_M = MSM / MSG(M)$

$$E(\text{tính cộng}) = [\mu + (1-2r)a + 2r(1-r)d] - [\mu - (1-2r)a + 2r(1-r)d]$$

$$= 2(1-2r)a$$

$$E(\text{tính trội}) = [\mu + (1-2r)a + 2r(1-r)d] - 2\{[\mu + (1-r)^2 + r_2]d\} + [\mu + (1-2r)a + 2r(1-r)d]$$

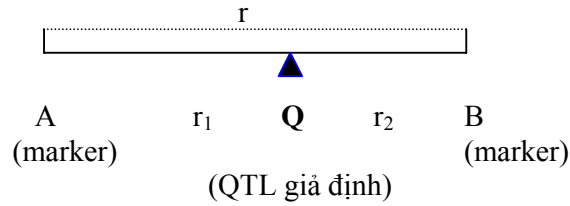
$$= 2(1-2r)^2 d$$

Dominant marker: người ta phải dùng lý thuyết giả định $H_0 = \mu_{A-} - \mu_{aa}$

$$E(\mu_{A-} - \mu_{aa}) = [\mu + 1/3 (1-2r)a + 2/3(1-r+r_2)d] - [\mu - (1-2r)a + 2r(1-r)d]$$

$$= 1/3[4(1-2r)a + 2(1-2r)^2 d]$$

1-12-4. Phân tích QTL trên cơ sở bản đồ cách quãng (interval mapping)



Hình 1-6: Mối quan hệ liên kết giữa một QTL và hai marker kế cận

QTL liên kết với marker A có giá trị tái tổ hợp (recombination fraction) là r_1

QTL liên kết với marker B có giá trị tái tổ hợp là r_2

Mối quan hệ liên kết có giá trị tái tổ hợp

$$r = r_1 + r_2 - 2r_1r_2$$

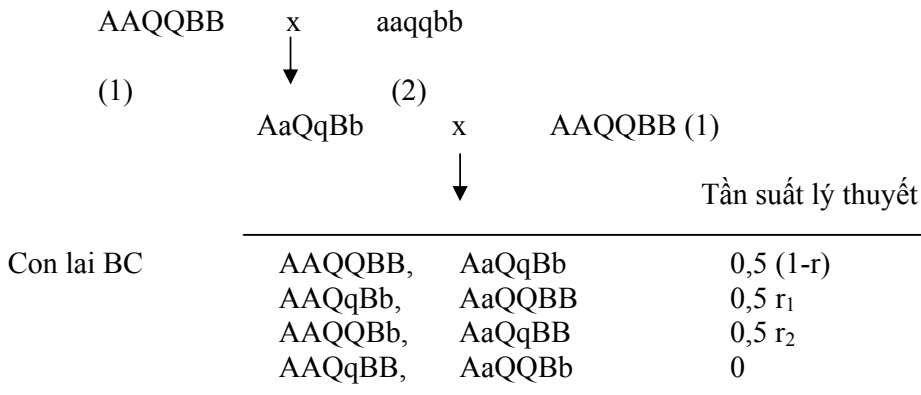
Khi r có giá trị rất nhỏ, $r = r_1 + r_2$

Vị trí của QTL được thể hiện bởi một vị trí tương đương với quãng giữa A và B

$$\rho = r_1 / r$$

$$1 - \rho = r_2 / r$$

1-12-4-1. Bản đồ cách quãng trong quần thể hồi giao (BC)



Hình 1-7: Quần thể con lai BC trong phân tích bản đồ cách quãng với 2 marker A và B

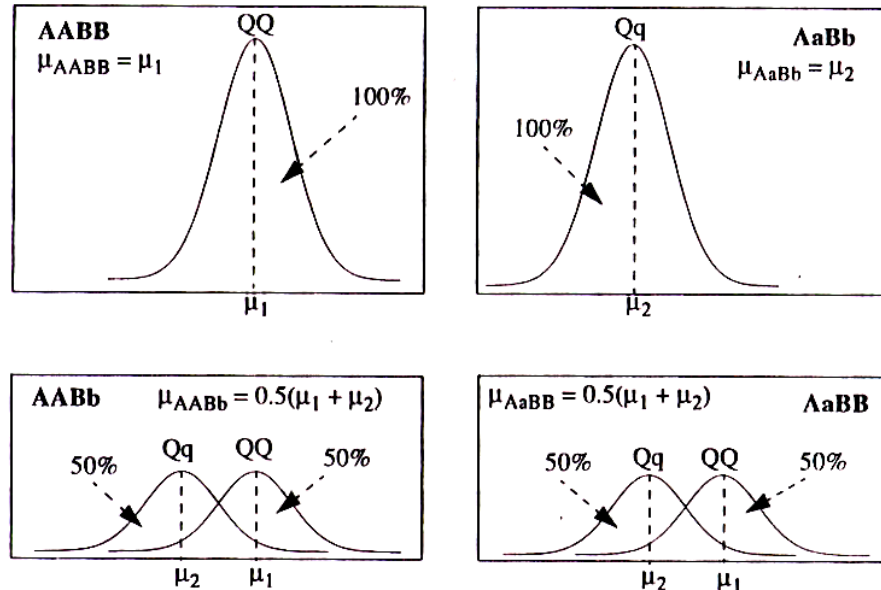
Bảng 9: Tần suất hi vọng của QTL và marker trong quần thể BC, không có quần chéo

Kiểu gen marker	Tần suất p_i	$p (Q_i/M_i)$		Giá trị ước đoán (g _i)
		QQ	Qq	
AABB	0,5 (1-r)	1	0	μ_1
AABb	0,5 r	$r_2 / r = 1 - \rho$	$r_1 / r = \rho$	$(1 - \rho)\mu_1 + \rho\mu_2$
AaBB	0,5 r	$r_1 / r = \rho$	$r_2 / r = 1 - \rho$	$\rho\mu_1 + (1 - \rho)\mu_2$
AaBb	0,5 (1-r)	0	1	μ_2
Trung bình	0,25	μ_1	μ_2	0,5 ($\mu_1 + \mu_2$)

Phương pháp mô phỏng bản đồ QTL trên quần thể BC được thực hiện theo hàm số

$$L = \frac{1}{([2\pi]^{1/2} \sigma)^N} \prod \Sigma p (Q_i/M_i) \exp \left[-\frac{(y_i - \mu)^2}{2\sigma^2} \right]$$

Sau đó, chúng ta tính giá trị Log (L) (logarith likelihood)



Hình 1-8: Phân bố lý thuyết của giá trị tính trạng đối với kiểu gen QTL (QQ vs Qq) trong kiểu gen marker (AABB, AABb, AaBB và AaBb), trên cơ sở quần thể BC. Marker A và B liên kết với giá trị $r = 0,3$ và QTL nghiên cứu định vị giữa hai marker này (Liu 1998)

1-12-4-2. Bản đồ cách quãng trong quần thể F_2

Thế hệ F_1 biểu thị ưu thế lai giữa hai dòng cận giao AAQQBB x aaqqbb. Bảng 10 cho thấy tần suất hi vọng có được của kiểu gen QTL và marker trong F_2 với giả định là không có trao đổi chéo. Tần suất tái tổ hợp giữa marker A và B là r , giữa QTL và marker A là r_1 .

Phương pháp mô phỏng bản đồ QTL trên quần thể BC được thực hiện theo hàm số

$$L = \frac{1}{([2\pi]^{1/2}\sigma)^N} \prod \sum p_i (Q_i/M_i) \exp \left[-\frac{(y_i - \mu)^2}{2\sigma^2} \right] \quad \text{trong trường hợp "codominant marker"}$$

Bảng 10: Tần suất hi vọng có được của kiểu gen QTL và marker trong F_2

Kiểu gen marker	Tần suất p_i	p_{ij}		
		QQ	Qq	qq
AABB	$0,25 (1-r)^2$	$0,25 (1-r)^2$	0	0
AABb	$0,5 (1-r)$	$0,5 r_2 (1-r)$	$0,5 r_1 (1-r)$	0
Aabb	$0,25 r^2$	$0,25 r_2^2$	$0,5 r_1 r_2$	$0,25 r_1^2$
AaBB	$0,5 r (1-r)$	$0,5 r_1 (1-r)$	$0,5 r_2 (1-r)$	0
AaBb	$0,5 (1-r)^2 + r^2$	$0,5 r_1 r_2$	$0,5[(1-r)^2 + r_1^2 + r_2^2]$	$0,5 r_1 r_2$
Aabb	$0,5 r (1-r)$	0	$0,5 r_2 (1-r)$	$0,5 r_1 (1-r)$
AaBB	$0,25 r^2$	$0,25 r_1^2$	$0,5 r_1 r_2$	$0,25 r_2^2$
AaBb	$0,5 r (1-r)$	0	$0,5 r_1 (1-r)$	$0,5 r_2 (1-r)$
aabb	$0,25 (1-r)^2$	0	0	$0,25 (1-r)^2$

LOD score là giá trị chứng minh mức độ có ý nghĩa của phân tích, được tính toán như sau:

$$\begin{aligned} \text{LOD}_1 &= \log_{10} L(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma^2, r_1) - \log_{10} L(\mu, \sigma^2) \\ \text{LOD}_2 &= \log_{10} L(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma^2, r_1) - \log_{10} L(\mu_1, \mu_3, \sigma^2, r_1) \\ \text{LOD}_3 &= \log_{10} L(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma^2, r_1) - \log_{10} L(\mu_1, \mu_2, \sigma^2, r_1) \end{aligned}$$

Thông thường bản đồ QTL có ý nghĩa khi giá trị $\text{LOD} \geq 3$.

1-12-5. Khả năng giải thích về thống kê sinh học của bản đồ QTL

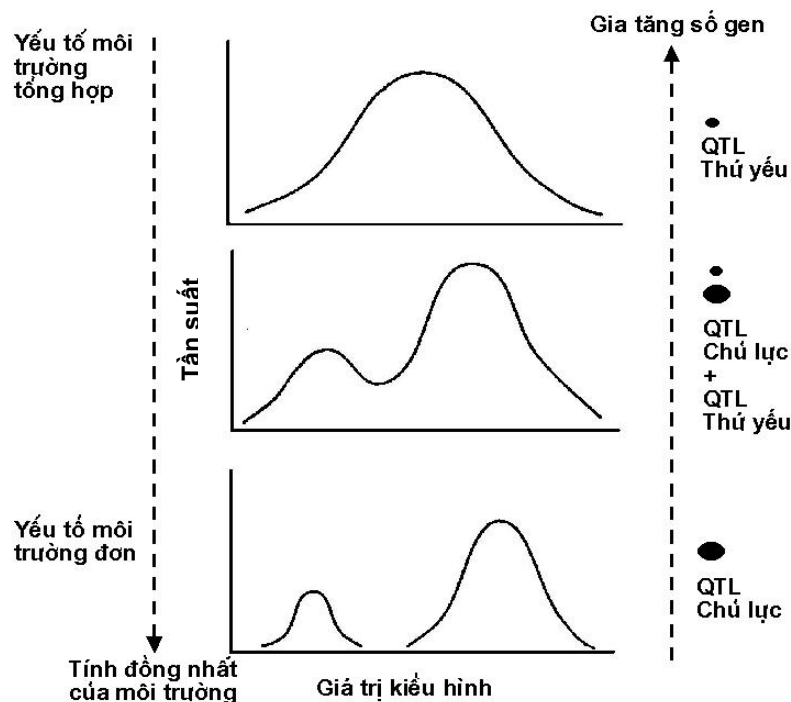
Những yếu tố sau đây có thể ảnh hưởng đến bản đồ QTL:

- Số gen điều khiển tính trạng và vị trí của nó trong genome
- Sự phân bố của các ảnh hưởng di truyền và cách thức tương tác giữa các gen
- Hệ số di truyền của tính trạng mục tiêu
- Số gen phân ly trong quần thể lập bản đồ
- Loại quần thể con lai và độ lớn của quần thể
- Mật độ của bản đồ liên kết gen, số marker phủ trên genome
- Phương pháp thống kê được ứng dụng, mức độ có ý nghĩa trong phân tích

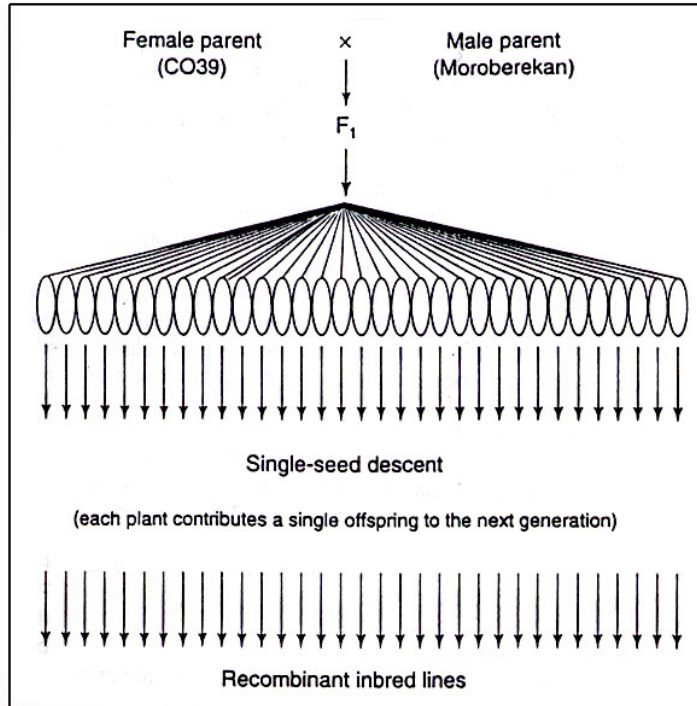
Trong phương pháp SMA, khả năng thống kê được dựa trên phép thử t (t-test), phân tích phương sai và trắc nghiệm mô phỏng theo dạng tuyến tính

Trong phương pháp bản đồ cách quãng (IMA: interval mapping analysis), khả năng thống kê dựa trên một hệ phương trình tuyến tính với con lai hồi giao, đối thuyết $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ (không có ảnh hưởng QTL trong quãng), trắc nghiệm mô phỏng thông qua giá trị “log likelihood”

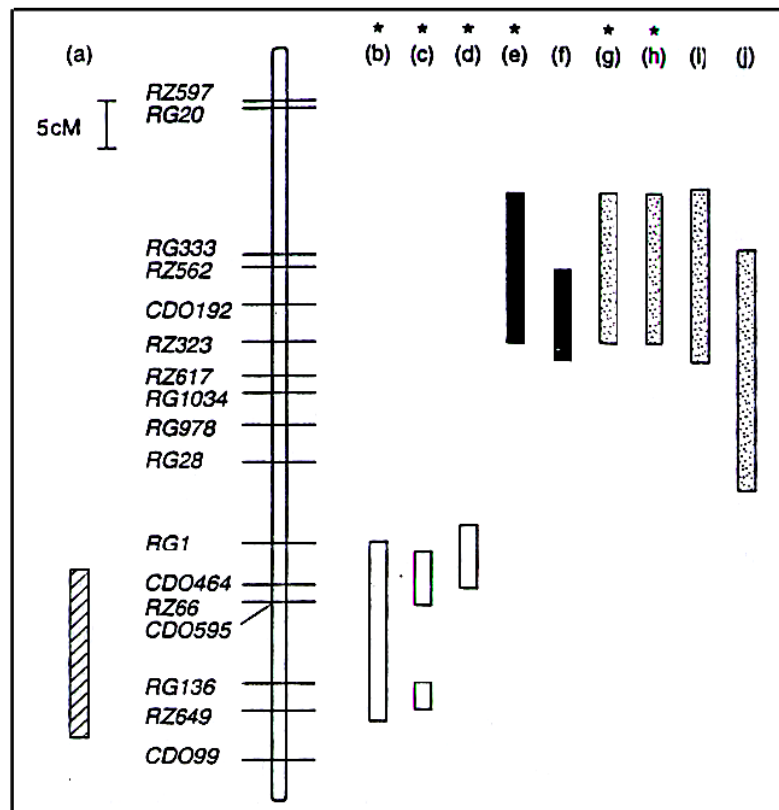
Trong phương pháp “multiple QTL”, khả năng thống kê dựa trên lý thuyết mỗi gen là tập hợp của $\{p_1, p_2, p_3, \dots, p_q\}$ ở mức độ tin cậy α , nhằm phát hiện được ít nhất q_e QTL, trong đó, $q_e \leq q_i$ (Liu 1998)



Hình 1-9: Tương quan giữa kiểu hình, kiểu gen và môi trường (Xu 1997)



Hình 1-10: Phát triển quần thể cận giao tái tổ hợp (RILs) thông qua kỹ thuật SSD (single seed descent: thu thập từng hạt trên mỗi cá thể) (McCouch và Doerge 1995)



Hình 1-11: Thí dụ bản đồ QTL cây lúa trên nhiễm sắc thể số 8. (a) Vị trí và kích thước của một đoạn đồng dạng (homeologous segment) của nhiễm thể 7A lúa mì trên cơ sở cDNA marker chung giữa lúa và lúa mì. (b) Tính trạng cuộn lá (leaf rolling) trong cơ chế thoát khô hạn. (c) Tính trạng chiều dày của rễ. (d) Tính trạng điều tiết áp suất thẩm thấu OA. (e) Số vết bệnh trong tính kháng không hoàn toàn (partial resistance) bệnh đạo ôn. (f) Gen *Pi-zb* (kháng đạo ôn hoàn toàn). (g) Ngày gieo đến trổ (xử lý 10 giờ sáng). (h) Ngày gieo đến trổ (xử lý 14 giờ sáng). (i) Ngày gieo đến trổ theo Li và ctv. (j) Ngày gieo đến trổ theo Xiao và ctv (McCouch và Doerge 1995)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Basten CJ, BS Weir, ZB Zeng. 1994. ZMAP- A QTL cartographer. Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 22:65-66
- Bonierbale MW, RL Plaister, SD Tanksley. 1998. Genetics 120: 1095-1103
- Bùi chí Bửu, Nguyễn thị Lang. 2002. Chuyển vị trong nghiên cứu chức năng genome thực vật. Bùi chí Bửu (chủ biên). Cơ sở di truyền tính kháng sâu bệnh hại cây trồng. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP Hồ chí Minh. Tr. 53-88
- FAO. 2002. FAO statistics, [http://apps.fao.org/\(2002\)](http://apps.fao.org/(2002))
- Gale M. 2002. Applications of molecular biology and genomics to genetic enhancement of crop tolerance to abiotic stress – a discussion document. FAO – Consultative Group on International Agricultural Research Interim Science Council. Rome, Italy 26-30 August 2002. 26 p.
- Kawasaki S, C Borchert, M Deyholos, H Wang, S Brazille, K Kawai, D Galbraith, HJ Bohnert. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. The Plant Cell 13:889-905
- Kilian A, J Chen, F Han, B Steffenson, A Kleinhofs. 1997. Plant Mol Biol 35: 187-195
- Knapp SJ, WC Bridges, BH Liu. 1992. Mapping quantitative trait loci using nonsimultaneous and simultaneous estimators and hypothesis tests. In: JS Beckmann and TS Osborn (eds.), Plant Genomes: Methods for genetic and physical mapping, pp. 209-237. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Lander ES, P Green. 1987. Construction of multilocus genetic linkage maps in human. Proc Natl Acad Sci USA 84:2363-2367
- Lander ES, D Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121:185-199
- Liu BH. 1998. Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, New York, 611pp.
- Manly KF, EH Cudmore Jr. 1996. New versions of MAP Manager genetic mapping software. Plant Genome IV (Abs.) p”105
- McCouch SR. 2001. Genomics and syteny. Plant Physiology 125: 152-155
- McCouch SR, RW Doerge. 1995. QTL mapping in rice. Plants 11(12): 482-487
- Nelson JC. 1987. QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding
- Tanksley SD, JC Nelson. 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding. Theor Appl Genet 92:191-203

- Terwilliger JD, J Ott. 1994. Handbook of human genetic linkage. The Johnson Hopkins University Press, Baltimore
- van Ooijen, C Maliepaard. 1996. MAPQTL version 3.0: Software for the calculation of QTL position on genetic map. Plant Genome IV (Abs.) p.105
- Weller JI. 1986. Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. Biometrics 42:627-640
- Xu Y. 1997. Quantitative trait loci: separating, pyramiding, and cloning. Plant Breeding Reviews 15. Cornell University, NY 14853-1902, USA

Chương 2

CƠ SỞ DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU MẶN

Đất nhiễm mặn là một trong những yếu tố chính làm khó khăn trong chiến lược phát triển sản lượng nông sản, năng suất / ha, và thử thách lớn trong mục tiêu an toàn lương thực, trong điều kiện khí hậu toàn cầu đang thay đổi, băng tan ở hai cực, nước biển sẽ dâng lên đe dọa các vùng canh tác đất thấp ở ven biển.

Đất mặn có thể được phân chia làm hai nhóm chính dựa theo nguồn gốc phát sinh mặn: mặn ven biển (coastal salinity), hoặc vùng cửa sông do nước biển xâm nhập vào mùa khô, có thể trồng trọt bình thường trong mùa mưa và mặn bên trong đất do mao dẫn từ tầng dưới lên (inland salinity) có thể do phá rừng, không có tán cây che phủ.

Trong nhiều năm qua, người ta đã cố gắng cải tiến nhiều giống cây trồng có tính chống chịu mặn tốt. Tuy nhiên, chúng ta vẫn chưa hiểu một cách đầy đủ về bản chất, cơ chế chống chịu và khả năng di truyền tính trạng chống chịu mặn (Mishra và ctv. 1998). Thành tựu đạt được trong chọn tạo giống chống chịu mặn rất chậm do những nguyên nhân như sau:

- kiến thức về di truyền tính chống chịu còn hạn chế
- tính chất phức tạp của cơ chế chống chịu mặn (Yeo và Flowers 1986)
- kỹ thuật thanh lọc chưa hoàn thiện
- hiệu quả chọn lọc thấp
- tương tác giữa tính trạng chống chịu mặn với môi trường chưa được hiểu rõ (Akbar 1986)

Đối với cây lúa, tính trạng chống chịu mặn là một tiến trình sinh lý rất phức tạp, thay đổi theo các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của cây (Akbar và Yabuno 1972, 1975, 1977). Tính trạng bất thụ trên bông lúa khi bị stress do mặn được điều khiển bởi một số gen trội, nhưng các gen này không tiếp tục thể hiện ở các thế hệ sau cùng. Phân tích diallel về tính trạng chống chịu mặn, người ta ghi nhận cả hai hoạt động gen cộng tính và không cộng tính với hệ số di truyền thấp (19,18%), và ảnh hưởng của môi trường rất lớn (Moeljopawirio và Senadhira 1993, Akbar và ctv 1985, Gregorio và Senadhira 1993). Mức độ có ý nghĩa về hoạt động gen cộng tính và không cộng tính được Mishra và ctv ghi nhận (1996). Năng suất và tính chống chịu mặn ở giai đoạn phát dục thể hiện rất khác nhau giữa các giống lúa so với tính chống chịu mặn ở giai đoạn mạ (Ikehashi và Ponnampereuma 1978, Akbar và ctv. 1985, Mishra và ctv 1990). Hiện chúng ta có rất ít thông tin về kiểu hình chống chịu mặn ở giai đoạn trưởng thành của cây lúa hơn là giai đoạn mạ. Hầu hết các thí nghiệm đều được tiến hành trên giai đoạn mạ, với qui mô quần thể hạn chế và chỉ số Na/K thường được dùng như một giá trị chỉ thị (Mishra và ctv. 1998). Cây lúa nhiễm mặn có xu hướng hấp thu Na nhiều hơn cây chống chịu. Ngược lại cây chống chịu mặn hấp thu K nhiều hơn cây nhiễm. Ngưỡng chống chịu NaCl của cây lúa là $EC=4dS/m$ (Sathish và ctv 1997). Trong quá trình bị nhiễm mặn, nồng độ ion K^+ trong tế bào được điều tiết tương thích với cơ chế điều tiết áp suất thẩm thấu và khả năng tăng trưởng tế bào (Ben-Hayyim và ctv 1987). Nhiều loài thực vật thuộc nhóm halophyte và một phần của nhóm glycophyte thực hiện hoạt động điều tiết áp suất thẩm thấu làm cản trở ảnh hưởng gây hại của mặn. Hoạt động này sẽ giúp cây duy trì một lượng lớn K^+ và hạn chế hấp thu Na^+ .

2-1. ĐẤT MẶN

Đất mặn được xem là đất có vấn đề rất phổ biến trên thế giới, làm hạn chế năng suất cây trồng. Tính chất vật lý và hóa học của đất mặn rất đa dạng. Biến thiên này tùy thuộc vào nguồn gốc của hiện tượng mặn, pH đất, hàm lượng chất hữu cơ trong đất, chế độ thủy văn, và nhiệt độ (Akbar và Ponnampereuma 1982).

Đất mặn chứa một lượng muối hòa tan trong nước ở vùng rễ cây, làm thiệt hại đến hoạt động sinh trưởng của cây trồng. Mức độ gây hại của đất mặn tùy thuộc vào loài cây trồng, giống cây, thời gian sinh trưởng, các yếu tố môi trường đi kèm theo nó, và tính chất của đất. Do đó, người ta rất khó định nghĩa đất mặn một cách chính xác và đầy đủ. Hội Khoa Học Đất của Mỹ (SSSA 1979) đã xác định đất mặn là đất có độ dẫn điện (EC) lớn hơn 2 dS/m, không kể đến hai giá trị khác : tỉ lệ hấp thu sodium (SAR) và pH. Tuy nhiên, hầu hết các định nghĩa khác đều chấp nhận đất mặn là đất có độ dẫn điện EC cao hơn 4dS/m ở điều kiện nhiệt độ 25⁰C, phần trăm sodium trao đổi ESP kém hơn 15, và pH nhỏ hơn 8,5 (US Salinity Laboratory Staff 1954).

Đất mặn khá phổ biến ở vùng sa mạc và cận sa mạc. Muối tích tụ và mao dẫn lên đất mặt, chảy tràn trên mặt đất theo kiểu rửa trôi. Đất mặn có thể phát triển ở vùng nóng ẩm hoặc cận nóng ẩm trên thế giới trong điều kiện thích hợp như vùng ven biển, mặn do nước biển xâm nhập khi triều cường, lũ lụt, mặn do nước thấm theo chiều đứng hay chiều ngang từ thủy cấp bị nhiễm mặn (Bhumbla và Abrol 1978).

Đất mặn bị ảnh hưởng mặn chiếm 7% diện tích đất toàn thế giới. Đất bị ảnh hưởng mặn không phải đều có khả năng canh tác giống như nhau, mà nó được chia ra thành từng nhóm khác nhau để sử dụng đất hợp lý. Đất bị ảnh hưởng mặn ở đại lục thuộc Châu Âu và Bắc Mỹ rất ít có khả năng trồng trọt. Ở Châu Á, hơn 80% đất bị ảnh hưởng mặn có khả năng trồng trọt, và đã được khai thác cho sản xuất nông nghiệp. Ở Châu Phi và Nam Mỹ, khoảng 30% đất bị nhiễm mặn có khả năng trồng trọt. Hiện tượng nhiễm mặn là mối đe dọa lớn nhất đến việc gia tăng sản lượng lương thực ở các quốc gia Châu Á (Abrol 1986).

2-2. CƠ CHẾ CHỐNG CHỊU MẶN

Cơ chế chống chịu mặn của cây lúa được biết thông qua nhiều công trình nghiên cứu rất nổi tiếng (Akbar và ctv. 1972, Korkor và Abdel-Aal 1974, Maas và Hoffman 1977, Mori và ctv. 1987). Mặn ảnh hưởng đến hoạt động sinh trưởng của cây lúa dưới những mức độ thiệt hại khác nhau ở từng giai đoạn sinh trưởng phát triển khác nhau (Maas và Hoffman 1977)

Nhiều nghiên cứu ghi nhận rằng tính chống chịu mặn xảy ra ở giai đoạn hạt nảy mầm, sau đó trở nên rất miễn cảm trong giai đoạn mạ (tuổi lá 2-3), rồi trở nên chống chịu trong giai đoạn tăng trưởng, kể đến nhiễm trong thời kỳ thụ phấn và thụ tinh, cuối cùng thể hiện phản ứng chống chịu trong thời kỳ hạt chín (Pearson và ctv. 1966, IRRI 1967). Tuy nhiên, một vài nghiên cứu ghi nhận ở giai đoạn lúa trổ, nó không miễn cảm với stress do mặn (Kaddah và ctv. 1975). Do đó, người ta phải chia ra nhiều giai đoạn để nghiên cứu một cách đầy đủ cơ chế chống chịu mặn của cây trồng.

Thiệt hại do mặn thể hiện trước hết là giảm diện tích lá. Trong điều kiện thiệt hại nhẹ, trọng lượng khô có xu hướng tăng lên trong một thời gian, sau đó giảm nghiêm trọng do suy giảm diện tích lá. Trong điều kiện thiệt hại nặng hơn, trọng lượng khô của chồi và của rễ suy giảm tương ứng với mức độ thiệt hại. Ở giai đoạn mạ, lá già hơn sẽ mất khả năng sống sót sớm hơn lá non (Akita 1986)

Thiệt hại do mặn được gây ra bởi sự mất cân bằng áp suất thẩm thấu và sự tích tụ nhiều ion Cl⁻ (Iwaki và ctv. 1953, Ota và Yasue 1958, Shimose 1963, Tagawa và Ishizaki 1963, Murty và Janardhan 1971).

Thiệt hại do mặn còn được ghi nhận bởi hiện tượng hấp thu một lượng quá thừa sodium, và độc tính của sodium làm cho clor trở thành anion trơ (neutral), có tác dụng bất lợi với một phổ rộng về nồng độ (Clarkson và Hanson 1980).

Sự mất cân bằng Na-K cũng là yếu tố làm hạn chế năng suất (Devitt và cvt. 1981). Ion kali có một vai trò quan trọng làm kích hoạt enzyme và đóng mở khí khổng tương ứng với tính chống chịu mặn của cây trồng, thông qua hiện tượng tích lũy lượng kali trong chồi thân (Ponnamperuma 1984)

Yeo và Flower (1984) đã tổng kết cơ chế chống chịu mặn của cây lúa theo từng nội dung như sau:

- Hiện tượng ngăn chặn muối - Cây không hấp thu một lượng muối dư thừa nhờ hiện tượng hấp thu có chọn lọc
- Hiện tượng tái hấp thu - Cây hấp thu một lượng muối thừa nhưng được tái hấp thu trong mô libe. Na^+ không chuyển vị đến chồi thân
- Chuyển vị từ rễ đến chồi – Tình trạng chống chịu mặn được phối hợp với một mức độ cao về điện phân ở rễ lúa, và mức độ thấp về điện phân ở chồi, làm cho sự chuyển vị Na^+ trở nên ít hơn từ rễ đến chồi
- Hiện tượng ngăn cách từ lá đến lá - Lượng muối dư thừa được chuyển từ lá non sang lá già, muối được định vị tại lá già không có chức năng, không thể chuyển ngược lại.
- Chống chịu ở mô – Cây hấp thu muối và được ngăn cách trong các không bào (vacuoles) của lá, làm giảm ảnh hưởng độc hại của muối đối với hoạt động sinh trưởng của cây
- Ảnh hưởng pha loãng – Cây hấp thu muối nhưng sẽ làm loãng nồng độ muối nhờ tăng cường tốc độ phát triển nhanh và gia tăng hàm lượng nước trong chồi

Tất cả những cơ chế này đều nhằm hạ thấp nồng độ Na^+ trong các mô chức năng, do đó làm giảm tỉ lệ Na^+/K^+ trong chồi (< 1).

Tỉ lệ Na^+/K^+ trong chồi được xem như là chỉ tiêu chọn lọc giống lúa chống chịu mặn (Gregorio và Senadhira 1993)

Mỗi một giống lúa đều có một hoặc hai cơ chế nêu trên, không phải có tất cả (Yeo và Flowers 1984). Phản ứng của cây trồng đối với tính chống chịu mặn vô cùng phức tạp, đó là hiện tượng tổng hợp từ những yếu tố riêng lẻ. Yeo và Flowers (1984) kết luận rằng phản ứng tốt nhất làm gia tăng tính chống chịu mặn phải gắn liền với việc tối ưu hóa nhiều đặc điểm sinh lý, có tính chất độc lập tương đối với nhau. Do vậy, mục tiêu của chúng ta là phối hợp tất cả những cơ chế sinh lý ấy vào trong giống lúa cải tiến tính chống chịu mặn

Abscisic acid (ABA) được xem như một yếu tố rất quan trọng của cây trồng phản ứng với những stress gây ra do mặn, do nhiệt độ cao (Gupta và ctv. 1998). Do đó ABA còn được xem như là gen cảm ứng (inducible genes) trong cơ chế chống chịu mặn của cây trồng

2-3. DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU MẶN

2-3-1. Nghiên cứu di truyền số lượng tính chống chịu mặn

Nghiên cứu di truyền số lượng cho thấy cả hai ảnh hưởng hoạt động của gen cộng tính và gen không cộng tính đều có ý nghĩa trong di truyền tính chống chịu mặn (Mishra và ctv. 1990, Gregorio và Senadhira 1993, Lee 1995).

Trong giai đoạn mạ của cây lúa, các tính trạng chiều dài chồi, hàm lượng Na và K ở trong chồi, trọng lượng khô của chồi và rễ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa giống kháng và giống nhiễm, tính trạng này chủ yếu được điều khiển do hoạt động của nhóm gen cộng tính. Hệ số di truyền tính chống chịu thông qua các tính trạng như vậy rất thấp (Teng 1994).

Trong giai đoạn trưởng thành của cây lúa, tính trạng chiều cao cây, năng suất trong điều kiện xử lý mặn được điều khiển bởi nhóm gen cộng tính (Moeljopawiro và Ikehashi 1981, Akbar và ctv. 1986, Mishra và ctv. 1990)

Trong phân tích di truyền số lượng thông qua lai diallel 6x6, năng suất lúa thể hiện tính hoạt động của nhóm gen cộng tính không có ý nghĩa trong điều kiện bình thường, nhưng trở nên có ý nghĩa trong điều kiện xử lý mặn (Narayanan và ctv. 1990). Năng suất lúa bị giảm là do ảnh hưởng của mặn. Một giống lúa có ưu thế hoạt động gen cộng tính đối với năng suất sẽ là điều kiện thuận lợi cho chọn lọc giống trong môi trường mặn.

Trong phân tích di truyền số lượng thông qua lai diallel 9x9, tính trạng chống chịu mặn được xem xét qua tỉ lệ thấp của Na / K ở trong chồi, tính trạng này được kiểm soát bởi hoạt động của cả hai nhóm gen cộng tính và không cộng tính. Tính trạng Na / K thấp còn thể hiện ảnh hưởng siêu trội và được điều khiển bởi ít nhất hai nhóm gen trội. Ảnh hưởng của môi trường rất có ý nghĩa và hệ số di truyền thấp (19,18%) (Gregorio và Senadhira 1993). Từ đó, các tác giả đề nghị quần thể con lai phải thật lớn, và việc tuyển chọn nên được thực hiện ở các thế hệ sau cùng, dưới điều kiện mặn được kiểm soát chặt chẽ, giảm thiểu thấp nhất ảnh hưởng biến động của môi trường.

Trong một nghiên cứu về di truyền tính chống chịu mặn bao gồm các bố mẹ có tính trạng tương phản nhau: giống CSR10 và CSR11 được chọn làm bố (có tính trạng chống chịu mặn), giống Basmati 370 được chọn làm mẹ (không có gen kháng mặn) (Mishra và ctv. 1998). Thế hệ F₁ được xử lý ở độ mặn có EC=10dS/m, điều kiện trồng trong chậu. Thế hệ F₂ được trồng trong điều kiện bình thường trên đồng ruộng, chọn theo phương pháp trồng dồn (bulk). Thế hệ F₃ được xử lý mặn ở giai đoạn mạ (EC=10dS/m). Quần thể cây trồng của các cặp lai được chia thành nhóm tùy theo phản ứng chống chịu đối với mặn ở các điểm 1, 3, 5, 7, 9. Giá trị trung bình được tính theo công thức

$$\mu = G + I U = G + I (\Sigma fU/n)$$

trong đó

G = số nhóm

I = quãng giữa các nhóm

f = tần suất cây trong mỗi nhóm

U = mã số của cây

n = tổng số cây

Phân bố chuẩn được ghi nhận trong quần thể F₃, với phép thử $Z = (X - \mu) / \sigma_x$

μ = trung bình nhóm

σ_x = độ lệch chuẩn

Ứng dụng phép thử χ^2 để xác định độ phân chuẩn của giá trị quần thể, từ đó suy ra hệ số “skewness” theo công thức như sau

$$vb_1 = g_1 = m_3 / (m_2 \sqrt{m_2})$$

trong đó

$$m_2 = \text{moment thứ cấp} = h_2 - h_1^2$$

$$m_3 = \text{moment tam cấp} = h_3 - 3h_2 + 2h_1^3$$

$$h_1 = \Sigma fU/n$$

$$h_2 = \Sigma fU^2/n$$

$$h_3 = \Sigma fU^3/n$$

Ứng dụng phép thử “Kurtosis” theo công thức sau

$$g_2 = b_2 - 3 = (m_4 / m_2^2) - 3$$

trong đó

$$m_4 = \text{moment tứ cấp} = h_4 - 4h_1h_3 + 6h_1^2h_2 - 3h_1^4 \text{ và}$$

$$h_4 = \Sigma fU^4 / n$$

Bảng 1: Kết quả thử nghiệm F₁ trong môi trường mặn (Mishra và ctv. 1998)

Tổ hợp lai	Điểm chống chịu mặn	Trung bình của 5 cây
Bas 370 / CSR10	5, 5, 7, 7, 5	29/5 = 5,8
Bas 370 / CSR11	5, 5, 3, 5, 5	23/5 = 4,6
Pak Bas / CSR10	7, 5, 7, 7, 5	31/5 = 6,2

Bảng 2: Thử nghiệm Z và χ^2 của tổ hợp Bas 370 / CSR10 (Mishra và ctv. 1998)

Điểm	Số cây	Giá trị Z	Vùng phân bố chuẩn (0-Z)	Vùng giữa hai giá trị cận
1	68	$Z_1 = -1,5511$	$0-Z_1 = 0,4397$	$(-\infty)-Z_1 =$
3	426	$Z_2 = -0,5916$	$0-Z_2 = 0,2230$	0,0603
5	768	$Z_3 = 0,3679$	$0-Z_3 = 0,1435$	$Z_1-Z_2 = 0,2167$
7	276	$Z_4 = 1,3274$	$0-Z_4 = 0,4073$	$Z_2-Z_3 = 0,3665$
9	247			$Z_3-Z_4 = 0,2638$
				$Z_4-(+\infty) =$
				0,0927
X = 5,233 n= 1785 1,000				
$\chi^2 = 159,18$ (P = 0,000) df = 5-3 = 2				
Hệ số skewness (g_1) = 0,2980 (SD = 0,0579) Hệ số Kurtosis (g_2) = -0,4789 (SD = 0,1159)				

F_1 của tất cả các cặp lai đều nằm gần ở điểm giữa của phân bố hình chuông, cho thấy tính trội không hoàn toàn đối với phản ứng nhiễm cũng như phản ứng chống chịu. Nhưng nếu điểm chống chịu của F_1 là 5,8 (tổ hợp 1) và 4,6 (tổ hợp 2) cho thấy ảnh hưởng thay thế của cây bố (CSR10 hoặc CSR11) đối với cây mẹ gần như giống nhau. Tổ hợp 1 và 2 có mức độ nghiêng (skewness) trong phân bố chuẩn có ý nghĩa về thống kê trong khi tổ hợp 3, phân bố nghiêng không có ý nghĩa, chứng tỏ rằng chỉ có một vài gen chủ lực tác động cùng với nhiều gen thứ yếu điều khiển tính chống chịu mặn (bảng 1 và 2). Thí nghiệm này cho thấy tính trạng chống chịu mặn là một tính trạng di truyền đa gen, không có ảnh hưởng của cây mẹ (Mishra và ctv. 1998)

2-3-2. Nghiên cứu di truyền phân tử tính chống chịu mặn

Bản đồ QTL (quantitative trait loci) được áp dụng trong trường hợp những tính trạng mục tiêu do đa gen điều khiển (thí dụ như tính chống chịu mặn). Di truyền số lượng truyền thống không thể phát hiện QTL trên những loci riêng biệt gắn với tính trạng số lượng đang nghiên cứu, vị trí của nó trên nhiễm sắc thể và liên kết của nó với những gen khác. Bản đồ di truyền phân tử với mật độ cao số lượng marker phủ trên toàn bộ nhiễm thể trong genome cây trồng sẽ cung cấp cho chúng ta công cụ có khả năng nghiên cứu tính trạng di truyền số lượng phức tạp, định vị gen trên những nhiễm thể, và xác định các gen mục tiêu liên kết với gen khác.

Bản đồ QTL và phân tích QTL đã phát triển theo trình tự như sau:

- Trên cơ sở marker hình thái và di truyền tế bào, người ta tính toán giá trị khác biệt về kiểu hình liên kết với tính trạng số lượng ở từng loci riêng biệt trong một quần thể đang phân ly theo lý thuyết của Thoday (1961), và phương pháp này khá phổ biến trong phân tích QTL vào thập niên 1980
- Một phương pháp khác có thuật ngữ là “phân tích QTL trên cơ sở tính trạng” (trait-based QTL analysis), dựa trên mối tương quan giữa marker và tính trạng số lượng (Stuber và ctv. 1980). Lý thuyết này căn cứ theo giả định rằng: áp lực chọn lọc sẽ làm thay đổi một cách có ý nghĩa tần suất gen của từng QTL riêng biệt, mà những QTL này liên kết khá chặt chẽ với những marker tương ứng trong bản đồ. Lebowitz và ctv. (1987) gọi phương pháp phân tích này là “ba loại hình bố trí thí nghiệm” (three kinds of experimental designs). Thuận lợi của phương pháp nói trên là tạo điều kiện tốt cho việc đánh dấu gen và chọn giống mờ marker phân tử (MAS) trong chương trình chọn

tạo giống cải tiến, làm gia tăng hiệu quả chọn lọc. Mỗi tương quan giữa một marker và một QTL được phân tích dựa trên phương pháp “ANOVA một chiều”

- Phương pháp ANOVA một chiều chỉ có thể phát hiện một QTL nếu nó được định vị rất gần marker tương ứng. Do đó, mật độ marker phủ trên genome trong quần thể phân ly có thể bị hạn chế, đặc biệt trong trường hợp marker hình thái. Sự phát triển RFLP, và gần đây microsatellite marker vô cùng phong phú, thoả mãn yêu cầu phủ kín trên genome cây trồng. Các quần thể được sử dụng cho phân tích QTL là đơn bội kép (Snape 1988), hồi giao (Patersons và ctv. 1991), F_2 kèm với hồi giao (Zhang và ctv. 1992)
- Phương pháp mô phỏng tối đa (maximum likelihood) đã được phát triển để ước đoán tần suất tái tổ hợp giữa một marker và một QTL, trên cơ sở tính toán giá trị kiểu gen và phương sai (Weller 1986). Phương pháp này tỏ ra có hiệu quả hơn trong trường hợp QTL có tính chất “codominant” so với trường hợp “dominant”. Sau đó Lou và Kearsley (1989, 1991) đề xuất phương pháp tương tự như phương pháp Weller, các tác giả đã thực hiện phép tính tần suất tái tổ hợp theo giá trị dự đoán của mô phỏng tối đa. Nhưng phương pháp này chỉ thật sự hữu dụng trong trường hợp xác định từng locus riêng biệt đóng góp vào tính trạng số lượng, và trường hợp hệ số di truyền lớn hơn 10%
- Người ta tiếp tục đề xuất phương pháp sử dụng những marker kề cận trên cơ sở phương pháp mô phỏng tối đa để khắc phục các nhược điểm nêu trên (Lander và Botstein 1989, Jensen 1989, Knapp 1991). Thông tin từ hai marker kề cận có tính chất “codominant” sẽ cho chúng ta khái niệm về liên kết của các khu vực trên nhiễm sắc thể. Sau đó, Knott và Haley (1992) tập hợp những so sánh giữa hai phương pháp marker đơn và marker kề cận, đề xuất cách tính chính xác hơn về ảnh hưởng và vị trí QTL của tính trạng đang nghiên cứu. Knapp và Bridges (1990) đề xuất mô hình quần thể đơn bội kép (DH), cận giao tái tổ hợp (RI), hồi giao (BC), F_2 , F_1 và mô hình các tính trạng liên quan có phân bố chuẩn khi thanh lọc với stress. Phương pháp này chỉ quan tâm đến hai marker trong mỗi lần xem xét. Landers và ctv. (1987) thực hiện một phần mềm vô cùng hữu ích, đó là MAPMARKER/QTL để sử dụng trong phân tích QTL.
- Hầu hết các mô hình thiết lập bản đồ QTL đều xem xét ảnh hưởng cộng tính của các gen mục tiêu. Carbonell và ctv. (1992) đề xuất một phương pháp phát hiện ảnh hưởng không cộng tính của QTL trong quần thể F_2 . Lou và Kearsley (1992) cũng đề xuất một phương pháp thông kê để phân tích quần thể F_2 và chứng minh kết quả của phương pháp thông qua mô hình hóa trên computer. Thông thường người ta ghi nhận một marker liên kết với một gen, nhưng thực tế một marker liên kết với nhiều gen thứ yếu ảnh hưởng đến tính trạng số lượng. Do đó, một giả định khác đã đề xuất: ước đoán kiểu gen thường sai lệch nên khó có thể ước đoán ảnh hưởng epistasis trong di truyền số lượng. Jensen (1992) đề xuất một mô hình phối hợp để khắc phục tình trạng này, xem xét cả trường hợp tính trạng liên quan không phân bố chuẩn khi thanh lọc với stress, phương pháp này được gọi là “multiple QTLs effect analysis”

Teng (1994) đã sử dụng quần thể cận giao tái tổ hợp (RI) thế hệ F_8 bao gồm 324 cá thể thuộc tổ hợp lai giữa IR29 / Nona Broka để nghiên cứu di truyền tính chống chịu mặn của cây lúa. Các dòng RI được thanh lọc mặn trong nhà lưới ở điều kiện EC = 15 dS/m và điều kiện đồng ruộng. Phân tích RFLP với 5 enzyme phân cắt hạn chế (*DraI*, *EcoRV*, *HindIII*, *ScaI*, *XbaI*) cho thấy có 266 RFLP marker, trong đó 117 thể hiện đa hình (43,98%), phủ trên genome cây lúa với mật độ 15cM / quãng. RG100 và RZ323 được ghi nhận cho đa hình rõ nhất trong trường hợp DNA của dòng chống chịu và dòng nhiễm. Mười ba marker định vị gần RG100 và RZ323 trên nhiễm thể số 3 cũng được sử dụng để xem xét liên kết gen. Phân tích ANOVA một chiều chứng minh Nona Broka mang alen kháng liên kết với RG100 và RZ323 tại các loci số lượng, với giá trị R^2 là 17,6% và 29,4% ($p < 0,0001$), theo thứ tự. Phân tích ANOVA hai chiều, tác giả phát hiện thêm RZ323 (nhiễm thể số 3) và RG333 (trên nhiễm thể

số 8) liên kết với QTL chống chịu mặn, với giá trị R^2 là 40,2% ($p < 0,001$), giải thích 40,2% biến thiên kiểu hình về tính trạng sống sót của cây mạ là do QTL này điều khiển. Các cá thể tái tổ hợp mang alen từ Nona Broka ở locus RZ323 và từ IR29 ở locus RG333 có kiểu hình sống sót lâu hơn trong môi trường mặn so với những tổ hợp khác có chứa cả hai alen. Kết quả cho thấy có sự biến thiên vượt trội (transgressive) đối với tính trạng thời gian sống sót của cây mạ

Bảng 3: Phân tích QTL theo phương pháp cách quãng (interval) đối với tính trạng hấp thu K, Na và tỉ số Na/Ka ở chồi thân (Teng 1994)

Chỉ tiêu	Quãng giữa hai marker	Nhiễm sắc thể	Giá trị LOD	Phương sai kiểu hình được giải thích (%)
Hấp thu K				
195-209	P3/M9-8 – <i>Saltol</i>	1	17,23	80,2
206-200	RG375 – P4/M3-2	4	5,34	83,5
3- 93	P1/M1-3 - P2/M1-3	12	3,46	21,2
Hấp thu Na				
195-209	P3/M9-8 – <i>Saltol</i>	1	14,54	64,6
39-188	P1/M5-3 – P3/M9-1	3	3,17	17,1
88 - 67	P1/M10-6 – P1/M7-10	3	3,02	16,0
27 - 25	P1/M3-10 – P1/M3-8	10	3,96	35,6
Tỉ số Na/K				
195-209	P3/M9-8 – <i>Saltol</i>	1	14,51	64,3
207- 65	G291 – P1/M7-8	10	3,60	86,1
3- 93	P1/M1-3 – P2/M1-3	12	3,14	18,5

QTL được khám phá có ảnh hưởng điều khiển tính trạng hấp thụ K ở chồi, định vị trên nhiễm sắc thể số 1, số 4 và số 12 (bảng 3), với phương sai kiểu hình được giải thích là 80,2%, 83,5% và 21,2%, theo thứ tự. QTL có ảnh hưởng đến hoạt động điều khiển tính trạng hấp thụ Na, định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 3, và 10. Đối với tỉ số Na/K, có 3 QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 10 và 12 được giả định là gen điều khiển tính trạng này, với biến dị kiểu hình được giải thích là 64,3%, 86,1% và 18,5%, theo thứ tự (bảng 3). QTL được quan sát trên nhiễm sắc thể số 1 đối với 3 tính trạng: Na thấp, K cao, tỉ số Na/K thấp với giả định có liên quan đến chống chịu mặn.

Bản đồ QTL (trên cơ sở AFLP và STS marker) cho thấy gen chủ lực điều khiển tính trạng chống chịu mặn định vị trên nhiễm sắc thể số 1 (*saltol*). Bên cạnh gen chủ lực, 3 QTL được ghi nhận có quan hệ với tính trạng hấp thụ cao K, 4 QTL có quan hệ với tính trạng hấp thụ thấp Na, và 3 QTL có quan hệ với tính trạng tỉ số Na/K thấp. Những QTL này định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 3, 4, 10 và 12 (Teng 1994)

2-4. SỰ THỂ HIỆN GEN CHỐNG CHỊU MẶN

Trong nông nghiệp, thiệt hại do mặn, lạnh, và khô hạn có ảnh hưởng nghiêm trọng nhất đối với năng suất cây trồng (Boyer 1982). Đặc biệt thiệt hại do mặn có thể làm thay đổi hoạt động sinh trưởng, phát triển, năng suất và làm chết cây. Nhiều nghiên cứu mong muốn tìm ra cơ chế chống chịu mặn một cách rõ ràng, để xây dựng một chương trình cải tiến giống chống chịu có hiệu quả chọn lọc cao. Trong lĩnh vực nghiên cứu sinh lý thực vật, hàng loạt ảnh hưởng stress do mặn cho thấy rằng thực vật tự bảo vệ mình khỏi những thiệt hại do mặn gây ra theo mô hình phản ứng oxygen (Kawasaki và ctv. 2001), tránh thiếu hụt nước, tăng cường hấp thụ ion trong chu trình quang hợp (Noctor và Foyer 1998, Dat và ctv. 2000).

Sự thể hiện gen chống chịu mặn xét về lĩnh vực sinh học phân tử là một khám phá vô cùng thú vị. Tín hiệu được truyền vào tế bào, các gen có chức năng chuyên môn được khởi động và hàng loạt các quá trình chuyển mã, giải mã xảy ra.

Kawasaki và ctv. (2001) đã sử dụng phương tiện microarray để theo dõi sự thể hiện của phân tử transcript và từng quá trình thể hiện gen điều khiển tính chống chịu mặn trong cây lúa. Trên cơ sở thư viện cDNA ly trích từ rễ lúa và bộ marker EST (expressed sequence tags) của genome cây lúa chống chịu mặn nổi tiếng Pokkali, người ta đã áp dụng kỹ thuật microarray để kiểm soát những transcript trong việc so sánh với nghiệm thức không xử lý mặn, thời gian thay đổi từ 15 phút đến 1 tuần lễ trong điều kiện gây mặn nhân tạo. Vật liệu được sử dụng là giống lúa Pokkali (chuẩn kháng) và giống lúa IR29 (chuẩn nhiễm). Nhóm tác giả này tập trung xem xét phản ứng đối với stress do mặn trong quần thể lai có 1728 transcript dẫn suất từ rễ lúa của cây bị xử lý mặn (NaCl ở nồng độ 150mM). Kết quả này cho thấy một tiến trình điều tiết gen chức năng với nhiều mức độ khác nhau của transcript. Trong giai đoạn đầu tiên, đáp ứng của IR29 chậm hơn Pokkali. Sau 3-6 giờ xử lý mặn, mức độ phong phú của transcript thay đổi nhanh trong Pokkali, nhưng IR29 có một sự suy giảm trong vòng 3 giờ đầu tiên, dẫn đến cái chết của giống nhiễm mặn này ngay sau đó.

Hoạt động quang hợp, sự lưu thông qua khí khổng, và hô hấp được ghi nhận sau khi xử lý 150mM NaCl. Quang hợp giảm trong vòng 20 phút và ổn định ở phút thứ 30 (Hoạt động quang hợp được đo theo giá trị $\mu\text{mol photons} / \text{m}^2 / \text{giây}$, hoạt động này chỉ còn khoảng 1/10 so với bình thường) trong giống chuẩn kháng Pokkali. Trong điều kiện xử lý mặn lâu hơn, Pokkali tiếp tục phát triển với tốc độ quang hợp thấp, 7 ngày sau khi xử lý mặn, tổng lượng chất khô tăng gấp đôi. Pokkali duy trì lượng nước trong chồi trong 6 ngày bị stress. Ngược lại, IR29 thể hiện phản ứng chậm hơn đối với stress, và tất cả cây lúa bị chết khô trong vòng 24 giờ. Điều này cho thấy tính chống chịu của Pokkali là một cơ chế thể hiện nhanh sau khi có tín hiệu mặn, giúp nó chống chịu thiệt hại do mặn tốt hơn giống nhiễm IR29 (Kawasaki và ctv. 2001)

2-4-1. Phổ thể hiện transcript (transcript abundance profile)

So sánh sự thể hiện transcript trong rễ lúa Pokkali trong điều kiện bình thường và trong điều kiện bị stress do mặn, người ta ghi nhận sự khác biệt về khả năng chống chịu của kiểu hình này (Kawasaki và ctv. 2001). Thông tin về phổ thể hiện transcript của cây trồng được thu thập thông qua so sánh giữa hai nghiệm thức: bình thường và có xử lý mặn, với các chuỗi mã là dữ liệu thu thập (bảng 4). Trong thư viện cDNA của rễ lúa, những EST được xếp loại theo phổ thể hiện như sau: thư viện OC, không có stress: 1106 EST, thư viện OD, OE và OF, có stress: 1418 EST. Khoảng 41% chuỗi mã của thư viện OC được xem là những protein không được xếp hạng (unclassified proteins), bao gồm cả nhóm có thuật ngữ chuyên môn là “no hits”, trong điều kiện bị xử lý mặn. Trong xếp hạng kiểu “no hits”, có 324 EST được tìm thấy với dữ liệu không có tính chất phong phú. Tính chất đồng dạng được tìm thấy trong nhiều marker EST này, nhưng 154 EST của những cây bị thiệt hại do mặn không thể hiện một cách có ý nghĩa tính chất đồng dạng với EST của dữ liệu. Sự khác biệt chính của transcript thuộc nghiệm thức bình thường và nghiệm thức bị stress do mặn ở chỗ: hoạt động tổng hợp protein giảm, xét về mặt chức năng. Trái lại, chúng ta quan sát thấy transcript thể hiện rất nhiều trong hoạt động làm dễ dàng sự lưu thông trong tế bào và hoạt động tự vệ của tế bào (bảng 4)

Bảng 4: Chức năng của những transcript trong giống lúa Pokkali, đặc trưng cho thư viện cDNA (Kawasaki và ctv. 2001)

Chức năng chủ yếu	Bình thường ^a		Xử lý NaCl ^b	
	Số lượng	%	Số lượng	%
Protein không xếp loại	354	32,0	590	41,6
Tổng hợp protein	253	22,9	152	10,7
Hoạt động biến dưỡng	109	9,9	142	10,0
“No hit”	94	8,5	230	16,2
Tổ chức tế bào	59	5,3	36	2,5
Định vị protein	59	5,3	51	3,6
Truyền tín hiệu	45	4,1	41	2,9
Năng lượng	29	2,6	39	2,8
Chuyển mã	29	2,6	17	1,2
Tạo điều kiện chuyển dịch	24	2,2	44	3,1
Cứu sống, bảo vệ, và phát triển tế bào	22	2,0	40	2,8
Tăng trưởng và phân bào	13	1,2	18	1,3
Phát sinh tế bào (biogenesis)	10	0,9	12	0,8
Di chuyển giữa các tế bào	6	0,5	6	0,4
Tổng cộng	1106	100	1418	100
^a thư viện OC (không có stress)				
^b phối hợp thư viện OD, OE, và OF (có stress)				

Có 4 thư viện cDNA từ rễ lúa Pokkali: thư viện OC sử dụng RNA của rễ lúa 10 ngày tuổi, không xử lý mặn, thư viện OD từ rễ lúa 30 phút sau khi thu hoạch cây mạ 12 giờ tuổi, thư viện OE từ rễ lúa của cây mạ 24-72 giờ tuổi, và thư viện OF từ rễ lúa của cây mạ 1 tuần tuổi

2-4-2. Phân tích microarray

Những phân tử DNA của các clone được chọn lọc, kích thước chèn vào lớn hơn 500 bp của thư viện OC, OD, và OE được khuếch đại với cặp mồi T3/T7 (Kawasaki và ctv. 2001). Những amplicon dài hơn 400 bp được in ra. Kết quả microarray có 1728 transcript được xác nhận với 3 lần nhân ($1728 \times 3 = 5184$ nguyên tố trên mỗi slide). Hiện nay, chúng ta có thể sử dụng web site: www.stress-genimocs.org để tham khảo bảng kết quả cập nhật về tất cả EST trong từng array. Sau khi lai và rửa mẫu, người ta tiến hành phân tích số liệu microarray nhờ những phần mềm hiện đã được thương mại hóa. Các tín hiệu từ những đốm lặp lại ba lần được tính theo giá trị trung bình. Cường độ tín hiệu Cy3 / Cy5 được điều chỉnh với sự trợ giúp của các gen điều khiển ở bên ngoài được cho thêm vào microarray slide (theo qui trình). Các tỉ lệ được tính toán theo tín hiệu Cy3 tổng số trên tất cả những đốm của slide tương ứng với tín hiệu Cy5 tổng số. Theo kiểm tra ban đầu, những microarray này được lai với những probe mục tiêu được đánh dấu bằng huỳnh quang từ những mRNA của mô lá hoặc mô rễ không bị stress do mặn. Kết quả cho thấy, hầu hết các transcript trên array có nguồn gốc từ thư viện của rễ, thể hiện ở mức độ cao hơn so với transcript có nguồn gốc từ lá. Phân tích RNA theo phương pháp Northern Blot, khẳng định tính chất chuyên biệt của mô rễ theo số liệu lai array (hình 2-1). Sự thay đổi cường độ tín hiệu được biểu thị bằng tỉ số thể hiện, tính theo log₁₀ (LR) (LR [Cy3/Cy5]). Kết quả so sánh độ lệch chuẩn so với trung bình mẫu của các đốm lai với RNA cho thấy 91% tín hiệu ở cường độ LR 0,1 tương ứng với độ lệch chuẩn là $\pm 1,25$ fold. Trong nhóm cường độ LR 0,15 ($\pm 1,4$ fold), có 98% tín hiệu được ghi nhận. Trong nhóm cường độ LR 0,2 ($\pm 1,6$ fold), có 0,18% tín hiệu được ghi nhận. Microarray có khả năng phát hiện sự thể hiện gen đa dạng ở cường độ tín hiệu lớn hơn $\pm 0,2$ LR, tương đương với ngưỡng đã được nghiên cứu trước đây (Maleck và ctv. 2000, Kawasaki và ctv. 2001). Mức độ biến thiên cao được quan sát trong một thí nghiệm tương tự với RNA của rễ sau một năm trong điều kiện giống như trên. Trong nhóm cường độ LR 0,1, có 76% tín hiệu được ghi nhận. Trong nhóm cường độ LR 0,15, có 92% tín hiệu được ghi nhận. Chỉ có 2,7%

tín hiệu trong trường hợp LR 0,2 và 47 marker của 1728 EST marker được ghi nhận, sự biến thiên này thể hiện một cách ngẫu nhiên.

2-4-3. Đặc điểm thể transcript của giống lúa chống chịu mặn trong điều kiện bị stress

Trong tất cả những thí nghiệm, người ta so sánh cường độ Cy3 và Cy5 được đánh dấu (PK nonstress) nhằm bình thường hóa hiện tượng biến thiên. Trong nghiệm thức đối chứng này, 95% các đốm được ghi nhận ở cường độ tín hiệu $\pm 0,07$ LR. Phân tử RNA không bị stress (3 giờ) (thu thập 6 giờ trong điều kiện có ánh sáng) lai với RNA (không bị stress, thu thập 3 giờ trong điều kiện có ánh sáng) cho kết quả phổ thể hiện rất giống với nghiệm thức đối chứng (98% các đốm được ghi nhận ở cường độ tín hiệu $\pm 0,01$ LR). Như vậy sự thay đổi về đêm có một tác dụng nhất định (Kawasaki và ctv. 2001)

Chức năng điều tiết sự thể hiện gen thay đổi, sau khi stress do mặn, đã được quan sát thông qua thí nghiệm so sánh những probe tại thời điểm đối chứng với những probe tại 6 thời điểm khác nhau, lúc thu thập RNA, sau khi xử lý cho cây bị stress. Chỉ sau 15 phút, Pokkali đã phản ứng, thực hiện chuyển mã. Sau 15 phút bị stress do mặn, chỉ có 2% transcript được điều tiết theo kiểu UP, hoặc theo kiểu DOWN với cường độ tín hiệu $\pm 0,2$ LR. Sau đó 14% transcript được điều tiết với cường độ $\pm 0,1$ LR (8% lớn hơn + 0,1 LR và 6% ít hơn - 0,1 LR). Sau 1 giờ, 33% của tất cả transcript được biến đổi cho hoạt động chuyển mã, với cường độ $\pm 0,1$ LR (16% lớn hơn +0,1 LR và 17% ít hơn - 0,1 LR), và 10% được điều tiết với cường độ lớn hơn $\pm 0,2$ LR (4% lớn hơn + 0,2 LR và 6% nhỏ hơn - 0,2 LR) (Kawasaki và ctv. 2001)

Trong cây *Arabidopsis thaliana*, gen chống chịu mặn được điều tiết với sự thể hiện gen cao nhất vào lúc 8 đến 10 giờ sau khi mặt trời mọc lên (Fowler và ctv. 1999, Park và ctv. 1999). Cường độ truyền tín hiệu cao của thể transcript *GIGANTEA* trong cây lúa Pokkali trong điều kiện có mặn và không có mặn được ghi nhận là 9 giờ sau khi có ánh sáng, và 10% transcript trong Pokkali điều tiết dạng UP và DOWN trong vòng 1 giờ khi bị stress do mặn (Kawasaki và ctv. 2001). Sau một tuần lễ, tính chất điều tiết theo kiểu UP (aquaporins) ở dạng hồi phục. Sinh tổng hợp protein gia tăng ở giai đoạn đầu, theo sau đó là sự kích thích những transcript có tính chất đáp ứng với stress trong vòng một vài giờ, và kích thích những transcript đảm nhiệm chức năng bảo vệ có liên quan

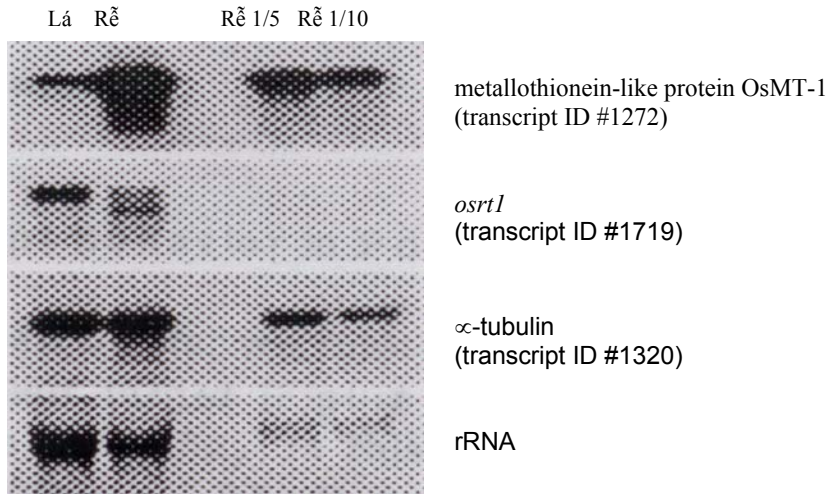
Các tác giả đã tổng kết sự khác biệt giữa giống chống chịu mặn và giống nhiễm như sau:

- Transcript của giống Pokkali chống chịu mặn thể hiện gen với cường độ là một hằng số (0,1 LR) trong tất cả các pha của stress do mặn
- Sự thể hiện của những transcript cần thiết cho hoạt động tế bào, cung cấp năng lượng cho hô hấp chu kỳ C3, hoạt động chuyển mã (mRNA), hoạt động chuyển dịch (ATPase), sinh tổng hợp tế bào (đặc biệt thành tế bào), sinh tổng hợp DNA không bị ảnh hưởng bởi điều kiện mặn
- Phân tích microarray cho thấy phổ thể hiện của Pokkali được ghi nhận trong vòng 15 phút, và của giống nhiễm IR29 được ghi nhận sau 1 giờ
- Phản ứng đầu tiên trong điều kiện mặn là điều tiết theo kiểu UP của transcript thuộc giống Pokkali (protein của ribô thể, CDPK, và nhiều EST chưa rõ chức năng), trong khi đó những hiện tượng điều tiết này không có trong giống nhiễm IR29

2-4-4. Vai trò của abscisic acid, jasmonate, proline

Abscisic acid (ABA) và jasmonate được ghi nhận trong phản ứng của cây trồng đối với stress do thiếu nước và khi cây bị thương. Moon và ctv. (1997) đã so sánh ảnh hưởng sinh lý học ở mức độ phân tử của jasmonic acid (JA) ($\leq 10\mu\text{M}$) và ABA đối với stress do mặn gây ra trong rễ lúa. Chúng ta biết rằng ABA và JA là một trong những chất điều tiết sinh trưởng (regulator) có thể làm thay đổi sự thể hiện của gen. Chất điều tiết sinh trưởng JA và hợp chất methyl ester của nó (methyl jasmonate = MeJA) xuất hiện trong cây trồng và truyền tín hiệu

của cây khi phản ứng với vết thương, cũng như khi cây bị pathogen tấn công (Mueller và ctv. 1993). Jasmonate tích tụ khá nhanh và có tính chất chuyển vị khi cây bị thương hoặc được xử lý với một “elicitor” (Creelman và ctv. 1992, Gundlach và ctv. 1992). Cả hai JA và MeJA đều làm kích thích sự thể hiện gen mã hóa những protein có chức năng khi cây bị thương và bị nguồn nấm bệnh, vi khuẩn tấn công, thí dụ như các loại hình khác nhau ức chế proteinase (Hidman và ctv. 1992), thí dụ như thionins (Andersen và ctv. 1992), protein ở vách tế bào giàu proline (Creelman và ctv. 1992), những enzyme trong phản ứng sinh tổng hợp phytoalexin, phenylalanine ammonialyase (Gundlach và ctv. 1992), enzyme “chalcone synthase” (Lee và ctv. 1996), và hàng loạt những protein khác như PR protein (pathogenesis-related) (Schweizer và ctv. 1997).



Hình 2-1: Sự chuyên biệt của mô trong hoạt động lai microarray – Phân tích “RNA gel blot” đối với những clone được chọn lọc với 10µg RNA / cột, RNA được ly trích từ rễ lúa và lá lúa của nghiệm thức đối chứng. Lai RNA được hoàn tất trong cùng điều kiện sử dụng microarray. Hình ảnh được ghi nhận trên phim X-quang, được phân tích bởi phần mềm GelExpert (version 3.5), Nucleotech, San Carlos. Giá trị log₋₁₀ ratio đối với các tín hiệu của rễ và lá trong RNA gel blot and microarray như sau: OsMT-1, 1,10/0,98; *ars1*, -0,4/-0,4; và α -tubulin, 0,02 /-0,01 (Kawasaki và ctv. 2001).

Jasmonate còn được tìm thấy trong hoạt động kích thích protein bất hoạt ở ribô thể của lá kiểu mạch (Reinbothe và ctv. 1994) và nhiều dạng khác của nhóm đồng dạng lipoxygenase (LOX) của thực vật (Bell và ctv. 1995).

Abscisic acid là hormone thực vật được xem như một tín hiệu quan trọng trong phản ứng phân tử và sinh lý thực vật khi cây thiếu nước, cây bị ảnh hưởng của mặn, hoặc nhiệt độ lạnh (Zeevarrt và Creelman 1988, Moon và ctv. 1997). ABA và sự thiếu nước làm kích thích sự thể hiện của hàng loạt gen có nhiệm vụ cải tiến tính chống chịu khô hạn, từ đó, các lớp khác nhau của protein LEA (late-embryogenesis abundant) hình thành nên một sự cân xứng sinh học, giúp cây chống chịu stress. Trên cơ sở cấu trúc như vậy, những phân tử protein LEA có nhiệm vụ bảo vệ thành tế bào, làm luân chuyển nước, hoặc lọc các ion. Stress gây ra do thiếu nước sẽ kích hoạt sự chuyển mã của gen *LEA* thông qua lộ trình “ABA-lệ thuộc” và ABA-độc lập” đã được nghiên cứu rất kỹ (Ingram và Bartels 1996, Shinozaki và Yamaguchi-Shinozaki 1997). Tuy nhiên, hiện chúng ta có rất ít hiểu biết về những ảnh hưởng ở giai đoạn hậu chuyển mã được kiểm soát bởi ABA (Moon và ctv. 1997).

Abscisic acid được chứng minh là hoạt động của gen trong phản ứng của cây khi bị thương tổn. Mức độ ABA nội sinh của thực vật sau khi bị tổn hại gia tăng tại chỗ và phát triển theo hệ thống nội hấp. Các nhà nghiên cứu sử dụng đột biến thiếu ABA để theo dõi mối tương

quan giữa sự gia tăng ABA sau khi bị thương tổn với sự biểu hiện của những phân tử ức chế proteinase (Hidmann và ctv. 1992). Phản ứng ABA của gen *pin2* có chức năng tổng hợp protein trong dịch bào khi tế bào bị thương. Gen LOX của *Arabidopsis* được tìm thấy do ABA kích thích làm gen này hoạt động, chứng minh sự hợp lực của cả hai chất điều hòa sinh trưởng (Melan và ctv. 1993).

Moon và ctv. (1997) tổng hợp như sau:

- JA kích hoạt một peroxidase của cation, hai protein mới có kích thước 32 và 28 kD, những protein PR có tính chất acid như PR-1 và PR-10, và protein SalT phản ứng với stress do mặn ở rễ lúa. Hầu hết những protein trong phản ứng của JA ở trong rễ được tích tụ lại khi cây lúa bị stress do mặn gây ra
- JA không kích thích protein LEA nhóm số 3 có tính chất đáp ứng với ABA
- Trong điều kiện mặn, ABA kích thích hiện tượng tích tụ transcript của gen *oslea 3*.
- JA, ABA, và stress do mặn kích thích sự tích tụ transcript của gen *salT* và gen *osdrr*, chúng mang mật mã của protein PR-10
- Mức độ ABA nội sinh trong rễ và mức độ methyl jasmonate gia tăng rất khác nhau về lượng và về thời gian bị stress do mặn kéo dài

Trong một nghiên cứu khác về thể hiện ABA với “binding protein” (BP) trong cơ chế chống chịu mặn của cây lúa, Gupta và ctv. (1998) đã ghi nhận những điểm chính như sau

- ABA kích thích những gen có nhiệm vụ quan trọng trong điều khiển tính chống chịu mặn
- Sự thể hiện yếu tố chuyển mã ghi nhận nguyên tố ABRE (viết tắt từ chữ abscisic acid response element) như một hoạt động điều hòa khi cây bị stress do mặn
- Trong điều kiện bị stress do mặn trong 72 giờ, hai transcript được tích tụ trong rễ lúa Pokkali (chuẩn kháng) đã được phát hiện là 2,0 kb (r2.0) và 1,5 kb (r1.5). Cả hai transcript này được phát hiện sau 6 giờ bị stress do mặn, hoặc được xử lý ABA.
- Giai đoạn thể hiện hoạt động điều tiết gen với nguyên tố “ABRE-binding protein” trong phản ứng với mặn xảy ra vào lúc 26 giờ sau khi xử lý 200mM NaCl
- Sự xuất hiện của “ABRE-binding protein” ở thể bất hoạt và tiền-sinh tổng hợp của cây đối chứng và hoạt động của GTP có thể là một lộ trình điều tiết sự thể hiện của những gen chống chịu mặn

Mối quan hệ giữa hoạt động truyền tín hiệu và sự điều hòa gen chống chịu mặn rất được quan tâm nghiên cứu. Thực vật có khả năng chống chịu được những thử thách của môi trường như khô hạn, nhiệt độ lạnh, mặn bằng cơ chế điều tiết (adjustment) nhiều hơn cơ chế thoát (escaping). Những phản ứng như vậy được sự hỗ trợ đặc lực của ABA, với những kênh truyền tín hiệu hiện nay vẫn chưa được biết rõ ràng. Một tín hiệu được ghi nhận là Ca^{++} , và chính ABA đã làm tăng hàm lượng Ca^{++} trong tế bào bảo vệ dẫn đến sự đóng mở khí khổng khi cần thiết (Wu và ctv. 1997). Có 3 chất làm nhiệm vụ điều tiết Ca^{++} là: inositol (1, 4, 5)-triphosphate (IP_3), cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose (cADPR), và nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate ($NAADP^+$). Receptor của IP_3 được biết khá rõ nhưng receptor của cADPR và $NAADP^+$ chưa được biết nhiều lắm. Receptor có tính giả định của cADPR là ryanodine (RyR) (Wu và ctv. 1997). Các xét nghiệm sinh học trên cây *Arabidopsis thaliana* cho thấy hàm lượng cADPR gia tăng theo ABA

Công trình nghiên cứu của Igarashi và ctv. (1997) đã định tính gen đối với “ Δ^1 -pyrroline-5-carboxylase synthetase” (cOsP₅CS) và xem xét mối tương quan giữa thể hiện gen này với tính chống chịu mặn của cây lúa. Người ta đã phân lập một cDNA đối với cOsP₅CS, một enzyme dùng trong sinh tổng hợp “proline”. Sau đó, người ta tiến hành xác định tính chất thư viện cDNA ly trích từ cây mạ 14 ngày tuổi của giống lúa Akibare. Chuỗi amino acid bị phân giải của protein P₅CS thể hiện 74,2% dạng tương đồng (homology) đối với P₅CS của *Arabidopsis thaliana*, và 75,5% dạng tương đồng đối với P₅CS của *Vigna aconitifolia*. Phân

tích Northern blot cho thấy phân tử RNA của gen này bị kích thích trong điều kiện xử lý nồng độ mặn cao, hoặc điều kiện có ABA. Sự tích lũy proline cũng được quan sát như một kết quả thể hiện gen trong điều kiện cây lúa bị xử lý mặn. **Proline** là một yếu tố có thể kích thích sự điều tiết gen đối với hiện tượng cơ nguyên sinh trong cây lúa khi bị xử lý mặn hoặc khô hạn (Strizhov và ctv. 1997, Iyer và Caplan 1998)

2-5. NGHIÊN CỨU CHUYÊN ĐỀ

CẢI TIẾN GIỐNG LÚA CHỐNG CHỊU MẶN Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

(Lang và ctv. 2001a, 2001b, 2001c)

Vùng trồng lúa bị nhiễm mặn ở Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) ước khoảng 700.000 ha. Mặn xâm nhập từ tháng 12 đến tháng 5. Nông dân ở đây thường chờ mưa để trồng lúa. Tuy nhiên do lượng mưa thất thường, cây lúa vẫn có thể bị mặn gây hại ở giai đoạn mạ, hoặc giai đoạn trở đến chín. Việc xác định tiêu chuẩn chọn giống chống chịu mặn, xác định các tính trạng cần thiết, cơ chế kháng mặn ở giai đoạn mạ, và giai đoạn phát dục là mục tiêu của nhiều chương trình chọn giống. Tính trạng được quan tâm nhiều là mức độ tổn thương trên lá ở giai đoạn mạ, tỉ lệ hạt bất thụ ở giai đoạn phát dục, tỉ số Na^+/K^+ của chồi thân, trong điều kiện môi trường mặn. Ảnh hưởng gây hại do mặn trên cây lúa rất phức tạp, chúng ta không chỉ quan sát tính trạng hình thái, mà còn tính trạng sinh lý, sinh hóa, tương tác với môi trường. Do đó, việc chọn lọc cá thể chống chịu mặn không thể căn cứ trên một tính trạng riêng biệt nào đó (Akbar và ctv. 1986). Giống chống chịu mặn nổi tiếng Nona Bokra được ghi nhận tốt ở giai đoạn mạ và giai đoạn tăng trưởng, nhưng giống chuẩn kháng Pokkali được ghi nhận tốt ở giai đoạn phát dục (Senadhira 1987). Giống Đốc Đỏ, và Đốc Phụng đã được đánh giá như nguồn cho gen kháng ở ĐBSCL (Bửu và ctv. 1995). Chương trình chọn giống lúa chống chịu mặn tập trung khai thác nguồn tài nguyên di truyền địa phương, thích nghi với môi trường và tập quán canh tác. Kỹ thuật di truyền phân tử hiện được ứng dụng để tạo giống lúa năng suất cao và chống chịu điều kiện bất lợi chính. Chen và ctv. (1991) đã ghi nhận sự có mặt của nhóm alen M-20 ở giữa hai loci RG711 and RG4 trên nhiễm thể số 7. Quần thể F_2 của cặp lai giữa M-20 với giống 77-170 cho thấy: gen kháng chủ yếu định vị trên nhiễm thể số 7, liên kết với marker RG711 với khoảng cách di truyền 7.0 ± 2.9 cM (Zhang và ctv 1995). Nhóm marker phân tử "microsatellite" được xem như rất phù hợp trong trường hợp xác định gen chống chịu mặn, với thể đa hình (polymorphism) phong phú (Kun-Shen và ctv 1993).

Mục tiêu nghiên cứu: (1) xác định vật liệu cho gen chống chịu mặn, (2) tìm hiểu một vài cơ sở sinh lý tính chống chịu mặn, (3) phát triển giống lúa chống chịu mặn ở ĐBSCL.

2-5-1. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu bao gồm các giống lúa địa phương cổ truyền, giống lúa cải tiến trong chương trình lai, với giống đối chứng kháng quốc tế là Pokkali và đối chứng kháng địa phương là A69-1, giống chuẩn nhiễm là IR28.

Sử dụng quần thể F_2 của tổ hợp lai IR28 / Đốc Phụng. Thu hoạch hai hạt trên mỗi bông của mỗi cá thể F_2 để theo dõi sự phân ly ở F_3 .

Dung dịch mặn được tạo ra bằng cách khuấy đều muối ăn trong nước cất (5 g trong 1 lít nước), điều chỉnh sao cho độ dẫn điện $\text{EC} = 10$ dS/m.

Thang điểm đánh giá được trình bày trong bảng 1, trên cơ sở quan sát bằng mắt. Việc đánh giá bắt đầu từ tuần lễ thứ ba sau khi xử lý mặn.

Bảng 5: Tiêu chuẩn đánh giá (SES) ở giai đoạn tăng trưởng và phát triển.

Điểm	Quan sát	Mức chống chịu
1	Tăng trưởng bình thường, không có vết cháy lá	Chống chịu tốt
3	Gần như bình thường, nhưng đầu lá hoặc vài lá có vết trắng, lá hơi cuộn lại	Chống chịu
5	Tăng trưởng chậm lại; hầu hết lá bị cuộn, chỉ có vài lá còn có thể mọc dài ra	Chống chịu trung bình
7	Tăng trưởng bị ngưng lại hoàn toàn; hầu hết lá bị khô; một vài chồi bị chết	Nhiễm
9	Tất cả cây bị chết hoặc khô	Rất nhiễm

Microsatellite: Sản phẩm PCR được chuẩn bị trong 10mM Tris-HCl (pH 8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1 unit của TAKARA *Taq*, 4 nmol dNTP, 10pmol primer và 50ng DNA. Sử dụng thermal cycler 9600 (Perkin-Elmer), chu kỳ nhân gen được thiết kế như sau: tách dây đơn ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo đó là 35 chu kỳ: 94°C trong 60 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 60 giây. Lần kéo dài phản ứng cuối là 72°C trong 5 phút. Sau khi thực hiện PCR, chúng tôi thêm vào 13µl dung dịch đệm (98% formamide, 10mM EDTA, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol. Mức độ đa hình của sản phẩm PCR được phát hiện nhờ ethidium bromide sau khi điện di trên 5% agarose gel. Microsatellite marker được ghi nhận sự có băng kháng và nhiễm theo số 1 (chống chịu mặn) và 2 (nhiễm).

Trong nghiên cứu cơ chế tính chống chịu mặn, việc xử lý mặn được thực hiện trên cây mạ 3-tuần- tuổi, trong môi trường dinh dưỡng Yoshida. Thêm vào 50ml NaCl sao cho nồng độ đạt 0.5% và 1.0% mỗi một tuần. Chỉ tiêu quan sát được ghi nhận vào lúa 1 và 2 tuần sau khi xử lý mặn. Sodium và potassium được đo bằng quang phổ kế ngọn lửa. Hai giống chống chịu là CSR10 và CRS13 của Ấn Độ được so sánh với hai giống nhiễm là IR20 và IR28 trên cơ sở các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa.

2-5-2. KẾT QUẢ & THẢO LUẬN

2-5-2-1. Xác định vật liệu lai tạo

Nghiên cứu di truyền số lượng gen chống chịu mặn đã được nghiên cứu trên cơ sở tính trạng hình thái học (Bửu và Tạo 1993). Ưu thế lai được ghi nhận đối với năng suất hạt, số bông trên bụi, và chiều cao, do hoạt động của gen trội và tương tác không alen. Trong điều kiện mặn, hạt chắc trên bông có giá trị đóng góp trực tiếp lớn nhất đến năng suất (Bửu và Trường 1988). Số hạt chắc trên bông và tỉ lệ hạt lép là hai thông số đáng tin cậy nhất của chỉ số chọn lọc trong điều kiện mặn. Ảnh hưởng của gen không cộng tính (non-additive) đối với các yếu tố cấu thành năng suất đã được ghi nhận, trừ trọng lượng 1000 hạt (Tạo và ctv. 1992). Có ít nhất 5 nhóm gen điều khiển tính trạng chiều cao cây của giống lúa nước sâu trồng ở vùng ven biển bị ngập mặn

Giá trị khả năng phối hợp chung cao đối với tính trạng sức chứa được ghi nhận trên giống lúa địa phương vùng mặn là Lúa Giàu, Ba xe giai, và Bông Hường (Lang 1994).

Chiến lược tạo chọn giống chống chịu mặn được xem như là cách làm kinh tế và có hiệu quả nhất để gia tăng sản lượng thóc ở vùng bị nhiễm mặn. Chúng ta đã cố gắng tìm kiếm tính trạng đạt chỉ tiêu chọn lọc đơn giản nhất cho nhà chọn giống. Những thông số đã được công bố và đề nghị cần quan tâm là mức độ thiệt hại trên lá ở giai đoạn mạ, hạt hữu thụ ở giai đoạn phát dục, tỉ số Na⁺/K⁺ của chồi trong điều kiện mặn (Bửu và ctv. 1995). Hiệu quả chọn lọc giống lúa chống chịu mặn vẫn còn rất thấp bởi vì tính chất phức tạp của vùng đất khảo sát, và những yếu tố môi trường khác có liên quan nhưng không kiểm soát được. Có hai hoặc nhiều gen số lượng điều khiển tính chống chịu mặn, liên kết khá chặt chẽ với môi trường đã được ghi nhận, nhờ phương tiện marker phân tử RFLP (Kuraka và ctv. 1994, McCouch và ctv. 1998).

Viện Lúa ĐBSCL đã thanh lọc 418 mẫu giống lúa địa phương trong điều kiện mặn 6-12dS/m, có 44 mẫu giống chống chịu tốt là Nàng Co Đỏ, Sóc Nâu (Bửu và ctv. 1995), và gần đây là Đốc Đỏ, Đốc Phụng, Trái Mây, Cà Đung Trắng (bảng 6)

2-5-2-2. Nghiên cứu cơ chế chống chịu mặn

Các giống lúa nhập nội IR37109-61, BW298-2, CSR9, CSR10, CSR13, và giống lúa của Viện OM723-7, OM723-11 có khả năng phục hồi tốt và cho năng suất cao trên các vùng mục tiêu, thông qua hệ thống khảo nghiệm giống hàng năm

Hai giống lúa chống chịu mặn của Ấn Độ là CSR10 (M40-431-24-114 / Jaya) and CRS13 (CSR1 / Basmati // CSR5) được sử dụng để so sánh với hai giống nhiễm IR20 và IR8 (Bây 1993).

Độ mặn làm gia tăng hàm lượng sodium trong cả hai cây lúa kháng và nhiễm mặn. Độ mặn làm giảm đáng kể hàm lượng potassium ở cây nhiễm, nhưng làm tăng potassium ở cây chống chịu, cả hai giai đoạn tăng trưởng và phát dục (bảng 7)

Giống lúa chống chịu mặn có hàm lượng Na^+ giảm do nó duy trì được một lượng cao K^+ trong thân (Krishnamurty và ctv. 1987, Prat và Fathi 1990). Tính chống chịu mặn Salinity tolerance (với tiêu chuẩn chọn lọc Na^+/K^+ của chồi thân) được điều khiển bởi hoạt động của cả hai nhóm gen cộng và trội (Gregorio và Senadhira 1993). Tính trạng chống chịu mặn được điều khiển bởi ít nhất hai nhóm gen có tính siêu trội. Nhóm thứ nhất có thể điều khiển sự loại thải Na^+ và nhóm thứ hai điều khiển sự hấp thu K^+ . Tỉ số Na^+/K^+ trong chồi thân của các giống chống chịu mặn thường nhỏ hơn so với giống nhiễm khi bị xử lý mặn. Tỉ số $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ lớn trong giống nhiễm so với giống chống chịu (Subbarao et al. 1990).

Giống lúa chống chịu mặn có thể còn nhờ cơ chế tích tụ một lượng cao spermidine và spermine so với những cây mạ chưa xử lý mặn ở cả hai giai đoạn. Hàm lượng putrescine hơi tăng lên trong cây mạ bị xử lý mặn so với cây bình thường (Bây 1993). Giống nhiễm mặn thường duy trì một lượng cao putrescine, kết hợp với hàm lượng thấp của spermidine và spermine trong cây mạ bị xử lý mặn ở cả hai giai đoạn (bảng 8). Katiyar và Dubey (1990) ghi nhận rằng mặn làm cho hàm lượng polyamine gia tăng đáng kể trong cây mạ; ở độ mặn 14 dS/m putrescine tăng gấp đôi trong giống nhiễm. Hợp chất polyamines bao gồm putrescine, được biết với chức năng kích thích sự tăng trưởng của cây trồng, cho thấy rằng nồng độ của những amines nội sinh này có thể là mức giới hạn của sự tăng trưởng (Smith 1982, 1984). Spermidine và spermine đã được biết trong cơ chế ngăn ngừa hoạt động của fructose-1,6-biphosphatase trong lục lạp (Costa và Bagni 1983, Costa và ctv. 1984). Sự có mặt của spermidine synthase trong lục lạp cho thấy rằng spermidine có thể là một "modulator" rất quan trọng của fructose-1,6-biphosphatase *in vivo* (Sindhu và Cohen 1983). Putrescine tích tụ trong cây để giúp cây thích nghi với các điều kiện gây stress từ bên ngoài, đặc biệt trường hợp thiếu K^+ và Mg^{++} , hấp thu NH_4^+ trong điều kiện bị acid hóa, và trường hợp bị nhiễm mặn (Altman và ctv. 1982, Young và Galston 1983, Flores và ctv. 1984, Smith 1984). Nồng độ putrescine cũng sẽ gia tăng nếu có yếu tố gây sốc làm co nguyên sinh hoặc yếu tố mất nước của tế bào (Flores và Galston 1984). Sự cân bằng điện giữa cation / anion cũng chứng minh được hiện tượng gia tăng putrescine khi co nguyên sinh, nhưng sự tích tụ proline trong điều kiện khô hạn và mặn có thể được xem xét từ một cơ chế giống nhau, putrescine tích tụ như một sản phẩm dự trữ trong những điều kiện bị stress rất đa dạng (Smith 1984) (Bảng 8).

Bảng 6: Thanh lọc giống lúa chống chịu mặn ở giai đoạn mạ, trong môi trường Yoshida + NaCl

Giống	Điểm chống chịu	
	6dS/m	12dS/m
Đốc Đỏ	3	5
Đốc Phụng	3	5

Trái Mây	3	7
Cà đung trắng	3	7
Lúa Trúng Cút	5	7
Nàng Thiêt	5	7
Nàng Tét	5	7
Cà Đung Đỏ	5	7
Cà Đung Phèn	5	7
Phụng Lùn Lem	5	7
Nàng Thơm Hạt Lựu	5	7
<hr/>		
Nếp Trúng Cút	5	9
Tám Đỏ	5	9
Lúa Nàng Thơm	9	9
Trắng Chùm	5	9
Nhỏ Thước Cò	5	9
Nàng Quýt	5	9
Nàng Rá	5	9
Chiêu Đỏ	3	9
Nàng Hương	5	9
Nàng Quýt	5	9
Ba Lê	9	9
Trắng Lùn	9	9
Nhỏ Thơm Lùn	3	9
Nếp Mỡ	3	9
Đốc Trắng	3	9
Nanh Chồn	3	9
Nếp Móng chim	3	9
Tiêu Chùm	3	9
Trắng Tép	3	9
Một Bụi	9	9
Nàng Keo	7	9
Nếp Than	9	9
<hr/>		
IR28 (chuẩn nhiễm)	9	9
Pokkali (chuẩn kháng)	3	5

(1: chống chịu tốt, 3: chống chịu, 5: chống chịu trung bình, 7: nhiễm, 9: rất nhiễm)

Bảng 7: Ảnh hưởng mặn đối với sự tích lũy chất khô, hàm lượng Na, K của cây lúa (Bảy 1993)

Giống	Nghiệm thức	Chất khô (g / cây)		Sodium (meq /g TL khô)		Potassium (meq /g TL khô)	
		1TSX	2TSX	1TSX	2TSX	1TSX	2TSX
CSR10	Đối chứng	0.58	1.38	0.64	0.74	0.92	1.12
	0,5% NaCl	0.49	1.01	0.82	1.30	1.34	2.60
	1,0% NaCl	0.45	0.90	0.88	1.60	1.64	3.20
CSR13	Đối chứng	0.61	1.17	0.90	0.96	1.10	1.38
	0,5% NaCl	0.47	0.77	1.16	1.80	1.32	2.72
	1,0% NaCl	0.37	0.68	1.26	2.42	1.58	3.00
IR20	Đối chứng	0.51	1.22	0.82	0.94	1.20	1.40
	0,5% NaCl	0.32	0.64	1.26	2.22	0.85	0.96
	1,0% NaCl	0.28	0.43	2.14	3.00	0.54	0.46
IR8	Đối chứng	0.63	1.42	0.60	0.70	1.00	1.36

	0,5% NaCl	0.41	0.84	0.98	1.56	0.82	0.94
	1,0% NaCl	0.36	0.71	1.38	2.14	0.58	0.68
LSD 0.05 (giống)		0.06	0.10	0.20	0.47	0.22	0.33
LSD 0.01		0.09	0.15	0.30	ns	0.34	0.49
LSD 0.05 (giống x nồng độ muối)		0.06	0.11	0.21	0.55	0.26	0.39
LSD 0.01		0.09	0.17	0.40	ns	0.39	0.57

Tsx: tuần sau khi xử lý mặn

Bảng 8: Hàm lượng polyamine tổng số, putrescine, spermidine và spermine trong chồi thân của giống chống chịu mặn và giống nhiễm ($\mu\text{mo}/100\text{g}$ trọng lượng tươi) (Bây 1993)

Giống	Nghiệm thức	Polyamine		Putrescine		Spermidine		Spermine	
		1 Tsx	2 Tsx	1 Tsx	2 Tsx	1 Tsx	2 Tsx	1 Tsx	2 Tsx
CSR10	ĐC	134	175	60	73	57	67	17	35
	0.5%NaCl	174	238	63	80	80	107	31	51
	1.0%NaCl	228	342	65	83	106	155	57	104
CSR13	ĐC	150	198	64	83	63	74	22	41
	0.5%NaCl	179	244	68	95	72	92	39	57
	1.0%NaCl	227	346	73	99	99	145	55	102
IR20	ĐC	167	228	74	99	71	88	22	41
	0.5%NaCl	205	298	103	156	77	95	25	47
	1.0%NaCl	240	338	103	184	82	101	28	53
IR8	ĐC	157	228	68	97	66	86	23	45
	0.5%NaCl	192	291	98	141	68	95	26	55
	1.0%NaCl	223	330	122	166	73	102	28	62
LSD0.05 (giống)		9	12	3	6	3	9	6	2
LSD0.01		13	18	4	9	5	ns	10	3
(Giống x%NaCl)									
LSD0.05		10	19	3	8	5	11	8	4
LSD0.01		15	27	5	11	7	16	11	5

Tsx: tuần sau khi xử lý mặn

Trong điều kiện xử lý mặn, hàm lượng spermine và spermidine tăng rất nhiều trong giống chống chịu mặn so với giống nhiễm.

2-5-2-3. Phân tích bản đồ di truyền QTL tính chống chịu mặn

Quần thể cận giao tái tổ hợp bao gồm 108 dòng từ tổ hợp lai Tenasai 2 / CB đã được sử dụng trong phân tích bản đồ QTL tính chống chịu mặn của cây lúa. Tenasai 2 là giống cho gen chống chịu mặn của Trung Quốc và CB là giống nhiễm có nguồn gốc từ Mỹ. Những tính trạng được quan sát trong điều kiện mặn 12 dS/m là : số ngày cây mạ sống sót (SD), trọng lượng khô của rễ, trọng lượng khô của chồi, hàm lượng Na^+ , K^+ và tỉ số Na^+/K^+ trong chồi. Marker phân tử được sử dụng trong phân tích bản đồ di truyền là RFLP và microsatellite với 108 marker, phủ trên 12 nhiễm sắc thể của cây lúa. Bản đồ được phủ với tổng số 2.340,5 cM, trung bình 21,68 cM / quãng giữa marker và loci. Những marker phân tử liên kết với loci thể hiện tính chống chịu mặn phân lớn định vị trên nhiễm thể số 1, 2, 3, 9, 11 và 12. Bản đồ di truyền QTL được phân tích để xác định ảnh hưởng giữa QTL và các tính trạng liên quan đến khả năng chịu mặn của cây lúa. Những xét nghiệm được áp dụng bổ sung trong phân tích QTL là phép thử chi bình phương, phân tích từng marker riêng (SMA), phân tích mapping từng quãng (IM). Kết quả giữa các phương pháp này cho những giá trị thống nhất để kết luận. Tính trạng có liên quan đến khả năng chống chịu mặn: SD do bốn QTL điều khiển, trọng lượng khô của chồi do một QTL, trọng lượng khô của rễ do hai QTL, sự hấp thu Na^+ do một QTL, sự hấp thu K^+ do một QTL, và tỉ số Na^+/K^+ do bốn QTL (hình 1). Thông qua phân tích QTL, sự biến thiên kiểu hình của SD thay đổi từ 5,2 đến 11,6%, của những tính trạng còn lại

là 4,80 đến 14,38%. Những QTL điều khiển chung tính trạng RD và trọng lượng khô của rễ, RD và Na^+/K^+ định vị trên nhiễm thể 3, và 9. Những QTL điều khiển chung tính trạng Na^+/K^+ và K^+ định vị trên nhiễm thể số 12. Kết quả này đã giải thích hiện tượng biến thiên vượt trội của con lai so với bố mẹ đối với các tính trạng có liên quan đến khả năng chịu mặn (Lang và ctv. 2000)

Bảng 9: Xác định QTL tính trạng số ngày sống sót sau khi xử lý mặn (SD) bằng phương pháp SMA (single marker analysis) của 108 dòng RIL từ tổ hợp Tenasai 2 / CB (Lang và ctv. 2001b)

Marker	Nhiễm sắc thể	Nguồn alen (1)	Giá trị trung bình của alen	Giá trị P (2)	R^2 (%) ³
C711	9	T	28.79±0.26	0.0080	11.5
		C	25.64±0.77		
C1454	9	T	28.79±0.36	0.0235	11.6
		C	23.22±0.00		
R1751	9	T	28.92±0.28	0.0277	6.9
		C	27.63±0.60		
R3156	3	T	28.30±0.28	0.0250	8.5
		C	30.90±1.21		
C560	2	T	28.38±0.25	0.0298	6.6
		C	31.60±1.56		
C747	2	T	28.22±0.30	0.0402	6.1
		C	29.60±0.60		
R26	2	T	28.46±0.25	0.0450	5.2
		C	31.06±1.60		
C178	1	T	28.84±0.26	0.0500	5.8
		C	26.66±1.61		

(1) alen của Tenasai ký hiệu T, alen của CB ký hiệu C

(2) Xác suất của trung bình nhóm khác biệt do ngẫu nhiên

(3) Phần trăm biến thiên kiểu hình của tính trạng số ngày sống sót (SD)

Đa hình được ghi nhận trên 74 RFLP giữa bố và mẹ, và đây là những marker rất có ích để xác định tính rõ ràng của những mẫu dự đoán trong nghiên cứu. Trong 91 cặp môi của microsatellite có 51 marker cho kết quả đa hình. Độ lớn phân tử của những SSR này biến thiên từ 95 bp (RM227) đến 220 bp (RM219, RM242).

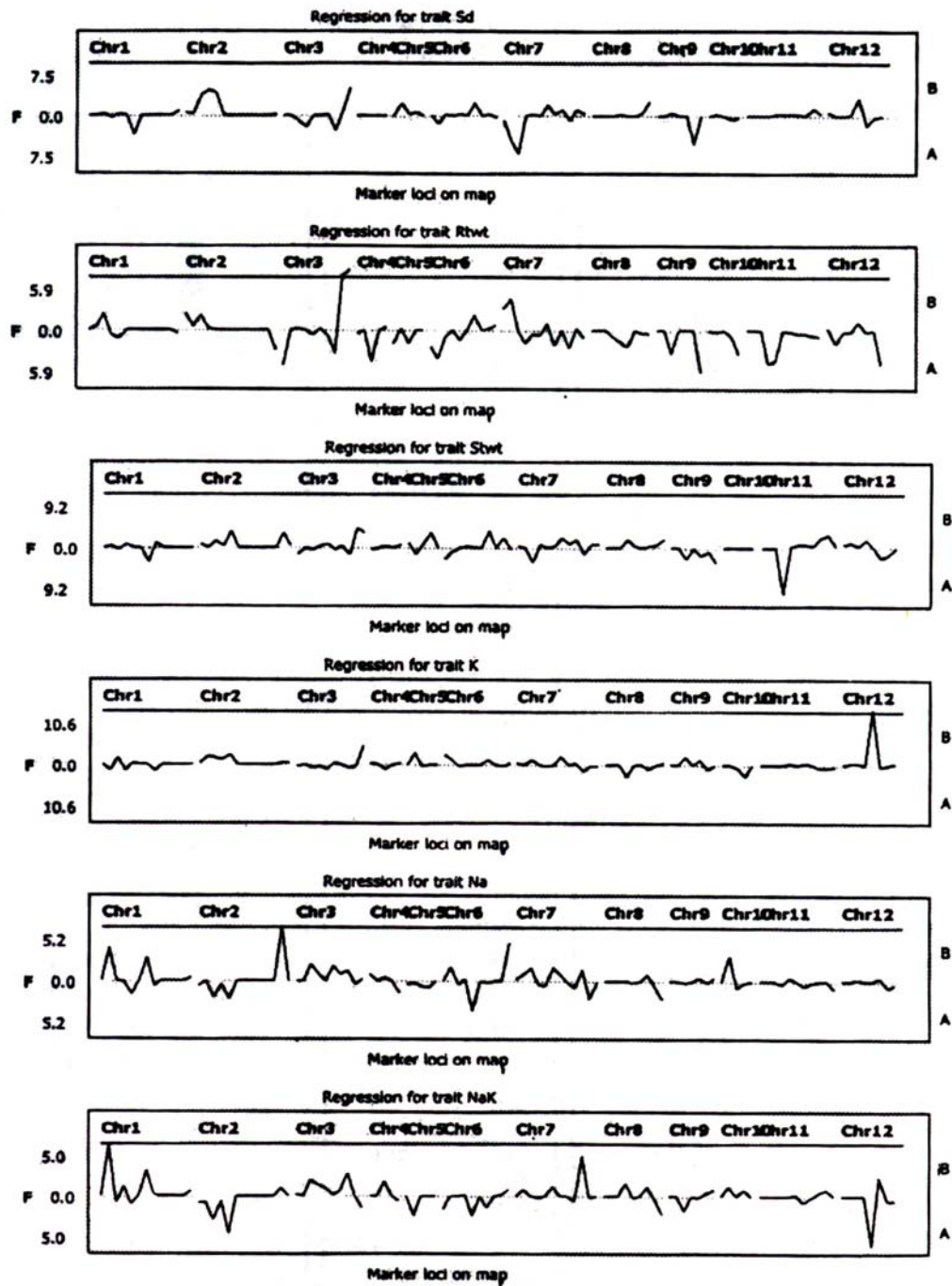
Điều tra 74 RFLP, có 42 marker phân ly một cách có ý nghĩa theo tỉ lệ 1:1. Tất cả marker (trừ một marker) thể hiện độ lệch về phía kiểu gen của Tenasai 2 (giống chống chịu mặn).

Bảng 9 cho thấy 8 marker định vị gần những QTL điều khiển tính trạng số ngày sống sót (SD) trong điều kiện mặn. Bốn marker thể hiện QTL điều khiển gia tăng tính chống chịu mặn từ kiểu gen của bố mẹ, nhưng hai marker thể hiện ảnh hưởng lớn nhất thuộc về kiểu gen của giống Tenasai 2. Những QTL mục tiêu như vậy định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 2, 3, và 9. Tất cả 8 marker này đóng góp một cách có ý nghĩa về độ lệch với tỉ lệ phân ly 1:1 giữa nhóm kiểu gen chống chịu và nhóm kiểu gen nhiễm.

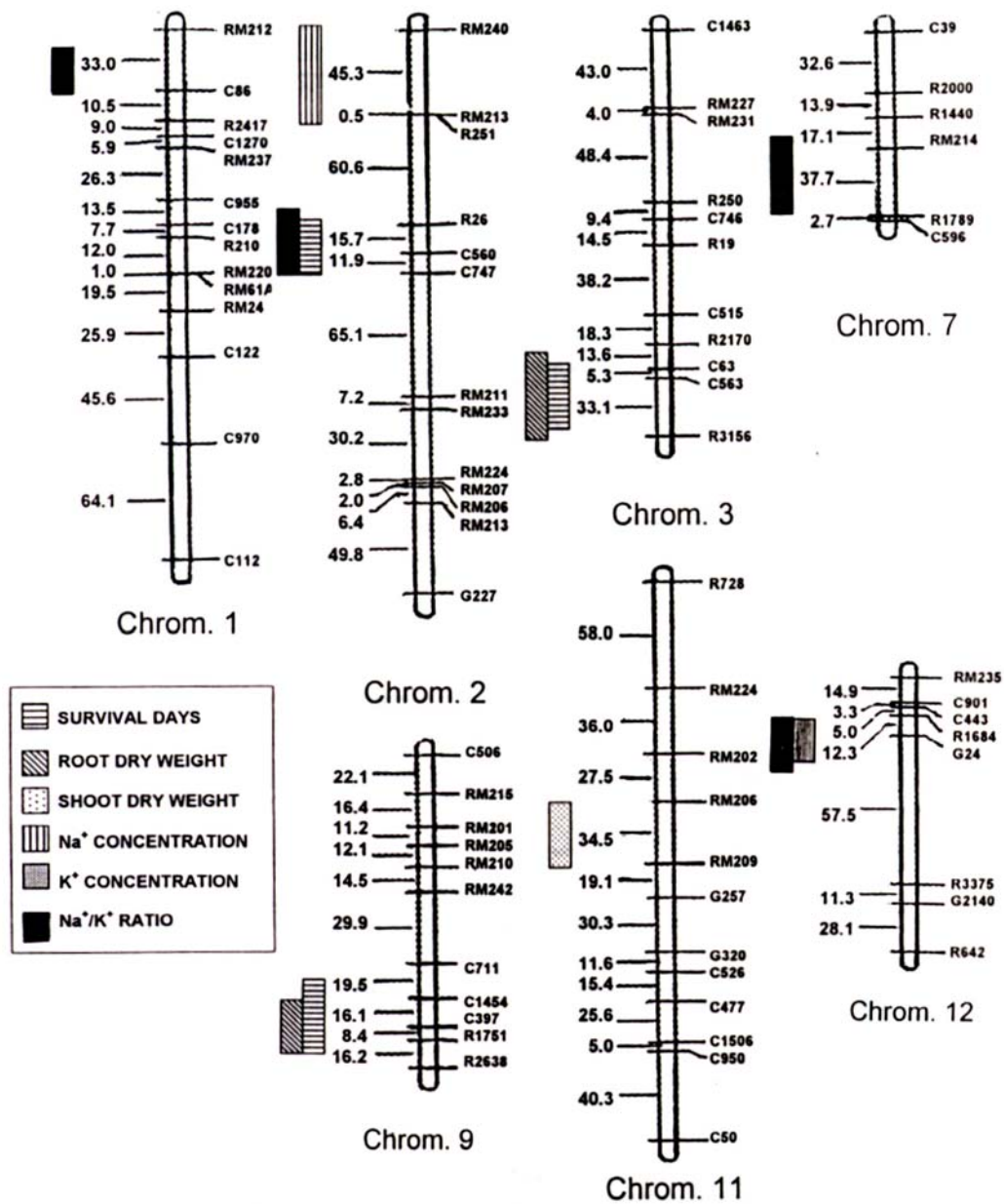
Bảng 10 cho thấy giá trị trung bình của trọng lượng chồi thân (SW) của các dòng cận giao có chứa alen của Tenasai 2, được khuếch đại bởi primer RM209, lớn hơn giá trị trung bình có ý nghĩa so với nhóm có alen của giống CB. Locus này định vị trên nhiễm thể số 11, nơi ấy không có QTL marker của các tính trạng khác liên quan đến hiện tượng chống chịu mặn định vị.

QTL đối với tính trạng trọng lượng rễ (RW) liên kết với những marker định vị trên nhiễm thể số 3 và 9, trùng với tính trạng SD, nhưng chỉ có một marker R3156 được chỉ định chung cho cả hai tính trạng RW và SD

Hàm lượng Na và K bị ảnh hưởng bởi các loci định vị trên nhiễm thể số 6, 7 và 12, cùng thể hiện trên nhiễm thể số 1 và 2.



Hình 2-2: Nguồn A từ Tenasai 2 - giống chống chịu mặn, và nguồn B từ CB- giống nhiễm mặn. Các đỉnh biểu thị vùng di truyền của giống nhiễm CB, trong khi đó các lõm biểu thị vùng di truyền của giống chống chịu Tenasai 2, giúp gia tăng tính trạng mục tiêu (Lang và ctv. 2001b)



Hình 2-3: Bản đồ QTL của những tính trạng mục tiêu liên quan đến hiện tượng chống chịu mặn trên quần thể F₈ (RIL) của tổ hợp lai Tenasai 2 / CB (Lang và ctv. 2001b)

Bảng 10: Xác định QTL của các tính trạng trọng lượng rễ (RW), trọng lượng chồi thân (SW), hàm lượng Na trong chồi, hàm lượng K trong chồi, tỉ lệ Na/K, bằng phương pháp SMA của 108 dòng RIL từ tổ hợp Tenasai 2 / CB (Lang và ctv. 2001b)

Tính trạng	Marker	Nhiễm thể	Kiểu gen	Trung bình alen	Giá trị F	Giá trị P	R ² (%)	DPE
St.wt	RM209	11	T	284.5±6.53	9.24	0.0036	14.3	T
			C	220.0±8.54				
Rt.wt	R3156	3	T	72.42±2.04	5.87	0.018	9.34	C
			C	92.0 ±4.98				
	C563	3	T	73.04±1.86	5.23	0.025	6.95	C
	C397	9	T	77.28 ±2.04	4.00	0.050	6.35	T
		C	61.81 ± 2.60					
Na ⁺	RM240	2	T	0.43 ±0.01	5.21	0.025	7.22	C
			C	0.48 ±0.01				
	R1167	6	T	0.44±0.01	3.68	0.050	4.35	C
			C	0.55±0.01				
K ⁺	G24	12	T	0.73±0.02	10.57	0.002	17.4	C
			C	0.97±0.11				
Na ⁺ / K ⁺	C86	1	T	0.57±0.02	5.03	0.029	9.14	C
			C	0.73±0.04				
	G24	12	T	0.61±0.02	4.83	0.032	8.81	T
			C	0.45±0.07				
RM214	7	T	0.59±0.02	3.86	0.050	5.86	C	
		C	0.81±0.06					
C747	2	T	0.62±0.02	3.71	0.050	5.25	T	
	C	0.54±0.04						

alen của Tenasai ký hiệu T, alen của CB ký hiệu C

DPE: Direction of phenotypic effect: xu hướng kiểu hình theo kiểu alen của T: Tesasai 2; và C : CB

Phương pháp nhạy cảm hơn trong phát hiện QTL là phương pháp phân tích cùng một lúc những ảnh hưởng của marker liên kết trong cùng một quãng của nhiễm sắc thể khi nghiên cứu về di truyền tính chống chịu mặn, được tóm tắt trong bảng 11. Ảnh hưởng của những vùng khác nhau trên mỗi nhiễm sắc thể đối với 6 tính trạng mục tiêu (tiêu chuẩn chọn lọc) liên quan đến hiện tượng chống chịu mặn được thể hiện trong hình 2-2. Các đỉnh biểu thị vùng di truyền của giống nhiễm CB, trong khi đó các lõm biểu thị vùng di truyền của giống chống chịu Tenasai 2, giúp gia tăng tính trạng mục tiêu. Trong bảng 11, có 7 đoạn thuộc 4 nhiễm sắc thể điều khiển tính trạng SD, và một vài đoạn điều khiển các tính trạng mục tiêu còn lại. Tính trạng SD có chung những đoạn định vị trên nhiễm sắc thể số 2 và tính trạng RW có chung những đoạn định vị trên nhiễm sắc thể số 3

Bốn vùng: C560 - C747, R3156 – C397, C1454 – C397, và G24 – R1684 có ảnh hưởng rất ý nghĩa với hai tính trạng mục tiêu (bảng 11). Những ảnh hưởng của các vùng khác nhau như vậy trên từng nhiễm sắc thể đối với 6 tính trạng mục tiêu được tóm tắt trong hình 2-2.

Hầu hết các tính trạng mục tiêu đều thể hiện ảnh hưởng một cách ý nghĩa trên các vùng được xác định của genome (bảng 11), nhưng tính trạng trọng lượng chồi, hàm lượng K⁺ thể hiện ảnh hưởng chỉ trong một quãng của bản đồ di truyền mà thôi.

Bảng 11: QTL của các tính trạng được xác định bằng phương pháp phân tích quãng (interval analysis) trên bản đồ di truyền (hình 2-3) (Lang và ctv. 2001a)

Index	Quãng giữa hai marker	Nhiễm thể	Giá trị P	centi-Morgan
Số ngày sống sót (SD)				
(6-7)	C178-R210	1	0.010	7.7
(18-19)	R26 - C560	2	0.000	15.7
(19-20)	C560- C747	2	0.000	11.9
(37-38)	R3156- C563	3	0.008	33.1
(80-81)	C1454 -C397	9	0.000	16.1
(79-80)	C711-C1454	9	0.008	19.5
(81-82)	R1751-C397	9	0.000	8.4
TL chôi thân (SW)				
(91-92)	RM209-RM206	11	0.003	34.5
TL rễ (RW)				
(36-37)	C563 -C63	3	0.000	5.3
(37-38)	R3156 -63	3	0.00001	33.1
(80-81)	C397-C1454	9	0.006	16.1
Hàm lượng K ⁺				
(104-105)	G24-R1684	12	0.010	12.3
Hàm lượng Na ⁺				
15-16)	RM240-RM213	2	0.002	45.3
Tỉ lệ Na ⁺ /K ⁺				
(1-2)	C86-RM212	1	0.020	33.0
(19-20)	C747-C560	2	0.000	11.9
(61-62)	RM214- R1789	7	0.0001	37.7
(104-105)	G24- R1684	12	0.0001	12.3

Hình 2-3 cho thấy bản đồ liên kết gen và marker với 74 RFLP và 31 SSR thể hiện đa hình, với chiều dài tổng cộng là 2.340,5 cM. Khoảng cách trung bình giữa hai marker là 21,68 cM. Những quãng có giá trị nhỏ nhất trong nhiễm sắc thể số 9 (16,20 cM) và lớn nhất trong nhiễm sắc thể số 4 (30,75 cM). Và còn lại một ít các quãng thiếu khoảng 50 cM.

Việc xác định cụ thể vị trí của QTL điều khiển hiện tượng chống chịu mặn còn được thực hiện trên các tổ hợp lai khác nhau (bảng 12, Lang và ctv. 2001c)

Bảng 12: Phản ứng của các dòng con lai BC₂F₂ của 12 tổ hợp lai (giai đoạn mạ, EC=36 dS/m)

Tổ hợp lai	Phản ứng với mặn
IR64 / Cheng-Hui 448	5
IR64 / OM1706	5
IR64 / FR13A	5
IR64 / Type3	3
Teqing / OM1706	5
Teqing / Amol3	5
IR68552-55-3-2 / Cheng-Hui448	7
IR68552-55-3-2 / OM1706	3
IR68552-55-3-2 / FR13A	3
IR68552-55-3-2 / Madhuhar	5
IR68552-55-3-2 / Type3	3
IR68552-55-3-2 / Almol3	5
Pokali (chuẩn kháng)	3
PSBRc88 (chuẩn kháng)	3
IR29(chuẩn nhiễm)	9
IR64 (chuẩn nhiễm)	5

Bảng 13: Kết quả thanh lọc các dòng BC₂F₂ trong điều kiện mặn EC = 18 dS/m và những marker tương ứng của nó (Lang và ctv. 2001c)

BC ₂ F ₂ của các tổ hợp lai	Code	Số cây	Phản ứng với mặn EC = 18dS/m	Marker xác nhận
IR64/Cheng-Hui448	32005	11	R	RM292, RM242
IR64/OM1706	32058	11	R	RM276, RM315
IR64/FR13A	32035	11	R	RM315
Teqing/OM1706	32134	8	R	
IR68552-55-3-2 / Chenghui448	32146	11	R	
IR68552-55-3-2 / OM1706	32197	11	R	RM223
IR68552-55-3-2 / FR13A	32175	5	R	
IR68552-55-3-2 / Madhukar	32177	24	R	OSR2
IR64/Type3	32044	6	R	
NTP/Type3	32184	13	R	
Teqing/Almol3	32088	10	R	
IR68552-55-3-2 / Almol3	32160	11	R	

Quần thể hồi giao cải tiến BC₂F₂ bao gồm 12 tổ hợp lai, với các vật liệu cho gen chống chịu mặn dùng làm bố là OM1706, FR13A, Cheng Hui 448, Almol 3, Type 3, và Madhadar, các vật liệu được dùng làm mẹ (tái tục) là IR64, IR68552-55-3-2, Teqing (Lang và ctv. 2001 c).

Số cặp primer tương ứng với 150 microsatellite markers đã được sử dụng trong phân tích.

Sự thể hiện đa hình giữa bố mẹ, sự truyền vào của gen mục tiêu (introgression) thông qua biểu hiện của con lai BC₂F₂ được ghi nhận trên nhiễm thể số 1, 6, 8 và 9.

Đánh giá kiểu hình giai đoạn mạ, trong điều kiện thanh lọc mặn ở môi trường dinh dưỡng được khuyến cáo ở EC = 18dS/m. Chiến lược chọn giống chống chịu nhờ marker phân tử (MAS) nên tập trung trên nhiễm thể số 1 và số 8, đặc biệt là nhiễm thể số 1, với marker RM315

Marker OSR1 rất hữu ích được khuyến cáo cho điều tra sơ khởi tính đa hình của bố mẹ

2-5-2-4. Chọn giống chống chịu mặn nhờ marker phân tử (MAS)

Từ kết quả này, chương trình cải tiến giống lúa chống chịu mặn tại Viện Lúa ĐBSCL đã được thực hiện theo hướng xác định một locus chính có quan hệ với tính chống chịu mặn ở cả hai giai đoạn tăng trưởng và phát dục, trên cơ sở lý thuyết "chọn giống nhờ marker phân tử" (MAS). Quần thể F₂ của IR28 / ĐốcPhụng đã được thử nghiệm, sau đó chúng tôi chọn ra 257 con lai ở F₃ để ly trích DNA, và ứng dụng microsatellite marker để tìm kiếm thể đa hình trong quần thể phân ly này. Cây mạ của từng cá thể được trồng trong dung dịch dinh dưỡng Yoshida (Yoshida và ctv. 1976) để đánh giá kiểu hình. Điều chỉnh nồng độ mặn với độ dẫn điện EC=6 dS/m. Ba ngày sau đó, nồng độ mặn được gia tăng lên 12dS/m bằng cách cho thêm NaCl vào dung dịch dinh dưỡng. Dung dịch này được thay đổi định kỳ sau 8 ngày, và duy trì pH luôn luôn là 5,0 trong ban ngày.

Cây lúa thường chống chịu được trong thời gian nảy mầm, nhưng sẽ trở nên nhạy cảm với mặn vào giai đoạn mạ có 3 lá, rồi trở nên chống chịu trong giai đoạn tăng trưởng, sau đó lại mất cảm trong lúc thụ phấn và thụ tinh (IRRI 1967). Có một vài nghiên cứu cho rằng lúa không nhạy cảm với mặn trong lúc trổ bông (Kaddah và ctv. 1975). Vì vậy, muốn biết phản ứng của cây lúa đối với stress do mặn gây ra một cách đầy đủ, chúng ta phải xem xét chúng ở mọi giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Điểm chống chịu mặn thể hiện khác nhau ở giai đoạn tăng trưởng và giai đoạn phát dục. Chúng tôi ghi nhận có sự phân ly vượt trội của con lai so với bố mẹ về tính chống chịu mặn. Điều này chứng tỏ hoạt động của một bộ alen đồng nhất trên các loci khác nhau để điều khiển tính chống chịu (Zhu et al.1999).

Bảng 14: Chuỗi ký tự của microsatellite markers cho thể đa hình trong quần thể cận giao tái tổ hợp của 108 cá thể ở F₉ thuộc tổ hợp lai Tenasai 2 / CB, và IR28 / Đốc Phụng (Lang và ctv. 2001a)

Marker	Nhiễm thể	Chuỗi ký tự primer	Độ lớn phân tử (bp)			
			Đốc Phụng	IR28	Tenasai 2	CP
RM237	1	CAAATCCCGACTGCTGTCC TGGGAAGAGAGCACTACAGC	126	136	126	106
RM231	3	CCAGATTATTCCTGAGGTC CACTTGCATGGTTCTGCATTG	170	190	190	160
RM232	3	CCGGTATCCTTCGATATTGC CCGACTTTTCCTCCTGACG	140	160	mono	
RM218	3	TGGTCAAACCAAGTCCCTTC GACATACATTCTACCCCGG	130	120	mono	
RM214	7	CTGATGATAGAAACCTCTTCTC AAGAACAGCTGACTTCACAA	150	114	118	150
RM223	8	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC GAAGGCAAGTCTTGGCACTG	120	163	160	140
RM201	9	CTCGTTTATTACCTACAGTACC CTACCTCCTTTCTAGACCGATA	140	150	150	140
RM202	11	CAGATTGGAGATGAAGTCCTCC CCAGCAAGCATGTCAATGTA	150	180	180	160
RM206	11	CCCATGCGTTTAACTATTCT CGTTCCATCGATCCGTATGG	120	*	200	110
RM235	12	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC TCACCTGGTCAGCCTCTTTC	90	135	130	100

*Dominant

Theo kết quả đánh giá kiểu hình, Đốc Phụng được điểm 3, và IR28 điểm 9 ở giai đoạn tăng trưởng. Có khoảng 19.4 % cá thể F₃ thể hiện tính chống chịu giống như Đốc Phụng, và 23.3 % nhiễm mặn ở giai đoạn mạ. Quan sát trong giai đoạn phát dục, có 13 % cá thể F₃ chống chịu mặn như Đốc Phụng, và 33.3 % nhiễm mặn.

Theo kết quả đánh giá kiểu gen nhờ microsatellite (SSR), nhiều marker đã được xác định cho kết quả đa hình rõ ràng giữa Đốc Phụng (type 1) và IR28 (type 2).

So với Pokkali, Đốc Phụng thể hiện tính chống chịu tốt hơn ở giai đoạn mạ, và chống chịu tương đương ở giai đoạn phát dục

Số primer được thử nghiệm thành công là 30 trong trường hợp khuếch đại locus của Đốc Phụng và IR28. Phân tử DNA của bố mẹ được đánh giá có mức độ đa hình cao với 10 marker như sau: RM202, RM223, RM231, RM235, RM237, RM218, RM214, RM201, RM232, RM206. Trong đó, marker RM206 chỉ được khuếch đại trong Đốc Phụng, nó thể hiện tính chất "dominant", phần lớn các SSR còn lại đều có tính chất "codominant" (bảng 14). Marker RM218 và RM232 thể hiện đơn hình trong trường hợp cặp lai Tenasai 2 / CB, nhưng thể hiện đa hình rất tốt trong quần thể con lai của IR28 / Đốc Phụng. Kết quả cho thấy thể đa hình DNA giữa bố mẹ đạt được 33.3 % thông qua microsatellite marker (bảng 14).

Bảng 15: Kiểm định lại độ chính xác giữa đánh giá kiểu gen và kiểu hình trong MAS, với quần thể con lai F₃ của IR28 / Đốc Phụng (Lang và ctv. 2001a)

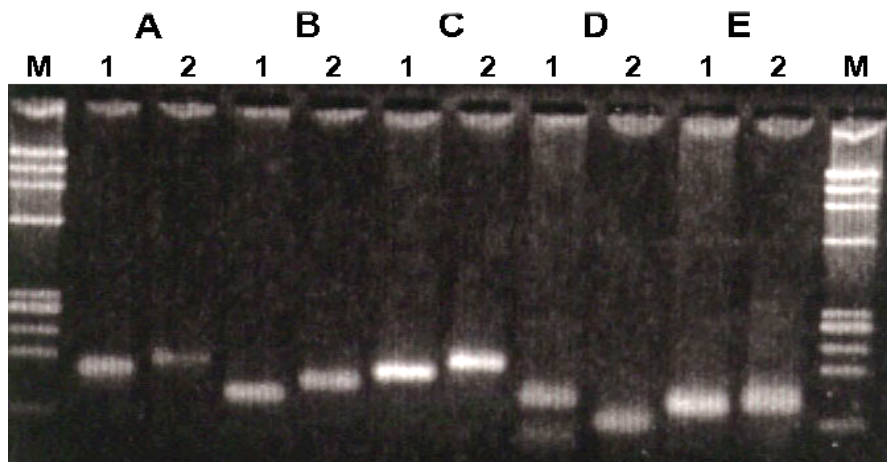
Kiểu hình	Số cây	RM223			Giá trị chính xác (%)
		RR	RS	SS	
<i>Giai đoạn mạ</i>					
Chống chịu	25	23	0	02	92
Nhiễm	25	01	2	22	88
<i>Giai đoạn phát dục</i>					
Chống chịu	23	19	4	00	82
Nhiễm	22	00	2	20	90

Những marker cho kết quả đa hình trên bố mẹ đã được dùng để phân tích quần thể con lai (hình 2-4). Có 9 marker cho thấy không có liên kết với gen chống chịu mặn trong quần thể con lai của IR28 / Đốc Phụng. Chỉ có RM223 liên kết rõ ràng với gen chống chịu mặn với khoảng cách di truyền là 6.3cM trên nhiễm thể số 8 ở giai đoạn mạ. Đoạn phân tử thể hiện trên băng có kích thước 90-190 bp. Tính chất đa hình như vậy có thể được khai thác trong chiến lược chọn giống nhờ marker phân tử (MAS) để phát hiện con lai có gen chống chịu mặn. Phân tích kiểu gen cho thấy, alen kháng của Đốc Phụng có kích thước phân tử 120 bp, và alen nhiễm của IR28 có kích thước phân tử 160 bp.

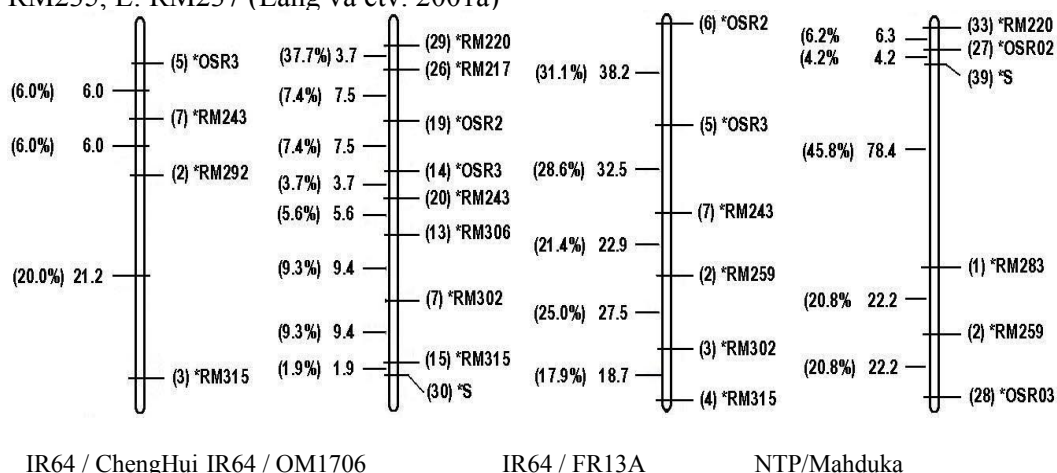
Quần thể F₃ được thanh lọc mặn trong điều kiện EC =10 dS/m ở giai đoạn phát dục. Trong 23 cá thể có kiểu gen đồng hợp tử kháng, trên cơ sở liên kết với marker RM223, 19 cá thể thuộc kiểu gen RR, 4 thuộc kiểu gen Rr, với mức độ chính xác 82% (bảng 10). Trong 22 cá thể có kiểu gen đồng hợp tử nhiễm, trên cơ sở liên kết với marker RM223, 20 cá thể thuộc kiểu gen SS và 2 thuộc kiểu gen Rs, với mức độ chính xác 90% (bảng 15).

So sánh đánh giá kiểu gen với kiểu hình của tính trạng chống chịu mặn ở cả hai giai đoạn mạ và phát dục, marker RM223 đạt kết quả tương ứng 76%.

Tuy nhiên, để đánh giá được ảnh hưởng của môi trường, tất cả giá trị về đánh giá kiểu hình của quần thể đều phải được thực hiện, và DNA phải được ly trích từ quần thể trồng dòn này. Nhiều tác giả đã nhận xét do các giá trị ghi nhận được bị ảnh hưởng bởi môi trường quá lớn (Lander and Bostein 1989), cho nên sử dụng quần thể cận giao tái tổ hợp RI (recombinant inbred lines), quần thể đơn bội kép DH (double haploid lines) và quần thể F₃ trồng dòn sẽ làm gia tăng hiệu quả của kỹ thuật "QTL mapping". Tương tác giữa RM223 và điểm đánh giá kiểu hình sẽ giải thích làm thế nào cá thể này chống chịu tốt hơn các thể kia, hoặc so với bố mẹ. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, có thể các loci điều khiển tính chống chịu mặn của Đốc Phụng chứa đựng những alen ở gần RM223, phối hợp với tính chống chịu NaCl ở giai đoạn mạ và giai đoạn phát dục.



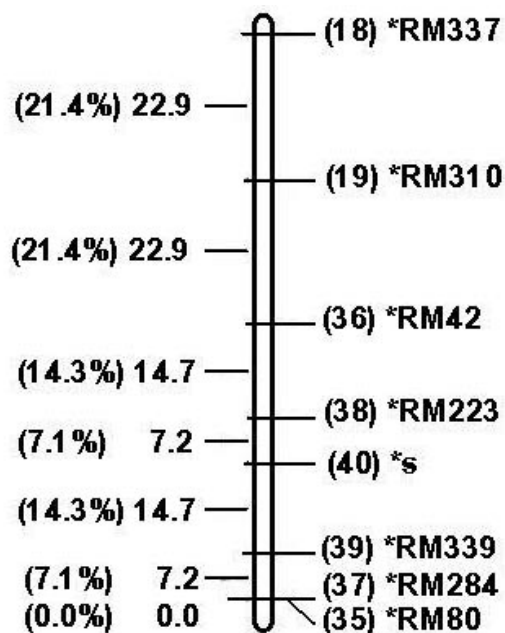
Hình 2-4: Ghi nhận thể đa hình sản phẩm PCR của giống chống chịu Đốc Phụng (1) và giống nhiễm IR28 (2), với các microsatellite marker như sau A: RM202, B: RM223, C: RM231, D: RM235, E: RM237 (Lang và ctv. 2001a)



Hình 2-5 a: So sánh QTL điều khiển tính trạng chống chịu mặn thông qua quần thể BC₂F₂ của các tổ hợp lai khác nhau, trên nhiễm sắc thể số 1 (Lang và ctv. 2001c).

Chú ý locus RM315 trong IR64 / Cheng Hui, IR64 / OM1706, và IR64 / FR13A, locus OSR2 trong NTP / Mahduka

Hình 2-5b: Bản đồ liên kết gen với SSR trên nhiễm sắc thể số 8, của quần thể BC₂F₂ thuộc tổ hợp lai IR64 / FR13A tại locus RM223



Microsatellite có thể được khai thác trong trường hợp tính trạng số lượng được kiểm soát bởi QTL trong chiến lược chọn giống nhờ marker phân tử (MAS). Công việc tiếp tục là thực hiện kỹ thuật "fine mapping" để có những marker liên kết với gen mục tiêu có khoảng cách gần hơn, sự chọn lọc sẽ chính xác hơn.

2-5-2-5. Phát triển giống lúa triển vọng cho vùng bị nhiễm mặn

Bảng 16: Thanh lọc mặn ở giai đoạn mạ trong dung dịch dinh dưỡng Yoshida + NaCl, căn cứ trên thiệt hại ở lá lúa.

Giống	EC = 6dS/m	EC = 12dS/m
AS996	3	9
OM1490	3	5
AS1007	5	7
OM1838	3	7
OM2031	3	9
OM2401	3	9
OM1346	3	7
OM1348	3	9
OM1849-5	7	9
A69-1	3	7
OM723-7	3	7
IR28 (chuẩn nhiễm)	5	9
Pokkali (chuẩn kháng)	1	3
Đốc đỏ (địa phương)	1	1

Trong vùng ven biển ở ĐBSCL, giống lúa IR42 đã được phát triển với qui mô rộng và ổn định từ những năm đầu của thập niên 1980 cho đến nay, nhất là ở Bán đảo Cà Mau. Bên cạnh đó, giống lúa A69-1 cũng được triển khai một vài năm, nhưng sau đó không phát triển được vì phẩm chất gạo kém. Giống nhập nội IR29723-143-3-2 đã được nông dân chấp nhận, mặc dù nó rất nhiễm bệnh bạc lá. Một vài giống lúa triển vọng đã được phát triển trong những năm qua như sau:

Nhóm trung mùa (125-140 ngày)

OM344	Mahsuri / IR42
OM723	A69-1 / NN6A
OM861	Ba Thiet / IR42
OM916	BG380 / A69-1
OM924	IR29723-143-3-2 / OM80
OM1571	A69-1 / OM87-9

Gần đây, nhóm có thời gian sinh trưởng sớm hơn đã được khuyến cáo và phát triển tốt

Hầm Trâu (OM576)	Hungari / IR48	115-120 ngày
OM1314	OM80 / OM576	105-110
OM1490	OM606 / IR44592-62-1-3-3	90-105
OM2031	Thái Lan / Bông Hường	90-105

Nhóm trung mùa vẫn được khuyến khích và có nhiều giống mới được nông dân và cán bộ khuyến nông chú ý như sau:

OM1346	IR42 / OM739-7-2-2-1	120-130 ngày
OM1348	IR42 / OM736-8-1-1	125-130
OM1849	OM723-11 / KSB54	130-135
Tép Hành đột biến	Tép Hành (cổ truyền)	130-135

Kết quả thanh lọc mặn được trình bày ở bảng 7 cho thấy phản ứng chống chịu của các giống triển vọng so với đối chứng Pokkali và Đốc Đỏ.

Một vài vùng trồng lúa ở ven biển còn chịu ảnh hưởng ngập mặn do thủy triều, do đó việc thanh ngậ tính chống chịu ngập hoàn toàn cần phải xem xét. Nghiên cứu cho thấy không có tính đối kháng giữa chống chịu mặn và năng suất, do đó chọn giống chống chịu mặn là chương trình có tính khả thi rất tốt (Shannon và Akbar 1978). Các quần thể lúa hoang *Oryza rufipogon* và *Oryza officinalis* được sưu tập ở vùng ngập mặn sẽ được khai thác làm vật liệu lai, giống như việc khai thác các giống lúa cổ truyền Đốc Đỏ, Đốc Phụng và Sóc Nâu. Tàn suất tái tổ hợp sẽ được gia tăng nếu chúng ta thực hiện chương trình hồi giao cải tiến để chọn được kiểu hình mong muốn trong quần thể con lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abrol IP. 1986. Salt-affected soils: problems and prospects in developing countries. In: Global Aspects of Food production. Oxford, 1986, pp. 283-305
- Akbar M, GS Khush, D HilleRisLambers. 1985. Genetics of salt tolerance. In: Rice Genetics, IRRI Philippines, pp. 399-409
- Akbar M, IE Gunawardena, FN Ponnampereuma. 1986. Breeding for soil stress. Pages 263-272 in Progress in rainfed lowland rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Akbar M, T Yabuno. 1972. Breeding for saline resistant varieties of rice. I. Variability for salt tolerance among some rice varieties. Jpn J Breed 22: 277-284
- Akbar M, T Yabuno. 1975. Breeding for saline resistant varieties of rice. III. Response of F1 hybrids to salinity in reciprocal crosses between Jhona 349 and Magnolia. Jpn J Breed 25: 215-220
- Akbar M, T Yabuno. 1977. Breeding for saline resistant varieties of rice. IV. Inheritance of delayed type panicle sterility induced by salinity. Jpn J Breed 27: 237-240
- Akbar M. 1986. Breeding for salinity tolerance in rice. In: Prospects for Biosaline Research- Proceedings of US-Pakistan Biosaline Research Workshop. Karachi, Pakistan, pp. 38-54
- Akbar M, FN Ponnampereuma. 1982. Saline soils of South and Southeast Asia as potential land. IRRI, Los Banos, Philippines.
- Akita S. 1986. Physiological bases of differential response to salinity in rice cultivars. Paper presented in Project Design Workshop for Developing a Collaborative Research Program for the Improvement of Rice Yields in Problem Soils. IRRI, Los Banos, Philippines
- Andresen I, W Becker, K Schluter, J Burges, B Parthier, K Apel. 1992. The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Mol Biol 19:193-204
- Atman A, R Friedman, D Amir, N Levin. 1982. Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. Pages 483-494 in Plant growth Substances. London, Academic Press.
- Bay ND. 1993. Biochemical changes in salt tolerant and susceptible varieties of rice (*Oryza sativa* L.) under saline conditions. MSc. Thesis. GB Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, India.

- Bell E, RA Creelman, JE Mullet. 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 92:8675-8679
- Ben-Hayyin G, P Spiegel-Roy, H Neumann. 1985. Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated salt-tolerant cell lines of *Citrus aurantium*. Plant Physiol 78:144-148
- Bhumbla DR and IP Abrol. 1978. Saline and sodic soils. In: Soils and Rice. IRRI, Los Banos, Philippines, pp. 719-734
- Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. Science 218:443-448
- Buu BC, DX Truong. 1988. Path analysis of rice grain yield under saline conditions. IRRN 13(6): 20-21
- Buu BC, NT Lang, PB Tao, ND Bay. 1995. Rice breeding research strategy in the Mekong Delta. Pages 739-755 in Proc. of the Int. Rice Res. Conf. "Fragile Lives in Fragile Ecosystems", IRRI, Philippines.
- Buu BC, PB Tao. 1993. Genetic nature of some agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.) through triple test cross analysis. OMonRice 3:5-10
- Carbonnell EA, TM Gerig, E Balansard, MJ Asins. 1992. Interval mapping in analysis of non-additive quantitative trait loci. Biometrics 48:305-315
- Chen SY, LH Zhu, J Hong, SL Chen. 1991. Molecular biological identification of rice salt tolerant line. Acta Bot Snia 33:569-573.
- Clarkson DT, JB Hanson. 1980. The mineral nutrition of higher plant. Ann Rev Plant Physiol 31:239
- Costa G, N Bagni. 1983. Effects of polyamines on fruit set of apple. Hort. Sci. 18:59-61
- Costa G, R Bagni, N Bagni. 1984. Influence of putrescine on fruit set of apple. Acta Gortic. 149:189-195
- Creelman RA, ML Tierney, JE Mullet. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 89:4938-4941
- Dat J, S Vandenameele, E Vranova, M Van Montagu, D Inze, F Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol Life Sci 57:779-795
- Devitt D, WM Jarreli, KL Stevens. 1981. Sodium-potassium ratios in soil solution and plant response under saline conditions. Soil Sci Soc Amer J 45:80-86
- Flores RE, AW Galston. 1984. Osmotic induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameter of the response. Plant Physiol. 75:102-109
- Flores RE, ND Young, AM Galston. 1984. Polyamine metabolism and plant stress. JK Key and T Kosuge, eds. Vol. 22. UCLA Symp. Mol. Cell Biol.
- Fowlers S, K Lee, H Onouchi, A Samach, K Richardson, B Morris, G Coupland, J Putterill. 1999. *GIGANTEA*: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. EMBO J 17:4679-4688
- Gregrio GB and D Senadhira .1993 Genetic analysis of salinity tolerance in rice. Theor.Appl.Gen. 86:333-338

- Gundlach H, MJ Muller, TM Kutchan, MH Zenk. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-inducer plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2389-2393
- Gupta S, MK Chattopadhyay, P Chatterjee, B Ghosh, DN SenGupta. 1998. Expression of abscisic acid-responsive element-binding protein in salt tolerant indica rice (*Oryza sativa* L. cv. Pokkali). *Plant Molecular Biology* 37:629-637
- Hildmann T, M Ebneith, H Pena-Corte, JJ Sanchez-Serrano, L Willmitzer, S Prat. 1992. General roles of abscisic acid and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4:1157-1170
- Igarachi Y, Y Yoshiba, Y Sanada, K Yamaguchi-Shinozaki, K Wada, K Shinozaki. 1997. Characterization of the "Δ²-pyrroline-5-carboxylase synthetase" and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol Biol* 33:857-865
- Ikehashi H, FN Ponnaperuma. 1978. Varietal tolerance of rice to adverse soils. In: *Soils and Rice*. IRRI, Philippines, pp. 801-803
- Ingram J, D Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377-403
- IRRI (International Rice Research Institute). 1967. Annual report for 1967. IRRI, Los Banos, Philippines
- Iwaki S, K Ota, T Ogo. 1953. Studies on the salt injury in rice plant. IV. The effects on growth, heading and ripening of rice plant under varying concentration of sodium chloride. *Proc Crop Sci Jpn* 22:13-14
- Iyer S, A Caplan. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol* 116:173-181
- Jensen J. 1989. Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus and two marker gene loci. *Theor Appl Genet* 84:49-56
- Jensen J. 1992. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205-211
- Kaddah MT, WF Lehman, BD Meek, FE Robinson. 1975. Salinity effects on rice after the boot stage. *Agron J* 67:436-439
- Katiyar S, RS Dubey. 1990. Changes in polyamine titer in rice seedlings following sodium chloride salinity stress. *J. Agron. Crop Sci.* 165:19-27
- Kawasaki S, C Borchert, M Deyholos, H Wang, S Brazille, K Kawai, D Galbraith, HJ Bohnert. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell* 13:889-905
- Knapp SJ, and WC Bridges. 1990. Using molecular markers to estimate quantitative trait locus parameters powers and genetic variances for unreplicated progeny. *Genetics* 126:769-777
- Knapp SJ. 1991. Using molecular markers to map multiple quantitative trait loci: models for backcross, recombinant inbred, and double haploid progeny. *Theor Appl Genet* 81:333-338
- Knott SA, and CS Harley. 1992. Maximum likelihood mapping of quantitative trait loci using full-sib families. *Genetics* 132:1211-1222
- Korkor SA, and RM Abdel-Aal. 1974. Effect of total salinity and type of salts on rice crop. *Agric Res Rev* 52(5):73-78

- Krishnamurthy R, V Anbazhagan, KA Bhagwat. 1987. Accumulation of free amino acid and distribution of sodium chloride and potassium in rice varieties exposed to sodium chloride stress. *Indian J. Plant Physiol.* 30:183-188
- Kun-Sheng Wu, Seteven D Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice . *Mol gen genet* . 241:225-235.
- Kurata N, Y Nagamura, K Yamamoto, Y Harushima, N Sue, J Wu, BA Antonio, A Shomura, T Kiriha, K Hayasaka, A Miyamo, A Monna, HS Zhong. Y Tamura, ZY Wang, T Momma, Y Umehara, M Yano, T Sasaki, Y Minobe. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nat. Genet* 8: 365-372
- Landers ES and D Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199
- Landers ES, P Green, J Abrahamson, A Barlow, MJ Daly, SE Lincoln, L Newburg. 1987. Mapmarker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Lang NT, S Yanagihara, BC Buu. 2001a. A microsatellite marker for a gene conferring salt tolerance on rice at the vegetative and reproductive stages. *SABRAO* 33(1):1-10
- Lang NT, S Yanagihara, BC Buu. 2001b. QTL analysis of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *SABRAO* 33(1):11-20
- Lang NT, Z Li, BC Buu. 2001 c. Microsatellite markers linked to salt tolerance in rice. *OMonRice* 9: 9-21
- Lang NT. 1994. Studies on heterosis of some physiological traits and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.). PhD Thesis. National Institute of Agricultural Sciences, Hanoi, Vietnam
- Lang NT. 2000. Quantitative trait loci for salt tolerance in rice via molecular markers. *OMonRice* 8:37-48.
- Lebonitz RJ, M Soller, JS Beckmann. 1987. Trait-based analysis for detection of linkage between marker loci and quantitative trait loci in crosses between inbred lines. *Theor Appl Genet* 73:556-562
- Lee J, B Hause, J Lehmann, A Graner, B Pathier, C Gernack. 1996. Isolation, characterization and expression DNA coding for a jasmonate-inducible protein of 37 kDa in leaves. *Plant Cell Environ* 19:700-707
- Lee KS. 1995. Variability and Genetics of salt tolerance in japonica rice. PhD Thesis, University of the Philippines, Los Banos, Philippines, pp. 108
- Lou ZW and MJ Kearsy. 1992. Intermapping of quantitative trait loci in an F₂ population. *Heridity* 69:236-242
- Maas EV, GJ Hoffman. 1977. Crop salt tolerance current assessment. *ASCE J Irrig and Drainage Div* 103:115-134
- Maleck K, A Levine, T Eulgem, A Morgan, J Schmid, KA Lawton, JL Dang, RA Dietrich. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* 26:403-410
- McCouch SR, G Kochert, ZH Yu, ZY Wang, GS Khush, WR Coffman, SD Tanksley. 1998. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor,Appl, Genet.* 76:815-829.
- Melan MA, X Dong, ME Endara, KR Davis, FM Ausubel, TL Peterman. 1993. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Pysiol* 101:441-450

- Mishra B, M Akbar, DV Seshu, D Senadhira. 1996. Genetics of salinity tolerance and ion uptake in rice. *IRRN* 21:38-39
- Mishra B, M Akbar, DV Seshu. 1990. Genetic studies on salinity tolerance in rice towards better productivity in salt-affected soils. Rice Research Seminar, July 12, 1990, IRRI, Philippines, 25 p.
- Mishra B, RK Singh, V Jetly. 1998. Inheritance pattern of salinity tolerance in rice. *J Genet & Breed* 52: 325-331
- Moeljopawiro S, H Ikehashi. 1981. Inheritance of salt tolerance in rice. *Euphytica* 30: 291-300
- Moon A, E Prinsen, G Bauw, M van Montegu. 1997. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell* 9:2243-2259
- Mori IK, T Kinoshita. 1987. Salt tolerance of rice callus clones. *Rice Genetics Newsl* 4:112-113
- Mueller MJ, W Brodscheim, E Spannagl, MH Zenk. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7490-7494
- Murty KS, KV Janardhan. 1971. Physiological consideration for selection and breeding of varieties for saline and alkaline tracts. *Oryza* 8 [Supp. 2]: 85-100
- Narayanan KK, S Krishnaraj, SR Sree Rangaswamy. 1990. Genetic analysis for salt tolerance in rice. Paper presented during the Second International Rice Genetic Symposium, May 14-18, 1990. IRRI, Manila, Philippines
- Noctor G, CH Foyer. 1998. Arscobate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279
- Ota K, T Yasue. 1958. Studies on salt injury in crops. XII. The effect of sodium chloride solution on the germination capacity of paddy seed. *Proc Crop Sci Soc Jpn* 27(2):223-225
- Park DH, DE Somers, YS Kim, YH Choy, HK Lim, MS Soh, HJ Kim, SA Kay, HG Nam. 1999. Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the Arabidopsis *GIGANTEA* gene. *Science* 285:1579-1582
- Paterson AH, S Damon, JD Hewitt, D Zamie, HD Rabinowitch, SE Lincoln, EC Lander, SD Tanksley. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: Comparison across species, generation, and environments. *Genetics* 127:181-197
- Pearson GA, SD Ayers, DL Eberhard. 1966. Relative salt tolerance of rice during germination and early seedling development. *Soil Sci* 102:151-156
- Ponnamperuma FN. 1984. Role of cultivar tolerance in increasing rice production in saline lands. *Strategies for crop improvement*. John Wiley and Sons, New York, 443 p.
- Prat D, RAE Fathi. 1990. Variation in organic acid and mineral compartments in young *Eucalyptus* seedlings under saline stress. *Plant Physiol.* 79:479-486
- Reinbothes S, B Mollenhauer, C Reinbothe. 1994. PR and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonate in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 1197-1209
- Sathish P, OL Gamborg, MW Nabors. 1997. Establishment of stable NaCl-resistant rice plant lines from anther culture: distribution pattern of K^+/Na^+ in callus and plant cells. *Theor Appl Genet* 95:1203-1209

- Scheizer P, A Buchala, P Silverman, M Seskar, I Raskin, JP Mettraux. 1997. Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. *Plant Physiol* 114:79-88
- Senadhira D. 1987. Salinity as a constraint to increasing rice production in Asia. Required workshop on maintenance of life support species in Asia Pacific Region 4-7 April, 1987.
- Shimose N. 1963. Physiology of salt injury in crops. I. Effect of iso-osmotic pressure due to sodium chloride and sodium sulfate on the growth and absorption of mineral element by rice plants. *Jpn Soil Sci. Tokyo* 34:107-111
- Shinozaki K, K Yamaguchi-Shinozaki. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115:327-334
- Sindhu RK, SS Cohen. 1983. Some properties of the spermidine synthase of Chinese cabbage. Pages 371- 380 in *Advances in polyamine research*. Vol. 4, New York Raven
- Smith TA. 1982. The function and metabolism of polyamines in higher plants. Pages 463-472 in *Plant Growth Substances*. London/New York, Academic Press.
- Smith TA. 1984. Putrescine and inorganic ions. *Adv. Phytochem.* 18:7-54
- Snape JW. 1998. The detection and estimation of linkage using double haploid or single seed descent populations. *Theor Appl genet* 76:125-128
- SSSA (Soil Science Society of America). 1979. Glossary of soil science terms. Madison, Wisconsin, 36 pp.
- Strizhov N, E Abraham, L Okresz, S Blickling, A Zilberstein, J Schell, C Koncz, L Szabados. 1997. Differential expression of two P₅CS gene controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABA 1*, *ABA 1* and *AXR 2* in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 12(3):557-569
- Stuber CW, RH Moll, MM Goodman, HE Schaffer, BS Weir. 1980. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize. *Genetics* 95:225-236
- Subbarao GV, C Johansen, MK Jana, JVDK Rao. 1990. Effect of sodium/calcium ratio in modifying salinity response of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *J. Plant Physiol.* 136:439-443
- Tagawa T, N Ishizaki. 1963. Physiological studies on the tolerance of rice plants to salinity. *Proc Crop Sci Soc Japan* 31(3):249-252
- Tao PB, DX Truong, BC Buu. 1992. Assessment breeding materials from salt tolerant deep water rices in the Mekong Delta. *OMonRice* 2: 56-63
- Teng S. 1994. Gene tagging for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). PhD Thesis. The University of the Philippines, Los Banos, Laguna, Philippines, 118 p.
- Thoday JM. 1961. Location of polygenes. *Nature* 191:368-370
- US Laboratory Staff. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. *Agric Hand B 60*. United States Department of Agriculture, Washington DC
- Weller JI. 1986. Maximum likelihood techniques for mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. *Biometrics* 42:L627-641
- Wu Y, J Kuzma, E Marechal, R Graeff, HC Lee, R Foster, NH Chua. 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278:2126-2130

- Yeo AR, TJ Flowers. 1984. Mechanism of salinity resistance in rice and their role as physiological criteria in plant breeding. In: Salinity tolerance in plants. Wiley-Interscience, New York, pp. 151-170
- Yeo AR, TJ Flowers. 1986. Salinity resistance in rice and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. In: Plant Growth, Drought, and Salinity. Ed. By NC Turner and JB Passioura. CSIRO, Melbourn, Australia. pp 161-173
- Yoshida S, F Fornoda, JH Cock, KA Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice . International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Philippines.
- Young ND, AW Galston. 1983. Putrescine and acid stress. *Plant Physiol.* 71:767-771
- Zeevaart JAD, RA Creelman. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:439-473
- Zhang GY, Y Guo, SL Chen, SY Chen. 1995. RFLP tagging of a salt tolerant gene in rice . *Plant Sci* 110:227-234.
- Zhang XF, JA Masjidis, ZL Hu. 1992. Methods for detection and estimation of linkage between a marker locus and quantitative trait loci. *Plant Breeding* 109:35-39
- Zhu HL, GP Hayes, A Kleinhofs, D Kudrna, Z Liu, L Pron., T Bsteffeson, H Toojinda, H Vivar. 1999. Does function follow form? Principal QTLs for fusarium head blight(FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled -haploid population of Barley . *Theo. Apple Genet* : 1221-1232.

Chương 3

CƠ SỞ DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU KHÔ HẠN

Khô hạn và mặn là hai yếu tố cơ bản làm hạn chế sự tăng trưởng và năng suất cây trồng. Mặc dù chúng ta đã có khá nhiều công trình nghiên cứu tính trạng chống chịu khô hạn của cây trồng, trong suốt hai thập niên 1980 và 1990, nhưng thành tựu cụ thể về chọn tạo giống chống chịu khô hạn vẫn chưa mang lại ý nghĩa lớn lao (Reddy và ctv. 1999).

Phương pháp tiếp cận thứ nhất là phương pháp phân tích sự đóng góp của các tính trạng có liên quan, với mô hình QTL (quantitative trait loci). Phương pháp tiếp cận này phù hợp với hầu hết các loài cây trồng chủ yếu như cây lúa, nhờ bản đồ di truyền với nhiều marker phân tử DNA phủ kín trên nhiễm sắc thể. Hầu hết các nghiên cứu về tính trạng chống chịu khô hạn đều quan tâm đánh giá các tính trạng có liên quan với đến sự sống và phát triển của cây trồng trong điều kiện khô hạn. Phương pháp phân tích di truyền phân tử đã giúp cho nội dung ấy đạt hiệu quả cao hơn, trong khi thực hiện trên từng tính trạng, trước khi chúng ta xem xét sự sống và phát triển của cây. Việc đánh giá kiểu hình của những tính trạng riêng biệt ấy là vô cùng quan trọng, giống như việc đánh giá kiểu hình của sự đáp ứng cây trồng trong điều kiện được kiểm soát ở nhà lưới hay phòng thí nghiệm, trước khi chúng ta đánh giá ngoài đồng ruộng. Một sự liên kết vô cùng chặt chẽ đã được chứng minh, đó là thực hiện các bước trong qui trình MAS (chọn giống nhờ marker phân tử)

Phương pháp tiếp cận thứ hai là sáng tạo ra một kiểu biến dị mới có chức năng được hiểu biết cặn kẽ trong phản ứng của cây trồng khi bị stress do khô hạn, thông qua kỹ thuật chuyển nạp gen. Phương pháp chuyển nạp gen cho thấy đó là phương tiện nhiều tiềm năng để gắn vào cây mục tiêu một phổ rất rộng của các gen với khả năng điều tiết một cách linh hoạt ở vị trí “up” hoặc “down” trong quá trình biến dưỡng kết hợp với hiện tượng đáp ứng khi cây bị stress do khô hạn. Nhưng phương pháp chuyển nạp với một gen hay một nhóm gen trong một lộ trình đặc biệt nào đó có thể không thích ứng trong điều kiện chống chịu khô hạn, bởi vì các sản phẩm di truyền điều khiển tính chống chịu khô hạn xuất phát từ rất nhiều lộ trình khác nhau (Ingram và Bartels 1996). Thông thường, nhiều protein hoặc những phân tử “osmolyte” có trọng lượng phân tử thấp, đóng vai trò điều tiết áp suất thẩm thấu, sẽ được tích tụ trong khi bị stress do khô hạn. Người ta chưa hiểu rõ: yếu tố nào chi phối hiện tượng thay đổi rất nhiều và đóng góp tích cực vào tính chống chịu khô hạn. Phương pháp chuyển nạp gen được xem như rất có ích nhưng nó vẫn chưa cho chúng ta biết các thông tin đáng giá

Phương pháp tiếp cận thứ ba là xác định các gen ứng cử viên (candidate genes) đối với tính chống chịu stress do khô hạn, hoặc mặn, với những phát triển không ngừng của kỹ thuật chuyển nạp gen, bên cạnh những thành tựu về công nghệ phân lập gen (gene isolation) và thao tác gen (gene manipulation)

3-1. XÁC ĐỊNH TÍNH TRẠNG THÀNH PHẦN TRONG CHỐNG CHỊU HẠN

Sự thể hiện tính chống chịu khô hạn được quan sát thông qua những tính trạng cụ thể như hình thái rễ cây, lá, chồi thân, phản ứng cơ nguyên sinh, bao phấn, quá trình trổ bông, v.v.. Những tính trạng như vậy được gọi là tính trạng thành phần (component traits). Bảng 1 cho chúng ta khái niệm về tính trạng thành phần và các loci tính trạng số lượng (QTL) có liên quan đến tính chống chịu khô hạn của một vài cây trồng.

Người ta nhận thấy có sự giống nhau về cơ bản và một vài khác biệt nhỏ về cơ chế chống chịu khô hạn, sự cấu thành năng suất của nhiều loài cây trồng khác nhau. Sự giống nhau về cơ chế chống chịu hạn ở mức độ phân tử rất rõ ràng so với sinh lý học và hình thái học. Chúng ta có thể nghiên cứu từ một cây rồi suy diễn đối với nhiều cây khác (Reddy và ctv. 1999)

Hầu hết các nghiên cứu về marker phân tử đều quan tâm đến những thành phần rất đặc biệt trong sự kiện chống chịu khô hạn, đó là

- khả năng của rễ cây phát triển sâu xuống tầng đất bên dưới,
- tính trạng phun râu và tung phấn với thời gian cách quãng được xác định (ASI = được viết tắt từ chữ anthesis to silking interval)
- sự điều tiết áp suất thẩm thấu (OA = được viết tắt từ chữ osmotic adjustment)
- hiện tượng biến dưỡng ABA (abscisic acid)
- hiện tượng nông học WUE (water use efficiency có nghĩa là hiệu quả sử dụng nước)

Nhiều nghiên cứu khác còn đề cập đến năng suất và thành phần cấu tạo năng suất. Do đó, người ta đã cố gắng xác định vị trí các QTL cho cả tính trạng có liên quan đến chống chịu khô hạn và năng suất, cũng như thành phần năng suất.

Quần thể được dùng trong phân tích bản đồ QTL thay đổi với nhiều thể hệ khác nhau. Rất hiếm khi, QTL được phát hiện trong một quần thể của những cặp lai khác nhau (Reddy và ctv. 1999). Người ta thường gặp nhiều khó khăn khi so sánh kết quả ghi nhận được từ quần thể đơn bội kép (DH) với quần thể cận giao tái tổ hợp (RILs), hoặc quần thể chọn giống nào đó. Người ta cũng gặp khó khăn khi so sánh kết quả của những quần thể có độ lớn khác nhau (số dòng con lai được sử dụng khác nhau, từ vài chục dòng đến hàng trăm dòng con lai)

Số QTL được tìm thấy đối với tính trạng chống chịu khô hạn thường thay đổi từ 1 đến 4 đối với một tính trạng thuộc thành phần trong sự kiện chống chịu hạn, và những QTL này thường trải rộng trên toàn bộ genome với nhiều nhóm liên kết gen. Thí dụ, tính trạng WUE (hiệu quả sử dụng nước) được tìm thấy với rất ít QTL, từ 4 đến 5 trong genome cây đậu nành (Milan và ctv 1998).

Trong một vài trường hợp, có những QTL định vị trên cùng một nhóm liên kết gen, điều khiển nhiều tính trạng quan trọng như khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu (OA), khả năng chống chịu sự thủy phân, chúng liên kết với tính trạng hình thái học của rễ lúa (Lilley và ctv. 1996). Biến thiên kiểu hình đối với từng tính trạng xét trên mỗi vị trí QTL xoay quanh giá trị 10%. Trong trường hợp ngoại lệ, QTL đối với tính trạng chiều dài rễ ở giai đoạn 28 ngày tuổi biến thiên 30% (Price và Tomas 1997).

Mối quan hệ giữa năng suất và QTL thường cho kết quả âm tính trong vài trường hợp, nhưng đối với tính trạng ASI, kết quả chống chịu hạn không đối kháng với năng suất (Ribaut và ctv. 1996). Những QTL đối với tính trạng ASI có tính ổn định nhiều năm, trong điều kiện mức độ stress khác nhau, sẽ được xem như là những ứng cử viên trong chiến lược áp dụng MAS.

Bảng 1: Các loci tính trạng số lượng (QTL) liên quan đến tính chống chịu khô hạn của một số loài cây trồng (Reddy và ctv. 1999)

Tính trạng	Cây trồng	Quần thể lập bản đồ QTL	Tác giả
Đặc tính của rễ 1. Hình thái 2. Phân bố rễ	Lúa Lúa	203 RILs của cặp lai Co39 x Moroberekan quần thể DH: 105 dòng	Champoux và ctv. (1995) Yadav và ctv (1997)
Đặc tính của lá và chồi 1. Lá và sự dẫn truyền qua khí khổng 2. Cường lực mạ	Lúa Lúa	178 dòng F ₂ s 118 dòng F ₂ s và bố mẹ là japonica	Price và Tomas (1997) Redona và Mackill (1996)

Đặc tính sinh lý 1.Hàm lượng nước và khả năng điều tiết nguyên sinh chất 2.Đặc điểm tung phấn, phun râu 3.Mức thiệt hại trước khi trổ 4.Mức thiệt hại sau khi trổ 5.Sự tích tụ ABA	Lúa mạch Bắp Cao lương Cao lương Bắp	187 dòng RILs 272 dòng F ₂ s 98 dòng RILs 98 dòng RILs 81 dòng F ₂ s	Teulat và ctv. (1997, 1998) Ribaut và ctv.(1996) Tuinstra và ctv. (1996) Tuinstra và ctv. (1998) Quarrie và ctv (1997)
Hiệu quả sử dụng nước (WUE) 1.WUE 2.WUE, ¹³ C phân biệt nhóm	Lúa mì Cà chua	150 dòng DH F ₃ s và các tổ hợp BC ₁ F ₁ , 11 tổ hợp có WUE cao và 8 thấp	Quarrie và ctv.(1995) Martine và ctv.(1989)
Năng suất, thành phần NS, tương tác GxE			
1.Năng suất & thành phần NS 2.Tương tác GxE	Bắp Bắp	150 dòng F ₂ :F ₃ 272 dòng F ₂ s	Weldboom và Lee (1994) Ribaut và ctv.(1997)
Phối hợp các tính trạng có giá trị kinh tế			
1.Ưu thế lai 2.Hiệu quả sử dụng N	Bắp Bắp	264 tổ hợp hồi giao 100 dòng RILs	Stuber (1997) Bertin và ctv.(1997)

3-2. NHỮNG MARKER PHÂN TỬ DNA & BẢN ĐỒ QTL

Những marker phân tử DNA được định nghĩa như những cột mốc trên đường thẳng, chúng được xem xét ở mức độ phân tử DNA, hoặc nhiễm sắc thể, mà những khác nhau về di truyền có thể được tìm thấy nhờ nhiều công cụ xét nghiệm có tính chất phân tử (Li 1999). Những loại marker phân tử chính thường được sử dụng là:

- RFLP là marker có tính chất đồng trội (co-dominant) và rất đáng tin cậy. Kỹ thuật này sử dụng cDNA hoặc thể probe, được đánh dấu bằng phóng xạ, và sự phân cắt hạn chế của enzyme
- RAPD là một dạng marker DNA được sản sinh nhờ kỹ thuật PCR. Mức độ khuếch đại cao từ một cặp môi đơn giản, ngắn, được thiết kế ngẫu nhiên (10 mer). Đây là marker có tính trội (dominant) và mức độ tin cậy thấp
- STS là marker được thiết kế từ chuỗi ký tự của RFLP (20-24 mer), có tính chất đồng trội, được sản sinh nhờ kỹ thuật PCR, đôi khi nó cũng thể hiện tính trội. Đây là phương pháp có thể phải sử dụng enzyme phân cắt trong trường hợp sự đa hình không thể hiện rõ. Kết quả có độ tin cậy tốt.
- Microsatellite hoặc SSR là marker được thiết kế từ những vệ tinh có chuỗi ký tự ngắn đơn, lặp lại nhiều lần. Cặp môi được thiết kế từ trước và sau những vệ tinh như vậy. marker có tính chất đồng trội, mức độ tin cậy cao, khả năng dò tìm đa hình khá nhạy. Do đó, nó đã nhanh chóng thay thế RFLP và RAPD với các mô típ “di-nucleotide” hoặc “tri-nucleotide” (GA, GT, CAT, CTT) trong genome cây lúa
- AFLP là một dạng trong những marker dựa trên cơ sở PCR, theo cách chọn lọc của hai “adaptor” (là những enzyme phân cắt hạn chế). Nó phối hợp cả hai tính chất của

RFLP và RAPD, nên có khả năng phát hiện đa hình rất tốt. Nhưng nó thường có tính chất trội (dominant) nên gặp hạn chế khi thể hiện alen lặn

Những marker phân tử nói trên đều có thể được áp dụng trong bản đồ QTL để nghiên cứu tính chống chịu khô hạn của genome cây lúa. Hướng ưu tiên hiện nay được người ta quan tâm là sử dụng microsatellite (SSR).

Mục tiêu cơ bản của bản đồ QTL là tìm hiểu cơ sở di truyền của những tính trạng số lượng bằng cách xác định số lượng, các vị trí, những ảnh hưởng của gen, và hoạt động của những loci bao gồm tương tác gen (epistasis) và tương tác QTL x E (môi trường). Một mục đích khác của bản đồ QTL là xác định những marker mang tính chẩn đoán đối với những kiểu hình đặc thù nào đó, sao cho việc áp dụng MAS trở nên có hiệu quả, phục vụ yêu cầu chọn dòng (giống) chống chịu khô hạn, chống chịu mặn, v.v.. Mục tiêu lâu dài của thí nghiệm về bản đồ QTL là “cloning” các gen điều khiển tính trạng số lượng vô cùng phức tạp, thông qua tiếp cận kỹ thuật “map-based cloning” (Li 1999).

Nguyên tắc lập bản đồ QTL với marker phân tử DNA là phát hiện cho được những kết hợp giữa marker và tính trạng trên cơ sở liên kết gen, thông qua các phương pháp bố trí thí nghiệm và phương pháp phân tích thống kê chính xác.

Quần thể phục vụ cho những yêu cầu như vậy thường là: F_2 , hồi giao (BC), đơn bội kép (DH), hoặc cận giao tái tổ hợp (RIL) từ một tổ hợp lai giữa hai dòng cận giao, phân ly những tính trạng số lượng mục tiêu và nhiều marker đi kèm theo. Quần thể này phải được đánh giá kiểu hình rất đầy đủ, và được đánh giá kiểu gen thông qua bản đồ liên kết gen với mật độ marker phủ trên nhiễm thể dày đặc.

Các phương pháp phân tích thống kê phải đáp ứng yêu cầu chính xác, đáng tin cậy, thông quan phân tích từng marker đơn, phân tích bản đồ cách quãng, và mô hình tuyến tính. Cho đến nay, người ta biết rằng QTL ảnh hưởng nhiều tính trạng nông học quan trọng. Những QTL này đóng vai trò ảnh hưởng chính (tính cộng và/hoặc tính trội), chúng được tìm thấy thông qua mô hình “main-effect QTL” được mô tả bởi Lander và Botstein (1989), Zeng (1994), Li (1999).

Mô hình “main-effect QTL” có những đặc điểm cơ bản như sau:

- Những gen chủ lực phải có ảnh hưởng đến tính trạng di truyền cao, chúng được xem như những QTL có ảnh hưởng lớn (giá trị LOD score phải lớn) và có tính chất xác định rõ ràng thông qua quần thể và môi trường
- Những QTL mẫu phải có ảnh hưởng chính khá nhỏ và đại diện cho hơn 80% loci được nhận dạng trong genome cây trồng
- Những thí nghiệm MAS đối với nội dung chuyển các QTL mong muốn để cải tiến tính trạng số lượng phải được thực hiện với sự thận trọng nhất định. Bởi vì tương tác giữa QTL với môi trường, hiện tượng epistasis cần phải được giải thích

Hiện tượng epistasis và sự kiểm soát biến dị di truyền đã được đề cập trong các mô hình cải tiến. Bên cạnh đó tương tác QTL x E cũng được thảo luận.

3-3. BẢN ĐỒ QTL ĐỐI VỚI TÍNH TRẠNG RỄ LÚA

Hệ thống rễ phát triển tốt là một tính trạng vô cùng quan trọng giúp cây trồng chống chịu khô hạn (cơ chế thoát hạn = drought avoidance mechanism). Người ta đã sử dụng quần thể đơn bội kép (DH) của cặp lai IR64 x Azucena tại Viện Lúa Quốc Tế (IRRI). Sau đó Shen và ctv. (1999) đã phát triển quần thể gần như đẳng gen (NIL) của IR64 được du nhập với những QTL chủ lực. Các tác giả đã ghi nhận bốn đoạn trên nhiễm sắc thể số 1, 2, 7, và 9 là nơi định vị các QTL chủ lực trong phân tích chọn lọc từng QTL mục tiêu (hình 3-1, Bảng 2). Có 4 dòng DH với hiện tượng tổ hợp alen riêng rẽ tại 4 đoạn nhiễm sắc thể này, trong đó có ít

hơn 50% alen của Azucena. Bốn dòng này đã được chọn làm “donor” (vật liệu cho gen chống chịu). Những dòng như vậy được lai với IR64 cho đến khi thu hoạch quần thể BC₃F₁, rồi sau đó cho chúng tự thụ bình thường. Áp dụng MAS đối với 4 đoạn nhiễm sắc thể như vậy để hoàn thiện qui trình chọn lọc từ BC₁F₁ đến BC₃F₂. Tất cả con lai của BC₃F₂ mang những alen của donor, định vị tại ít nhất một trong bốn khu vực mục tiêu. Những cây mang hai đoạn mục tiêu trở lên đã được xác định. Biến thiên kiểu hình đối với nhiều tính trạng không phải là mục tiêu cũng được quan sát ở BC₃F₂, người ta kết luận rằng có sự thể hiện về di truyền từ thế hệ trước sang thế hệ sau trong quá trình du nhập gen (introgression) (Shen và ctv. 1999). Điều tra cơ bản phần còn lại của genome cho thấy những cây của BC₃F₂ có một phần rất nhỏ của những alen thuộc Azucena định vị trên những vùng không phải mục tiêu, gần với giá trị lý thuyết # 3%. Người ta thực hiện nhiều cặp lai giữa các cây BC₃F₂ mang những đoạn mục tiêu của vật liệu cho gen điều khiển rễ lúa phát triển tốt, để loại trừ ảnh hưởng di truyền theo kiểu “genetic drag” và ảnh hưởng các QTL mục tiêu khác nhau chồng lấp theo hình tháp (Shen và ctv. 1999)

Bảng 2: Các dòng đơn bội kép (DH) được chọn lọc để thực hiện hồi giao (Shen và ctv. 1999)

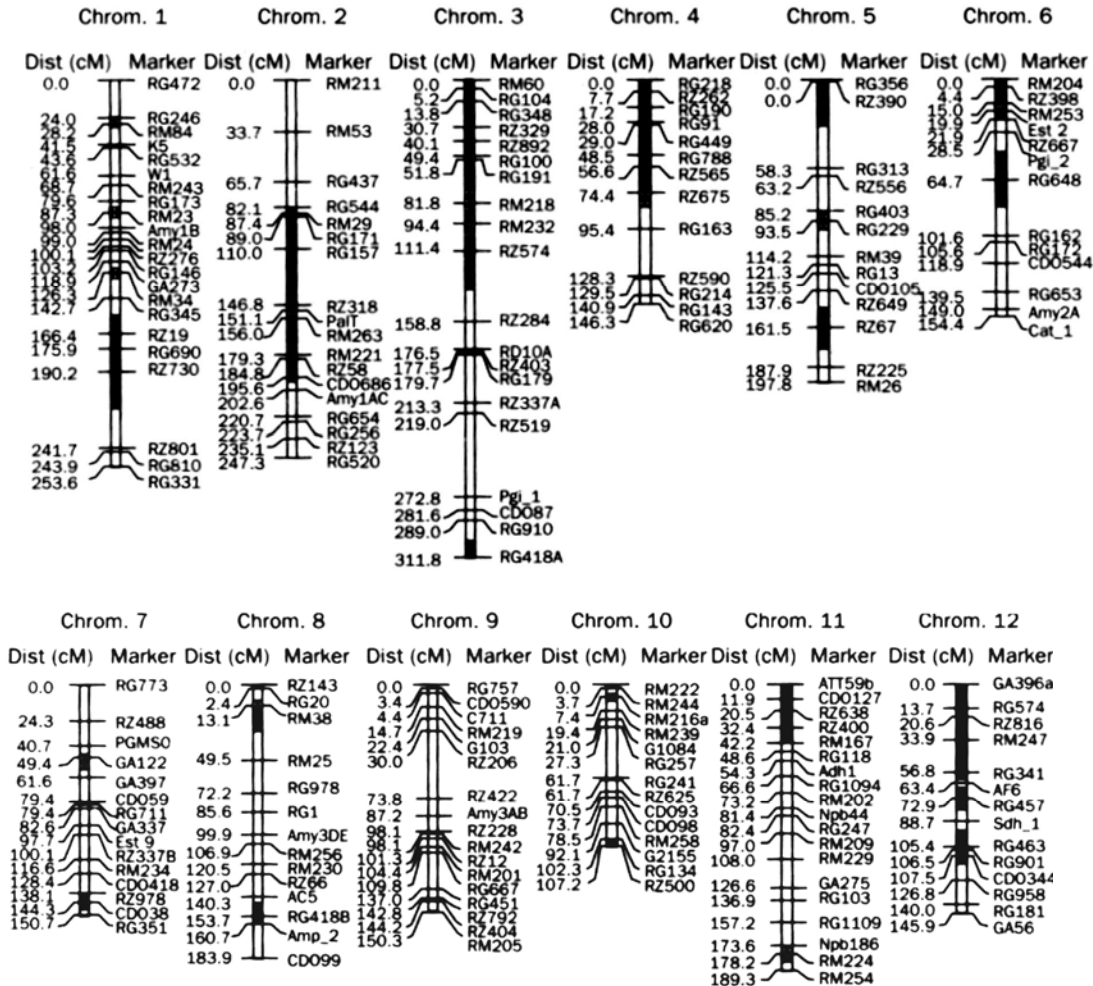
Dòng DH	Mục tiêu ban đầu			Mục tiêu lần hai		
	Tần suất alen của Azucena trong vùng không phải mục tiêu	Nhiễm thể	Marker	Độ dài của quãng (cM)	Nhiễm thể	Marker
P0055	33,8	1	RZ19-RG690-RZ730	61,4	2	RM29-CDO686
P0035	38,9	2	RG437-RG171-RG157-RZ318	99,2	1	Không
P0295	44,9	7	RM234-CDO418-RZ978-CDO38-RG351-RM248	42,4	2	W1-RG331
P0475	37,0	9	RZ228-RM242-RZ12-RM201-RG667	30,8	7	Est9-RG351

Bảng 3: Những QTL đối với hình thái của rễ lúa (Shen và ctv. 1999)

Tính trạng	Nhiễm thể	Quãng (interval)	Khoảng cách marker-QTL	Vị trí QTL	LOD score	R ²	Ảnh hưởng cộng
THK	1	RM34-RG345	0.0	126.3	4.7	21.4	-0.042
TRW	1	RG690-RZ730	12.0	187.9	4.6	21.1	-0.125
TRW	1	RZ730-RZ801	12.0	202.2	5.1	35.2	-0.158
DR/S	1	RG690-RZ730	14.0	189.9	3.1	13.3	-0.003
DRW	1	RG690-RZ730	10.0	185.9	4.7	23.0	-0.035
DR/T	1	RZ730-RZ801	0.0	190.2	5.6	22.9	-3.758
MRL	2	RG171-RG157	14.0	103.0	6.3	33.4	-6.160
MRL	2	RZ318-Pa11	0.0	146.8	3.4	14.8	+4.565
MRL	7	CD0418-RZ978	0.0	128.4	7.4	28.8	-5.078
DR/S	7	CD0418-RZ978	0.0	128.4	8.1	31.2	-0.005
DR/S	7	RZ978-CD038	2.0	140.1	5.5	23.0	-0.004
DRW	7	RG773-RZ488	8.0	8.0	3.4	21.5	-0.035
DRW	7	CD0418-Z978	0.0	128.4	7.0	27.7	-0.039

DRW	7	RZ978-CD038	4.0	142.1	5.3	23.4	-0.036
DR/T	7	CD0418-RZ978	0.0	128.4	5.7	24.4	-3.713
MRL	9	RZ12-RM201	0.0	101.3	4.2	16.8	-3.561
TRW	9	RZ206-RZ422	4.0	34.0	3.6	18.4	-0.112

DWR: trọng lượng rễ lúa dài <30cm, DR/S: trọng lượng rễ dài / thân chồi, DR/T: trọng lượng rễ dài / số chồi, MRL: chiều dài rễ tối đa, THK: độ dày của rễ, TRW: trọng lượng rễ tổng số. Khoảng cách marker-QTL: khoảng cách tính bằng cM từ marker bên trái của quãng. Vị trí QTL: khoảng cách tính bằng cM từ đỉnh của nhiễm sắc thể. R²: phần trăm biến thiên kiểu hình đóng góp bởi QTL giả định. Giá trị âm của ảnh hưởng cộng (additive effect) biểu thị ảnh hưởng dương tính của kiểu hình từ các alen của Azucena.



Hình 3-1: Bản đồ di truyền QTL trên cơ sở quần thể đơn bội kép (DH) của IR64 / Azucena về tính trạng rễ lúa mọc sâu (Shen và ctv. 1999)

3-4. BẢN ĐỒ QTL ĐỐI VỚI TÍNH TRẠNG ĐIỀU TIẾT ÁP SUẤT THÂM THẤU (OA)

Thành tựu của công nghệ sinh học trong việc thực hiện xây dựng bản đồ di truyền phân tử cho phép chúng ta xem xét những tính trạng di truyền phức tạp như tính chống chịu khô hạn và năng suất (Zhang và ctv. 1999). Tại Đại học Texas Tech, nhóm tác giả này đã thực hiện bản đồ di truyền QTL đối với 2 tính trạng quan trọng liên quan đến sự kiện chống chịu khô hạn, đó là: khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu (OA), và những tính trạng hình thái của rễ lúa.

Hiện nay, người ta biết rằng: nghiên cứu sinh lý học đã tìm ra 3 hợp phần chính đóng góp vào sự kiện chống chịu khô hạn của cây lúa: (1) khả năng ăn sâu của rễ xuống tầng đất phía dưới, (2) khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu (cơ chế chống chịu), giúp cây bảo vệ sinh mô không bị tổn hại do mất nước (3) khả năng kiểm soát sự mất nước ở bên ngoài khí khổng của lá (Nguyễn và ctv. 1997)

Hiện tượng điều tiết áp suất thẩm thấu (OA) là một hợp phần quan trọng trong sự kiện chống chịu khô hạn. Khả năng OA của cây giúp nó tích lũy chất hoà tan một cách chủ động trong tế bào, khi cây bị khô hạn. Tính trạng OA kết hợp với tính trạng năng suất ổn định trong điều kiện bị stress do khô hạn đã được quan sát ở lúa mì và cao lương, nhưng hiện tượng này không được ghi nhận trên cây lúa (Zhang và ctv. 1999).

Quần thể lúa đã được sử dụng trước đây để lập bản đồ QTL tính trạng OA là:

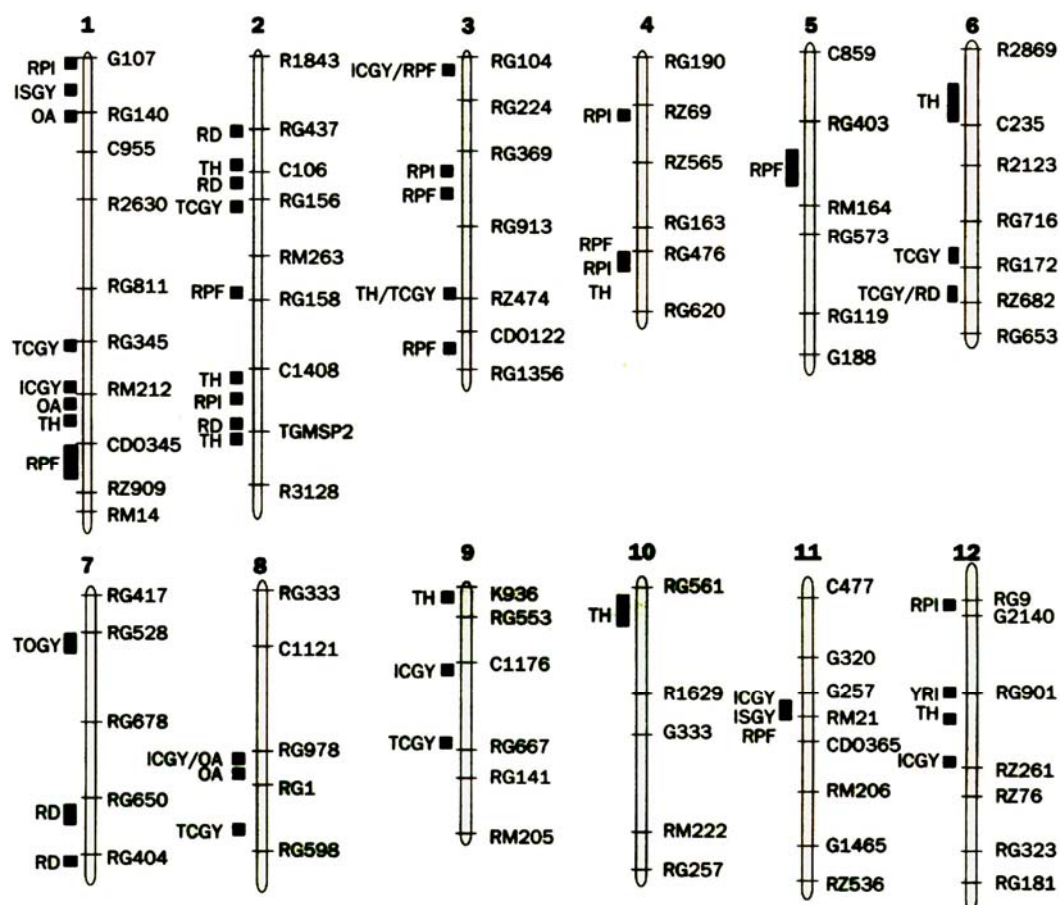
- Quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) của tổ hợp lai CO39 / Moroberekan, với 1 QTL (Lilley và ctv. 1996)
- Quần thể đơn bội kép (DH) của tổ hợp lai CT9993 / IR62266, với 4 QTL (Zhang và ctv. 1999)

Quần thể lúa đã được sử dụng để lập bản đồ QTL tính trạng chống chịu sự thủy phân (viết tắt DT từ chữ dehydration tolerance) là:

- Quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) của tổ hợp lai CO39 / Moroberekan, với 5 QTL (Lilley và ctv. (1996)

Quần thể lúa đã được sử dụng để lập bản đồ QTL tính trạng tích lũy ABA là:

- Quần thể F2 của tổ hợp lai IR20 / 63-83, với 10 QTL (Quarrie và ctv. 1997)



Hình 3-2: Bản đồ QTL trên cơ sở quần thể DH của tổ hợp lai CT9993-5-10-1-M / IR62266-42-6-2. ICGY: năng suất tại Israel, điều kiện bình thường. ISGY: năng suất tại Israel, điều kiện khô hạn. OA: điều tiết áp suất thẩm thấu. RD: độ sâu của rễ. RPF: lực nhỏ rễ. RPI: chỉ số rễ phát triển chiều sâu. YRI: chỉ số năng suất, TCGY : năng suất tại Thái Lan. TH: độ dày của rễ (Zhang và ctv. 1999)

Một yếu tố vô cùng quan trọng làm hạn chế việc thực hiện bản đồ QTL của tính trạng OA là thiếu những qui trình đánh giá kiểu hình nhanh, với một số lượng lớn các vật liệu thí nghiệm.

Gần đây, có 3 qui trình thường được sử dụng để xác định OA so sánh với phương pháp tái tạo hiện tượng hấp thụ nước đã được đề xuất trong trường hợp cây lúa (Babu và ctv 1999).

Quần thể đơn bội kép (DH) của tổ hợp lai CT9993 / IR62266, với 154 dòng con lai được chọn. Nhóm tác giả đã sử dụng 145 RFLP, 153 AFLP và 17 microsatellite để thiết lập bản đồ QTL. Tổng số là 315 marker.

Đánh giá kiểu gen còn được thực hiện trên quần thể RIL của tổ hợp lai IR58821-23-B-2-1 / IR52561-UBN-1-12, với 166 dòng con lai được chọn. Tổng số 383 AFLP và 106 RFLP đã được sử dụng để thiết lập bản đồ QTL (Zhang và ctv. 1999).

Một QTL đã được xác định trên nhiễm sắc thể số 8, định vị giữa 2 marker RG1 và RG978 (hình 3-2), với tần suất biến thiên kiểu hình 32-34%. QTL này nằm trong vùng đồng dạng với nhiễm sắc thể số 7 của lúa mì

3-5. BẢN ĐỒ QTL TÍNH TRẠNG BIỂU HIỆN MÀU XANH CỦA CAO LƯƠNG

Trong cây cao lương, khô hạn xảy ra trước và sau khi trở bông gây ra hiện tượng chín sớm trong tính trạng mức độ hóa già của lá (senescence). Cây mất màu xanh nhanh chóng, đổ ngã, và thất thu năng suất. Hơn 80% cao lương ưu thế lai được trồng tại Mỹ dưới điều kiện không có nước tưới, nhưng hầu hết các giống này đều có khả năng kháng hạn ở giai đoạn trước khi trở bông, hiện tượng như vậy được gọi với thuật ngữ là “stay-green trait” (tạm dịch là tính trạng biểu hiện màu xanh, tính trạng kéo dài thời gian hóa già, viết tắt là SGT). Tính trạng như vậy là một cơ chế kháng hạn giúp cho cây cao lương chống lại sự lão hóa sớm dưới điều kiện khắc nghiệt của âm độ đất hạn chế trong suốt quá trình sau khi trở. Subudhi và ctv. (1999) đã xác định 4 QTL đối với tính trạng SGT này, trong quần thể cận giao tái tổ hợp của tổ hợp lai B35 / Tx7000, với 98 dòng được chọn ở F₇. Ba QTL chủ lực của tính trạng SGT được xác định trên những thí nghiệm ngoài đồng, đóng góp 46% biến thiên kiểu hình. Bốn QTL của tính trạng SGT định vị trên 3 nhóm liên kết gen. Ba QTL: *Sgt 1*, *Sgt 2*, và *Sgt 3* đóng góp vào tần suất biến thiên kiểu hình là 20%, 30% và 16%, theo thứ tự. QTL thứ tư là *Sgt 4* được xác định trong năm 1994, giải thích 13% sự biến thiên kiểu hình. Đối với tất cả QTL này, những alen SGT đều do giống mẹ B35 cung cấp. Các tác giả dự định sẽ thiết lập bản đồ vật lý các nơi định vị của những QTL như vậy để có những hiểu biết rõ ràng hơn về di truyền tính chống chịu hạn của cao lương. Hiện kết quả nghiên cứu đã áp dụng MAS để xác định sự du nhập các gen *Sgt* vào các dòng con lai có triển vọng (Subudhi và ctv. 1999).

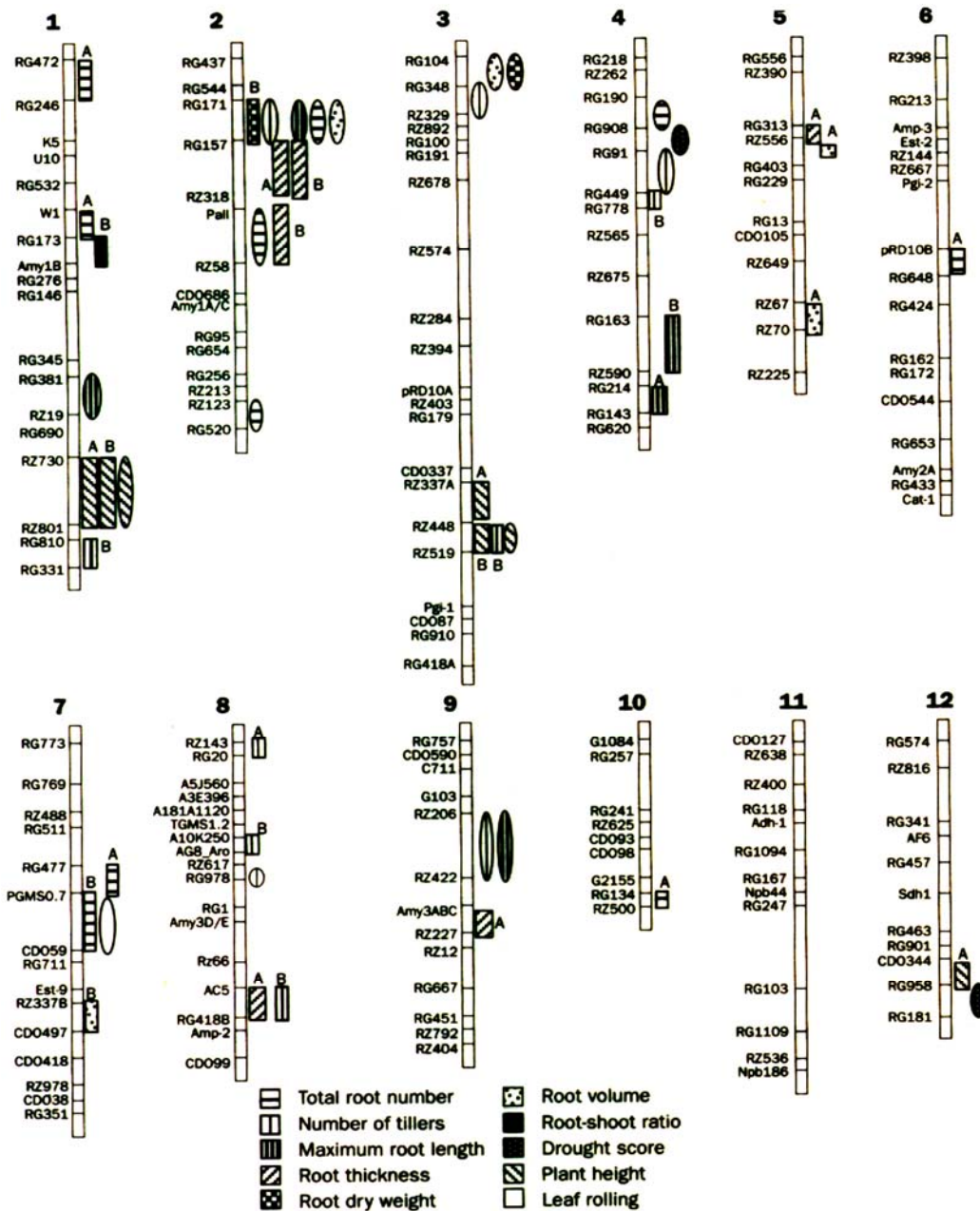
Một cặp lai khác B35 / Tx430 cũng được thành lập quần thể RIL, với 96 dòng được chọn. Bảy QTL của tính trạng SGT được xác định, trong đó có 3 QTL chủ lực *Sgt A*, *Sgt D* và *Sgt G*. Những QTL này định vị trên 3 nhóm liên kết gen, đóng góp 42% biến thiên kiểu hình. Bốn QTL thứ yếu (*Sgt B*, *Sgt I-1*, *Sgt I-2*, *Sgt J*) đóng góp 25% biến thiên kiểu hình của tính trạng SGT (Subudhi và ctv. 1999).

3-6. BẢN ĐỒ QTL CÁC TÍNH TRẠNG HÌNH THÁI QUAN TRỌNG

Các tính trạng số lượng của cây lúa giai đoạn mạ: tổng số rễ, thể tích rễ, số chồi, tỉ lệ rễ / chồi, chiều dài rễ tối đa, điểm chống chịu khô hạn (1-5), bề dày của rễ, chiều cao cây mạ, trọng lượng rễ khô, độ cuộn lại của lá lúa, đã được thiết lập bản đồ QTL (Shashidhar và ctv. 1999). Người ta sử dụng quần thể đơn bội kép từ cặp lai IR64 / Azucena, với 56 dòng được chọn. Tổng số RFLP marker biểu hiện đa hình trong điều tra ở bố mẹ, được sử dụng là 175 marker, bao phủ 2.005 cM, với khoảng cách trung bình là 11,5 cM giữa hai marker.

QTL đối với tính trạng chiều cao cây định vị giữa marker RZ730-RZ801 trên nhiễm sắc thể số 1. Vị trí này tương ứng với gen *sd-1* điều khiển tính trạng nửa lùn (semidwarf).

Hình 3-3, và bảng 4 cho thấy: 15 QTL khác được tìm thấy ở cả hai giai đoạn phát triển, trong đó có 4 QTL thể hiện khá phổ biến



Bảng 4: Những QTL giả định trong 2 giai đoạn tăng trưởng của cây lúa: 65 ngày sau khi gieo (DAS) có nước tưới bình thường, và 85 DAS dưới điều kiện bị khô hạn từ ngày 65 trở đi (Shashidhar và ctv. 1999).

Tình trạng	Ngày lấy mẫu	Marker	QTL	Nhiễm thể	Phương sai	Ảnh hưởng cộng	LOD
------------	--------------	--------	-----	-----------	------------	----------------	-----

Cao cây (cm) Số chồi	65DAS	RZ730-RZ801	<i>Sdl</i>	1	22.1	4.32	2.53
		RZ448-RZ337A	qPHT3-1	3	27.0	4.74	3.03
	85DAS	RZ730-RZ801	<i>Sdl</i>	1	29.2	4.96	3.63
		RZ519-RZ448	qPH3-2	3	27.0	4.66	3.42
		RG958-CD0344	qPHT12-1	12	16.9	3.75	2.04
	85DAS ^c	RZ730-RZ801	<i>Sdl</i>	1	24.9	5.19	2.79
		RZ519-RZ448	qPHT3-2	3	16.1	4.04	1.92
Số chồi	65DAS	RZ-143-RG20	qNOT8-1	8	15.3	0.62	1.94
	85DAS	RG810-RG331	qNOT1-1	1	15.8	-0.96	2.10
		RZ448-RZ519	qNOT3-2	3	15.8	-0.97	1.95
		RG449-RG788	qNOT4-2	4	19.8	-1.15	2.51
		A10K250-AG8Aro	qNOT-8-1	8	21.3	1.16	2.80
		AC5-RG4188	qNOT8-4	8	14.3	-0.99	1.73
	85DAS	RG171-RG157	qNOT2-1	2	15.5	-0.99	1.63
		RZ329-RG348	qNOT3-1	3	14.6	-0.82	1.81
		RG91-RG449	qNOT4-1	4	12.4	-0.77	1.61
		RZ617-RG978	qNOT8-3	8	25.7	1.07	3.54
Chiều dài rễ (cm)	65 DAS	RG214-RG143	qRTL4-2	4	12.7	-1.74	1.65
	85DAS	RG163-RZ590	qRTL4-1	4	16.0	-3.04	2.07
	85DAS	RG381-RZ19	qRTL1-1	1	13.7	3.25	1.64
		RG171-RG157	qRTL2-1	2	15.4	-4.01	1.62
Tổng số rễ	65 DAS	RG472-RG246	qTRN1-1	1	14.1	-6.88	1.81
		W1-RG173	qTRN1-2	1	24.5	-10.93	3.00
		RG477-PGMS0.7	qTRN7-1	7	15.7	-7.25	2.06
		RG134-RZ500	qTRN10-1	10	13.4	-6.79	1.75
	85DAS	PGMS0.7-CD059	qTRN7-1	7	15.3	-9.88	1.58
	85DAS	RG171-RG157	qTRN2-1	2	17.4	-9.96	1.80
		<i>Pai1</i> -RZ58	qTRN2-2	2	25.1	-11.02	2.69
		RZ123-RG520	qTRN2-3	2	17.7	-8.15	2.26
Thể tích rễ (cm ³)	65 DAS	RG403-RZ556	qRTV5-1	5	13.5	-1.51	1.60
		RZ67-RZ70	qRTV5-3	5	15.1	-1.70	1.82
	85DAS	RZ337B-CD0497	qRTV7-1	7	14.3	-2.01	1.74
	85DAS	RG171-RG157	qRTV2-1	2	15.6	-2.07	1.74
		RG104-RG348	qRTV3-1	3	21.4	-1.99	2.89
Độ dày của rễ	65 DAS	RG157-RZ318	QRRT2-1	2	26.7	0.05	3.21
		RG313-RZ556	QRRT5-1	5	19.1	0.04	2.41
		AC5-RG418B	QRRT8-1	8	21.6	0.04	2.94
	85DAS	RG157-RZ318	QRRT2-2	2	16.7	0.05	1.66
		<i>Pal1</i> -RZ58	QRRT2-3	2	12.4	0.04	1.59
TL khô của rễ (g)	85DAS	RG171-RG157	qRTW2-1	2	13.3	-0.42	1.58
	85DAS	RG348-RG104	qRTW3-1	3	20.8	-0.38	2.80
Tỉ lệ rễ/chồi	85 DAS	RG173- <i>Amy1B</i>	qRS1-1	1	12.7	-0.31	1.63
Điểm chống chịu hạn (1-5)	85DAS	RG908-RG91	qDRS4-1	4	14.4	-0.27	1.80
		RG181-RG958	qDRS12-1	12	16.1	0.27	2.03
Độ cuộn lại của lá (1-5)	85DAS	PGM0.7-CD059	qLFR7-1	7	11.9	0.36	1.55

Các tác giả còn ghi nhận 21 QTL đối với những tính trạng khác trong điều kiện bị stress do khô hạn. Mặc dù có 2 QTL đối với tính trạng chiều cao định vị ở nhiễm thể số 1 và 3, khá phổ biến, nhưng không có một loci nào đối với tính trạng hình thái học của rễ được ghi nhận phổ biến giữa hai giai đoạn phát triển. Sự không có mặt của những QTL phổ biến đối với tính trạng hình thái của rễ giữa hai giai đoạn phát triển (65 ngày đầu có nước, và từ ngày 65- đến ngày 85: khô hạn) cho thấy sự hiện diện của những cơ chế di truyền cùng tồn tại song song, cùng khởi động ở các giai đoạn tăng trưởng khác nhau, dưới điều kiện nước tưới khác nhau (Shashidhar và ctv. 1999). Thể tích rễ và tổng số rễ trên một cây giảm có ý nghĩa về mặt thống kê dưới điều kiện bị stress do khô hạn, trong khi đó chiều dài rễ tối đa và chiều cao cây khác biệt không có ý nghĩa.

3-7. CHUYỂN NẠP GEN MỤC TIÊU

Dựa trên cơ chế chống chịu khô hạn của cây trồng, người ta đã cố gắng thiết kế những clone của gen mục tiêu phục vụ cho hoạt động chuyển nạp gen và tạo ra những cây trồng biến đổi gen, chống chịu khô hạn. Bảng 5 cho thấy danh sách các gen mục tiêu và sản phẩm của nó đã được công bố

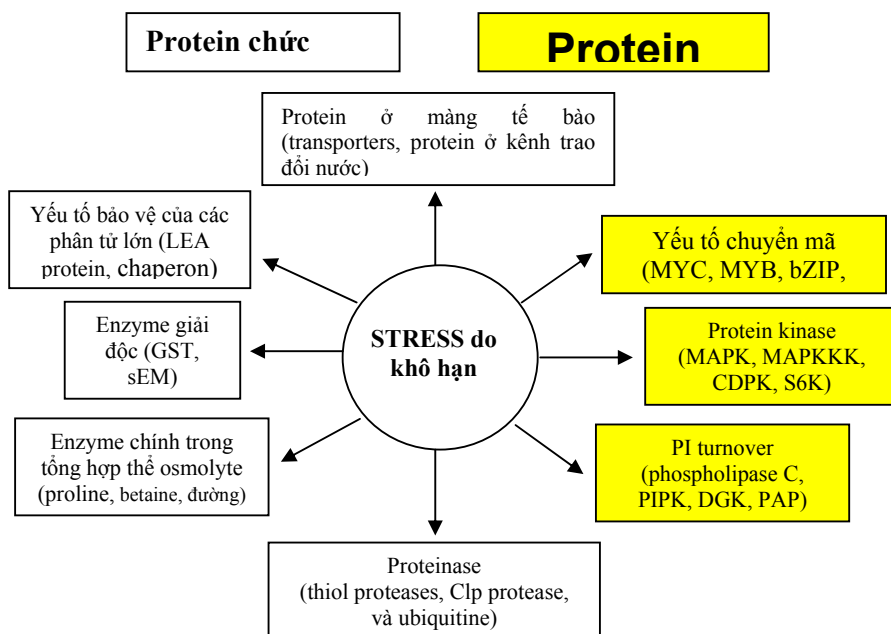
Bảng 5: Sự thể hiện của các gen mục tiêu liên quan đến tính chống chịu hạn, mặn trong cây lúa chuyển gen (Reddy và ctv. 1999)

Gen	Enzyme/protein	Nguồn	Phản ứng chống chịu	Tác giả
<i>HVA1</i>	Nhóm LEA	Lúa mạch (barley)	Khô hạn, mặn	Xu và ctv. 1996
<i>P5CS</i>	Δ' pyrroline-5-carboxylate synthetase	Đậu "mothbean"	Khô hạn, mặn	Zhu và ctv. 1998
<i>Beta</i>	Choline dehydrogenase / betaine aldehyde dehydrogenase	<i>E. coli</i>	Khô hạn, mặn, nhiệt độ	Takabe và ctv. 1998
<i>CodA</i>	Choline oxidase	<i>A. globiformis</i>	Khô hạn, mặn	Murata và ctv. 1998
<i>ADC</i>	Arginine decarboxylase	Kiêu mạch (oat)	Khô hạn	Capell và ctv. 1998

(LEA: late embryogenesis abundant protein)

Gen điều khiển sự điều tiết chất nguyên sinh (OA) liên quan đến chống chịu khô hạn trong cây thuốc lá, cây *Arabidopsis thaliana*, được chuyển nạp gen thành công là

- Nhóm mannitol-1-phosphate dehydrogenase với gen mục tiêu là *mtlD*
- Nhóm proline bao gồm Δ' pyrroline-5-carboxylate synthetase, với gen *P5CS*.
- Nhóm glycine betaine trong vi khuẩn là *CodA* (bacterial choline oxidase) được phân lập từ vi khuẩn *Arthrobacter globiformis*, hoặc từ *Synechococcus* sp.
- Nhóm trehalose từ men làm bánh mì là gen "trehalose-6-phosphate synthetase" (*TPSI*).
- Nhóm trehalose từ vi khuẩn là các gen: *otsA* và *otsB*.
- Nhóm fructans chính là những phân tử polyfructose được phân lập từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*, với gen điều khiển tính chống chịu hạn là *sacB*
- Nhóm D-ononitol thể hiện gen mã hóa từ cDNA của myo-inositol O-methyltransferase (*IMTI*)
- Nhóm polyamine
- Nhóm gen có liên quan đến stress do oxid hóa



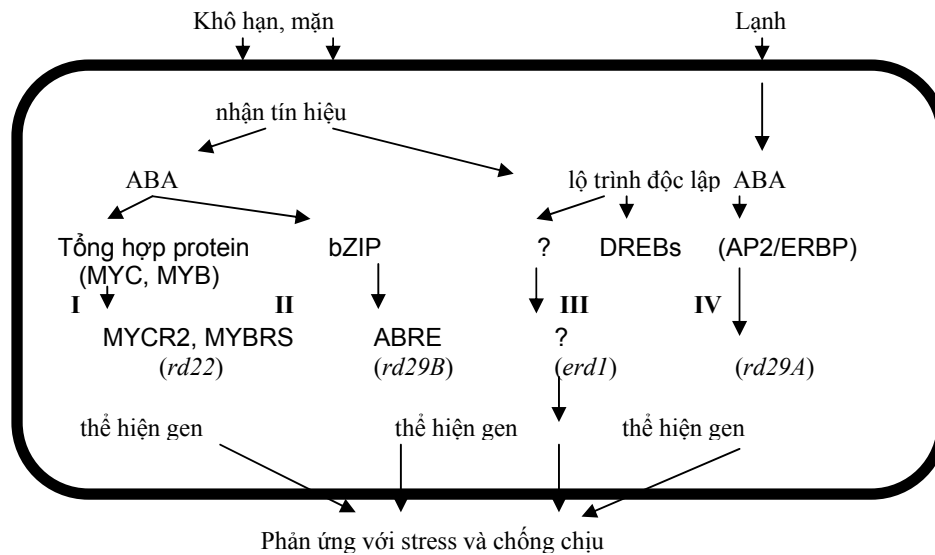
Hình 3-4: Những gen cảm ứng với stress do khô hạn. sản phẩm của gen có thể được chia thành 2 nhóm: protein đóng vai trò chức năng và protein đóng vai trò điều tiết các tín hiệu di truyền và sự thể hiện gen khi cây phản ứng với stress (Yamaguchi-Shinozaki và Shinozaki 1999)

3-8. CƠ CHẾ TRUYỀN TÍN HIỆU

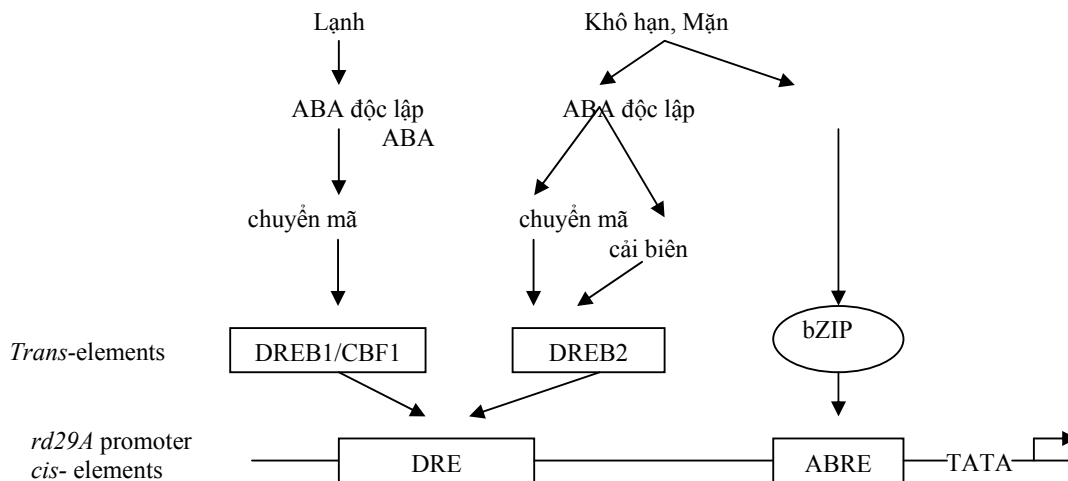
Có ít nhất 4 lộ trình truyền tín hiệu, khi cây trồng bị stress do khô hạn, mặn và lạnh (hình 3-5). Đó là 2 lộ trình có tính chất độc lập ABA, ký hiệu III, IV và 2 lộ trình ABA có tính chất lệ thuộc, ký hiệu I, II. Sự tổng hợp protein vô cùng cần thiết trong trường hợp lộ trình ABA có tính chất lệ thuộc (I). Sản phẩm ABRE cũng được ghi nhận trong lộ trình ABA có tính chất lệ thuộc (II).

DRE là sản phẩm có trong lộ trình ABA độc lập do hiện tượng điều tiết của gen, không những xảy ra trong trường hợp khô hạn mà còn xảy ra trong trường hợp mặn và lạnh (IV) (hình 3-5)

Một lộ trình ABA độc lập chỉ kiểm soát tính chống chịu hạn và mặn, mà không kiểm soát tính chống chịu lạnh, ký hiệu III (hình 3-5).



Hình 3-5: Lộ trình truyền tín hiệu và sự thể hiện gen (Yamaguchi-Shinozaki và Shinozaki 1999)



Hình 3-6: Mô hình cảm ứng của gen *rd29A* và hoạt động của các nhân tố hoạt động có tính chất *cis* và *trans* trong hiện tượng thể hiện gen chống chịu với stress (Yamaguchi-Shinozaki và Shinozaki 1999)

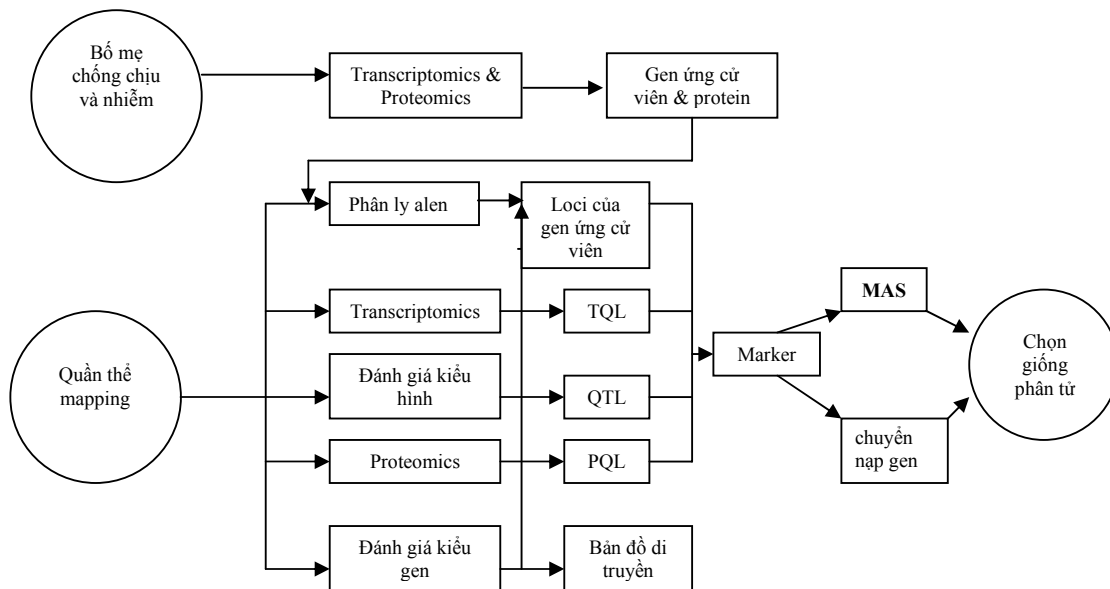
Trong hình 3-6, hai nhân tố hoạt động theo kiểu *cis* là DRE trong hệ thống ABA độc lập và ABRE trong hệ thống ABA lệ thuộc, tham gia đóng góp vào hiện tượng cảm ứng gen *rd29A*. Có hai loại “binding protein” khác nhau là DREB1 và DREB2 tham gia vào 2 lộ trình truyền tín hiệu khác nhau, một đáp ứng với stress do lạnh, một đáp ứng với stress do khô hạn. DREB1/CBF1 được điều tiết trong khi chuyển mã, trong khi đó DREB2 được kiểm soát cả hai giai đoạn: trong quá trình sau khi chuyển mã và trong quá trình chuyển mã.

Protein ABRE mã hóa những nhân tố chuyển mã bZIP. Promoter *rd29A* làm giảm thiểu những ảnh hưởng không có lợi cho sự sinh trưởng của cây, trong khi 35ScaMV làm chậm tăng trưởng rất mạnh (Yamaguchi-Shinozaki và Shinozaki 1999).

3-9. GEN & SỰ KHÁM PHÁ LỘ TRÌNH THÔNG QUA GENOME HỌC CHỨC NĂNG

Một trong những mục tiêu chính của genome học về chức năng (functional genomics) là khám phá ra những gen chủ lực và QTL tương ứng với tính trạng nghiên cứu. Sự khám phá các gen mục tiêu hiện được phát triển thông qua kỹ thuật phối hợp đọc trình tự genome, phân tích “microarray”, và proteomics (ngành protein học), trên cơ sở nguồn dữ liệu của sinh tin học (bioinformatics) và di truyền phân tử (Salekdeh và ctv. 2002). Những gen ứng cử viên được gọi với thuật ngữ “short-listed candidate genes” được khám phá và lưu trữ. Chúng được thử nghiệm một cách trực tiếp trên cây chuyển nạp gen về hiệu quả của tính trạng chống chịu khô hạn.

Ngành protein học (proteomics) có thể giúp chúng ta xác định những gen ứng cử viên đã thể hiện rõ chức năng và vị trí trong genome. Hình 3-7 sẽ cung cấp cho chúng ta thông tin về sự đóng góp của ngành học mới là protein học và transcript học (transcriptomics) trong chiến lược MAS và chọn giống cây trồng.



Hình 3-7: Đóng góp của ngành protein học và transcript học vào chiến lược MAS và chọn giống cây trồng (Salekdeh và ctv. 2002). Gen ứng cử viên được so sánh ứng với tính chất proteomic hay transcriptomic của những dòng chống chịu và dòng nhiễm stress do khô hạn. TQL: transcript quantity locus, QTL: quantitative trait locus, PQL: proteomic quantity locus

Phân tích proteomic cung cấp cho chúng ta những nhìn nhận mới, rộng hơn về hiện tượng phản ứng của cây trồng đối với stress ở mức độ protein. Trong những năm gần đây, phương pháp này đã phát triển trong khi tìm hiểu mức độ nhạy cảm của thực vật, và người ta xem nó như công cụ có khả năng rất mạnh trong cải tiến kỹ thuật điện di polyacrylamide hai chiều (2DE). Thuật ngữ 2DE được viết tắt từ chữ “two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis”. Phương pháp proteomic còn là công cụ để phát hiện protein, định lượng protein, kỹ thuật “fingerprinting” (in dấu trong xác định quan hệ huyết thống), kỹ thuật đọc trình tự protein từng phần (partial sequencing) bằng sắc ký (mass spectrometry = MS), kỹ thuật tin sinh học (bioinformatics), và các phương pháp phân lập gen mục tiêu (gene isolation).

Kỹ thuật 2DE cung cấp cho chúng ta những thông tin về những thay đổi trong động thái phát triển của protein, phản ánh những hiện tượng cải biên xảy ra sau khi chuyển mã thí dụ như hiện tượng phosphoryl hóa.

Salekdeh và ctv. (2002) đã áp dụng phương pháp này để nghiên cứu về hiện tượng đáp ứng của cây lúa đối với stress do khô hạn và mặn. Các tác giả đã khám phá trên 2000 protein trong lá lúa bị xử lý khô hạn và lá lúa được tưới nước đầy đủ. Với hơn 1000 protein đã được định lượng một cách đáng tin cậy, có 42 protein đã thể hiện sự thay đổi về mức độ đa dạng và vị trí trong genome. Nhóm tác giả này đã phân lập được nhiều protein trên lá lúa mà mức độ đa dạng của nó đã gia tăng một cách có ý nghĩa trong suốt thời gian bị xử lý khô hạn, và trong thời gian nguồn nước cung cấp giảm dần. Ba thay đổi có ấn tượng nhất là

- (1) hoạt động của “actin depolymerase”,
- (2) một phân tử đồng dạng của “S-like ribonuclease”
- (3) hoạt động của “chloroplastic glutathione-dependent dehydroascorbate reductase”

Những so sánh ở mức độ proteomic giữa giống lúa chống chịu mặn và giống lúa nhiễm mặn cho thấy có sự khác biệt protein trong rễ lúa trong cả hai khái niệm protein cấu trúc (constitutive) và protein cảm ứng (inducible). Một enzyme tổng hợp lignin là caffeoyl-CoA - *O*-methyltransferase là kết quả của sự so sánh khác nhau này giữa hai giống chống chịu và giống nhiễm. Mức độ đa dạng của ascorbate peroxidase thể hiện cao hơn rất nhiều trong giống lúa chống chịu mặn Pokkali so với giống nhiễm IR29, trong điều kiện chưa bị xử lý stress (Salekdeh và ctv. 2002).

Bảng 6: Phân lập protein cây lúa đáp ứng với stress do khô hạn và mặn trên cơ sở phân tích “protein-fingerprinting” (MALDI-TOF MS), hoặc phương pháp đọc trình tự protein từng phần (ESI-Q-TOF MS/MS) (Salekdeh và ctv. 2002).

Spot ^a	TL phân tử (kDa)	Mức độ phủ MALDI-TOF (%) ^b	ESI-Q-TOF		Phân lập	Số mẫu ^d
			Sequence	Mức độ AA (%) ^c		
LD1	46		GITINTATVEYE	100	Kéo dài sự dịch mã <i>EF-Tu precursor</i> , chloroplast	AAF15312
LD2	43	37			RUBISCO activase	P93431
LD3	43	33			RUBISCO activase	P93431
LD4	38	25			Fructose-1,6-biphosphate aldolase, chloroplast	Q40677
LD5	28	57			Triose phosphate isomerase, cytosolic	P48494
LD6	29		YGYPSEDFFVK MCFTFDSENTAVVR		S-like nuclease ^e	-
LD7	27		LALTELQALEEHLK LPEDLTNVHAYTEA	100	GSH-dependent DHA reductase	BAA90672
LD8	21		LFSR DE[L/I]TASLPADG	80	ADF	S30934
RS1	31		VVEVVESPPEIK SGTTPLSPAIAFILEK	100 100	ESTs AU091660	BAA96588
RS2	31	46			Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	BAA81774
RS3			T[L/I]NDT[L/I]		Chưa có kết quả	-
RS4	28	60			Ascorbate peroxidase	P93404
RS5	22	39			ABA- và protein cảm ứng <i>Asr1</i>	AAB96681

^aLDS = protein trong lá lúa, nghiệm thức xử lý khô hạn, RS = protein trong rễ lúa, xử lý mặn

^bPhần trăm amino acid trong protein được phủ bởi cầu nối peptide tương ứng trong phân tích MALDI-TOF

^cPhần trăm amino acid trong chuỗi mã ESI-Q-TOF được tìm thấy ở protein mục tiêu

^dSố mẫu trong NCBI, SWISS-Prot, hoặc PIR

^ePhân lập bằng trình tự tổng BLASTing của cDNA tương ứng

RUBISCO activase: Cây lúa được xem như có hai “isoform” chính về hệ thống RUBISCO activase, có kích thước từ 43 đến 47 kDa. Nhóm tác giả nói trên đã tìm thấy trong lá lúa trên cơ sở kỹ thuật 2DE là: có ít nhất 4 dạng khác nhau của activase với kích thước thay đổi từ 42 đến 43 kDa. Hai trong số activase đó biểu hiện mức độ đa dạng cao hơn trong điều kiện bị xử lý khô hạn, so với điều kiện tưới nước bình thường (bảng 6).

- (1) Nhiệm vụ chính của RUBISCO activase là phóng thích gốc phosphate đường có tính chất ức chế, thí dụ như ribulose-1,5-biphosphate (RuBP) từ những vị trí hoạt động của RUBISCO sao cho nồng độ CO₂ trong lá có thể kích hoạt enzyme thông qua hiện tượng carbamyl hóa. Khô hạn kích thích sự đóng lại của khí khổng tạo ra nồng độ CO₂ cao trong lá, làm suy giảm hoạt động carbamyl hóa, và làm khởi động hiện tượng kết gắn có tính chất “dead-end” của RuBP tại vị trí hoạt động của RUBISCO.
- (2) Nhiệm vụ gia tăng mức độ phong phú của “activase” gia tăng có thể có một chức năng đặc biệt làm cho RUBISCO hoạt động trở lại trong hiện tượng cố định CO₂ thông qua carboxylase, hoặc hiện tượng phân tán năng lượng có tính chất bảo vệ nhờ phản ứng oxygenase trong quang hô hấp
- (3) Nhiệm vụ thứ ba của RUBISCO activase là bảo vệ sinh tổng hợp protein ở lục lạp, khi cây bị stress do khô hạn, hoặc do nhiệt độ

Hầu hết cây trồng đều chỉ có một gen *RUBISCO activase*. Nó được hình thành một cách tích cực, trong đó các intron của phân tử “transcript” đầu tiên thường bị cắt rời thành hai “isoform” của activase, chỉ khác nhau duy nhất gốc carbon cuối cùng. Làm thế nào để 3-4 “isoform” hợp lại với nhau thành một gen đơn ? Người ta hoàn toàn chưa biết rõ quá trình như vậy.

Guenzi và ctv. (2003) tại Đại Học Oklohama đã thành công trong chuyển nạp gen “mannitol-1-phosphate dehydrogenase” (gen *mtlD*) trong cây lúa mì chống chịu khô hạn và mặn. Gen này có tính chất bổ sung bộ gen vốn có trong tự nhiên, nhằm kích hoạt cây trồng chống chịu tốt hơn khô hạn (nguồn truy cập từ <http://www.isaaa.org/kc>). Chúng ta có thể tham khảo từ sách của Abebe và ctv. (2003)

Trong lá cây bị khô hạn và trong rễ cây bị stress do mặn, những kỹ thuật theo dõi sự thay đổi về mức độ đa dạng của protein, thay đổi về vị trí của protein được biết và chưa được biết, là một phương pháp rất đáng chú ý. Những protein là sản phẩm của quá trình quang tổng hợp, sự kéo dài tế bào, quá trình bền dưỡng hợp chất chống oxi hóa (antioxidant) và quá trình lignin hóa đã được quan tâm trong nghiên cứu. Do đó, ngành học mới có thuật ngữ “proteomics” sẽ là công cụ hữu hiệu, giúp cho nhà chọn giống tìm kiếm những kiểu gen thích hợp cho mục tiêu cải tiến tính trạng chống chịu khô hạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abebe T, AC Guenzi, B Martin, JC Cushman. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. April 11, 2003. Issue of Plant Physiology 131:1748-1755
- Babu RC, MS Pathan, A Blum, HT Nguyen. 1999. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. Crop Sci 39:150-158
- Bertin P, A Chacosset, A Gallais. 1997. Physiological and genetic basis of nitrogen use efficiency in maize. In: Tsafstasis A, editor. Genetics, biotechnology and breeding of maize and sorghum. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry. P 59-64
- Botstein D, RL White, M Skolnick, RW Davis. 1989. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Ann J Genet 32:314
- Capell T, C Escobar, H Liu, D Burtin, O Lepri, P Christou. 1998. Overexpression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. Theor Appl Genet 97:246-254

- Champoux MC, G Wang, S Sarkarung, DJ Mackill, JC O'Toole, N Huang, SR McCouch. 1995. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theor Appl Genet* 90:969-981
- Ingram J, D Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 15:963-968
- Li Z. 1999. DNA markers and QTL mapping in rice. In: *Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments*. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 157-172.
- Lilley JM, MM Ludlow, SR McCouch, JC O'Toole. 1996. Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* 47:1427-1436
- Martin B, J Nienhuis, G King, A Shaefer. 1989. Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science* 243:1725-1728
- Milan MAR, DA Aswey, HR Boerma. 1998. An additional QTL for water-use-efficiency in soybean. *Crop Sci.* 38:390-393
- Murata N, H Hayashi, A Sakamoto, Alia. 1998. Genetic enhancement of tolerance to multiple stress by metabolic engineering of biosynthesis of glycine betaine. In: *proceeding of International workshop on breeding and biotechnology for environmental stress in rice*, 26-29 Oct. 1998, Japan.
- Nguyen HT, RC Babu, A Blum. 1997. Breeding for drought tolerance in rice (*Oryza sativa*): physiology and molecular genetic considerations. *Crop Sci* 37:1426-1434
- Price AH, Thomas. 1997. Quantitative trait loci associated with stomatal conductance, leaf rolling and heading date mapped in upland rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol* 137:83-91
- Quarries S, A Steed, A Semikhodski, C Lebreton, C Calestani, DA Clarkson, R Tuberosa, MC Sanguineti, R Melchiorre, JL Prioul. 1995. Identification of quantitative trait loci regulating water-nitrogen-use efficiency in wheat. In: *II STRESSNET Conference*, 21-23 Sept. 1995, Salsomaggiore, Italy. European Commission, Rep FII.3-MOR/OCO2.
- Quarries S, V Lazic-Jancic, M Ivanovic, C Pekic, A Heyl, P Landi, C Lebreton, A Steed. 1997. Molecular marker methods to dissect drought tolerance in maize. In: Tsaftaris A, editor. *Genetics, biotechnology and breeding of maize and sorghum*. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry. P. 52-58
- Reddy AR, V Ramanathan, N Seetharama, S Bajaj, R Wu. 1999. Genetic improvement of rice for drought and salt tolerance: molecular breeding and transgenic strategies. In: *Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments*. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 135-155
- Redona ED, DJ Mackill. 1996. Molecular mapping of quantitative trait loci in japonica rice. *Genome* 39:395-403
- Ribaut JM, C Jang, D Gonzales de Leon, GO Edmeades, DA Hoisington. 1997. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor Appl Genet* 94:887-896
- Ribaut JM, DA Hoisington, JA Deutsch, C Jang, D Gonzales de Leon. 1996. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. I. Flowering parameters and anthesis-silking interval. *Theor Appl Genet* 92:905-914
- Salekdeh GhS, J Sioponco, LJ Wade, B Ghareyazie, J Bennett. 2002. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. Elsevier, *Field Crops Research* 76:199-219

- Shashidhar HE, GS Hemamalini, S Hittalmani. 1999. Molecular marker-assisted tagging of morphological and physiological traits at the peak vegetative stage: two contrasting moisture regimes. In: Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 239-256
- Shen L, B Courtois, K McNally, SR McCouch, Z Li. 1999. Developing near-isogenic lines of IR64 introgressed with QTLs for deeper and thicker roots through marker-aided selection. In: Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 275-289
- Stuber C. 1997. Years of searching and manipulating QTLs in maize. In: Tsafstasis A, editor. Genetics, biotechnology and breeding of maize and sorghum. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry. P 43-58
- Subudhi PK, GB Magpantay, DT Rosenow, HT Nguyen. 1999. Mapping and marker-assisted selection to improve the stay-green trait for drought tolerance in sorghum. In: Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 183-191
- Takabe T, Y Hayashi, T Tanaka, S Kishitanu. 1998. Evaluation of glycine betaine accumulation for stress tolerance in transgenic rice plants. In: proceeding of International workshop on breeding and biotechnology for environmental stress in rice, 26-29 Oct. 1998, Japan.
- Teulat B, D Tjies, M Khairallah, C Borries, C Ragot, P Sourdille, P Leroy, P Monneveux, A Charrier. 1998. Several QTL involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl Genet 96:688-698
- Teulat B, P Monneveux, J Wery, C Borries, I Souyris, A Charrier, D This. 1997. Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. Nwe Phytol 137:99-107
- Tuinstra MR, EM Grote, PB Goldsbrough, G Ejeta. 1996. Identification of quantitative trait loci associated with pre-flowering drought tolerance in sorghum. Crop Sci 36:1337-1344
- Tuinstra MR, G Ejeta, P Goldsbrough. 1998. Evaluation of near-isogenic sorghum lines contrasting for QTL markers associated with drought tolerance. Crop Sci 38: 835-842
- Velboom LR, M Lee. 1994. Molecular-marker-facilitated studies of morphological traits in maize. II. Determination of QTLs for grain yield and yield components. Theor Appl Genet 89:451-458
- Xu D, X Duan, B Wang, B Hong, THD Ho, R Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiol 110:249-257
- Yadav R, B Courtois, N Huang, G McLaren. 1997. Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a double haploid population of rice. Theor Appl Genet 94:619-632
- Yamaguchi-Shinozaki K, K Shinozaki. 1999. Improving drought, salt, and freezing stress tolerance using a single gene for a stress-inducible transcription factor in transgenic plants. In: Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 173-182
- Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136:1457-1468
- Zhang J, HG Zheng, ML Ali, JN Triparthu, A Aarti, MS Pathan, AK Sarial, S Robin, Thuy Thanh Nguyen, RC Babu, Bay duy Nguyen, S Sarkarung, A Blum, Henry T Nguyen. 1999. Progress on the molecular mapping of osmotic adjustment and root traits in rice.

In: Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 307-317

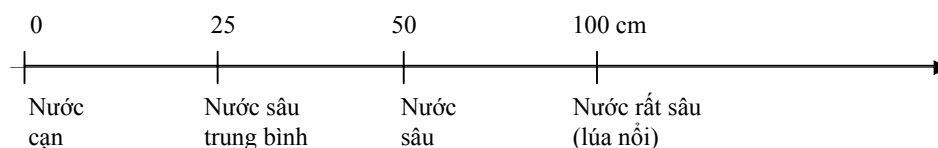
Zhu B, J Su, MC Chang, DPS Verma, YL Fan, R Wu. 1998. Overexpression of a Δ^1 pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci.* 139:41-48

CƠ SỞ DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU NGẬP ÚNG

Trong thập niên 1980, có khoảng 30 đến 40% diện tích trồng lúa ở Châu Á thuộc loại hình canh tác bị ngập lụt hàng năm vào vụ mùa, độ sâu mực nước trung bình từ 0,5 đến 1,0 m ở Ấn Độ, Bangladesh, Miến Điện, Thái Lan và Việt Nam; những vùng khác có mực nước rất sâu (hơn 1m) được gọi là vùng lúa nổi, tập trung ở Nam và Đông Nam Á Châu (Jackson và ctv 1982, Vergara và ctv 1976 HilleRisLambers và Seshu 1982).

Việc điều tra và phân loại vùng trồng lúa gặp nhiều khó khăn vì tiêu chuẩn định danh chưa thống nhất. Từ năm 1979 đến năm 1984, thuật ngữ về vùng sinh thái trồng lúa đã được thay đổi nhiều lần bởi các nhà khoa học IRRI và người ta phải thành lập một Ủy ban quốc tế để phân loại và định danh vùng sinh thái lúa, nhằm thống nhất cách gọi tên, giúp ích cho việc xác định mục tiêu nghiên cứu rõ ràng hơn (Garrity 1984).

Căn cứ vào độ sâu mực nước, Khush (1984) đề nghị gọi như sau:



Áp dụng hệ thống định danh này, chúng ta có thể chia tập đoàn lúa mùa nước sâu địa phương ở ĐBSCL làm hai nhóm: lúa nước sâu (mực nước trên ruộng dưới 100 cm) và lúa nổi (trên 100 cm).

Công trình nghiên cứu về lúa nước sâu được công bố từ năm 1934 tại trạm lúa nổi Habiganj (Bangladesh) (Jackson và Vergara 1979). Công trình tập trung vào việc nghiên cứu tuyển chọn giống cải tiến, ảnh hưởng của tuổi mạ đối với sự chịu ngập, điều kiện đất đai, thời vụ và phương pháp gieo sạ. Trạm thí nghiệm lúa nổi Huntra (Thái Lan) được xây dựng sau trạm Habiganj 7 năm. Ở đây, công trình tập trung vào việc cải tạo phẩm chất hạt và năng suất bằng con đường tuyển chọn từ các giống lúa địa phương.

Trong những năm 1950, vài công trình nghiên cứu về lúa nước sâu được thực hiện ở Nhật và Bangladesh (Yamada 1959, Yamada và Ota 1956, Yamada và ctv 1954, Alim và Sen 1955, Alim và Zaman 1985), nhưng vẫn chưa có cải tiến gì về công tác giống.

Lúa nước sâu bắt đầu được nghiên cứu ở IRRI từ những năm 1960, xem đó như một nhiệm vụ quan trọng của Viện. Thuật ngữ “floating dwarf” đã được sử dụng rộng rãi trong các chương trình lai tạo giữa giống lúa lùn và lúa nổi tại IRRI trong thời gian này. Khả năng phòng thích ra các dạng hình nửa lùn, có thể vươn lóng trong điều kiện nước sâu trung bình đã được chứng minh với các dòng triển vọng của tổ hợp lai IR442 (IR95-31-4 / Leb Mue Nahng 111).

Tuy nhiên, người ta yêu cầu phải xác định rõ về độ sâu của mực nước: sâu bao nhiêu thì được gọi là nước sâu? Đó là câu hỏi được đặt ra từ những chương trình hợp tác quốc tế về lúa nước sâu ở IRRI. Các nhà chọn giống cần có sự thống nhất về định nghĩa vùng nước sâu, bao gồm mức độ và những trở ngại chính của hiện trạng để có được mục tiêu lai tạo rõ ràng (Jackson và ctv 1982).

Hội nghị quốc tế lúa nước sâu lần thứ nhất được tổ chức tại Bangladesh (1974) với nhiều báo cáo nghiên cứu về giống, di truyền, hình thái học, những thiệt hại chính ở các vùng lúa nước sâu. Hội nghị đã thảo luận việc tăng cường sự hợp tác quốc tế.

Sau đó vào năm 1975 các nhà khoa học đã họp tại IRRI, thống nhất mục tiêu lai tạo giống: (1) kháng hạn, (2) khả năng vươn lóng, (3) cường lực mạ, và (4) chống chịu ngập. Về canh tác, họ yêu cầu nghiên cứu tập trung: (1) phòng trừ cỏ dại, (2) thời vụ gieo, (3) mật độ sạ, (4) phân bón, (5) phương pháp canh tác, (6) sửa soạn đất.

Chương trình khảo nghiệm lúa nước sâu quốc tế (IRDWON) được tổ chức từ 1976 đã dần dần đáp ứng phần nào yêu cầu về công tác giống.

Hội nghị quốc tế lúa nước sâu lần thứ hai được tổ chức tại Thái Lan (1976) đã thống nhất về cơ bản việc sử dụng thuật ngữ giống lúa nước sâu và tiêu chuẩn hóa phương pháp cho điểm trong nghiên cứu tính chống chịu:

Hội nghị quốc tế giống lúa nước sâu lần thứ ba được tổ chức tại Ấn Độ (1978) đã đề xuất chương trình hợp tác quốc tế về kỹ thuật RGA (rapid generation advance), để phát triển nhanh chóng các dòng lai, chương trình thanh lọc chống chịu ngập và chịu khô hạn quốc tế.

Hội nghị quốc tế lúa nước sâu lần thứ tư được tổ chức tại Thái Lan (1982) đã nhấn mạnh về tính chống chịu ngập, đề xuất mục tiêu lai tạo với tính chống chịu sâu bệnh riêng biệt đối với từng vùng (tuyển chọn thân được xem là một trong những đối tượng chính): tính kháng hạn ở giai đoạn mạ, tính chịu ngập cho những vùng bị lũ lụt đột ngột. Hội nghị nêu rõ yêu cầu về giống cho vùng lúa nước sâu trở nên vô cùng cần thiết, về tầm quan trọng cho chương trình lai tạo. Hội nghị rất quan tâm đến những nghiên cứu cơ bản về di truyền - nhất là tính trạng chống chịu ngập và khả năng vuron lóng.

Hội thảo về lúa nước sâu (ACIAR workshop) được tổ chức vào tháng 6-1985 tại Australia đã tập trung thảo luận về tính chịu ngập của cây lúa (sinh lý học) và những kết quả mới nhất về cơ chế chống chịu

4-1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU TRƯỚC ĐÂY

Năm 1941, Ramiah và Ramaswami đã công bố một chương trình nghiên cứu về di truyền tính trạng nổi của cây lúa (trên cơ sở dạng hình thân rạp). Đặc tính tăng trưởng theo kiểu ngã rạp (bò) của lúa nổi do hai gen lặn, lặp đoạn điều khiển, một gen liên kết với gen trội của tính chín muộn. Những phát hiện chủ yếu dựa trên việc nghiên cứu quần thể F₂ được trồng trong điều kiện nước cạn của các cặp lai, giữa lúa nước sâu với giống không phải nước sâu của Ấn Độ, Bangladesh, Pakistan. Tác giả không cho rằng có khả năng vuron lóng của những cây đang phân ly. Tác giả đề nghị một chương trình lai cho những cây thân lùn với khả năng đề chồi gọn và chống chịu được nước sâu. Điều này có thể làm được vì không có sự tương quan có tính di truyền giữa đặc tính chịu nước sâu và chiều cao cây, hoặc giữa đặc tính chịu nước sâu và sự đề chồi gọn (Choudhury 1975). Các tác giả điều đề nghị kiểu hình đề chồi gọn được xem như một đặc tính cải tiến của giống lúa nổi (Jackson và Vergara 1979).

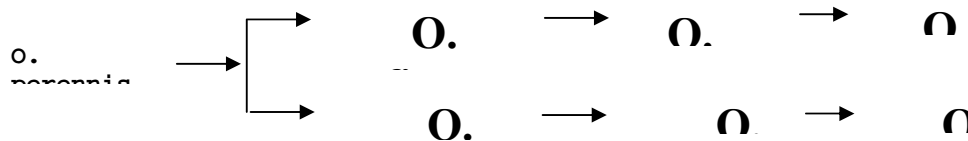
Năm 1965, Chang xác định thêm về hai gen lặn *dw1* và *dw2* điều khiển tính trạng nổi.

Ở Nhật, Kihara và ctv (1962) đã nghiên cứu đặc tính tăng trưởng của các giống lúa nước sâu sưu tập từ Assam (Ấn Độ), Thái Lan, và Châu Phi. Từ đó, người ta đề nghị đặc tính nổi có thể được nghiên cứu trên cơ sở của 3 yếu tố:

- Sự phát triển chiều cao và sự thích nghi nhờ vuron lóng với điều kiện không có sự ngập bất ngờ lúc đầu (điều kiện bình thường).
- Khả năng vuron lóng thích nghi với tốc độ gia tăng mực nước trung bình.
- Khả năng vuron lóng thích nghi với tốc độ gia tăng mực nước tối đa.

Tác giả chưa đề cập đến việc xác định gen cho mỗi yếu tố, hoặc ước đoán số gen của từng yếu tố. Theo kết quả này, các giống lúa nước sâu nổi tiếng đều có chứa yếu tố b và c. Có sự khác biệt giữa các giống thuộc nhóm b và c. Các gen nổi có thể được truyền từ giống lúa nước sâu sang giống lúa lùn, đề chồi khỏe, dạng gọn (Kihara và ctv 1962).

Yêu cầu về một nguồn gen phong phú cho chương trình lai tạo giống lúa nước sâu cũng được các nhà khoa học đề xuất. Cả hai *Oryza sativa* L. và *Oryza glaberrima* Steud đều có những giống lúa trồng (cultivar) thích nghi với điều kiện ngập lũ, nhưng các loài có nguồn gốc ở Châu Á cung cấp được nhiều dạng hình phong phú hơn (Chang và ctv 1977). Những giống lúa thuộc *Oryza glaberrima* Steud có đặc tính tăng trưởng kiểu bò và khả năng gối đầu dẫy (kneeing) trong khi trồng ở nước cạn đều có thể xem như dạng hình lúa nước sâu (Chang 1979). Tác giả cho biết hiện có 646 mẫu giống lúa nước sâu của Châu Á và 680 mẫu giống của Châu Phi được sưu tập tại Ngân hàng gen của Viện lúa Quốc tế. Sự thích nghi rộng của các giống lúa trồng cho thấy có nguồn gốc đa hệ (polyphyletic) của *Oryza sativa* L. về lĩnh vực nước sâu được ghi nhận như sau:



Các giống lúa nước sâu có từ quá trình tiến hóa của *Oryza perennis* Moench (Chandraratna 1964, Choudhury 1975).

Tất cả các giống lúa nổi được biết hiện nay thuộc loại hình Indica, chưa thấy giống lúa nổi loại hình japonica, cũng như chưa truyền được gen nổi của indica vào japonica (Oka 1975). Tác giả lưu ý: có vài giống lúa không thể hiện tính vượt nước nhưng vẫn có thể có gen nổi bởi có tổ tiên của nó là giống hoang dại, nổi.

Morishima và ctv (1962) công bố rằng lúa nổi dạng hoang dại không những có khả năng nổi mà còn kháng hạn. Tác giả cho rằng trong các giống lúa trồng thuộc *Oryza sativa* L. có sự khác biệt một cách đáng chú ý về khả năng nổi: từ trung bình đến mạnh. Khả năng nổi là yếu tố thuộc dạng hình hoang dại và nửa hoang dại để cây lúa thích nghi với chế độ nước thay đổi bất thường.

Tại Viện nghiên cứu di truyền quốc gia Nhật bản, 10 giống lúa hoang và lúa trồng được thử nghiệm theo sự phân loại của Kihara và ctv (1962) đã có những kết quả rất khác nhau đối với yếu tố a, b và c, cho thấy đặc tính nổi thể hiện ra với nhiều hình khác nhau (Morishima 1975).

Đặc tính có rễ phụ và chồi mắt lóng của lúa nổi và lúa nước sâu, cùng với đặc tính vuron lóng đã được dùng để phân biệt giữa lúa nổi và lúa không nổi. Sử dụng các dữ kiện thu từ các thí nghiệm trong hồ với 56 dòng lúa trồng và lúa hoang, Morishima (1975) đã thiết lập công thức theo phương pháp phân tích phương trình biệt thức (discriminant function) để làm tối đa hóa những khác biệt dạng hình nổi và không nổi. Có sự phối hợp tuyến tính của 4 yếu tố:

- A: Số lóng được vuron dài ra (hơn 3 cm)
- B: Chiều dài tổng cộng của các lóng được vuron dài.
- C: Số lóng có rễ phụ trên thân lúa
- D: Số chồi mắt lóng trên thân.

Phương trình biệt thức $X_F = 1.00A + 0.47B + 0.50C + 0.24D$.

Với phương trình này, tác giả đã điều tra sự biến thiên về khả năng nổi của một số dòng lúa trồng và lúa hoang. Đối với lúa trồng thuộc *O. sativa* L. và *O. glaberrima* Steud. Các giống lúa nổi và không nổi rất dễ dàng phân biệt. Đối với các dòng hoang dại thuộc *O. perennis* Moench và *O. brevigulata* A. Cheval et Roehr, có sự biến thiên liên tục về khả năng nổi ở một mức độ nhất định.

Quần thể F_2 của các cặp lai giữa lúa nổi và lúa không nổi cũng cho một biến thiên liên tục về XF. Điều này cho thấy, có thể có nhiều gen điều khiển tính trạng nổi (Morishima 1975).

Cây F_2 được trắc nghiệm trong điều kiện nước sâu cho thấy số lóng và chiều dài có tương quan nghịch (r biến thiên từ - 0.39 đến - 0.52). Trong 56 dòng được thử, hai yếu tố này tương quan không có ý nghĩa. Điều này cho thấy, số lóng và chiều dài lóng trong nước sâu được điều khiển bởi nhiều gen khác nhau (Morishima 1975). Ngoài ra tác giả còn ghi nhận rằng, số lóng trong điều kiện trồng ở nước cạn (5cm) có thể được dùng như một chỉ tiêu ước đoán khả năng nổi ($r = 0.78$) trong điều kiện ngăn ngày và mực nước cạn (5cm).

Khi nghiên cứu về các kiểu gen (genotypes) của các tổ hợp lai giữa lúa nổi và các dạng trung gian, Mukherji và Roy (1977) nhận thấy công thức tính khả năng nổi của Morishima (1975) cần được thay đổi, vì số lóng có rễ phụ và số chồi mắt lóng không tương quan với khả năng nổi. Yếu tố chính có liên quan đến nó là chiều cao cây cuối cùng. Tác giả đề nghị một công thức mới:

$$F_D = 1.00A + 0.50B + 0.20C + 1.00D - 0.25E.$$

(F_D): khả năng nổi, (A): số lóng dài hơn 3cm, (B): chiều cao cây cuối cùng trong điều kiện nước sâu, (C): chiều dài tổng cộng lóng thân được tăng thêm, (D) chiều dài tổng cộng lóng thân được tăng thêm cho đến ngày thứ 81 kể từ sau khi gieo, (E): tỉ lệ vuron lóng giữa điều kiện nước sâu so với điều kiện bình thường (nước sâu 5 cm).

Tại Huntra (Thái Lan), nghiên cứu các tổ hợp lai giữa lúa lùn và lúa nổi trên cơ sở theo dõi sự phân ly của F_2 , F_3 , F_4 ở các độ sâu mực nước 90, 110, 140 và 150 cm cho thấy: (1) khả năng vuron lóng chỉ có thể được ghi nhận ở mực nước sâu hơn 90 cm, (2) việc tuyển chọn đặc tính vuron lóng trên cơ sở từng thể hệ riêng biệt và từng vụ sẽ không đạt kết quả tốt, (3) sự phân bố tần suất của các dòng ở F_3 , F_4 chứng minh rằng có sự chuyên biến mạnh mẽ từ sự

vươn lóng kém đến tốt giữa các cây F₃ và dòng con cháu F₄ của cây ấy (Supapoj và ctv 1977).

Điều này cho thấy việc tuyển chọn khả năng vươn lóng sẽ được thực hiện khi có sự đồng hợp tử.

Cũng từ thí nghiệm này, khả năng vươn lóng trong điều kiện nước sâu hơn 150 cm có quan hệ mật thiết đến chiều cao, cường lực mạ, góc lá, thời gian trổ (HilleRisLambers và ctv. 1977).

Sự phân bố về tính vươn lóng ở F₂ là một đường biểu diễn liên tục chỉ có một đỉnh, đặc tính này được điều khiển bởi đa gen với tính trội không hoàn toàn (partial dominance) – không hoàn toàn vì chỉ có một phần nhỏ có dạng hình nổi thật sự (Hamamura và Kupkanchanakul 1979, Nasiruddin và ctv. 1982, Supapoj và ctv. 1977), còn lại phần lớn có dạng hình trung gian, không có hiện tượng phân ly vượt trội (transgressive segregation).

Các nhà nghiên cứu ở Gagrahat (Ấn Độ) cho rằng có sự phân ly rời rạc (discrete segregation) của dạng hình nổi và không nổi bởi hoạt động của gen bổ sung (Nasiruddin và ctv. 1982). Tác giả còn ghi nhận:

1. Trung bình về chiều cao của quần thể F₂ thấp hơn F₁ cho thấy sự giảm sút về tính chất lai ở đời sau (inbreeding depression).
2. Có hoạt động tương tác không alen xảy ra cho thấy phải có nhiều hơn một locus điều khiển sự vươn lóng.
3. Cả hai sự vươn lóng và vươn dài cây lúa đều được điều khiển bởi một cơ chế di truyền thống nhất.

Sự vươn dài của cây lúa thường là sự kết hợp ảnh hưởng của sự vươn lóng, vươn dài của bẹ lá, của phiến lá (Nasiruddin và ctv. 1977). Sự vươn dài bẹ lá cần một lượng carbohydrate và oxy cao hơn so với yêu cầu vươn lóng (Gomosta và Vergara 1985). Tác giả cho rằng có thể lá thứ (n-2) là trung tâm hoạt động, nó điều khiển sự vươn lóng của lóng thứ (n-2), bằng cách cung cấp đường chất, carbohydrate và các hormones.

Đặc tính tạo lóng thân sớm khiến cho cây lúa nổi có đặc điểm tăng trưởng bò, là một tính trạng di truyền. Sự phân hóa tạo lóng thân sớm do một gen trội điều khiển ký hiệu *Nd* (Tripathi và Rao 1985). Tác giả cũng ghi nhận sự điều khiển của hai gen trội *Nr 1* và *Nr 2*, hoạt động bổ sung, đối với sự tạo ra rễ phụ. Các tính trạng có liên quan khác đã được công bố như: Hai gen trội, lặp đoạn *An 1* và *An 2* điều khiển tính trạng râu hạt, gen trội *Gd* điều khiển tính ngũ nghỉ của hạt. Có sự liên kết gen giữa đặc tính tăng trưởng bò và tính trạng râu hạt, giữa tính trạng gạo đỏ với độ ngũ nghỉ của hạt (dormancy) trong loại hình các giống lúa nổi.

Sự vươn dài lóng thân của giống lúa nước sâu địa phương xảy ra ở cây mạ 4 tuần tuổi, trong khi đối với loại hình cải tiến (nửa lùn): 10 tuần tuổi (Keith và ctv. 1986).

Có sự khác biệt về nguồn gốc của các nhóm lúa nổi về mặt địa lý, khi nghiên cứu về các kiểu gen với hàm lượng esterase khác nhau (Inouye và ctv. 1985). Trong nghiên cứu này, cho thấy các giống lúa nổi vượt nước giỏi nhất có xu hướng trổ muộn nhất, thích nghi với điều kiện ngập lụt, nước rút khô chậm. Tác giả còn ghi nhận: lúa nổi khác với lúa thường là sự kéo dài lóng thứ 5 và 6 khi cho phản ứng với GA (gibberellic acid).

Ngoài ra người ta còn chú ý đến phương pháp phân loại nhanh chóng các dòng lai có tính chống chịu nước sâu ở giai đoạn mạ, cây lúa nổi có thể phân biệt bởi chiều dài của trục mang lá mầm (mesocotyl) khi cho nảy mầm trong tối và gieo sâu, chiều dài của lá thứ hai (ngắn hơn), chiều dài của lóng thứ tư, và năm khi cho lấp đất ở cây mạ 10 ngày tuổi, sự khác biệt về hàm lượng acid abscisic và acid gibberellic (Hamamura và Saengpetch 1977, Inouye và Xuân 1973).

Về lĩnh vực nghiên cứu tính chống chịu sự ngập đột ngột, cho đến nay có rất ít thông tin về di truyền tính chống chịu này (Mohanty và ctv. 1982).

Tính kháng ngập là một tính trạng quan trọng cho lúa nước cạn cũng như cho lúa nổi. Lúa nước cạn cần có khả năng sống sót sau khi ngập hoàn toàn suốt một ngày hoặc một tuần. Lúa nổi cũng có khả năng chịu ngập trong trường hợp sự vươn lóng không theo kịp tốc độ nước dâng quá nhanh trong mùa lũ bất thường (Vergara và Mazaredo 1975).

Kết hợp tính kháng ngập vào các giống lúa nổi sẽ là một bước cải tiến rất lớn về khả năng thích nghi của nó.

Khả năng vươn lóng và tính chống chịu ngập là hai tính trạng hoàn toàn khác nhau, sự vươn dài lóng thân được xem như cơ chế tránh ngập (avoidance mechanism), điều quan trọng là cơ chế phục hồi sau khi bị ngập hoàn toàn (Riccharia và Misro 1960, De Datta và Banerjee 1972).

Tính kháng ngập là khả năng của cây lúa sống sót sau khi bị ngập hoàn toàn, là một tính trạng di truyền (Mazaredo và Veragra 1982).

Phân tích di truyền về khả năng phối hợp cho thấy:

1. Sự chống chịu ngập hoàn toàn trội so với nhiễm.
2. Có sự không đối xứng gen và các alen lặn thường thể hiện nhiều hơn khi phân ly. Các alen trội tập trung trong các tổ hợp có những bố mẹ kháng ngập rất tốt như FR 13A, Kurkaruppan, FR 43 B, Goda Heenati.
3. Hoạt động cộng hưởng và không cộng hưởng đều được ghi nhận. Giá trị di truyền có thể đạt đến 0,71 cho thấy tính chất quan trọng của hiệu quả cộng hưởng.
4. Phân tích diallel cho thấy có ít nhất một gen chủ lực cùng tồn tại bên cạnh nhiều gen khác.
5. Bên cạnh tính trội còn có hiện tượng epistasis (Mohanty và ctv. 1982).

Về lĩnh vực chống chịu khô hạn ở giai đoạn mạ: công tác lai tạo giống kháng hạn đã được thực hiện từ đầu những năm 1970 và được xem như một trong những yếu tố chính cần được đánh giá trong chương trình GEU (đánh giá và sử dụng nguồn gen) của IRRI (Chang và Ctv 1985).

Cơ chế sinh lý học về tính kháng bao gồm:

1. Sự thoát khỏi khô hạn (escape) chủ yếu nhờ vào chu kỳ sinh trưởng ngắn.
2. Sự tránh khô hạn (avoidance) nhờ hệ thống rễ dày, sâu và độ nhạy về sự cuộn lại, mở ra của phiến lá.
3. Tính chống chịu (tolerance) nhờ sự điều chỉnh sinh lý học của mô, tế bào và áp suất thẩm thấu – cơ chế này ít được biết.
4. Sự phục hồi (recovery) có tương quan đến cường lực sinh trưởng của giống lúa. Các thuật ngữ về cơ chế chống chịu này đã được xác định và thảo luận bởi nhiều tác giả (Chang và ctv. 1974, Loresto và ctv. 1976).

Nghiên cứu về di truyền tính kháng hạn của cây lúa ở IRRI được tập trung vào cơ chế 1 và 2, nguồn gen kháng hạn rất đa dạng của các giống lúa trồng thuộc *Oryza sativa* L. và *Oryza glaberrima* Steud. (Chang và ctv 1985). Tác giả thấy rằng:

1. Cơ chế tránh hạn có tương quan nghịch với cơ chế phục hồi.
2. Tính chín sớm giúp thoát khỏi khô hạn được điều khiển bởi những gen không đều cỡ dị phân (anisomeric genes).
3. Khả năng đẻ chồi kém hoặc trung bình của lúa rầy là tính trội.
4. Đa gen điều khiển số rễ lúa được tạo ra, số rễ ít là tính trội, tính trạng rễ dài của các giống lúa rầy là tính trội, trong khi đó tính trạng rễ dày bị tính trạng rễ mỏng lấn áp.
5. Có sự kết hợp chặt chẽ: dạng cây, số chồi, chiều dài rễ và bề dày rễ, trong cùng một loại hình cây lúa.

Những kết quả trong công tác chọn giống:

Các trạm nghiên cứu lúa nước sâu đều bắt đầu thực hiện việc cải tạo giống bằng cách chọn lọc các giống địa phương trên ruộng nông dân, thí dụ như Leb Mue Nahng 111 ở Thái Lan, Chenab Sel 64 – 117 ở Ấn Độ...

Công trình lai tạo mới được thực hiện sau này tại Bihar, Uttar Pradesh, West Bengal, Assam (Ấn Độ), (Padmanabhan 1975, Duara 1975, Maurya 1975), tại Indonesia vào năm 1968 (Noorsyami và Hidayat 1975), và tại Thái Lan năm 1968 – nơi phóng thích sớm nhất giống lúa nước sâu qua chương trình lai tạo (Prechachat và Jackson 1975).

Khả năng sản xuất ra các dạng hình nửa lùn, có thể vươn lóng trong điều kiện nước ngập trung bình đã được chứng minh. Dòng lúa nước sâu dạng cải thiện IR442-2-58 được phóng thích, đã trở thành giống chuẩn kháng khô hạn sau này và dòng T 442-57 được dùng làm dạng hình tiêu chuẩn cho những nghiên cứu so sánh khả năng vươn lóng (Jackson và Vergara 1979). Tuy nhiên đặc tính không miễn cảm với ánh sáng ngày ngắn và tính dễ nhiễm bệnh đạo ôn và bạc lá của nó đã khiến cho những giống này không phát triển được.

Lợi dụng đặc tính miễn cảm với ánh sáng ngày ngắn, Ikehashi (1977) đề xuất áp dụng kỹ thuật RGA (rapid generation advance) để áp dụng trong công tác chọn giống lúa nước sâu với ít nhất 3 thuận lợi như sau:

1. Tạo được sự ổn định nhanh.
2. Phục hồi các kiểu hình do gen lặn điều khiển.
3. Thúc đẩy được sự tái tổ hợp di truyền, chưa kể thuận lợi cơ bản của nó là rút ngắn được thời gian nghiên cứu tạo giống rất lớn, vì người ta có thể trồng được 2-3 vụ/ năm cây F₂, F₃, F₄ bằng kỹ thuật che sáng (8-10 giờ sáng/ ngày) và điều chỉnh nhiệt độ cũng như mật độ cây.

Đề cập đến chiến lược chọn giống lúa nước sâu (Swaminathan 1979), chúng ta cần có nhiều công trình nghiên cứu cơ bản về tính đa dạng của giống đối với các yêu cầu sau:

1. Tạo ra số lượng lóng nhiều hơn trên thân lúa với sự vươn dài lóng kém cũng được.
2. Hoạt động biến dưỡng ở rễ lúa phải thật mạnh mẽ.
3. Sự phân hóa tạo lóng thân sớm hơn.
4. Số hạt và trọng lượng hạt lúa cao hơn cũng như chỉ số kinh tế phải lớn hơn.
5. Hoạt động quang hợp ở lá phải hữu hiệu hơn, ngay cả trong trường hợp bị ngập.

Tác giả đề nghị chương trình lai tạo giống với nhiều mức độ khác nhau về mục tiêu thích nghi: lúa nước sâu trung bình, lúa chịu ngập, lúa nổi nước rất sâu...

Điều rất quan trọng là mục tiêu chọn giống phải hết sức rõ ràng như dạng hình, khả năng vươn lóng tính miễn cảm với ánh sáng... (Jackson và Vergara 1979).

Bốn loại hình lúa nước sâu được ghi nhận như sau (HilleRisLambers và Seshu 1982, Vergara 1981).

1. Lúa nổi: nước dâng từ từ, thời gian ngập kéo dài
2. Lúa nổi: nước dâng nhanh, thời gian ngập kéo dài
3. Lúa bị ngập đột ngột, thời gian ngập lũ ngắn.
4. Lúa bị ngập do ảnh hưởng của thủy triều, thời gian ngập xen kẽ.

Mỗi loại hình có yêu cầu về dạng cây, khả năng chống chịu khác nhau.

Chương trình khảo nghiệm lúa nước sâu quốc tế (IRDWON) đã bắt đầu từ năm 1976, các giống có dạng kiểu hình chấp nhận được ở nhiều điểm và nhiều năm liên tiếp là: RD 19, BKN7022-6-4, BKN 6986 – 108-3, PRRS 43/3, SPR 7292-151-2-1-B-B (Seshu 1982).

Các giống được đề xuất làm vật liệu lai cho chương trình lúa nước sâu là RD 19, BKNFR 76045-35-1, DWCT 156-1B-B, SPR 7282-2-0-7, BKNPR 76035-106-1, IR8234-OT-9-2, BKNFR 76016-16-0-1 (Jackson và ctv. 1982).

Các giống lúa địa phương được sử dụng nhiều trong các chương trình lai tạo giống là :

- Leb Mue Nahng 111, Pingaw 56, Chamara, Khama, Baisbish về khả năng vượt nước.

- FR 13A, Goda Heenati, Kurkaruppan, Thavalu, Saran Kraham về khả năng chịu ngập.
- Habiganj Aman 1, LMN 111, Sitpwa về khả năng gồi đầu dậu.

Ngoài ra những giống cung cấp tính trạng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn, rầy nâu, tungro, ... cũng được thông báo (Seshu 1982, Hille RisLambers và Seshu 1982, Jackson và ctv 1982, Vergara và Mazaredo 1975).

4-2. HÌNH THÁI HỌC CỦA CÂY LÚA THÍCH NGHI VỚI VÙNG BỊ LŨ LỤT

Vùng trồng lúa bị ảnh hưởng bởi lũ lụt được gọi bằng thuật ngữ quốc tế là “flood prone rice”. Chúng có thể được chia thành 4 nhóm như sau:

- Nhóm lúa chống chịu ngập hoàn toàn trong vòng 10 ngày, sau đó chúng có thể phục hồi sau khi nước rút. Đó là những vùng bị lũ quét, hay vùng bị ngập thành linh. Tiếng Anh gọi là “flash flood”, và tính chống chịu trong điều kiện như vậy được gọi là “complete submergence”
- Nhóm lúa có khả năng vượt nước 5-10cm / ngày, hoặc nhiều hơn trong vùng lũ lụt kéo dài 3-4 tháng / năm. Đó là vùng lúa nổi ở Đồng bằng Sông Cửu Long trước đây. Loại hình lũ lụt như vậy được gọi với thuật ngữ quốc tế là “stagnant flood”, nước dâng từ từ, kéo dài nhiều tháng. Tính chống chịu trong điều kiện như vậy được gọi là “khả năng vươn lóng” (elongation ability)
- Nhóm lúa có khả năng thích nghi vùng đầm lầy ven biển, nơi đó thủy triều lên xuống trong ngày làm cây lúa bị ngập lúc triều cường. Đó là vùng bị ngập xen kẽ (mixed flood)
- Nhóm lúa không có khả năng vượt nước, nhưng thích nghi tốt trong vùng nước ngập sâu, lũ lụt kéo dài 2-3 tháng, thuật ngữ chung gọi là “deep water rice” (lúa nước sâu), lúa có tính cảm quang, thời gian trở thường xảy ra khi nước rút.

4-3. KHẢ NĂNG VƯƠN LÓNG

Khả năng vươn lóng là tính trạng quan trọng của giống lúa nổi, làm gia tăng chiều cao cây lúa nhờ đặc tính vươn dài lóng thân, vươn dài bẹ lá, và lá lúa, hoặc phối hợp tất cả những tính trạng này cùng một lúc. Hiện tượng vươn lóng thường xảy ra ở giai đoạn tăng trưởng, và ít thấy ở giai đoạn sinh sản. Bẹ lá và phiến lá non có thể vươn dài ra rất nhanh trong điều kiện cây lúa bị ngập hoàn toàn trong nước. Gomosta (1985) ghi nhận hiện tượng vươn dài của lá lúa nhờ nguồn năng lượng của sản phẩm quang hợp được tích lũy ở dạng carbohydrate. Quá trình tiêu thụ năng lượng và tăng trưởng tỏ ra ít nhạy cảm hơn khi bị ngập hoàn toàn, trong khi khả năng vươn lóng rất cần năng lượng tích lũy. Chính khả năng vươn lóng được nhiều tác giả cho rằng đó là tính trạng quan trọng nhất của lúa nổi giúp nó sống sót và phát triển (Vergara và Mazaredo 1979).

Nasiruddin và ctv. (1977) ghi nhận rằng sự vươn dài của cây là kết quả kéo dài của tế bào. Nhưng Sugawara và Horika (1971) cho rằng cơ chế chủ yếu trong sự vươn lóng là sự gia tăng số lượng tế bào, nó xảy ra một cách tích cực tại mô phân sinh ở cuối lóng thân rạ. Điều này thống nhất với ý kiến của Inouye (1983).

Raskin và Kende (1984) phát hiện nồng độ O_2 khá thấp trong lóng thân bị ngập nước (khoảng 3%). Nồng độ O_2 khá thấp như vậy làm gia tăng hiện tượng tổng hợp ethylene (C_2H_4) trong lóng thân của cây lúa nước sâu. Ethylene tích lũy trong thân rạ bị ngập hoàn toàn, sẽ làm gia tăng sự tăng trưởng của lóng thân và ức chế sự tăng trưởng của lá lúa. Ảnh hưởng đồng thời của C_2H_4 về tăng trưởng lóng thân làm gia tăng nồng độ CO_2 trong lóng thân (khoảng 6%). Sự thích nghi của cây lúa nước sâu với điều kiện ngập nước như vậy là phản ứng giảm O_2 , tăng CO_2 và C_2H_4 trong lóng thân bị ngập nước

Trong điều kiện cây lúa bị ngập nước, tốc độ phân bào xảy ra nhanh hơn làm gia tăng chiều dài ở vùng mô phân sinh (Metraux và Kende 1984). Khi tế bào đã già, lóng thân không thể vươn lóng vì thiếu hiện tượng phân bào tích cực.

Bleecker và ctv. (1987) phát hiện khả năng vươn lóng do sự gia tăng mức độ phân bào ở vùng sinh mô, trong đó có sự tác động hỗ tương giữa kích thích tố sinh trưởng ethylene và

gibberellic acid, mà những mức độ này thay đổi tùy theo tính chất ngập khác nhau. Sự ngập nước làm giảm O_2 trong lòng thân, nồng độ O_2 thấp như vậy kích hoạt sự tổng hợp ethylene. Ethylene sẽ tích tụ nhiều trong lòng thân bị ngập. Nồng độ cao của ethylene làm gia tăng mức độ miễn cảm của mô đối với gibberellic acid (GA), hoặc làm gia tăng nồng độ gibberellin hoạt động, dẫn đến sự đáp ứng sinh trưởng của cây trong điều kiện bị stress do ngập nước. Setter và ctv. (1988) cho rằng nồng độ ethylene thay đổi tùy theo nhóm giống lúa nước sâu, đặc biệt nhóm giống lúa có nguồn gốc ở Thái Lan. Mặt khác, Khan và ctv. (1987) ghi nhận cây mạ của giống lúa nước sâu trong điều kiện bị ngập hoàn toàn sẽ sản sinh ra một lượng ethylene lớn hơn nhiều lần so với điều kiện bị ngập không hoàn toàn.

Sauter và Kende (1992) quan sát thấy GA kích thích tế bào đầu tiên kéo dài ra trong sinh mô, tiếp theo đó là hoạt động phân bào tích cực. Sauter và ctv. (1993) ghi nhận gibberellin không khởi động hiện tượng kéo dài của lòng thân, khi sinh mô của nó đã bị tách ra trong một nghiệm thức của thí nghiệm. Cách thức hoạt động của các vi sợi cellulose (cellulose microfibrils = CMF) mới chính là yếu tố chủ yếu trong tăng trưởng của tế bào. Sự kéo dài lòng thân sẽ xảy ra khi CMF sắp xếp theo hướng tăng trưởng thuận chiều. Sự kéo dài gặp trở ngại khi CMF sắp xếp theo chiều nghiêng, không thuận lợi. Sự phát hiện của Sauter và ctv. (1995) về chất điều hòa sinh trưởng trong hoạt động phân bào ở sinh mô cho thấy rằng: có sự thể hiện của hai gen “cyclin” tương ứng: *cycOs1* và *cycOs2*. Hai gen này là cDNA được clone hóa từ cây lúa và là phân tử đồng dạng (homologs) của *cdc2/CDC28*, chúng được kích hoạt bởi GA.

4-3-1. Di truyền về khả năng vươn lóng

Nghiên cứu có tính chất hệ thống tại Viện Lúa Quốc Tế, bởi Thakur và HilleRisLamber (1988) cho thấy tính trạng khả năng vươn lóng được điều khiển bởi hai gen, hoạt động bổ sung. Phân ly trong F_2 của tổ hợp lai giữa Leb Mue Nahng 111 / Baisbish cho thấy gen điều khiển tính trạng vươn lóng trong hai giống khác nhau, không alen với nhau, trong đó, mỗi gen đều có thể điều khiển sự vươn lóng, và sự hiện diện của cả hai tạo ra khả năng vươn lóng mạnh hơn. Trong tổ hợp lai giữa giống có khả năng vươn lóng và giống lúa thấp cây, không vươn lóng cho thấy: tỉ lệ phân ly 9:7 được ghi nhận trong quần thể F_2 . Phân bố liên tục trong quần thể F_2 với một đỉnh, dạng phân bố chuẩn (Thakur và HilleRisLambers 1989) được ghi nhận, thống nhất với kết quả của Suge (1988), các tác giả kết luận rằng tính trạng vươn lóng thân được kiểm soát bởi hai gen trội không hoàn toàn, với ảnh hưởng có tính chất bổ sung, một gen kiểm soát sản phẩm GA, và một gen kiểm soát tính chất đáp ứng của ethylene

Khả năng vươn lóng trội so với tính trạng không vươn lóng, với tỉ lệ phân ly ở F_2 là 13:1 và 15:1 (Saha Ray 1987, Saha Ray và ctv. 1994). Điều này cho thấy tính chất di truyền “digenic” với hiện tượng epistasis trội trong một trường hợp. Ảnh hưởng epistasis tiên-trội (predominant) thể hiện mạnh hơn ảnh hưởng epistasis cộng (additive) và ảnh hưởng epistasis trội (dominance), với vai trò quan trọng của loại hình lặp đoạn trong epistasis. Thạch (1994) nghiên cứu mối quan hệ giữa di truyền khả năng vươn lóng và tính trạng chống chịu ngập từ nguồn vật liệu FR13A cho thấy, gen của FR13A tương tác alen với một trong hai gen có tính chất bổ sung kiểm soát khả năng vươn lóng, gen điều khiển vươn lóng trội so với gen điều khiển tính chống chịu ngập.

Trong khi quan sát tính chất siêu trội của tính trạng vươn lóng ở F_1 của nhiều tổ hợp lai giữa lúa nổi của Nam Á và Đông Nam Á, Mishra (1995) ghi nhận hiện tượng vượt trội về chiều cao cây lúa, từ đó tác giả đã đề xuất giả thuyết (1) một vài QTL có chức năng điều khiển khả năng vươn lóng, (2) giống lúa nước sâu của Nam Á có khả năng vượt nước nhanh hơn nhóm giống lúa nước sâu ở Đông Nam Á, (3) gen vượt nước trong cả hai nhóm giống lúa này có thể không giống nhau, (4) tổ hợp lai giữa hai nhóm giống đều có thể tạo ra con lai vượt nước tốt hơn bố mẹ.

Cấp cho điểm trong nghiên cứu khả năng vươn lóng (Mazaredo và Vergara 1977)

1 lòng thân dài 60cm hoặc lớn hơn

- 3 lóng thân dài 40-50cm
- 5 lóng thân dài 20-39cm
- 7 lóng thân dài 1-19cm
- 9 không vuron lóng, cây chết

4-3-2. Nghiên cứu lúa nổi ở ĐBSCL (Bừ 1987)

Danh sách các giống lúa nổi ở Đồng bằng sông Cửu Long được nghiên cứu trong bảng 1 (Bừ 1987)

Bảng 1: Phân nhóm lúa nổi và không nổi theo chỉ số X_F của (Morishima 1975). (Bừ 1987)

Giống	Số mẫu	A	B	C	D	X_F
Nàng tri đỏ (đ/c)	0197	14	214	10.0	0.5	129.700
Nàng tây đùm hạt lớn	0083	11	207	8.0	0.7	112.458
Ba bông	0167	13	201	7.0	0.7	111.038
Nàng tây lớn	0084	12	198	9.0	0.3	109.632
Nàng chết trụi	0287	10	196	7.0	0.7	105.788
Leb Mue Nahng 111	0040	12	182	9.0	2.3	102.592
Nàng tây nút	0102	11	184	7.0	0.8	102.582
Nàng tây nút	0085	13	173	9.0	1.5	99.170
Tây nâu	0243	13	171	9.0	0.9	98.086
Tây nút	0093	12	173	9.0	0.7	97.978
Lúa rung	0273	10	172	6.0	5.0	95.040
Nàng tây đùm chọn lọc	0082	13	163	8.5	2.9	95.026
Nàng tây đùm (Đ/C)	0030	10	168	8.7	1.2	93.598
Nếp nàng chết	0019	13	166	5.3	2.4	93.246
Nàng tây rắn	0015	11	164	8.0	1.2	93.368
Nàng tây bông dừa	0207	13	155	11.0	2.2	91.878
Ba bông	0206	12	157	8.0	1.1	90.054
RD 19 (Đ/C)	0032	10	157	7.0	0.8	87.482
Nàng tây nhỏ CP15	0246	9	160	6.0	1.0	87.440
Chết cụt	0017	9	152	10.9	2.5	86.490
Cù là	0370	10	147	10.0	606	85.530
Nàng chết cụt	0323	8	158	5.0	0.0	84.760
Nếp chăm	0022	11	151	4.3	2.5	84.720
Nàng đùm to	0292	9	150	6.0	1.7	82.838
Trắng chùm (Đ/C)	0188	10	147	3.0	2.4	81.166
Nàng trôi dài	0195	8	150	4.0	2.7	81.148
Nếp rắn	0117	8	141	5.8	2.0	77.650
Nếp sông lớn	0067	9	135	6.5	2.1	76.008
Nếp nàng chết đuôi	0029	8	132	7.4	0.2	73.788
Nàng tây C	0189	10	126	7.0	1.2	73.008
Cù là	0320	7	136	3.0	1.6	72.804
Lúa tháng 10	0045	7	124	5.0	6.8	69.292

LSD 0.05 = 5.014

Sự tương quan chặt chẽ giữa chỉ số nổi X_F và tỷ lệ cây ngoi lên mặt nước ở độ sâu 120cm

$$r = 0,816^{**}$$

$$y = 0,48x + 7,44$$

Đặc tính tạo lóng thân rất sớm ở giai đoạn tăng trưởng đầu tiên của cây lúa nổi được ghi nhận không những ở điều kiện nước sâu mà còn thấy ở điều kiện trồng cạn, tạo cho nó một dạng hình bò (postrate) như các loài cỏ hoà thảo. Ramiah và Ramaswami (1941) đã sử dụng đặc tính này như một chỉ tiêu của khả năng nổi.

Trong điều kiện thanh lọc giống tại hồ nước sâu của IRRI (1985) và mức độ nước dâng 5 cm/ngày sử dụng giống có tuổi mạ 30 ngày, cho thấy: (bảng 4).

- Các giống lúa nổi Ba sào, Nàng chệt cụt, Nàng đùm nhỏ, Nàng đùm to, Nàng đùm trắng, Nàng phước, Nàng rừng, Nàng son, Nàng tây, Nàng tây C, Nàng Tây đùm, Nàng tri, Nếp cô Ba, đều vượt nước ở điểm 1 (IRRI 1980).
- Các giống lúa nước sâu như Trắng chùm, Trắng lựa, Tàu nút, Lúa Thước vẫn phát triển bình thường ở độ sâu 70 cm, nhưng ở độ sâu 120cm, tất cả đều bị thiệt hại.

Sự khác biệt về tuổi mạ và tốc độ mực nước dâng cao mỗi ngày cho thấy có sự khác nhau một ít giữa 2 thí nghiệm ở IRRI và Viện Lúa ĐBSCL. Các giống Nàng đùm to, Nàng tây C thể hiện mức độ vượt nước trung bình hoặc yếu trong điều kiện thí nghiệm tại Ô Môn, nhưng tỏ ra vượt nước tốt trong điều kiện ở IRRI.

Kết quả quan sát sự phân ly giữa dạng đứng và dạng bò ở giai đoạn mạ của các tổ hợp lai (Bảng 5) cho thấy tỷ lệ phân ly ở F₂ là 15: 1 và 3: 1 chứng minh tính chất lặn, lặn đoạn của gen điều khiển tính trạng này (Ramiah và Ramaswami 1941, Chang 1965).

Bảng 2: So sánh một vài đặc tính vượt nước của 4 nhóm lúa nước sâu ở ĐBSCL

Nhóm giống lúa	Chỉ số nổi X _F	Thử nghiệm ở giai đoạn mạ			
		Tỷ lệ cây ngoi lên mặt nước (arcsin)	Chiều dài (cm)		Số lóng dài hơn 3 cm
			Thân lúa	Lóng dài nhất	
I. Nàng tri đỏ	129.7	60.00ab	155ab	42	2
Ba bông	111.1	60.00ab	164a	27	2
Nàng tây lớn	109.6	45.00b	147bc	32	1
Nàng tây nút	102.6	63.44a	164a	52	3
Trung bình		56.79	158	43	2
II. Lúa rung	95.0	42.13bc	144a	20	1
Nàng tây đùm	93.6	50.77b	154b	33	2
Nàng tây rắn	92.4	53.73ab	149bc	43	3
Nàng tây bông dừa	91.9	42.13bc	145bc	46	2
Trung bình		47.29	148	33	2
III. HD 19	87.5	18.44d	140cd	33	1
Nàng tây nhỏ CF15	87.4	30.00c	135d	48	1
Chệt cụt	84.8	0.57c	110f	0	0
Trung bình		28.66	133	28	1
IV. Trắng chùm	81.2	0.57e	133e	0	0
Nàng chó dài	81.2	0.57e	125e	0	0
Nếp sông lớn	76.2	0.57e	121ef	0	0
Ba thiệt	-	0.57e	112r	0	0
Trung bình		0.57	118	0	0
LSD 0.05	5.014			10.42	

Những số theo cùng một mẫu tự không khác biệt có ý nghĩa ở mức độ 0.05.

Bảng 3. Trắc nghiệm khả năng vươn lóng tại IRRI 1985 (mạ 30 ngày tuổi, tốc độ nước dâng 5 cm/ngày)

Số đăng ký	Giống	Khả năng vươn lóng			
		45 cm	60 cm	70 cm	120 cm
Acc.32084	Ba sào	1	1	1	1
07819	Leb Mue Nahng 111	1	1	1	1
26242	Nàng phước	1	1	1	1
32185	Nàng rừng	1	1	1	1
24209	Nàng son	1	1	1	1
26247	Nàng tây đùm	1	1	1	1
26248	Nàng tây nút	1	1	1	1
32193	Nàng tây to	1	1	1	1
32196	Nàng tri	1	1	1	1
32212	Nếp Cô Ba	1	1	1	1
	Pingaew 56	1	1	1	1
26237	Nàng chệt cụt	1	1	1	3
26239	Nàng đùm nhỏ	1	1	1	3
00231	Nàng đùm to	1	1	1	3
32168	Nàng đùm trắng	1	1	1	3
26241	Nàng lên	1	1	3	3
32191	Nàng tây C	1	1	1	3
32192	Nàng tây nâu	1	1	3	3
05967	Nàng tây nhỏ CF15	1	1	3	3
16777	Trắng chùm	1	1	1	9
16781	Trắng lựa	1	1	1	9
07258	Trắng nhỏ	1	1	3	9
00196	Lúa thước	1	1	3	9
16783	Trắng tép	1	1	5	9
32273	Trắng lùn	1	3	5	9
07091	Nàng chệt cụt	3	3	5	9
07217	Nàng chô	5	5	7	9
	RD 19 (ĐC)	5	7	9	9
	IR42 (ĐC)	9	9	9	9

Bảng 4: Sự tạo tạo lóng thân và mức độ vươn lóng của các giống lúa nổi ở giai đoạn mạ - tốc độ nước dâng 5 cm/ngày, tại hồ nước sâu IRRI

Giống	Số lóng thân dài hơn 3 cm	Tổng chiều dài của các lóng (cm)	Chiều dài trung bình của lóng (cm)
Ba sào	5.5	63.4	11.74
Leb Mue Nahng 111 (ĐC)	6.0	68.6	11.43

Nàng chệt cụt	5.0	64.9	12.98
Nàng đùm nhỏ	5.6	61.0	14.46
Nàng đùm to	5.0	78.2	15.64
Nàng đùm trắng	5.2	65.2	12.54
Nàng lên	5.4	61.5	11.39
Nàng phước	5.4	64.8	12.00
Nàng son	5.0	73.7	15.74
Nàng tây A	5.6	66.9	11.94
Nàng tây C	5.4	63.2	11.70
Nàng tây đùm (ĐC)	4.8	67.3	14.02
Nàng tây nâu	4.8	63.2	13.60
Nàng tây nhỏ CF 15	5.0	63.5	12.70
Nàng tây to	6.2	77.0	12.41
Nàng tri	5.2	66.0	12.69
Nếp Cô Ba	4.4	99.7	13.56
Pin gaew 56	5.4	69.5	12.87
IR 11141-6-1-4 (ĐC)	7.2	54.5	7.54
LSD 0.05	NS	NS	0.662

Bảng 5: Tỷ lệ cây ngoi lên mặt nước ở độ sâu 120cm, với tốc độ nước dâng 6cm/ngày

	Tỷ lệ cây ngoi lên mặt nước %		
	Sâu 90 cm	Sâu 110 cm	Sâu 120 cm
Leb Mue Nahng 111/IR48	54	44	15
Nàng tây đùm/IR48	48	33	8
Ba Bông/IR48	80	76	14
Nàng tây bông dừa/IR48	80	79	14
Nàng tây đùm (ĐC)	100	100	100
RD 19 (ĐC)	100	100	0
IR48 (ĐC)	0	0	0

Tổ hợp lai Ba bông/IR48, Nàng tây bông dừa/IR48 có tỷ lệ cây ngoi lên mặt nước cao nhất ở độ sâu 90 và 110 cm.

Ở độ sâu 120cm và 7 ngày sau đó, RD19, bị thiệt hại hoàn toàn, tỷ lệ cây ngoi lên mặt nước của 4 tổ hợp lai biến thiên từ 8 - 15%. Tổ hợp lai Nàng tây đùm/IR48 có tỷ lệ vượt nước thấp nhất.

Quần thể F2 của 4 tổ hợp đều có tính trạng vượt nước nằm trong khoảng giới hạn của bố mẹ, nghĩa là có một ít cá thể có khả năng vươn lóng như cây mẹ (lúa nổi) còn lại phần lớn có dạng hình trung gian. Nghiên cứu về vấn đề này, các nhà chọn tạo giống gọi là hiện tượng không có phân ly vượt trội (transgressive segregation) (Nasiruddin và ctv 1982, Supapoj và ctv 1977). Không có cá thể nào thể hiện khả năng vượt nước hơn hẳn Nàng Tây đùm, mặc dù đã ngoi theo kịp, nhưng phát triển kém.

Tương quan giữa số lóng và chiều dài lóng trung bình là tương quan nghịch, rất chặt chẽ

$$r = -0.699* (n = 17 \text{ giống lúa nổi}).$$

Số lóng của các giống lúa nổi và lúa nước sâu có xu hướng tăng theo sự gia tăng chỉ số nổi XF ($r = 0.677**$). Điều này phù hợp đề xuất của Morishima (1975): số lóng trong điều kiện nước cạn có thể dùng để ước đoán khả năng vượt nước. Tác giả còn ghi nhận: số lóng và chiều dài lóng có thể được điều khiển bởi nhiều gen khác nhau.

Trong thí nghiệm thanh lọc giống tại hồ nước sâu của IRRI (1985), với mức độ nước dâng 5cm/ngày, sử dụng tuổi mạ 30 ngày cho thấy :

Giống lúa nổi có khả năng tạo lóng thân rất sớm (ghi nhận 60 ngày sau khi gieo) số lóng thân biến thiên từ 4 đến 6/thân lúa. Sự khác biệt về số lóng giữa các giống lúa nổi Việt nam không có ý nghĩa ($F=1,169 \text{ ns}$), so sánh với các giống lúa nổi khác nhau Baisbish, IR11141-6-1-4, các giống lúa nổi Việt Nam có số lóng thân ít hơn và có xu hướng phát triển chiều dài lóng nhiều hơn.

Chiều dài lóng thân trung bình của những giống lúa nổi Việt Nam khác biệt có ý nghĩa (LSD_{0.05} = 0,662) các giống Nàng son, Nàng đùm nhỏ, Nàng đùm to, Nàng tây đùm có chiều dài trung bình lóng lớn nhất

4-4. DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU NGẬP HOÀN TOÀN

Tính chống chịu ngập hoàn toàn là một đặc tính quan trọng cho lúa nước cạn cũng như lúa nổi. Lúa nước cạn cần có khả năng sống sót sau khi ngập hoàn toàn 1 ngày hoặc 1 tuần. Lúa nổi cũng cần có tính trạng này trong trường hợp sự vươn lóng không theo kịp tốc độ nước dâng quá nhanh vào đầu vụ cho chế độ lũ bất thường gây ra (Vergara và Mazaredo 1975)

Kết hợp được cả hai đặc tính vươn lóng và chịu ngập trong chương trình lai tạo giống là yêu cầu có tính chiến lược (Mohanty và ctv 1982).

Có rất nhiều phương pháp thanh lọc để đánh giá các vật liệu khởi đầu dùng làm bố mẹ cho những chương trình lai tạo giống chống chịu của 18 tác giả bằng 20 phương pháp riêng của họ (HilleRisLambers và Vergara 1982, Vergara và Dikshit 1982).

Áp dụng phương pháp thanh lọc ngập của Vergara và Mazaredo (1975), ngập với độ sâu 30 cm, sử dụng mạ 10 ngày tuổi. Kết quả ghi nhận như sau:

4-4-1. Dùng hệ thang điểm của Suprihato (1980) với 54 giống dòng được thử nghiệm.

- Nhóm lúa nổi vùng 5,6 (bảng 6) chịu ngập kém, trừ giống Nàng đùm to, Nàng tây đùm.
- Nhóm lúa canh tác vùng đầm lầy ven biển, bị ảnh hưởng của thủy triều lên xuống hằng ngày, chịu ngập khá nhất: Lúa thước, Trắng tếp, Trắng lùn, Lem lùn, Nàng tây đỏ, Nàng nguyệt.

Tuy nhiên sử dụng hệ thang điểm này, chỉ căn cứ vào số lá xanh và tình trạng sinh trưởng của chúng sau khi ngập cho nên kết quả ít rõ ràng, vì tùy thuộc vào điều kiện xung quanh (nhiệt độ, sự khéo léo khi đem mẫu ra khỏi hồ v.v. .) do đó độ chính xác không cao.

4-4-2. Thí nghiệm được thực hiện lại với 100 giống và dòng triển vọng tại hồ nước của IRRI (1985) hai lần lặp lại kiểm soát được sự đồng đều về nhiệt độ, độ ngập sâu hoàn toàn, độ đục của nước, độ đồng đều về sự nảy mầm, sử dụng hệ thang điểm tính theo tỉ lệ cây sống sót so với giống đối chứng kháng FR13A (%CS), cho thấy:

$$\%CS = \frac{\%S}{\% \text{ sống sót của FR13A}} \times 100$$

Điểm	Tính chống chịu ngập (%CS)
1	100% hoặc lớn hơn
3	95 – 99
5	75 – 94
6	50 – 74
9	0 – 49

(CS: được viết tắt từ chữ comparative survival)

- Về phương pháp chấm điểm: trong điều kiện thanh lọc ở nhà lưới, giống chuẩn kháng FR13A có tỷ lệ cây sống sót biến thiên từ 30-95%, và giống chuẩn nhiễm IR42 từ 0-10%. Tỉ lệ sống sót trung bình của giống chuẩn kháng: 60%, cho phép kết luận: số liệu thí nghiệm chấp nhận được. Như vậy sử dụng % CS chính xác hơn tính tỉ lệ cây sống sót đơn thuần, làm giảm yếu tố sai biệt do ngoại cảnh.
- Các giống Việt Nam có tỉ lệ cây sống sót thấp từ 5-10% là Nàng đùm to, Tàu nút, Trắng nhỏ, Nàng tây đùm, Nàng đùm nhỏ, Nàng son, Nàng tây. Tất cả các giống lúa nổi và lúa nước sâu còn lại đều bị thiệt hại hoàn toàn.
- Các giống FR13A, Chenab sel. 64-117 (Ấn độ) và Murkaruppan (Sri. Lanka) tỏ ra chống chịu khá nhất, được đề xuất làm nguồn lai tạo tính kháng ngập hoàn toàn (Jackson và ctv 1982, HilleRisLambers và Seshu 1982, Mohanty và ctv 1982, Mazaredo và Vergara 1982).
- Các dòng lai có triển vọng: IR33277-1-507-1-1-3 và IR38683-35-2-9-12

Có nguồn gốc từ FR13A và Chenab Sel.64-117 (bảng 12) có phản ứng chống chịu ngập khá nhất; tính kháng ngập là một tính trạng di truyền (Mazaredo và Vergara 1982), và tính chịu ngập hoàn toàn trội so với sự nhiễm, có ít nhất một gen chủ lực cùng tồn tại bên cạnh nhiều gen khác (Mohanty và ctv. 1982).

4-4-3. Nguồn cung cấp, tính kháng ngập hoàn toàn từ các giống lúa địa phương ở ĐBSCL, có thể có rất ít donors, nhưng trong hồ sơ GEU của Trung tâm quỹ gen của IRRI, chỉ có 2 giống lúa của Việt nam có tính kháng

ngập hoàn toàn cấp 1 là giống Móng chim (Acc. 29588) và Nếp Văn (Acc. 29873). Hai giống này được thu thập tại Thuận Hải và Đồng Nai- trên vùng canh tác lúa nước trời, thường bị ngập đột ngột trong mùa lũ, thời gian ngập từ 7-10 ngày. Do đó, cần nghiên cứu đánh giá tình trạng này từ các giống có nguồn gốc ở vùng canh tác lúa nước trời thuộc miền Đông Nam bộ và những vùng có điều kiện tự nhiên tương tự.

Tuy có khác biệt về đặc tính sinh lý giữa khả năng vươn lóng và khả năng chịu ngập, nhưng cả hai đặc tính này đều cần thiết cho lúa nổi (Vergara 1976). Bởi vì lúa nước sâu cần có khả năng sống sót trong điều kiện bị ngập hoàn toàn vào giai đoạn mạ, lúc ấy cây lúa chưa thể vươn lóng được. Mức độ cây mạ sống sót sau khi ngập hoàn toàn tùy thuộc vào: thời gian ngập, độ sâu mực nước, nhiệt độ và độ đục của nước, lượng phân đạm được bón và cường độ ánh sáng.

Sự ngập làm ngăn cản sự thành lập sắc tố lá mặc dù cây không thiếu ánh sáng, do đó Suprihatno (1980) đã đề xuất phương pháp chấm điểm theo số lá xanh và tình trạng sinh trưởng của chúng.

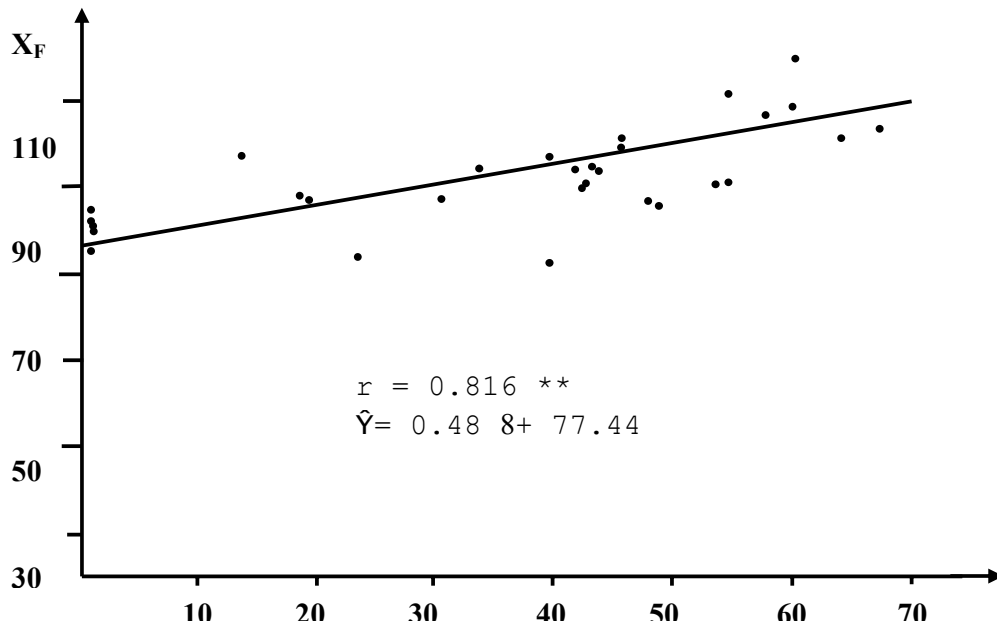
Cần có những kiến thức cơ bản về sinh lý học để phát triển kỹ thuật thanh lọc hợp lý hơn (Mazaredo và Vergara 1982).

Khi cây lúa bị ngập, lượng O₂ trong thân giảm do sự cung cấp không đầy đủ, sự hô hấp kỵ khí tăng lên và sự tiêu thụ các cơ chất hô hấp cũng tăng lên, do đó Yamada (1959) cho rằng: tính kháng ngập của cây lúa được xác định bằng số lượng cơ chất hô hấp có trong cây trước khi bị ngập. Các giống kháng có sự gia tăng về trọng lượng chất khô rất cao và phục hồi nhanh hơn sau khi ngập (Mazaredo và Vergara 1982). Khác với kết luận của Yamada (1959) và hàm lượng carbohydrate của giống kháng rất cao trước khi ngập: Mazaredo và Vergara (1982) thấy rằng sự sống sót và khả năng phục hồi nhanh chóng tùy thuộc vào số lượng carbohydrate sau khi bị ngập.

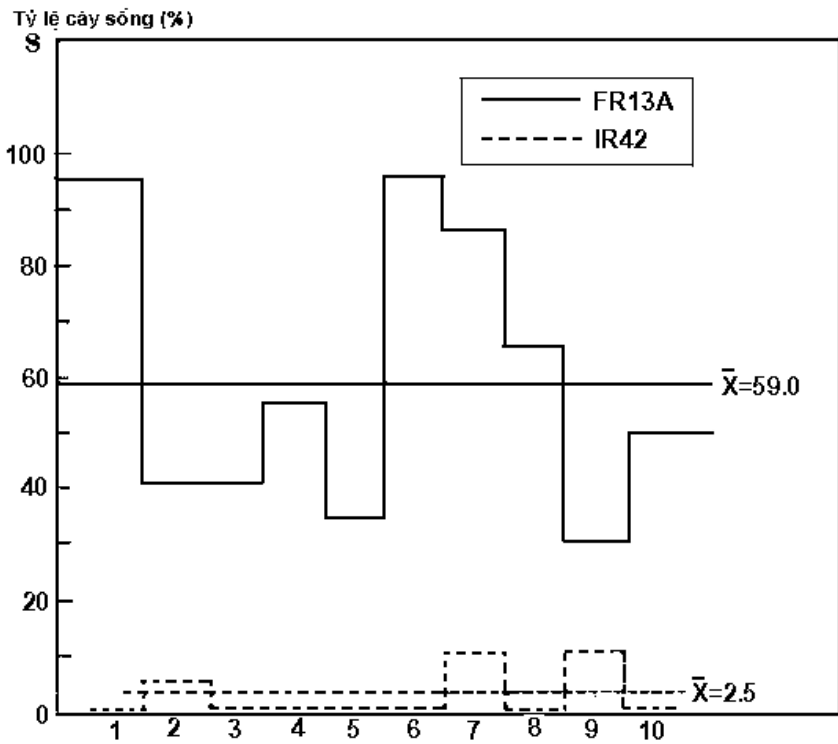
Bảng 6: Kết quả thí nghiệm chống chịu ngập hoàn toàn (sử dụng hệ thang điểm Suprihatno 1980) của các giống lúa mùa chủ lực ở các vùng canh tác khác nhau và những dòng lai triển vọng (Bừu 1987).

Giống	Số đăng ký	Điểm chống chịu	Giống	Số đăng ký	Điểm chống chịu
Lúa thước	0294	1	Sa mo chùm	0182	5
Trắng tép	0283	2	Thần nông đỏ	0050	5
Nàng đùm to	0292	3	Chùm ruột lụa	0073	5
Lem lùn	0228	3	Trái mây	0086	5
Trắng lùn	0204	3	Trắng nhỏ	0252	5
Nàng nguyệt	0106	4	Lúa Phi	0255	5
Nàng tây đùm	0030	4	Nàng tri đỏ	0197	5
Lúa nước mặn	0092	4	Tàu binh	0176	7
Nàng keo	0060	4	Ba bông	0167	7
Độc rắn	0114	4	Tây nâu	0243	7
Cà đung lá	0079	4	Nếp sông lớn	0067	9
Ba thiệt	0142	4	Nàng tây lớn	0084	9
Chô biên	0166	4	Trung hưng	0334	9
Trắng chùm	0188	4	Nàng tây bông dừa	0207	9
Kiều lụa	0227	4	342 (Độc phụng/ IR5853)		9
Tất nọ	0247	4	522 (Trái mây cụt/424)		9
Trắng phước	0254	4	375 (Tàu binh/NN5A)		9
Chệt cụt	0017	5	523 (IR8608/Trung hưng)		9
Nếp cô ba	0147	5			

(1= kháng 9= nhiễm)



Hình 4-1a: Tương quan giữa chỉ số nổi XF và tỷ lệ cây vượt nước ở giai đoạn mạ



Hình 4-1b: Phản ứng của giống chuẩn kháng FR 13A và giống chuẩn nhiễm IR42 trong thí nghiệm tính chống chịu ngập (Bừ 1987)

Bảng 7: Kết quả thí nghiệm chống chịu ngập hoàn toàn theo tỷ lệ cây sống sót so với đối chứng kháng tại hồ nước sâu IRRI (Bừ 1987)

Giống	Số mẫu giống	S (%)	CS (%)	Điểm 1 - 9
-------	--------------	-------	--------	------------

Ba sào	Acc.32084	0.00	0.00	9
Chenab sel. 64-117	Acc.846483	48.48	80.80	5
Kurkaruppa	Acc.15449	57.74	96.23	3
Lúa thước	Acc.00196	0.00	0.00	9
Nàng chệt cụt	Acc.26237	0.00	0.00	9
Nàng chồ	Acc.07217	2.94	4.90	9
Nàng đùm to	Acc.00231	9.95	16.59	9
Nàng lên	Acc.26241	0.00	0.00	9
Nàng phước	Acc.26242	3.45	5.75	9
Nàng tây	Acc.24209	3.85	6.42	9
Nàng tây đùm	Acc.26247	6.25	10.43	9
Nàng tây nút	Acc.26248	3.84	6.41	9
Nàng tri	Acc.32196	0.00	0.00	9
Tàu nút	Acc.10271	0.00	0.00	9
Trắng chùm	Acc.16777	0.00	0.00	9
Trắng lựa	Acc.16781	2.94	4.90	9
Trắng lùn	Acc.32273	4.34	7.25	9
Trắng nhỏ	Acc.07258	6.06	10.10	9
Trắng tép	Acc.16783	2.70	4.50	9
IR33277-1-507-1-1-3		67.87	112.96	1
(FR13A/IR9129-209-2-1//IR9129-117-2-3)				
IR38683-137-5- (Chenab sel. 64-117//IR4744-295-2-3)		59.50	99.17	1
Đối chứng				
FR13A (kháng)		60.00	100.0	1
IR42 (nhiễm)		0.00	0.00	9

(1 = kháng; 9= nhiễm)

Khả năng chống chịu ngập hoàn toàn (submergence tolerance) là một tính trạng di truyền giúp cây lúa phục hồi sau khi bị ngập hoàn toàn trong nước (10-14 ngày). Cây có thể sống mà không cần có khả năng vươn lóng. Rất ít giống lúa cổ truyền được ghi nhận có khả năng này. Những vật liệu đã được công bố là FR13A, FR43B có nguồn gốc từ Ấn Độ, giống Kurkaruppan, Thavalu, Goda Heenati có nguồn gốc từ Sri Lanka (IRRI 1978)

Giống lúa chống chịu ngập có khả năng tổng hợp và tích tụ nhanh hơn và nhiều hơn carbohydrate so với giống không chống chịu ngập, trước khi lũ bắt đầu ập tới (Emes và ctv. 1988, Setter và ctv. 1997)

Di truyền về tính chống chịu ngập thực sự vẫn chưa được hiểu rõ. Một nghiên cứu đã kết luận rằng tính trạng chống chịu ngập là tính trội so với tính không chịu ngập, với ít nhất 3 gen trội, trong đó 2 gen lặp đoạn, và gen thứ ba hoạt động bổ sung với 2 gen còn lại (Suprihatno và Coffman 1981). Một vài nghiên cứu sau đó đã ghi nhận tính trạng chống chịu ngập có hệ số di truyền cao và ảnh hưởng gen cộng tính với ít nhất có một gen chủ lực thể hiện tính trội hoàn toàn hoặc trội từng phần (Mohanty và ctv. 1982, Mohanty và Khush 1985, Haque và ctv. 1989). Có tác giả kết luận đây là tính trạng được điều khiển bởi cả gen chủ lực và các gen thứ yếu (Mohanty và Khush 1985), hay được điều khiển bởi một gen trội trong FR13A, Kurkaruppan và Thavalu (Thạch 1994), hay được điều khiển bởi chỉ một gen trội (Mishra 1995).

Saha Ray và ctv (1993) cho rằng tính chống chịu ngập và khả năng vươn lóng có thể được kết hợp trong cùng một giống khi chúng ta sử dụng bố mẹ là những giống có khả năng chống chịu ngập rất mạnh. Thạch (1994) cho rằng gen điều khiển tính chống chịu ngập của giống FR13A tương tác alen với một trong hai gen hoạt động bổ sung điều khiển khả năng vươn lóng của giống lúa nổi Jalmagna, do đó, việc kết hợp tính chống chịu ngập của FR13A và khả năng vươn lóng của Jalmagna là không có tính khả thi.

Những gen mục tiêu điều khiển tính chống chịu ngập đã được phân lập bởi công trình nghiên cứu của Xu và Mackill (1995). Các tác giả này đã tìm thấy gen chủ lực điều khiển tính trạng chống chịu ngập từ giống lúa IR40931-26-3-3-5, định vị trên nhiễm sắc thể số 9, liên kết với RFLP marker (C1232), thông qua đó, có 69% biến thiên kiểu hình về tính trạng này được giải thích.

Một nghiên cứu khác của Vanavichit (1996) cho thấy các gen chống chịu ngập của giống lúa IR49830-7-1-2-2, liên kết với RFLP marker (RZ698) và hai RAPD marker (AO2c và HO3b), định vị trên nhiễm sắc thể số 9, với giá trị liên kết khoảng 4 cM. Phân tích QTL cho thấy gen điều khiển tính trạng này liên kết với RZ70, định vị trên nhiễm sắc thể số 5. Vị trí của gen chủ lực được nghiên cứu một cách hệ thống tại IRRI với kỹ thuật AFLP trên quần thể cận giao tái tổ hợp F₈ của tổ hợp lai IR74 / FR13A, những gen thứ yếu được công bố định vị trên nhiễm sắc thể số 6, 7, 11 và 12 (Nandi và ctv. 1997)

4-5. CƠ CHẾ CHỐNG CHỊU NGẬP VỀ SINH LÝ HỌC

4-5-1. Diệp lục tố

Giống nhạy cảm với stress do ngập úng thường có hàm lượng diệp lục suy giảm nhanh theo thời gian cây bị ngập. Hiện tượng quang hợp dưới nước vẫn có thể hoạt động, nhưng tốc độ quang hợp giảm do sự giảm oxygen và thiếu ánh sáng. Hoạt động quang hợp liên quan rất chặt chẽ với hoạt động của RuBP carboxylase trong lục lạp, và sự ngập hoàn toàn như vậy làm giảm đi hoạt động của RuBP carboxylase (Rai và Murty 1979). Do đó, các yếu tố ánh sáng giảm, oxygen giảm, diệp lục tố giảm, chúng phối hợp với nhau làm cho hoạt động quang hợp giảm trong suốt thời gian bị ngập nước. Những giống chống chịu có khả năng sống sót nhờ hàm lượng diệp lục giảm rất chậm, và khả năng duy trì hoạt động quang hợp trong điều kiện như vậy

4-5-2. Carbohydrate

Trong suốt quá trình bị ngập hoàn toàn, sự cung cấp oxygen bị hạn chế. Sự hô hấp kỵ khí gia tăng (Yamada 1959, Rai và Murty 1976, Setter và ctv. 1987). Điều này tạo ra một sự tiêu thụ nhanh chóng lượng carbohydrate và ức chế thủy phân protein. Hàm lượng chất bột giảm nhanh, ethylene gia tăng trong chồi thân bị ngập, gia tăng chiều dài lá (Setter và ctv. 1988). Trường hợp cây lúa chỉ bị ngập sâu 30-50cm, không có sự thay đổi đáng kể về carbohydrate, tinh bột, đường trong cây lúa (Setter và ctv. 1987)

4-5-3. Hàm lượng nitrogen

Hàm lượng nitrogen tổng số giảm trong cây mạ bị xử lý ngập hoàn toàn (Mazaredo và Vergara 1982), nhưng ở cây lúa thuộc giống không chống chịu ngập, mức độ giảm này nhiều hơn so với cây chống chịu.

4-5-4. Hoạt động của peroxidase

Peroxidase trong quá trình tăng trưởng và phân hóa chức năng được nhiều báo cáo ghi nhận trong điều kiện bị ngập nước hoàn toàn (Kadam và ctv. 1973, Murty và Nada 1974), nhưng vai trò chính xác của nó như thế nào vẫn chưa được hiểu rõ. Có thể mối quan hệ tương tác giữa chất kích thích sinh trưởng IAA và peroxidase giữ một vai trò quan trọng của cây, đặc biệt trong rễ nhằm mục đích giúp cây chịu đựng trong thời gian dài hơn đối với stress do ngập (Krishnayya và ctv. 1990). Hoạt động của peroxidase ở bẹ lá lúa gia tăng từ trước khi bị ngập cho đến sau khi bị ngập trong tất cả các giống thử nghiệm. Sự gia tăng này càng mạnh trong giống chống chịu. Nhưng hoạt động peroxidase trong lá và rễ của giống không chống chịu tỏ ra suy giảm trong quá trình bị ngập, trong khi đó, peroxidase gia tăng một ít trong giống chống chịu

4-6. NGHIÊN CỨU BẢN ĐỒ DI TRUYỀN TÍNH TRẠNG VƯỜN LÓNG

Tại Viện Lúa Quốc Tế, người ta đã sử dụng kỹ thuật AFLP để phân tích bản đồ di truyền trên cơ sở quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL), quần thể F_8 của tổ hợp lai IR74 x Jalmagna (Sripongpankul 1998). Tác giả đã sử dụng 247 dòng lai để đánh giá kiểu hình, với hai nghiệm thức mức nước gia tăng chậm và mức nước gia tăng nhanh. Sau đó, tác giả đã chọn lại 41 dòng có khả năng vuron lóng và 41 dòng không có khả năng vuron lóng, tổng cộng 82 dòng RIL. Kỹ thuật AFLP đã được áp dụng với 201 marker phân bố trên 12 nhiễm sắc thể cây lúa, với sự phối hợp của 20 cặp môi của *Pst*1 và *Mse*1. Kỹ thuật RFLP cũng được áp dụng với 7 marker và gen *adh* được dùng để kiểm định bản đồ.

Biến thiên kiểu hình của tính trạng vuron lóng thân, vuron cao cây, và vuron dài lá được trắc nghiệm theo phương pháp PROC GLM trong phần mềm SAS, trên cơ sở ANOVA một chiều, được hiệu chỉnh trên từng marker riêng biệt, mỗi phối hợp giữa hai marker được ghi nhận có tính chất giả định (putatively) về tính trạng khả năng vuron lóng. Giá trị liên kết được áp dụng trong MAPMARKER (Lander và ctv. 1987). Khoảng cách di truyền được tính trên cơ sở hàm Kosambi (Kosambi 1944). Những gen chủ lực và gen thứ yếu được phân tích theo phương pháp MAPMARKER/QTL (Lander và Botstein 1989). Theo nguyên tắc, tất cả marker đều được thử nghiệm với tỉ lệ phân ly 1:1 trong MAPMARKER/QTL

Sripongpankul (1998) đã thiết lập bản đồ AFLP trên quần thể RIL của tổ hợp lai IR74 / Jalmagna với LOD score là 4,0, bên cạnh đó, bản đồ RFLP cũng được thiết lập để tăng thêm mức độ tin cậy của kết quả, với sự tham gia của 11 enzyme phân cắt hạn chế.

Đánh giá kiểu hình cho kết quả phân lập 41 dòng có khả năng vượt nước giống như Jalmagna và 41 dòng không có khả năng vượt nước giống như IR74. Khả năng vượt nước ký hiệu *ELON*, khả năng vuron lóng thân: *INTN*, và khả năng vuron lá: *LE*.

Bảng 8: Phân bố marker trên từng nhiễm sắc thể (Sripongpankul 1998)

Nhiễm sắc thể		Marker	Khoảng cách trung bình (cM)
Số	Chiều dài (cM)		
1	354.73	36	9.85
2	204.87	16	12.80
3	145.64	12	12.14
4	154.68	15	10.31
5	207.93	16	13.00
6	81.91	10	8.19
7	85.82	7	12.26
8	96.40	14	6.89
9	198.79	13	15.29
10	75.73	7	10.82
11	350.61	43	8.15
12	246.44	23	10.71
Tổng cộng	2203.55	212	10.87

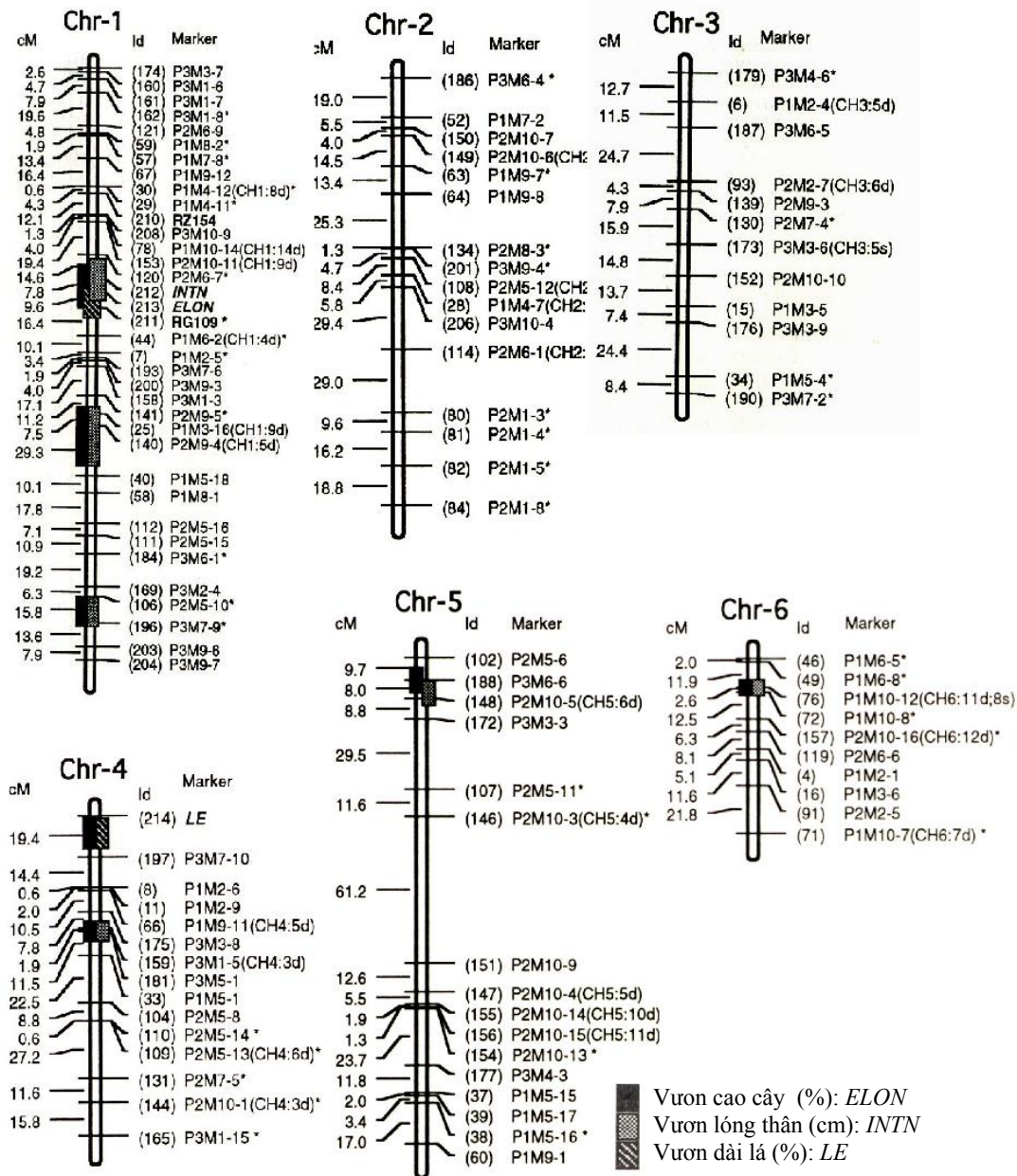
Hình 4-2a, b cho thấy: những gen chính điều khiển tính trạng vuron cao (*ELON*) và tính trạng vuron lóng thân (*INTN*) được định vị trên bản đồ AFLP, nằm giữa hai marker kế cận P2/M6-7 và RG109 trên nhiễm sắc thể số 1, với giá trị LOD là 6,9 và 10,6 theo thứ tự. Khoảng cách di truyền giữa P2/M6-7 với hai tính trạng là 14,6 cM, giữa RG109 với hai tính trạng là 9,6cM. Tính trạng vuron dài của lá (*LE*) được định vị trên bản đồ AFLP, ở đoạn đầu của nhiễm sắc thể số 4, với giá trị LOD là 3,9, liên kết với marker P3/M7-10 trong khoảng cách 19,4cM.

Chín QTL phối hợp với tính trạng vươn cao thân định vị ở nhiễm sắc thể số 1, 4, 5, 6, 10 và 12

Sáu QTL phối hợp với tính trạng vươn lóng thân định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 4, 5, 6, và 10

Ba QTL phối hợp với tính trạng vươn dài của lá định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 4, và 12

Phân tích ANOVA cho thấy: một gen chủ lực liên quan đến tính trạng *ELON* có LOD = 34,9, định vị trên nhiễm sắc thể số 1, với biến thiên kiểu hình được giải thích là 83,9%. Bên cạnh đó, 2 QTL thứ yếu định vị trên nhiễm sắc thể số 1, số 4, một QTL trên nhiễm sắc thể số 5, 6, 10 và 12

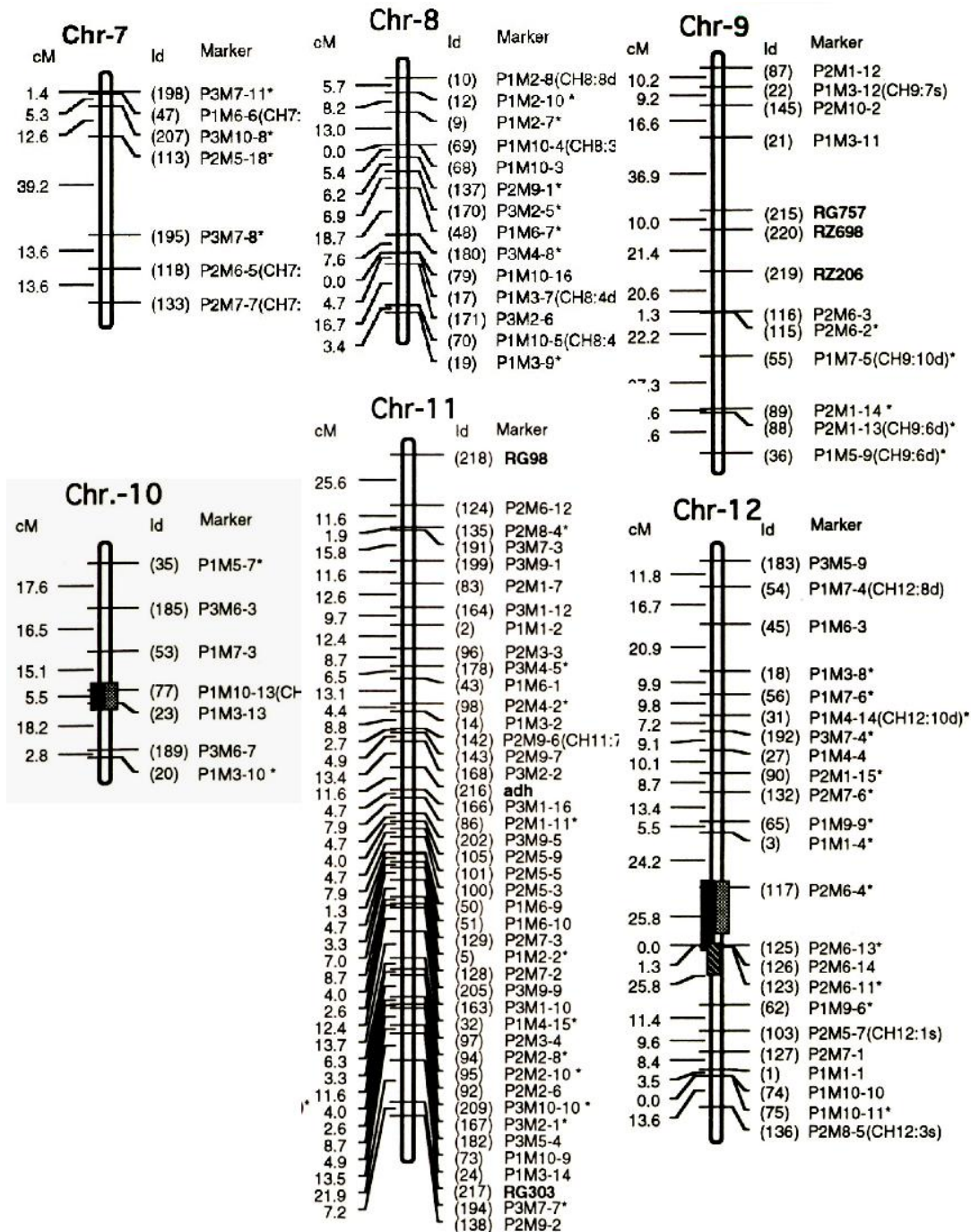


Hình 4-2a: QTL điều khiển tính trạng vươn lóng trên bản đồ AFLP của quần thể RIL thuộc tổ hợp lai IR74 / Jalmagna (Sripongpankul 1998)

Đối với tính trạng *INTN*, một gen chủ lực với LOD = 31,9, định vị trên nhiễm sắc thể số 1, với 86,7% biến thiên kiểu hình được giải thích. Bên cạnh đó, một QTL thứ yếu định vị trên nhiễm sắc thể số 4, 5, 6 và 10

Đối với tính trạng *LE*, một gen chủ lực với LOD = 11,4, định vị trên nhiễm sắc thể số 4, với 47,3% biến thiên kiểu hình được giải thích. Bên cạnh đó, một QTL thứ yếu định vị trên nhiễm sắc thể số 1 và 12

Hai QTL phổ biến kết hợp cả 3 tính trạng mục tiêu được tìm thấy trên nhiễm sắc thể số 1 và 12. Các QTL thứ yếu được tìm thấy trên nhiễm sắc thể số 9, định vị gần gen điều khiển tính chống chịu ngập hoàn toàn (Sripongpankul 1998)



Hình 4-2b: QTL điều khiển tính trạng vươn lóng trên bản đồ AFLP của quần thể RIL thuộc tổ hợp lai IR74 / Jalmagna (tiếp theo)

4-7. “CLONE” HÓA GEN *OsGAPDH* ĐIỀU KHIỂN TÍNH CHỐNG CHỊU NGẬP

Người ta đã phân lập rất nhiều clone điều khiển tính chống chịu ngập ở cây lúa. Một trong những clone như vậy có tên là *OsGAPDH* (Arumugam Pillai và ctv. 2002). Nó thể hiện ở mức độ cao trong suốt 12 giờ bị ngập. Một tương đồng trong “GenBank Database” cho thấy *OsGAPDH* có chuỗi ký tự di truyền tương đồng với “glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” không có khả năng đảo chiều của genome cây bắp. Chuỗi ký tự của *OsGAPDH* bao gồm 1772 bp với khung đọc mã ORF dài nhất, mã hóa 499 amino acid và độ lớn phân tử của nó là 54,2 kDa. Phân tích Southern blot cho thấy có một hoặc hai bản sao của *OsGAPDH* biểu hiện trong genome giống lúa Yukihihikari (Nhật). Người ta phân tích RFLP và xác định vị trí của gen *OsGAPDH* định vị trên nhiễm sắc thể số 8. Sự thể hiện của gen này ở các mô tế bào đặc biệt cho thấy rằng mức độ cao của phân tử mRNA thường được tìm thấy trên bông lúa (Arumugam Pillai và ctv. 2002). Những cây lúa biểu hiện tính chống chịu khô hạn, chịu ngập và phản ứng với nghiệm thức xử lý ABA đều cho thấy có sự gia tăng mức độ tích tụ thể transcript của gen *OsGAPDH*. Hiện tượng kích thích tế bào của *Escherichia coli* chứa plasmid của pGST-*OsGAPDH* sẽ tạo ra một sự tích tụ một số lượng lớn protein có tính chất tái tổ hợp (recombinant protein), với kích thước phân tử 83,2 kDa (Arumugam Pillai và ctv. 2002). Enzyme GAPDH thuần khiết có hoạt tính ở điều kiện pH 8,5, nhiệt độ 50°C, enzyme này bị ức chế bởi ATP và ADP.

Tính chống chịu ngập trong cây lúa liên quan đến khả năng duy trì năng lượng cung cấp cho quá trình lên men rượu với mức độ nhanh, và yêu cầu rất cao về carbohydrate. Những nghiên cứu về thể hiện của các gen có sản phẩm protein trong thực vật bậc cao trong điều kiện hiếm khí và hảo khí đã được thực hiện trong rất nhiều năm và có nhiều báo cáo ghi nhận tầm quan trọng của cơ chế năng lượng trong hiện tượng chống chịu ngập (điều kiện hiếm khí), nhiều protein sản sinh trong điều kiện hiếm khí có tên : “anaerobic protein” viết tắt là ANP bao gồm những enzyme làm nhiệm vụ thủy phân và nhiệm vụ lên men (Vartapetian và Jackson 1997).

Hiện tượng thủy phân trong điều kiện hiếm khí và hiện tượng lên men vô cùng quan trọng trong việc cung cấp năng lượng cho cây trồng. Sự thể hiện của những gen điều khiển tiến trình này (thí dụ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enolase, alcohol dehydrogenase và pyruvate decarboxylase) đều được kích hoạt bởi điều kiện hiếm khí (anaerobiosis) (Umeda và Uchimiya 1994, Sachs và ctv. 1996). Sự kích hoạt như vậy rất cần thiết cho hiện tượng chống chịu stress của cây khi phản ứng với điều kiện yếm khí. Tế bào sẽ chết thông qua các sự kiện sau đây: (1) bị ngộ độc ethanol do quá trình lên men rượu, (2) tế bào chất bị acid hóa (hiện tượng acidosis), (3) không phát ra đủ năng lượng (ATP) để duy trì hoạt động của tế bào, (4) chết do biến dưỡng rối loạn bởi oxy tái hấp thu sau một thời gian không có oxy. Tiến trình làm chậm sự lên men rượu hoặc làm sai lệch sự hình thành ethanol sẽ góp phần làm giảm mức độ thiệt hại dưới dạng hợp chất ít gây hại như “malate”. Đây là ý kiến của của Vartapetian và Jackson (1997) dựa trên cơ sở sinh hóa giúp cho cây thích nghi và sống sót. Protein “ANP” đã được nghiên cứu rất sâu trong trường hợp rễ cây bắp, với 20 protein chiếm khoảng 70% tổng số protein được sản sinh trong vòng 5 giờ trong điều kiện hiếm khí, và đóng vai trò hoạt động xúc tác chính trong phản ứng thủy phân hoặc hoạt động biến dưỡng phosphate đường (Sachs và ctv. 1996). Sản lượng ANP tiếp tục tăng cho đến khi rễ bắp chết sau 72 giờ không có oxy (Sachs và ctv. 1980). Đây là kết quả của hiện tượng chuyển mã được kích hoạt và hiện tượng giải mã có chọn lọc trên cơ sở hoạt động phosphoryl hóa sinh tổng hợp protein như là những yếu tố khởi động (Webster và ctv. 1991). Những công trình đầu tiên về cơ chế kích hoạt do điều kiện yếm khí, phát sinh ra những thể transcript và sự tích tụ mRNA, thí dụ như *adh1* trong genome cây bắp, do Rowland và Strommer (1986) công bố.

Giống lúa japonica phổ biến “Yukihihikari” là giống lúa có năng suất cao đã được sử dụng trong nghiên cứu. Arumugam Pillai và ctv (2002) đã cho nảy mầm 50 hạt trong lọ tam giác 300-ml, ở nhiệt độ 28°C. Mô tế bào được thu thập vào giai đoạn cây lúa 6 tuần tuổi. Cây lúa được trồng trong điều kiện 16 giờ sáng, 6 giờ tối / ngày, trong tủ định ôn (growth

chamber) nhiệt độ 28°C. Cây lúa 6 tuần tuổi được trồng riêng trong điều kiện tối hoàn toàn ở 28°C trong 2 ngày. Phân tử RNA được ly trích từ toàn thân cây lúa rồi phân tích Northern blot với nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức khô hạn, nghiệm thức mặn, nghiệm thức bị ngập hoàn toàn. Đối với nghiệm thức xử lý kích thích tố, cây mạ được phun mannitol (0,5 M), elephon (10^{-2} M), và ABA (10^{-5} M).

Mẫu DNA được ly trích và được phân cắt hạn chế bởi *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III. Điện di được thực hiện trên agarose gel 0,8%.

Bản đồ RFLP được thực hiện trên quần thể đơn bội kép (DH) bao gồm 127 dòng DH của cặp lai ZYQ8 (*indica*) x JX17 (*japonica*). Vị trí trên nhiễm sắc thể của gen *OsGAPDH* được tìm thấy trên bản bản đồ liên kết gen do He và ctv. (1999) thực hiện. Genome của quần thể DH được phân cắt hạn chế bởi *Sca*I và điện di trên agarose gel 0,8% và được chuyển đến màng nylon. Thực hiện lai DNA với probe là *OsGAPDH* cDNA. Phân tích bản đồ di truyền theo MAPMARKER/EXP version 3.0 (Lander và ctv. 1987).

Phân tử RNA tổng số được ly trích từ cây mạ 6 tuần tuổi bằng phương pháp SDS-phenol của Bachem và ctv. (1996). tất cả mẫu được bảo quản trong nitrogen lỏng (-80°C). Phân tử RNA được chiết tách riêng biệt trong 1,2% (w/v) agarose gel (3 Vcm^{-1}) chứa 2,2 M formaldehyde và được chuyển đến Highbond-N⁺ nylon membrane (Amersham) sử dụng 20x SSC (Sambrook và ctv. 1989).

4-7-1. Phân tích Southern

Hình 4-3 biểu thị nucleotide và chuỗi mã amino acid của cDNA clone gen mục tiêu *OsGAPDH*, và hình 4-4 biểu thị cách sắp xếp của gen *OsGAPDH* trong genome cây lúa so với những chuỗi mã của genome cây khác (bắp, đậu, thuốc lá,..)

Hình 4-5 cho thấy kết quả phân tích Southern với 4 enzyme phân cắt hạn chế. Băng có độ lớn phân tử 16,0 kb và 5,6 kb được phát hiện bởi *Bam*HI và *Eco*RI. Các băng có độ lớn phân tử 2,8 và 3,8 kb được phát hiện bởi enzyme *Bgl*II và 2,0 và 5,0 kb do enzyme *Hind*III (hình 4-5). Những tín hiệu của Southern blot cho thấy có một hoặc hai bản sao của *OsGAPDH* xuất hiện trong genome cây lúa. Bản đồ liên kết gen của He và ctv. (1999) cho thấy trong tổng số 243 RFLP và microsatellite marker phân bố trên 12 nhiễm sắc thể, gen *OsGAPDH* được phát hiện trong quần thể đơn bội kép F2, định vị trên nhiễm sắc thể số 8, giữa hai marker RG1 và CT56 (hình 4-6)

4-7-2. Phân tích Northern

Arumugam Pillai và ctv. (2002) đã cố gắng phân biệt từng phần của mRNA gen *OsGAPDH* tích tụ ở nhiều mô khác nhau trong genome cây lúa (bông, phiến lá, bẹ lá, lóng thân, mắt lóng, và rễ). Các tác giả đã ghi nhận mRNA biểu hiện nhiều nhất trong bông lúa, hiện tượng chuyển mã xảy ra mạnh mẽ nhất trong các mô tế bào ở bông lúa (hình 4-7). Ảnh hưởng vệt được tìm thấy trong bẹ lá, lóng thân và mắt lóng. Thể transcript như vậy rất khó tìm thấy ở lá già và rễ.

```

CGCGCCCCATCACCACCCACTCCACTCCCTCCTCCCCGAGCCCGAGTGCCTCACCGCC 60
ACTAGCTAGCAGCAGCGGCGGGCGGGCGGAGAGAAGAGGAGGAGATATGGCGGGCGGTGGCC 120
                                     M A A V A 5
GGGACGGGGGTGTTTCGCGGAGATCCTGGAGGGGGAGGTGTACAGGTACTACGCCGACGGG 180
G T G V F A E I L E G E V Y R Y Y A D G 25
GAGTGGCGCGTCTCGGCTCCGGCAAGTCCGTCGCCATCGTCAACCCACCACCCGCCTC 240
E W R V S A S G K S V A I V N P T T R L 45
ACCCAGTACAGGGTGAAGCATGCACCCAGGAGGAGGTGAACAAGGTGATGGAGACGGCG 300
T Q Y R V Q A C T Q E E V N K V M E T A 65
AAGGTGGCGCAGAAGGCGTGGGCGCGCACGCCGCTGTGGAAGCGCGCGGAGCTCCTGCAC 360
K V A Q K A W A R T P L W K R A E L L H 85
AAGGCGGGCCGCTCAAGGAGCACAAGACCCCGATTGCAGAGTGCCTCAAGGAG 420
K A A A I L K E H K T P I A E C L V K E 105
ATCGCCAAGCCTGCCAAGGACGCGATCTCTGAAGTGGTGAGGTGAGGGGATTTGGTGTGC 480
I A K P A K D A I S E V V R S G D L V S 125
TACACAGCTGAGGAGGGTGTTCGGATACTGGGGGAAGGCAAGCTGCTGGTGTCTGATAGC 540
Y T A E E G V R I L G E G K L L V S D S 145
TTCCCGGGCAATGAACGGAACAAGTACTGTTTGGAGCTCCAAGGTACCTCTTGGAGTAGTT 600
F P G N E R N K Y C L S S K V P L G V V 165
TTGGCAATCCACCATTAACTATCCTGTCAACCTAGCAGTCTCCAAGATTGGCCAGCA 660
L A I P P F N Y P V N L A V S K I G P A 185
CTAATTGCTGGCAATGCTCTGTCTGAAGCCTCCAACCTCAGGGAGCGGTGGCTGCACTA 720
L I A G N A L V L K P P T Q G A V A A L 205
CATATGGTGCCTTCCACCTTGTGGTTTCCCAAAGGCTTGATCAATTGTGTACC 780
H M V H C F H L A G F P K G L I N C V T 225
GGGAAAGGTTCTGAAATTGGTGATTTTCTTACGATGCATCCTGGAGTCAACTGCATAAGT 840
G K G S E I G D F L T M H P G V N C I S 245
TTTACGGGAGGTGATACTGGTATAGCCATTTCAAAGAAGGCTGGAATGGTCCCGCTTCAG 900
F T G G D T G I A I S K K A G M V P L Q 265
ATGGAACCTGGAGGAAAAGATGCTTGTGTGTGTAGAGGATGCAGATCTGGATTTAGTG 960
M E L G G K D A C V V L E D A D L D L V 285
GCAGCAAATATAGTAAAGGAGGCTTCTCTTACAGTGGCCAGAAGTGCCTGTGTGAAA 1020
A A N I V K G G F S Y S G Q K C T A V K 305
GTGGTGTGATCATGGAATCCGTTGCTGATATCGTGGTAGAGAAGGTGAAGGCCAAGTTG 1080
V V L I M E S V A D I V V E K V K A K L 325
GCAAAACTGACAGTTGGGCCACCTGAGGCTGACTCTGATATCACCCAGTTGTAACAGAA 1140
A K L T V G P P E A D S D I T P V V T E 345
TCCTCAGCAAATTTTATTGAGGGTTTGGTTCATGGATGCCAAGGAGAAAGGAGCAACCTTT 1200
S S A N F I E G L V M D A K E K G A T F 365
TGTCAGGAGTACAGGAGAGAAGGCAACCTTATCTGGCCGTTGCTACTGGATCACGTCGG 1260
C Q E Y R R E G N L I W P L L L D H V R 385
CCTGACATGAGGATTGCTTGGGAGGAGCCATTTGGCCCTGTCTGCCTGTGATTAGGATC 1320
P D M R I A W E E P F G P V L P V I R I 405
AACTCGGTGAGGAAGGCATCCACCATTGCAATGCCAGCAATTTTGGGCTGCAGGGATGT 1380
N S V E E G I H H C N A S N F G L Q G C 425
GTATTCATAAAGATATCAACAAAGCGATCATGATCAGCGATGCGATGGAGACCGGAACC 1440
V F T K D I N K A I M I S D A M E T G T 445
GTTGAGATCAACTCTGCACCGGCTCGAGGACCTGACCATTTCCCTTCCAGGGCTTGAAG 1500
V Q I N S A P A R G P D H F P F Q G L K 465
GACAGTGGGATTGGATCCAGGGGATAACTAACAGCATAACATGATGACCAAGGTGAAG 1560
D S G I G S Q G I T N S I N M M T K V K 485
AGCACTGTCATAAACCCTACCATCTCCATCCTACACCATGGGCTGAGGTGTTCCATATAGA 1620
S T V I N L P S P S Y T M G * 499
TGATCAGATTTCTATAACCACATGAGTACAATGTAGAGAATTCAAATGTTTGTAAACCAC 1680
GTGAGCTTTGTACGCTATTTGCACCACAGTTCTCCCTGTATGTTGTTGGCTCTTTTACAA 1740
TTAAGAATAATGCATGTTGAAGTAAAAAAA

```

Hình 4-3: Chuỗi trình tự nucleotide và amino acid của phân tử cDNA thuộc gen *OsGAPDH* (Arumugam Pillai và ctv. 2002)

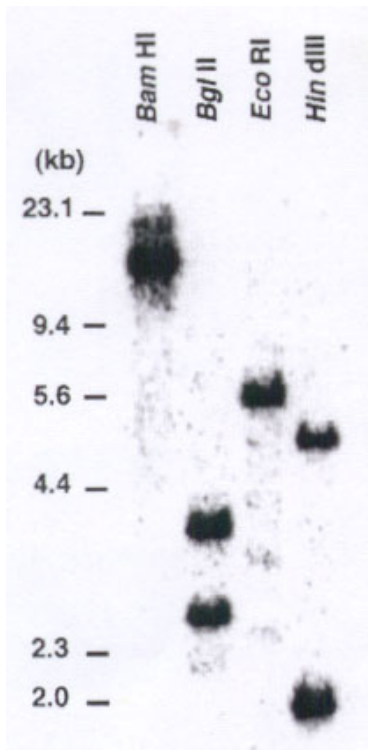
OsGAPDH	MAAVAGTGVF	AEILEGEVYR	YYADGEWRVS	ASGKSVAIVN	PTTRLTQYRV	50
Z.m. (X75326)	..-L.....	..I.D.....T.....K.....	49
P.s. (X75327)	..---A...L	..IID.D..KKK.	T.....I.KP..K.	47
N.p. (U87848)	..---N...	VDII..D.FK	..SE...KK.I.K...K.	47
A.g. (AF196292)	..---S..Y	.DII..D.FK	..S...KK.	S.....I.M..FK.	47
OsGAPDH	...TQEEVNK	VMETAKVAQK	AWARTPLWKR	AELLHKAAGI	LKEHKTPIAE	100
Z.m. (X75326)	A.DA.....DV.....A....	99
P.s. (X75327)	...S.....	..DS..S...	S..K.....AA...	97
N.p. (U87848)V..T...	S..K.....A....	97
A.g. (AF196292)	A.....KV..	Q..K.....AA..D	97
OsGAPDH	CLVKEIAKPA	KDAISEVVRS	GDLVSYTAE	GVRILGEGKL	LVSDSFPNGE	150
Z.m. (X75326)V.....	V.....	149
P.s. (X75327)VT.....C...F.....	147
N.p. (U87848)VT.....F.....	147
A.g. (AF196292)SVT.....C...	...L.....F.....	147
OsGAPDH	RNKYCLSSKV	PLGVVLAIPP	FNYPVNLAVS	KIGPALIAGN	ALVLKPPQTG	200
Z.m. (X75326)I.....A...G.	199
P.s. (X75327)	.T...T..I	...I.....A.....	SI.....	197
N.p. (U87848)	.T...T..I	...I.....A.....	S.....	197
A.g. (AF196292)	.T...T..I	...I.....	197
OsGAPDH	AVAALHMVHC	FHLAGFPKGL	INCVTGKGSE	IGDFLTMHPG	VNCISFTGGD	250
Z.m. (X75326)S.....	249
P.s. (X75327)S.....	247
N.p. (U87848)	...C.....S.....H.....	247
A.g. (AF196292)	...C.....S..I.....	247
OsGAPDH	TGIAISKKAG	MVPLQ MELGG	KDACVVLEDA	DLDLVAANIV	KGGFSYSGQK	300
Z.m. (X75326)I.....S....R	299
P.s. (X75327)S.	..I.....I.....I.....R	297
N.p. (U87848)	..V.....	..I.....I.....	...A.GS..R	297
A.g. (AF196292)I.....SN.IR	297
OsGAPDH	CTAVKVVLIM	ESVADIVVEK	VKAKLAKLTV	GPPEADSDIT	PVVTESSANF	350
Z.m. (X75326)I..A..Q.	..N.....K.D....	349
P.s. (X75327)V.AL...	..V.V..S.D....	...S.....	347
N.p. (U87848)V.AL...	..N..V....D.C...	...S.....	347
A.g. (AF196292)	...I..I.V.	Q....TL...	..N..V....DN....	...S.....	347
OsGAPDH	IEGLVMDAKE	KGATFCQEYR	REGNLIWPLL	LDHVRPDMRI	AWEEFPGPVL	400
Z.m. (X75326)	399
P.s. (X75327)N...KN.....	397
N.p. (U87848)Q	..N...Q.KN.....	397
A.g. (AF196292)K....KN.K....I.	397
OsGAPDH	PVIRINSVEE	GIHHCNASNF	GLQGCVFTKD	INKAIMISDA	METGTVQINS	450
Z.m. (X75326)I..R.L....	449
P.s. (X75327)S.....	447
N.p. (U87848)L....	447
A.g. (AF196292)A..R.	...ML....	..S..I....	447
OsGAPDH	APARGPDHFP	FOGLKDSGIG	SQGITNSINM	MTKVKSTVIN	LPSPSYTMG-	499
Z.m. (X75326)S-	498
P.s. (X75327)I.....T....-	496
N.p. (U87848)I.....T....	..T.....-	496
A.g. (AF196292)I.T....-	496

Hình 4-4: Cách sắp xếp của gen *OsGAPDH* trong genome cây lúa so với những chuỗi mã của genome cây khác (*Zea mays*, *Pisum sativum*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Apium graveolens*) (Arumugam Pillai và ctv. 2002)

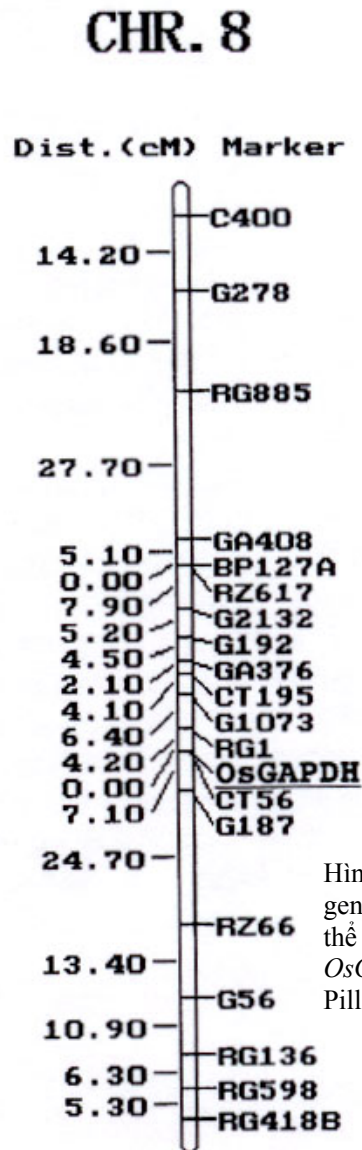
Sự thể hiện gen *OsGAPDH*

Phân tử RNA tổng số của *OsGAPDH* được xác định trong cây mạ với những nghiệm thức xử lý khác nhau (hình 4-8). Cây lúa bị xử lý trong điều kiện khô hạn, ngập hoàn toàn và ABA, sẽ gia tăng hàm lượng mRNA tích tụ. Ở nghiệm thức xử lý nhiệt độ lạnh 5°C, nghiệm thức mannitol, ethephon, mức độ tích tụ mRNA tương đối thấp.

Đối với xử lý khô hạn, mức độ thể hiện cao nhất thể transcript tích tụ xảy ra lúc 12 giờ sau xử lý. Nhưng mức độ thể transcript này sẽ giảm đi qua ngày hôm sau, rồi tăng lên tối đa vào giai đoạn 3 ngày sau khi xử lý khô hạn. Hiện tượng đáp ứng rất mạnh mẽ do xử lý ngập hoàn toàn được quan sát vào lúc 12 giờ sau khi xử lý, sau đó sự thể hiện này giảm rất nhanh. Kích thích tố sinh trưởng ABA cũng biểu hiện một sự kích hoạt khá mạnh trong vòng 1 ngày khi cho xử lý ABA, sau đó thể transcript này giảm chậm trong 2-3 ngày sau đó (hình 4-9).



Hình 4-5: Phân tích Southern blot *OsGAPDH*



Hình 4-6: Bản đồ di truyền genome cây lúa, nhiễm sắc thể số 8 nơi định vị gen *OsGAPDH* (Arumugam Pillai và ctv. 2002)

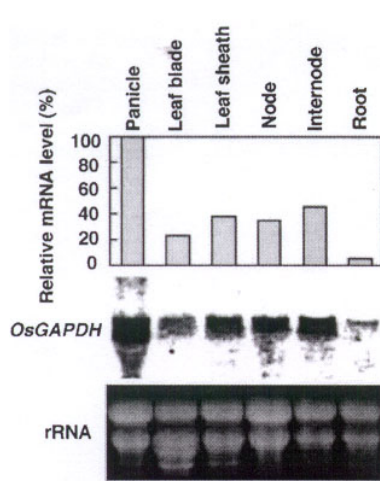
4-7-3. Sự thể hiện dung hợp GST-OsGAPDH

Muốn xác định protein OsGAPDH có hoạt tính của glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, nhóm tác giả nói trên đã tìm cách thể hiện protein đầy đủ OsGAPDH 54, kDa (499 aa) trong tế bào *E. coli* là protein tái tổ hợp GST-OsGAPDH. Sự tích tụ của GST (29

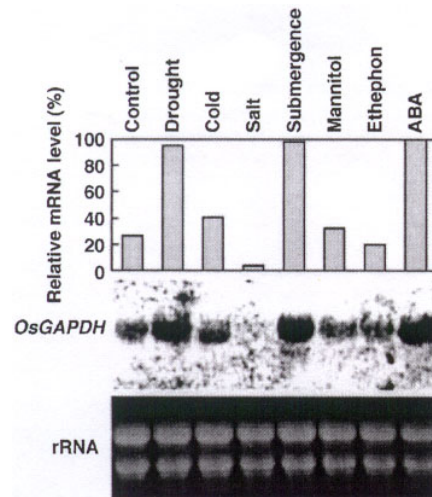
kDa) được quan sát khi *E. coli* có chứa pGEX-6P-3. Sự kích thích của tế bào *E. coli* chứa plasmid “pGST-OsGAPDH” bởi IPTG sẽ tạo ra hiện tượng tích tụ số lượng lớn protein có tính chất tái tổ hợp (83,2 kDa) (hình 4-10).

Tính chất hoạt động hay ức chế của một số họ gen khác nhau có thể tạo ra sự thể hiện khác nhau của một enzyme như glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase và pyruvate decarboxylase của cây bắp và cây *Arabidopsis thaliana* (Russell và Sachs 1989, Peschke và Sachs 1993, Yang và ctv. 1993).

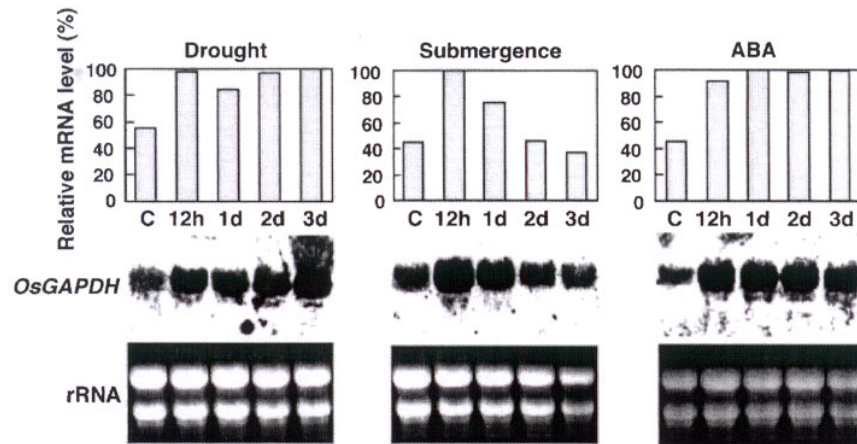
Di truyền tính chống chịu trong những trường hợp này là di truyền số lượng, do đó nó có thể tồn tại ở dạng một vài gen chủ lực và nhiều gen thứ yếu (polygenes). Mọi nỗ lực nhằm xác định vùng mục tiêu của *GAPDH* vô cùng cần thiết đối với tính trạng chống chịu ngập hoàn toàn và khô hạn (Arumugam Pillai và ctv. 2002).



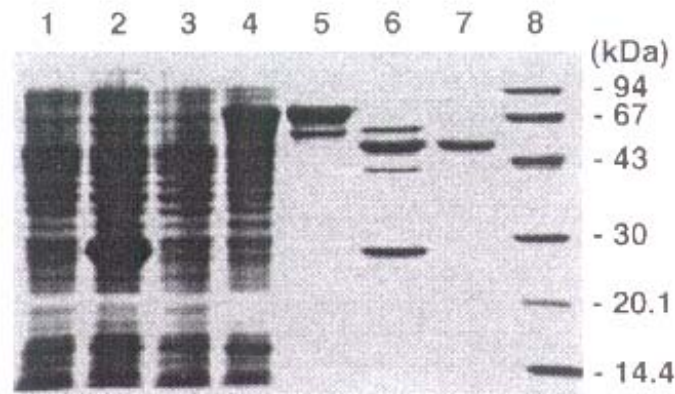
Hình 4-7: Phân tích Northern blot *OsGAPDH* mRNA của phân tử RNA (30 μ l / lane) ly trích từ bông lúa, lúa lúa, bẹ lá lúa, mắt lóng, lóng thân, và rễ lúa (Arumugam Pillai và ctv. 2002)



Hình 4-8: Ảnh hưởng của những nghiệm thức stress khác nhau và kích thích tố sinh trưởng biểu thị bằng mức độ thể hiện transcript (Arumugam Pillai và ctv. 2002)



Hình 4-9: Phân tích Northern sự thể hiện của gen *OsGAPDH* thông qua nghiệm thức khô hạn, ngập hoàn toàn và xử lý ABA (Arumugam Pillai và ctv. 2002)



Hình 4-10: Thể hiện protein dung hợp GST-OsGAPDH trong *E. coli*. Lane 1: protein tổng số DH5 α có chứa pGEX-6P-3, không chèn vào -IPTG. Lane 2: protein tổng số DH5 α có chứa pGEX-6P-3, không chèn vào +IPTG. Lane 3: protein tổng số DH5 α có chứa pGST-OsGAPDH trừ đi IPTG. Lane 4: protein tổng số DH5 α có chứa pGST-OsGAPDH cộng IPTG. Lane 5: protein dung hợp pGST-OsGAPDH tinh khiết bởi glutathione-Sepharose 4B trong sắc ký khí. Lane 6: protein tinh khiết pGST-OsGAPDH được phân cắt bởi PreScission Protease. Lane 7: protein tinh khiết OsGAPDH bởi tiến trình glutathione-Sepharose cột 4B. Lane 8: những marker phân tử: phosphorylase b 94 kDa, BSA 67 kDa, ovalbumin 43 kDa, carbonic anhydrase 30 kDa, trypsin inhibitor 20.1 kDa và lysozyme 14.4 kDa. Tất cả mẫu protein điện di trên 12% SDS-polyacrylamide gel, nhuộm màu Coomassive Brilliant Blue R250 (Arumugam Pillai và ctv. 2002)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alim A, and H Zaman. 1958. Effect of mechanical up rooting on the yield of deepwater aman paddy. *Agric. Pakistan* 9: 337-339
- Alim A, and JL Sen. 1955. Floating paddy in East Pakistan. *IRC newsletter*. 14 June: 13-14.
- Arumugam Pillai M, Z Lihuang, T Akiyama. 2002. Molecular cloning, characterization, expression and chromosomal location of *OsGAPDH*, a submergence responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 105:34-42
- Bachem CW, RS van der Hoeven, SM De Bruijn, D Vreugdenhil, M Zabeau, RG Visser. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9:745-753
- Bleecker AB, J Schuette, H Kende. 1987. An evaluation of 2,5-norbornadiene as a reversible inhibitor of ethylene action in deep water rice. *Plant Physiol* 84: 395-398
- Bùi chí Bửu. 1987. Nghiên cứu một vài đặc tính quan trọng của các giống lúa nước sâu địa phương ở đồng bằng sông Cửu Long. Luận án PTS Khoa Học Nông Nghiệp. Chuyên ngành Giống 4 01 05. Viện KHKTNN Việt Nam. 112 trang
- Chandraratna MP. 1964. Genetic and breeding of rice Longmans London. 389 p.
- Chang TT, JT Armenta-Soto, CX Mao, R Peiris, and C Loresto. 1985. Genetic studies on the components of drought resistance in rice (*Oryza sativa* L.) Paper presented at the ins. Rice Genetics symposium. 27-31 May 1985. IRRI. Los Banos, Philippines.
- Chang TT. 1979. Deepwater rice germplasm. Paper 35-37 in Proc. of the 1978 deepwater rice workshop. 17-19 Aug. 1978, Calcutta, India.
- Chang TT, AP Marciano, and GC Loresto. 1977. Morpho-agronomic variousness and economic potential of *Oryza glaberrima* and wild species in the genus *Oryza*. Paper 67-76 in IRATORSTOM meeting of African rice species, Paris, France.
- Chang TT, GC Loresto, and O Tagumpay. 1974. Screening rice germplasm for drought resistance. *SABRAO* 6: 9-16.
- Chang TT, EA Badernas. 1965. The morphology and varietal characters of the rice plant. *Tech. Bull.* 4, IRRI, Lobanos, Laguna, Philippines.
- Choudhury MA. 1975. Genetics and breeding of deepwater rice. Pages 83-86 in . Proceeding of the Int. Seminar on deepwater rice 1974. Bangladesh.
- De Datta SK, and B Banerji. 1972. Performance of flood resistance and deepwater rice in relation to growth and yield under different cultural practices. *Indian J. Agric. Sci.* 42 (8): 664-670.
- Duara BN. 1975. The deepwater rice of Aman State. Pages 55-60 in Proceeding of the international seminar on deepwater rice. Aug. 21-26, 1974. Dacca, Bangladesh
- Emes MJ, CP Wilkins, PA Smith, K Kurkanchanakul, K Hawker, WA Charlton, EG Cutter. 1988. Starch utilization by deep water rice during submergence. In; Proceedings of the 1987 International DeepWater Rice Workshop, 20-30 Oct, Bangkok, Thailand. IRRI, Philippines. Pp. 319-326
- Garrity DP. 1984. Rice Environments classification: A comparative review. Pages 11-26 in Terminology for rice growing environment. IRRI, Los Banos, Philippines.
- Gomosta AR, and BS Vergara. 1985. Factor effecting elongation of deepwater rice under submergence. Paper presented at the IRRI's Saturday seminar. Aug. 1985. IRRI 6 pages (mimeo)
- Gomosta AR. 1985. Factors affecting elongation of deep water rice under submergence. PhD Thesis, University of The Philippines at Los Banos, Laguna, Philippines, 290 pp.
- Hamanura K, and K Kupkanchanakul. 1979. Inheritance of floating ability in rice. *Jpn. J. Breed.* 29 (3): 211-216.
- Hamamura K, and P Saengpetch. 1977. Technique to distinguish floating rice from non-floating types in seedling stage. Pages 93-100 in proceeding of the 1976 int deepwater rice workshop 8-10. Nov. 1976, Bangkok, Thailand.
- Haque QA, D HilleRisLambers, NM Tepora, QD de la Cruz. 1989. Inheritance of submergence tolerance in rice. *Euphytica* 41: 247-251
- He P, SG Li, Q Qian, YQ Ma, JZ Li, WM Wang, Y Chen, LH Zhu. 1999. Genetic analysis of rice grain quality. *Theor Appl Genet* 98:502-508

- HilleRisLambers D, and DV Seshu. 1982. Some ideas on breeding procedures and requirement for deepwater rice improvement. Pages 29-44 in proceeding of the 1981 int deepwater rice workshop. IRRI, Los Banos, Philippines.
- HilleRisLambers D, and BS Vergara. 1982. Summary results of an international collaboration on screening method for flood tolerance. Pages 347-354 in proceeding of the 1981 int. deepwater rice workshop, IRRI, Los Banos, Philippines.
- HilleRisLambers D, C Setabutara, N Supapoj, K Kupkanchanakul and E Shuwisitkul. 1977. segregation for elongating ability in two crosses of floating rice with ordinary lowland rice. Pages 37-44 in proceeding of the 1976 int. deepwater rice workshop 8-10 Nov. 1976, Bangkok, Thailand.
- Ikehashi H. 1977. New procedure for breeding photoperiod - sensitive deepwater rice with rapid generation advance. Pages 45-54 in proceeding of the 1986 int. deepwater rice workshop. 8-10 Nov. 1976 Bangkok, Thailand.
- Inouye J, and VT Xuan. 1973. On the growth habits of floating single and double - Transplanting rice plants in South Vietnam. I. Mesocotyl elongation in darkness. *Jpn. J. Trop. Agric.* 17 (2): 75 - 80.
- IRRI. 1980. Standard evaluation system. The International Rice Research Institute, Los Banos Philippines.
- Jackson BR and BS Vergara. 1979. progress in deepwater rice research. Pages 3 - 12 in proceeding of the 1978 int. deepwater rice workshop, Aug. 17-19, 1978. Calentta, India.
- Jackson BR, D HilleRisLambers, and C Prechachat. 1982. Development of deepwater rice varieties and breeding materials for south and Southeast Asian countries. Pages 19-28 in proceeding of the 1981 int. deepwater rice workshop. IRRI Philippines.
- Kadam SS, J Singh, SL Mehta. 1973. Changes in isoenzymes in embryo and endosperm of normal and opaque-2 *Zea mays* during inhibition. *Phytochemistry* 12: 1221-1225
- Khan AA, R Thakur, M Akbar, D HilleRisLambers, DV Seshu. 1987. Relationship of ethylene production to elongation in deepwater rice. *Crop Sci* 27: 1188-1196
- Khush GS. 1984. Terminology for rice growing environments. Pages 5 -10 in Terminology for rice growing environments. IRRI, Philippines.
- Kihara H, TC Katayama, and K Tsunewaki. 1962. Floating habit of 10 strains of mild and cultivated rice. *Jpn. J. Genet.* 37: 1-9.
- Krishnayya GR, RM De, SB Lodh. 1990. Physiological basis for submergence tolerance in rice. *Oryza* 27:286-290
- Kosambi DD. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175
- Lander ES, D Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199
- Lander ES, P Green, J Barahamson, A Barlow, MJ Daly, SE Lincoln, L Newbury. 1987. Mapmarker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181
- Loresto GC, TT Chang, and C Tagumpay. 1976. Field evaluation and breeding for drought tolerance. *Philippines J. Crop Sci.* 1: 36-39.
- Maurya DM. 1975. Concept of flood and flood resistance in rice. Pages 170-177 in proceeding of the int. seminar on deepwater rice. Aug. 21-26.1974. Dacca, Bangladesh.
- Mazaredo AM and BS Vergara. 1982. Physiological differences in rice varieties tolerant of and susceptible to complete submergence. Page 327-342 in proceeding of the 1981 int. deepwater rice workshop. IRRI, Los Banos Philippines.
- Mazaredo AM and BS Vergara. 1977. Screening for rapid elongation ability in small water tank. In; Proceeding of the International Deepwater Rice Workshop, Bangkok, Thailand. IRRI, Los Banos, Philippines. Pp. 109-113
- Metraux JP, H Kende. 1984. The cellular basis of the elongation response in submerged deepwater rice. *Planta* 160:73-77
- Mishra SB. 1995. Genetics of submergence tolerance and elongation ability of flood-prone rice. Plant Breeding, Genetics and Biochemistry Division. IRRI, Philippines. 16 pp.

- Mohanty HK, GS Khush. 1985. Diallel analysis of submergence tolerance in rice, *Oryza sativa* L.. *Theo Appl Genet* 70:467-473
- Mohanty HK, B Suprihatno, GS Khush, WR Coffman, and BS Vergara. 1982. Inheritance of submergence tolerance in deepwater rice. In: *Proceeding of the 1981 int. deepwater rice workshop*. IRRI, Los Banos Philippines. pp121-134
- Morishima H. 1975. Floating ability as an adaptive character of rice and its measuring method. Pages 109-114 in *proceeding of the int. seminar on deepwater rice*. Aug 21-26, 1974, Dacca, Bangladesh.
- Morishima H, K Hinata, and HI Oka. 1962. Floating ability and drought resistance in wild and cultivated species of rice. *Indian J. Genetic Plant Breed*, 22:1-11.
- Mukherji DK, and SKB Roy. 1977. Genotypic adaptability of rice (*Oryza sativa* L.) and a suggested formula for measuring adaptation to water depths above 30cm. Pages 55-65 in *proceeding of the workshop on deepwater rice*, 8-10 Nov. 1976. Bangkok, Thailand.
- Murty KG, KK Nanda. 1974. Changes in peroxidase isoenzymes of *Phaseolus mungo* hypocotyl cutting rooting. *Phytochemistry* 13:1089-1093
- Nandi S, PK Subudhi, D Senadhira, NL Manigbas, S sen-Mandi, N Huang. 1997. Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol Gen Genet* 255: 1-8
- Nasiruddin M, A Wahale, and BA Dewan. 1982: Genetic of plant and internode elongation ability in rice. Pages 113-120 in *proceeding of the 1981 deepwater rice workshop* IRRI, Los Banos Philippines.
- Nasiruddin M, MS Ahmed, SNH Zanman, and E Haq. 1977. Effects of flooding on morphological characteristic of floating rice varieties of Bangladesh. Pages 67-74 in *proceeding of the workshop on deepwater rice*. 8-10 Nov. 1976. Bangkok Thailand.
- Oka HI. 1983. Conservation of the heterogeneous rice germplasm observation workshop. IRRI, Los Banos Philippines.
- Oka HI. 1975. Floating rice, an ecotype adapted to deepwater paddies - Review from the viewpoint of breeding. Pages 277-287. *from rice in Asia*. National Institute of genetics. Mishima, Japan.
- Padmanabhan SY. 1975. deepwater rice India and its improvement. Pages 51-54 in *proceeding of the int. seminar on deepwater rice*. Aug. 21-26, 1974. Dacca, Bangladesh.
- Peschke VM, MM Sachs. 1993. Multiple pyruvate decarboxylase genes in maize are induced by hypoxia. *Mol Gen Genet* 240:206-212
- Prechachat C, and BR Jackson. 1975. Floating and deepwater rice variation in Thailand. Pages 39-45 in *proceeding of the int. seminar on deepwater rice*, Aug. 21-26, 1974. Dacca, Bangladesh.
- Rai RSV, KS Murty. 1976. Effect of submergence on some physiological changes in rice seedlings. *Ind. J. Exp. Biol.* 14:369-370
- Rai RSV, KS Murty. 1979. Note on the effect of complete submergence of RVBP carboxylase activity on rice seedlings. *Indian J. Agric. Res.* 13: 61-63
- Ramiah K, and K Ramaswami. 1941. Floating habit in rice. *Indian J. Agric. Sci.* 11: 1-8.
- Raskin I, H Kende. 1984. Regulation of growth in stem sections of deepwater rice. *Planta* 160: 66-72
- Riccharia RH, and B Hisro. 1960. Flood and deepwater rices and future plan of their improvement. *Indian Agric.* 4: 135-143.
- Rowland LJ, JN Strommer. 1986. Anaerobic treatment of maize roots affects transcription of Adh1 and transcript stability. *Mol Cell Biol* 6:3368-3372
- Russell DA, MM Sachs. 1989. Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family. *Plant Cell* 1:793-803
- Sachs MM, M Freeling, R Okimoto. 1980. The anaerobic proteins of maize. *Cell* 20:761-767
- Sachs MM, CC Subbiah, IN Saab. 1996. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J Exp Bot* 47:1-15
- Saha Ray PK, D HilleRisLambers, NM Tepora. 1993. Combination of stem elongation ability with submergence tolerance in rice. *Euphytica* 68:11-16
- Saha Ray PK, D HilleRisLambers, NM Tepora. 1994. Genetics of stem elongation ability in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 74:137-141

- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, New York
- Sauter M, K Kende. 1992. Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188:362-368
- Sauter M, RW Seagull, H Kende. 1993. Internodal elongation and orientation of cellulose microfibrils and microtubules in deepwater rice. *Planta* 190:354-362
- Sauter M, SL Mekhedov, H Kende. 1995. Gibberellin promotes histone H₁ kinase activity and the expression of *cdc2* and cyclin genes during the induction of rapid growth in deepwater rice internodes. *The Plant Journal* 7:623-632
- Seshu DV. 1982. Multilocation screening for rice varietal traits relevant to deepwater culture. Pages 6-45-61 in proceeding of the 1981 international deepwater rice workshop. IRRI, Los Banos Philippines.
- Setter TL, MB Jackson, I Waters, I Wallace, H Greenway. 1988. Foodwater carbon dioxide and ethylene concentrations as factors in chlorosis development and reduced growth of completely submerged rice. In: Proceedings of the 1987 International Deepwater Rice Workshop, Bangkok, Thailand. IRRI, pp. 301-310
- Setter TL, I Waters, H Greenway, BJ Atwell, T Kupkanchanakul. 1987. Carbohydrates status of terrestrial plants during flooding. In: Crawford RMM (Ed.), *Plant Life in Aquatic and Amphibious Habitats*. British Ecological Society Symposium No. 5. Blackwell Scientific Publications, Oxford pp. 411-433
- Setter TL, E Ellis, EV Laureles, ES Ella, D Senadhira, SB Mishra, S Sarkarung, S Datta. 1997. Physiology and genetics of submergence tolerance in rice. *Annals of Botany* 79:67-77
- Sripongpankul K. 1998. Gene mapping and quantitative trait loci analysis of flood tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). PhD Thesis. University of The Philippines, Los Banos (UPLP), IRRI, Philippines. 137 P.
- Sugawara T, T Horikawa. 1971. Studies on the elongation of internodal elongation and nodal root development in the floating rice. *Plant Cell Physiol* 26:607-614
- Suge H. 1988. Physiological genetics of internode elongation in submerged deepwater rice. In: Proceedings of the International Deepwater Rice Workshop, Bangkok, Thailand. IRRI, Philippines. pp 245-259
- Supapoj N, C Setabutara, K Kupkanchanakul, and R Shuwisitkul. 1977. Segregation for elongation ability in two crosses of floating rice with ordinary lowland rice. Pages 29-36 in proceeding of the int. workshop on deepwater rice, 8-10 Nov. 1976. Bangkok Thailand.
- Suprihatno B. 1980. Inheritance of submergence tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) Ph.D. thesis, University of Philippines. Los Banos, Laguna, Philippines.
- Suprihatno B, WR Coffman. 1981. Inheritance of submergence tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *SABRAO* 13:98-108
- Swaminathan MS. 1979. International seminar on deepwater rice keynote address. In proceeding of the 1978 int. deepwater rice workshop. 17-19 Aug 1978.
- Thach TD. 1994. The genetic association between elongation ability and submergence tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). MSc Thesis, Central Luzon State University, Nueva Ecija, Philippines. 65 pp.
- Thakur R, D HilleRisLambers. 1988. Inheritance of elongation and submergence tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). In: Proceedings of the International Deepwater Rice Workshop, Bangkok, Thailand. IRRI pp.269-274
- Thakur R, D HilleRisLambers. 1989. Inheritance of plant elongation ability at seedling stage in rice. *Euphytica* 41:227-233
- Umeda M, H Uchimiya. 1994. Differential transcript levels of genes associated with glycolysis and alcohol fermentation in rice plants (*Oryza sativa* L.) under submergence stress. *Plant Physiol* 106:1015-1022
- Vartapetian BB, MB Jackson. 1997. Plant adaptations to anaerobic stress. *Ann Bot* 79(Suppl A): 3-20
- Vergara BS, and NN Dishit. 1982. Research strategies for rice areas with excess water. Pages 187-199 in *Rice Research strategies for the future*. IRRI, Los Banos Philippines.
- Vergara BS and A Mazaredo. 1979. Effect of presubmergence drought on internode elongation of deepwater rice. Pages 41-44 in proceeding of the 1978 int. deepwater rice workshop. 17-19 Aug. 1978, Calcutta, India.

- Vergara BS, B Jackson, and SK De Datta. 1976: Deepwater rice and its response to deepwater stress. Pages 321-346 in proceeding of the symposium on climate and rice. IRRI Sep. 24-27, 1974. Los Banos Philippines.
- Vergara BS and AM Mazaredo. 1975. Screening for resistance Aug. 21-26, 1974. Dacca, Bangladesh.
- Webster C, RL Gaut, KS Browning, JM Ravel, JKM Roberts. 1991. Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tip. J Biol Chem 266:23341-23346
- Xu K, DJ Mackill. 1995. RADP and RFLP mapping of a submergence tolerance locus in rice. Rice Genetics Newsletter 12: 244-245
- Yamada N. 1959. Physiological basis of resistance of rice plant against overhead flooding [in Japanese, English summary] Bull, National Institute Agricultural Science Ser. No. 9 110 P.
- Yamada N, and Y Ota. 1956. Varietal difference in resistance of rice plant to submersion under water [in Japanese, English summary]. Proceeding Crop Sci. Soc. Jpn. 24: 151-153.
- Yamada N, A Osada, and Y Ota. 1954. Changes of metabolism of rice plant under flooding (prelim, rep.). Proc. Crop Sci. Soc. Jpn. 22: 57-58.
- Yang Y, HB Kwon, HP Peng, MC Shih. 1993. Stress response and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. Plant Physiol 101:209-216

Chương 5

CƠ SỞ DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU ĐỘ ĐỘC NHÔM

Năng suất cây trồng trên đất acid, đất phèn bị ảnh hưởng rất đáng kể do nhiều yếu tố: (1) độ độc sắt, (2) độ độc nhôm, (3) độ pH thấp, (4) thiếu lân, v.v... Trong chương này, chúng ta đề cập đến tính trạng chống chịu độ độc nhôm của cây trồng trên đất chua (pH thấp), hoặc đất phèn (pH thấp, nhiều lưu huỳnh, như đồng bằng sông Cửu Long)

Độ độc nhôm được xem như yếu tố hạn chế chính đối với sự tăng trưởng của cây trồng (Kochian 1995). Người ta chưa biết nhiều về cơ chế chống chịu độ độc nhôm của cây trồng ở mức độ sinh học phân tử. Trong các loài mễ cốc, cây lúa mạch đen (rye) được xem như là cây có tính chống chịu độ độc nhôm tốt nhất. Aniol và Gustafson (1984) phát hiện tính chống chịu này ở cây lúa mạch đen, được điều khiển bởi những gen chủ lực định vị trên nhiễm sắc thể 3R và 6R, với những gen khác định vị trên nhiễm sắc thể 4R. Hai loci trội: *Alt1* trên nhiễm sắc thể số 6R và *Alt2* trên nhiễm sắc thể số 4R, đã được thiết lập bản đồ (Gallego và ctv. 1998, Miftahudin và ctv. 2002). Đối với lúa mì, tính trạng này được điều khiển bởi 2-3 gen trội hoặc đa gen (Aniol và Gustafson 1984). Người ta đã xác định được một gen chính *Atl_{BH}* điều khiển tính trạng chống chịu độ độc nhôm, định vị trên nhiễm sắc thể 4DL, đóng góp 85% biến thiên kiểu hình (Riede và Anderson 1996). Tang và ctv. (2000) đã thiết lập bản đồ một gen điều khiển tính chống chịu nhôm trên một nhánh vai của nhiễm sắc thể 4H của lúa mạch (barley), liên kết với marker *Xbcd117*, khoảng cách liên kết là 2,1 cM, liên kết với marker *Xwg464* và *Xcdo1395*, khoảng cách liên kết là 2,1 cM. Đối với cây bắp, nhiều phòng thí nghiệm cũng đã tiến hành nghiên cứu tính trạng chống chịu độ độc nhôm, họ ghi nhận tính trạng này do đa gen điều khiển (Magnavaca và ctv. 1987). Nghiên cứu tính trạng này trong cây lúa vẫn còn ít báo cáo. Sử dụng kỹ thuật phân tử, Wu và ctv. (2000) đã xác định được nhiều QTL có liên quan đến tính chống chịu nhôm, trong một quần thể cận giao ngẫu nhiên của tổ hợp lai IR1552 / Azucena. Nguyễn và ctv. (2001) đã phát hiện 5 QTL điều khiển tính chống chịu nhôm, định vị rải rác trên 5 nhiễm sắc thể, với một QTL chính thức định vị trên nhiễm sắc thể số 1. Nguyễn và ctv. (2002) tìm thấy 10 QTL định vị trên 9 nhiễm sắc thể điều khiển tính chống chịu nhôm, trên cơ sở quần thể lưỡng bội kép (DH) của tổ hợp lai CT9993 / IR62266. Những phát hiện này khẳng định rằng: tính chống chịu độ độc nhôm là một tính trạng phức tạp

Đối với cây lúa, trước đây, người ta nghĩ rằng rễ lúa trong đất acid phải tiếp xúc và bị ngộ độc bởi ion H^+ , nhưng hiện nay người ta cho rằng chính ion Al^{3+} là tác nhân (Coronel 1980, Thaworuwong và van Diét 1974). Trong các thí nghiệm của tác giả, với pH từ 3.5 - 5.0, không thấy ảnh hưởng độc hại rễ lúa nếu không có sự hiện diện của nhôm.

Chính sự phát triển của rễ lúa là chỉ tiêu quan sát dễ nhất ở các nồng độ gây độc hại của nhôm.

Thông thường, độ gây độc hại của nhôm không xuất hiện ở pH lớn hơn 5,5 (Mc Cart và Kaprath 1965), mà chỉ gây thiệt hại trầm trọng ở pH nhỏ hơn 5,0.

Kỹ thuật thanh lọc tính chống chịu độ độc nhôm trong môi trường dinh dưỡng có nhiều thuận lợi hơn thanh lọc ngay trên đất acid, bởi vì rất khó kiểm tra được nồng độ nhôm một cách chính xác trong đất (Froy 1974, Howeler và Cadavid 1976, Martinez 1976), chưa nói sự thay đổi pH làm ảnh hưởng đến dạng nhôm hoà tan và mức độ gây độc hại trong đất (Moore 1974).

Có 3 kỹ thuật thanh lọc nhôm trong môi trường dinh dưỡng: chiều dài rễ tuyệt đối, sự phục hồi sinh trưởng của rễ và nhuộm màu khi phản ứng với hematoxylin. Nhưng kỹ thuật đo chiều dài rễ tuyệt đối được áp dụng phổ biến nhất (Coronel 1980).

Sau khi có được chiều dài tuyệt đối (MRL), người ta còn dùng phép tính chiều dài rễ tương đối (RRL) để làm giảm bớt sự sai biệt về di truyền của sự sinh trưởng rễ lúa (Coronel 1980). Khái niệm về chiều dài tương đối (RRL) được xem như là tỷ số của chiều dài rễ ở 2 mức độ nhôm khác nhau.

$$RRL = \frac{\text{Chiều dài rễ ở nồng độ 30 ppm Al}}{\text{Chiều dài rễ ở nồng độ 0 ppm Al}}$$

Hiện tượng đầu tiên của cây trồng khi bị độ độc của nhôm là sự kéo dài của rễ bị ức chế. Rễ bị thương tổn trong điều kiện nồng độ nhôm cao, biểu hiện thông qua các triệu chứng như sau: ngắn, dày, sậm màu, giòn dễ gãy, ít đâm nhánh, chiều dài tổng số của rễ và thể tích rễ cây giảm rõ rệt.

Độ độc nhôm còn có thể ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của chồi thân, thông qua sự giới hạn di chuyển chất dinh dưỡng, và nước do hiện tượng hấp thu hoặc truyền dẫn quá kém

5-1. GIỐNG LÚA NƯỚC SÂU CHỐNG CHỊU ĐỘ ĐỘC NHÔM Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Hầu hết các vùng lúa nước sâu ở ĐBSCL là đất phèn, nồng độ sắt và nhôm cao, gây độc hại cho cây lúa ở giai đoạn mạ trước khi mưa ngập, đặc biệt trong điều kiện mưa thất thường (van Breeman 1978, Võ Tòng Xuân và ctv 1982).

Cây lúa chịu tác động của nhiều yếu tố cùng một lúc, chẳng hạn như sự thiếu lân, thừa sắt, nhôm và các hợp chất có chứa lưu huỳnh (S) trên đất phèn. Các biểu hiện về triệu chứng gây độc này rất phức tạp, vì sự tác động có tính chất tổng hợp của nó.

Tính chống chịu độ độc nhôm của các giống lúa nước sâu phổ biến ở ĐBSCL đã được phân tích.

Thí nghiệm được thực hiện tại IRRI, trong phytotron, nhiệt độ 29/21°C (ngày/đêm), ẩm độ tương đối 70%. Hàm lượng nhôm cho vào môi trường dinh dưỡng là 0 ppm và 30 ppm lấy từ dung dịch IM (AlCl₃, 6H₂O)

Sau khi có được chiều dài tuyệt đối (MRL), người ta còn dùng phép tính chiều dài tương đối (RRL) để làm giảm bớt sự sai biệt về di truyền của sự sinh trưởng rễ lúa (Coronel 1980).

Áp dụng phép thử chi bình phương về sự đồng nhất của phương sai (Gomez 1984), chúng tôi xếp nhóm những giống có tính chống chịu độ độc nhôm từ khá, trung bình đến nghiêm, so với giống đối kháng (bảng 1).

Bảng 1. Chiều dài rễ tuyệt đối của các giống kháng ở nồng độ 0 và 30ppm Al trong môi trường dinh dưỡng (Buu 1987).

Giống	Chiều dài rễ (cm)		RRL
	0ppm Al	30ppm Al	
Leb Mue Nahng	13.75±1.65	9.37±0.61	0.68
Tàu nút (Lúa giáng)	10.30±1.34	7.04±1.57	0.68
Ba sào	10.05±1.41	4.43±0.97	0.65
Khao Daeng	13.19±1.42	8.44±1.10	0.64
Habiganj Aman 1	13.78±0.95	8.81±0.39	0.64

Nàng phước	12.18±1.72	7.71±1.76	0.63
HTAFR 77022-14-157-6-1	10.83±1.91	6.78±0.38	0.63
Sa quay	10.93±1.47	6.85±1.33	0.63
IR 11185-RRR-88-2	11.36±1.63	7.13±1.09	0.63
Ba chúc	9.30±0.89	5.78±0.93	0.62
IAC3 (ĐC kháng)	20.36±2.41	16.51±2.71	0.81
IR45 (ĐC nhiễm)	14.84±1.3	6.11±1.76	0.41

RRL: chiều dài rễ tương đối (relative root length)

Ở bảng 1, các giống kháng có giá trị RRL đồng nhất ($\chi^2=0,416$, $p=0,50$). Giống Leb Mue Nahng 111 (LMN111), Habiganj Aman1, Khao Daeng và Ba sào đều được cả hai tiêu chuẩn về chiều dài tuyệt đối và tương đối. Các giống lúa nổi Ba sào (Đồng Tháp Mười), Nàng Phước (Tứ giác Long Xuyên) đều thể hiện tính kháng độ độc nhôm rất tốt. Giống Ba chúc và Tàu nút phổ biến ở vùng Tây Sông Hậu và Tứ Giác Long Xuyên cũng thể hiện tính kháng nhôm. Giống Sa quay thuộc nhóm lúa mùa sớm - phổ biến ở An Biên (Kiên Giang), trồng trên đất nhiễm mặn và than bùn, cũng được ghi nhận có tính kháng.

Khao Daeng - giống lúa nước sâu gạo đỏ của Thái Lan và giống lúa nổi LMN111 - trước đây được ghi nhận kháng nhôm rất khá (HilleRisLambers và Sittiyos 1985), cũng thể hiện kết quả tương tự trong thí nghiệm này.

Dòng lúa nước sâu triển vọng IR11185-RRR-8-2 từ tổ hợp lai IR2070-414-39/LMN111 được ghi nhận có tính kháng giống như LMN111.

39 dòng giống có giá trị RRL lớn hơn trung bình mẫu được liệt kê ở bảng 3 và được xếp nhóm theo sự đồng nhất về phương sai.

Mức độ phản ứng đối với nồng độ nhôm ở 30 ppm thể hiện rất rõ ($\chi^2=14.37$).

Không ghi nhận triệu chứng độc hại trên lá già.

Các giống lúa nổi Nàng tri, Nàng đùm nhỏ, Nàng đùm to (Đồng Tháp Mười), Nàng Tây, Nàng son (Tứ Giác Long Xuyên) có phản ứng hơi kháng.

Giống phổ biến trên vùng Tây Sông Hậu là Trắng Chùm, Trắng Lụa cũng có phản ứng hơi kháng.

Giống Trắng lùn, Lúa Thước phổ biến trên đất phèn bị nhiễm mặn cho thấy có phản ứng nhiễm.

Thực hiện cân trọng lượng khô bằng cách sấy mẫu trong tủ định ôn 150 °F trong 4 ngày. Cân riêng mẫu rễ lúa và mẫu chồi thân (Bảng 2)

Nhìn chung trọng lượng khô của chồi và rễ đều có xu hướng giảm ở nồng độ 30 ppm Al, nhưng kết quả không rõ ràng như quan sát chiều dài rễ.

Áp dụng khái niệm về chiều dài rễ tương đối (RRL) là phương pháp thanh lọc nhôm đơn giản và hiệu quả hơn hết. Trong thí nghiệm này, tương quan giữa RRL và chiều dài rễ tuyệt đối (MRL) rất chặt chẽ (hình 5-1)

$$r = 0,798 ** (n=107)$$

$$y = 0,039 x + 0,215$$

Hình 5-2 và 5-3 cho thấy, sự biến thiên của trọng lượng chất khô thường lớn hơn nhiều so với biến thiên về chiều dài. Do đó phương pháp đo chiều dài rễ để quan sát phản ứng chống chịu với độ độc nhôm có thể cho biết kết quả chính xác hơn cân trọng lượng khô.

Bảng 2: Trọng lượng khô của rễ và chồi của các giống kháng ở 2 nồng độ nhôm 0ppm và 30ppm (Buu 1987).

Giống	Trọng lượng rễ (mg/cây)		Trọng lượng chồi (mg/cây)	
	0ppm Al	30ppm Al	0ppm Al	30ppm Al
Leb Mue Nahng	22,2	20,2	53,2	48,5
Tàu nút (lúa giáng)	14,1	16,2	15,1	61,6
Ba sào	22,3	21,5	53,6	50,9
Khao Daeng	21,6	26,8	63,6	59,8
Habiganj Aman 1	20,9	16,5	55,5	40,8
Nàng phước	17,1	10,2	35,3	26,1
HTAFR 77022-14-157-6-1	13,0	15,3	30,4	38,0
Sa quay	21,6	18,0	65,7	51,5
IR 11185-RRR-88-2	16,4	18,1	38,5	43,4
Ba chúc	16,8	15,0	52,2	55,1
IAC3 (ĐC kháng)	28,6	27,3	53,2	59,4
IR45 (ĐC kháng)	30,5	17,3	56,7	39,5

Thí nghiệm nhuộm hematoxylin ở rễ lúa cũng khó so sánh và kết luận.

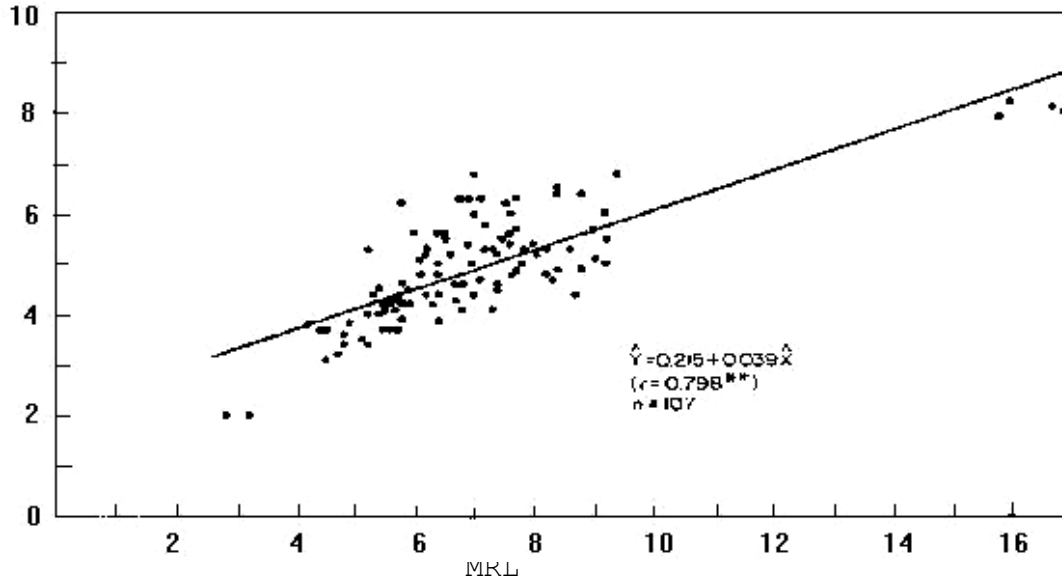
Cần tiếp tục thanh lọc và ghi nhận mức độ phổ biến của từng giống lúa trên những loại đất phèn khác nhau (*Sulfaquepts*), kết hợp với sự thanh lọc độ độc sắt để có những kết luận tiếp theo giúp cho sự bố trí cơ cấu giống hợp lý và xác định mục tiêu lai tạo phù hợp cho từng vùng.

Bảng 3a. Danh sách các dòng giống có RRL lớn hơn trung bình mẫu (Bửu 1987)

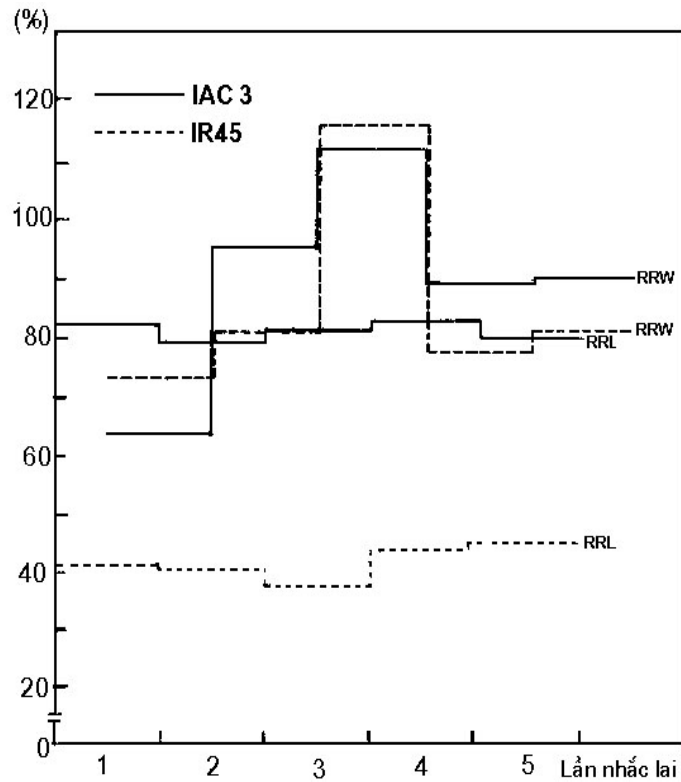
Hạng	Dòng giống	RRL	χ^2
1	Leb Mue Nahng 111	0.68	0.416
2	Tàu nút (lúa giáng)	0.68	
3	Ba sào	0.65	
4	Khao Daeng	0.64	
5	Habigan j Aman 1	0.64	
6	Nàng phước	0.63	
7	HTAFR 77022-14-157-6-1	0.63	
8	Sa quay	0.63	
9	IR1185-RRR-88-2	0.63	
10	Ba chúc	0.62	
11	Nàng đùm nhỏ	0.60	3.361
12	Nàng đùm to	0.60	
13	BGD4-7-3PE-1-12	0.60	
14	Nàng tây	0.60	
15	Habiganj Aman 8	0.58	
16	FR13A	0.57	
17	SPR7411-7-2-1	0.57	
18	Cù là	0.56	
19	Jhora	0.56	
20	Trắng lựu	0.56	
21	Nàng tây	0.56	
22	Nàng tri	0.55	
23	IR33277-1-507-1-13	0.55	4.193
24	IRRS 43/3	0.54	
25	BKN 6986-1	0.54	
26	IR5853-196-1-1	0.54	
27	Baisbish	0.53	
28	HKNPR 76010-108-2-0	0.53	
29	SPR 7294-136-2-4-1-0-8-2	0.53	
30	IR31086-12-1-3-3-1	0.53	
31	Khama	0.53	
32	Khao Dawk Mali 105	0.53	

33	Tàu nút	0.53
34	Huyết rồng D10	0.52
35	Nàng tây C	0.52
36	Nàng sen	0.52
37	IR28932-9-3-3	0.52
38	Trắng chùm	0.51
39	IR11288-B-B-69-1	0.51

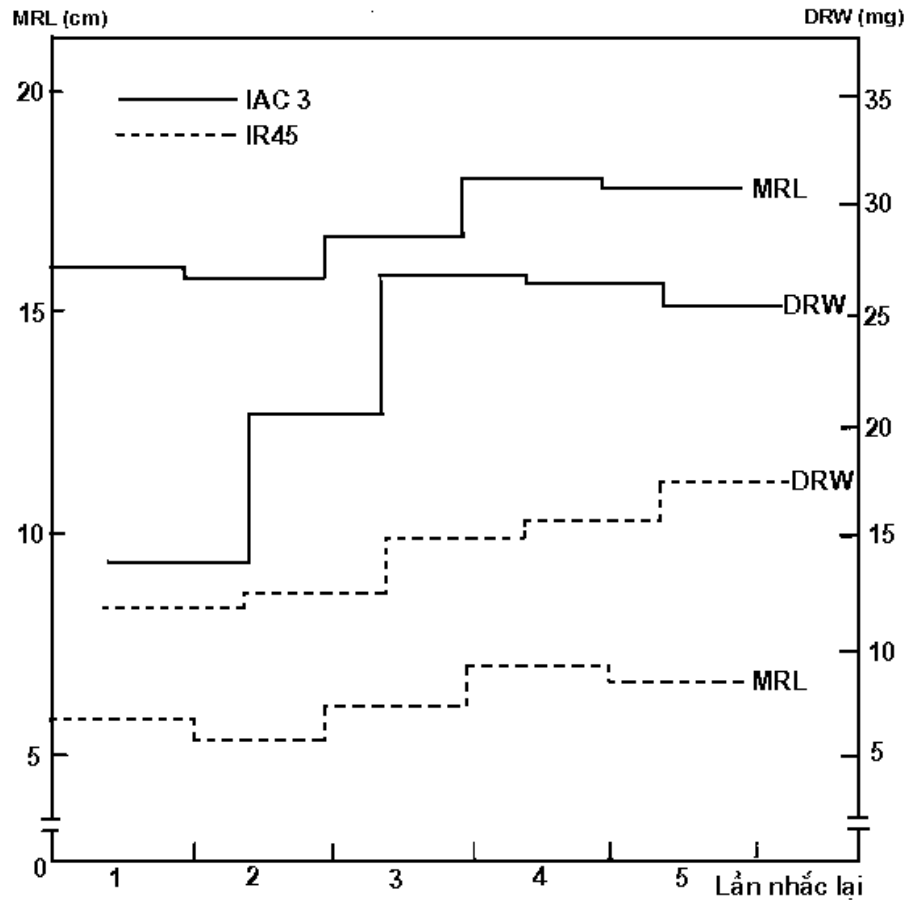
$$= 0.49^{**} \pm 0.02$$



Hình 5-1: Tương quan giữa chiều dài tuyệt đối (MRL) và chiều dài rỗ tương đối (Buu 1987)



Hình 5-2: Biến thiên chiều dài rỗ tương đối (RRL) và trọng lượng khô của rỗ tương đối (RRW) ở nồng độ 30ppm Al của 2 giống đối chứng (Bửu 1987)



Hình 5-3: Biến thiên chiều dài rễ tuyệt đối (MRL) và Trọng lượng rễ (DRW) ở nồng độ 30ppm Al của 2 giống đối chứng (Bửu 1987)

Bảng 3b: Kết quả thanh lọc nhôm bộ giống lúa được sưu tập từ nhiều quốc gia (Khatiwada và ctv. 1996), giá trị RRL được theo thứ tự từ cao xuống thấp.

Giống	Nguồn gốc	RRL (trung bình của 2 lần lặp lại)
Siyam Kuning	Indonesia	1.159
Gudabang Putih	"	1.135
Siyam	"	1.105
Lemo	"	1.088
Khao Deang	Thái Lan	1.083
Siyamhalus	Indonesia	1.059
Bjm-12	"	1.058
Ketan	"	1.056
Seribugangtang	"	1.050
Bater Raden Rati	"	1.047
Padi Kanji	"	1.043
Bjm-13	"	1.040
Batang Pane	"	1.039
Bjm-14	"	1.038
Cà Đưng đỏ	Việt Nam	1.037
Bjm-10	Indonesia	1.035
Padi Jambi	"	1.032
Gablak Cablak	"	0.956
Barito	"	0.944

Engatek	Malaysia	0.930
Bjm-15	Indonesia	0.928
Siyam Kuning	Indonesia	0.925
Quisidugo	“	0.922
Lúa Thước	Việt Nam	0.918
Gudabang Kuning	Indonesia	0.916
Bjm-17	“	0.903
Kutik Putih	“	0.902
Kapuas	“	0.886
Baiang 6	“	0.886
Pontianak	“	0.853
Nàng Côi	Việt Nam	0.850
Bayar Kuning	Indonesia	0.848
Bjm-11	“	0.845
Trắng Hòa Bình	Việt Nam	0.845
Alabio	Indonesia	0.807
Khao Seetha	Thái Lan	0.807
Gaw Diaw Bow	Indonesia	0.801
Khao Taeng	Thái Lan	0.800
Lúa Thước Cò	Việt Nam	0.794
Talang A	Indonesia	0.784
Mahakam	“	0.783
Galambong	“	0.773
Tài Nguyên	Việt Nam	0.768
Ketumbar	Indonesia	0.742
Thơm Rần	Việt nam	0.738
Talang B	Indonesia	0.729
Đuôi Trâu	Việt Nam	0.701
Cà Đung Phèn	“	0.700
Gogo Ranceh	Indonesia	0.698
Độc Phụng	Việt Nam	0.676
Nàng Gáo	“	0.671
Masirit	Indonesia	0.670
Kapus	“	0.622
Yaca	West Africa	0.661
S-1	“	0.659
Atanha	“	0.623
Nàng Co	Việt Nam	0.623
Thần Nông Đỏ	“	0.621
Pokkali	India	0.617
Sóc nâu	Việt Nam	0.587
Silla	West Africa	0.573
S-4	“	0.450
IRAT104 (chuẩn kháng)		0.828
IR1552 (chuẩn nhiễm)		0.572
CV %		12.50
LSD 0,05		0.213

5-2. XÁC ĐỊNH QTL ĐIỀU KHIỂN TÍNH CHỐNG CHỊU ĐỘ ĐỘC NHÔM

Bảy và ctv. (2003) đã sử dụng 171 dòng F_6 (dòng cận giao tái tổ hợp = RILs) được chọn một cách ngẫu nhiên từ 312 dòng của tổ hợp lai IR64 / *Oryza rufipogon* (acc. 106424). Mẫu giống lúa hoang *Oryza rufipogon* này được thu thập từ Tràm Chim (Đồng Tháp Mười), nơi được xác định là đất phèn nặng. Các dòng RIL được tạo ra thông qua phương pháp chọn lọc SSD (single seed descent) cho đến F_6 tại IRRI.

IR64 là giống lúa indica cho năng suất cao và phẩm chất gạo tốt, phát triển rộng khắp ở Châu Á, nhưng rất nhạy cảm với độ độc nhôm (Khatiwada và ctv. 1996). Lúa hoang *Oryza rufipogon* là loại hình đa niên, genome AA giống như bộ genome của lúa trồng IR64, chúng mọc hoang dại trong vùng đầm trũng, đất phèn ở Đồng Tháp Mười.

Bố mẹ và con lai được thanh lọc nhôm trong dung dịch dinh dưỡng Yoshida (Yoshida và ctv 1976). Nghiệm thức nhôm được thêm vào là 0 và 40 ppm Al (tương đương 1.48 mM), nhôm hoạt động Al^{3+} từ $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ở pH 4. Dung dịch dinh dưỡng được thay mỗi ngày, điều chỉnh pH 5. Khay thí nghiệm và cây mạ được giữ trong điều kiện phòng thí nghiệm có nhiệt độ 27 ± 2 °C, với 12 giờ sáng 300 PPF (photo proton flux density)

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 lần nhắc lại.

Chương trình MAPMARKER/EXP v.3.0 (Lander và ctv. 1987, Lincoln và ctv. 1992) được sử dụng để phân tích bản đồ liên kết gen, với hàm Kosambi (Kosambi 1944). Chương trình MAPMARKER/QTL version 1.1 được sử dụng để xác định các loci ảnh hưởng đến những tính trạng số lượng mục tiêu trên cơ sở phân tích bản đồ cách quãng (Paterson và ctv. 1988, Lincoln và ctv. 1992). Sử dụng LOD score = 2,4 làm ngưỡng chọn lọc sự hiện diện QTL trên cơ sở khoảng cách tổng số của bản đồ, và khoảng cách trung bình giữa những marker (Lander và Botstein 1989). Với ngưỡng này, một QTL có thể được phát hiện trong genome với xác suất tin cậy 0,05 (Paterson và ctv. 1988, Lander và Botstein 1989). Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi tất cả QTL thông qua mô hình phương trình đa tuyến trong MAPMARKER/QTL. Tương tác giữa những loci trên bản đồ được thể hiện bằng cách sử dụng QTLMapper version 1.0 (Wang và ctv. 1999)

Ba tính trạng mục tiêu được xem xét là

- Chiều dài rễ đối chứng: **CRL**
- Chiều dài rễ bị stress: **SRL**
- Chiều dài rễ tương đối: **RRL**

Phân tích ANOVA để phát hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa bố mẹ với con lai dòng cận giao tái tổ hợp được trình bày ở bảng 4

Bảng 4: Thông số của 3 tính trạng được ghi nhận trên bố mẹ và 154 dòng con lai RIL, 4 lần lặp lại (Bảy và ctv. 2003)

Tính trạng	Min.	Max.	Trung bình	CV (%)	LSD _{0,01}
CRL					
IR64	-	-	11,30**	-	-
<i>O. rufipogon</i>	-	-	7,10**	-	-
RILs	4,48	19,28	9,98**	11,12	2,02
SRL					
IR64	-	-	2,56**	-	-
<i>O. rufipogon</i>	-	-	5,50**	-	-
RILs	1,76	9,83	3,99	16,18	1,18
RRL					
IR64	-	-	0,20**	-	-
<i>O. rufipogon</i>	-	-	0,77**	-	-
RILs	0,18	0,88	0,41	18,93	14,30

5-2-1. Điều tra đa hình trong bố mẹ

Sử dụng 5 enzyme *EcoRI*, *EcoRV*, *DraI*, *HindIII* và *XbaI* để phân cắt hạn chế genome của bố mẹ. Sử dụng 400 RFLP marker của Đại Học Cornell và của chương trình RGP (Nhật) trong nghiên cứu đa hình. Kết quả có 274 probe (65,9%) thể hiện đa hình. Mức độ đa hình thể hiện tương ứng với các enzyme *EcoRI* (14,0%), *EcoRV* (12,5%), *DraI* (19,8%), *HindIII* (27,7%) và *XbaI* (19,5%)

Trong 168 SSR marker được sử dụng, có 112 marker (66,7%) thể hiện đa hình.

Tác giả xem xét 13 gen ứng cử viên điều khiển tính chống chịu độ độc nhôm theo nguồn số liệu GenBank, trong đó có 4 gen (30,8%) được tìm thấy biểu hiện đa hình giữa bố và mẹ

5-2-2. Phân ly và thiết lập bản đồ

Đa hình được xem xét trên cơ sở 238 marker rất rõ ràng trong bố mẹ, từ đó chúng được sử dụng để điều tra trên quần thể con lai. Tác giả đã thiết lập bản đồ với 151 marker loci và phân tích QTL trong dòng con lai cận giao tái tổ hợp (RIL). Hầu hết những marker này để thể hiện bằng lai đơn, trừ RG788 có hai copy. Marker này được đánh dấu là “suffix A và B”. Những alen không rõ nguồn gốc, không phải của bố mẹ (hoàn toàn mất tín hiệu) được tìm thấy trong quần thể RIL này là 7,3%. Trường hợp như vậy được xử lý như trường hợp thiếu số liệu. Phân ly của 151 marker trong bản đồ liên kết gen được trắc nghiệm thông qua phép thử Chi bình phương. Kết quả cho thấy hầu hết (122 marker) phân bố theo lý thuyết Mendel 1:1, chiếm 80,7% tổng số. Hầu hết marker (118 marker) thiên lệch về IR64, 4 marker lệch về *Oryza rufipogon*, và 29 loci có ít nhất 50% alen thuộc về *Oryza rufipogon*. Mức độ lệch này (skewness) trong quần thể RIL [60% nghiêng về alen IR64, 40% nghiêng về alen lúa hoang] đã gây ảnh hưởng đến khả năng thiết lập bản đồ marker *de novo* trên cơ sở số liệu phân ly của những dòng RIL (Bảy và ctv. 2003)

Bảng 5: Những QTL giả định trong trường hợp 3 tình trạng CRL, SRL và RRL (Bây và ctv. 2003)

Tình trạng	QTL	Quãng	Nhiễm thể	Chiều dài (cM)	Khoảng cách với marker đầu tiên (cM)	Ảnh hưởng cộng	LOD	R ² (%) [a]
CRL	<i>QAlCr12.1</i>	RG341-RZ397	12	8,9	4,0	1,834(I)	2,8	10,3
SRL	<i>QAlSr2.1</i>	RG139-RG324	2	11,6	8,0	3,235(O)	2,9	26,4
	<i>QAlSr3.1</i>	CDO1395-RG391	3	0,5	0,0	1,478(O)	6,2	18,7
	<i>QAlSr8.1</i>	RG28-RM233	8	31,0	18,0	1,915(O)	3,1	20,8
Mô hình QTL tối hảo							45,6	
RRL	<i>QAlRr1.1</i>	RG406-RZ252	1	6,5	6,0	0,100(O)	2,4	9,0
	<i>QAlRr3.1</i>	CDO1395-RG391	3	0,6	0,0	0,167(O)	8,3	24,9
	<i>QAlRr7.1</i>	RZ629-RG650	7	29,8	18,0	0,126(O)	5,4	22,5
	<i>QAlRr8.1</i>	RG28-RM223	8	31,0	18,0	0,104(O)	2,5	20,8
	<i>QAlRr9.1</i>	RM201-WAL17	9	10,0	8,0	0,109(O)	2,6	9,9
Mô hình QTL tối hảo [b]								70,8

(I): IR64, (O): *Oryza rufipogon*

[a] biến thiên kiểu hình được giải thích bởi từng QTL riêng biệt

[b] biến thiên kiểu hình được giải thích bởi tất cả QTL

Chiến lược thiết kế một bản đồ liên kết gen từ quần thể có tính chất nghiêng lệch như vậy (skewness) đã được Wang và ctv. (1994) đề xuất. Trước tiên, những marker này cùng thuộc về nhóm liên kết đã được xác định trên cơ sở bản đồ có mật độ cao về liên kết di truyền trong cây lúa (Causse và ctv. 1994, Harushima và ctv. 1998, Temnykh và ctv. 2001). Sau đó, tỉ lệ tái tổ hợp, vị trí thứ tự trên nhiễm sắc thể được xác định bằng lệnh “Three Point” và “First Order” trong phần mềm chương trình máy tính, ở LOD = 3,0 trên cơ sở số liệu của quần thể RIL. Đối với những marker mà vị trí của nó chưa được biết rõ, chúng ta phải dùng phương pháp phân tích hai điểm với LOD 10-12 để tìm thấy nhóm liên kết của chúng. Câu lệnh “Try” được sử dụng đối với những marker không liên kết (unlinked).

Kết quả phân tích cho thấy, 151 marker loci phân ra thành 13 nhóm liên kết (riêng nhiễm thể số 1 có hai nhóm liên kết). Các nhiễm sắc thể được định hướng theo nhánh vai ngắn nằm phía trên của vị trí tâm động (Singh và ctv. 1996). Thứ tự của marker trên bản đồ được xếp theo nguyên tắc thống nhất của Đại Học Cornell (Causse và ctv. 1994, Temnykh và ctv. 2001), của chương trình genome cây lúa (RGP) tại Nhật (Harushima và ctv. 1998), và bản đồ cây lúa được phát triển từ quần thể *O. sativa x O. rufipogon* (Xiong và ctv. 1997, Xiao và ctv. 1998).

Tổng chiều dài bản đồ là 1.755 cM, khoảng cách trung bình giữa hai marker là 11,6 cM (hình 5-4)

Nhiễm sắc thể số 10 có số marker thể hiện ít nhất. Cho dù 12 SSR và 20 RFLP định vị trên nhiễm thể này, nhưng chỉ có 6 marker được thiết lập trên bản đồ. Sự thể hiện đa hình kém trên nhiễm thể số 10 cho thấy: ở một vài vùng của genome giống lúa trồng và lúa hoang có thể biểu hiện khá phổ biến hiện tượng suy giảm (descent), hoặc *O. rufipogon* đóng vai trò dẫn xuất của con lai (derivative) tạo ra trạng thái gần gũi về huyết thống (proximity) của loài hoang dại mọc ở đồng ruộng của nông dân trồng lúa Châu Á (thí dụ hiện tượng lúa cổ)

5-2-3. Bản đồ QTL

Tác giả xác định 9 QTL với giá trị LOD 2,4 đã được phân lập đối với 3 tính trạng mục tiêu (bảng 5). Những QTL giả định này được ghi nhận với nhiễm sắc thể mà nó định vị, giá trị LOD, phần trăm biến thiên kiểu hình được giải thích, ảnh hưởng cộng (additive effect). Số QTL điều khiển tính trạng thay đổi từ 1 QTL đối với **CRL** cho đến 5 QTL đối với **RRL**. Biến thiên kiểu hình cũng thay đổi từ 9,0% đến 26,4%. Vị trí của những QTL được xem xét trên hình 5-4

Tính trạng chiều dài rễ đối chứng (CRL): chỉ có 1 QTL, đó là *QALCr12.1*, định vị trên nhiễm thể số 12, hai marker kế cận của nó là RG341 và RZ397, điều khiển tính trạng chiều dài rễ trong điều kiện không có stress do nhôm. QTL này giải thích 10,3% biến thiên kiểu hình với 1 alen (chiều dài rễ dài hơn) từ giống lúa IR64. Sự gia tăng của chiều dài rễ do alen này là 1,83cm

Tính trạng chiều dài rễ bị stress do nhôm (SRL): có 3 QTL ảnh hưởng, được tìm thấy trên nhiễm thể số 2, 3 và 8. Đó là *QALSr2.1* định vị trên nhiễm thể số 2, hai marker kế cận là RG139 và RG324, nó có giá trị R^2 cao nhất (26,4%). Tiếp theo sau đó là *QALSr8.1*, hai marker kế cận là RG28 và RM223, trên nhiễm thể số 8 (20,8%). Và cuối cùng là *QALSr3.1*, hai marker kế cận là CDO1395 và RG391, trên nhiễm thể số 3 (18,2%). Những QTL này đóng góp 45,5% biến thiên kiểu hình. Ở đây *Oryza rufipogon* có những alen ưu thế về tính trạng chiều dài rễ trong cả 3 QTL nói trên. Ảnh hưởng allelic thay đổi từ 1,46 cm (*QALSr3.1*) đến 3,24 cm (*QALSr2.1*)

Tính trạng chiều dài rễ tương đối (RRL): có 4 QTL ảnh hưởng, được tìm thấy trên nhiễm thể số 1, 3, 7 và 8. Đó là *QALRr1.1* định vị trên nhiễm thể số 1, hai marker kế cận là RG406 và RZ252, nó có giá trị R^2 là 9,0%). Kế đến là *QALRr3.1*, hai marker kế cận là CDO1395 và RG391, trên nhiễm thể số 3 (24,9% cao nhất). Tiếp theo sau đó là *QALRr7.1*, hai marker kế cận là RZ629 và RG650, trên nhiễm thể số 7 (22,5%). *QALRr8.1*, hai marker kế cận là RG28 và RM233, trên nhiễm thể số 8 (20,8%). Và cuối cùng là *QALRr9.1*, hai marker kế cận là RM201 và WALI7, trên nhiễm thể số 9 (9,9%).

Tổng số QTL trong mô hình giả định như vậy đã giải thích được 70,8% biến thiên kiểu hình. Ảnh hưởng của alen thay đổi từ 10,0% (*QALRr1.1*) đến 16,7% (*QALRr3.1*) (Bảy và ctv. 2003)

5-2-4. Phân tích epistasis

Hiện tượng epistasis là thành phần quan trọng của di truyền đối với những tính trạng phức tạp như tính chống chịu độ độc nhôm. Tương tác giữa QTL và những loci cải biến có thể được xem như một dạng chính của epistasis đối với các tính trạng số lượng (Yu và ctv. 1997). Phân tích epistasis giữa các loci trên bản đồ của 3 tính trạng chính được thể hiện ở bảng 6, nhờ phần mềm QTLMapper version 1.0 (Bảy và ctv. 2003)

Bảng 6: Phân tích epistasis đối với những loci của gen điều khiển tính trạng chiều dài rễ đối chứng (CRL), chiều dài rễ bị xử lý (SRL), và chiều dài rễ tương đối (RRL) trong quần thể RIL của tổ hợp lai IR64 x *Oryza rufipogon* (Bảy và ctv. 2003)

Tính trạng	Nhiễm sắc thể	Quãng giữa 2 marker (i)	Nhiễm sắc thể	Quãng giữa 2 marker (j)	A(i)	A(j)	AA(ij)	LOD
CRL	2	RM233-RM203	5	RM249-RM164	0,03	0,18	1,39**	2,84
	4	S2486-RZ590	12	RM17-RG901	0,43	0,29	1,19**	3,11
	6	Rali33-RG172	12	RM17-RG901	0,18	0,53	1,60**	4,16
	7	RZ509-RM2	9	Wali7-RZ404	0,18	0,32	1,92**	3,82
				R^2 (%)	0,00	0,00	51,21	
SRL	3	S1845-CDO1395	6	RG653-RZ828	1,00**	0,10	0,39	5,20
				R^2 (%)	22,84	0,00	0,00	
RRL	1	RM1-RM283	3	CDO1395-RG391	0,030	0,112	0,033	7,73

	4	Rali26-RG788B	5	RM249-RM164	0,024	0,065**	0,006	3,34
	9	RM201-Wali7	12	RG543-RG341	0,029	0,036**	0,060	3,35
				R ² (%)	0,000	36,59	0,000	

Dấu * và ** biểu thị mức độ ý nghĩa 0,05 và 0,01, theo thứ tự

A(i): ảnh hưởng allelic ở site (i)

A(j): ảnh hưởng allelic ở site (j)

AA(ij): tương tác không alen giữa site (i) và site (j)

R²(%): biểu thị mức độ kiểu hình được giải thích ở site (i), site (j) và ảnh hưởng epistatic (ij)

Khi xem xét tính trạng chiều dài rễ trong điều kiện có xử lý nhôm, trên nhiễm sắc thể số 3, quãng giữa hai marker S1845-CDO1395 có một tương tác với khu vực được xác định bởi RG653-RZ828 (trên nhiễm thể số 6). Ảnh hưởng allelic tại site (i) rất có ý nghĩa về thống kê và được giải thích 22,8% kiểu hình thể hiện ra. Tuy nhiên, ảnh hưởng allelic ở site (j) và ảnh hưởng tương tác không alen giữa site (i) và site (j) không biểu thị mức độ ý nghĩa rõ ràng, và không có ảnh hưởng đến biến thiên kiểu hình (bảng 6). Chiều dài rễ trong điều kiện bình thường, chỉ có một QTL định vị trên nhiễm thể số 12 điều khiển trong giống IR64. Tuy nhiên, bốn cặp loci có tính chất epistatic đã được ghi nhận với mức độ có ý nghĩa cao. Ảnh hưởng chính của những loci này không biểu hiện biến thiên về kiểu hình, nhưng nó biểu hiện ở hiện tượng tương tác không alen với nhau, với R²=51,2%. Kết quả này cũng được công bố bởi Zhang và ctv. (2001).

Khi xem xét tính trạng chiều dài rễ tương đối, tác giả tìm thấy 6 khu vực khác nhau trên nhiễm sắc thể (1, 3, 4, 5, 9, và 12) biểu thị tương tác với nhau. Ảnh hưởng allelic ở site (j) được ghi nhận rất có ý nghĩa, với 36,59% kiểu hình được giải thích bởi QTL. Ảnh hưởng allelic ở site (i) và ảnh hưởng epistasis không có ý nghĩa thống kê, và R² cũng bằng 0 (bảng 6). Khu vực *QAlRr3.1* định vị trên nhiễm thể số 3 có tương tác không alen với khu vực RM1-RM283 trên nhiễm thể số 1, cho dù tương tác này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Khu vực *QAlRr9.1* định vị trên nhiễm thể số 9 tương tác với khu vực RG543-RG341 trên nhiễm thể số 12, cho kết quả không có ý nghĩa về mặt thống kê. Trong một quần thể mapping khác, Wu và ctv. (2000) đã tìm thấy 3 cặp loci tương tác theo kiểu epistasis, với biến thiên kiểu được giải thích khoảng 20% đối với tính trạng chiều dài rễ tương đối, trong khi kết quả này (IR64 x *O. rufipogon*) cho thấy epistasis không có ý nghĩa (R²=0,00). Phân tích epistasis cho thấy tính chống chịu độ độc nhôm ở giai đoạn cây mạ được điều khiển bởi ưu thế của hoạt động gen cộng tính, giống như cây lúa mì (Bona và ctv. 1994) và cây bắp (Lima và ctv. 1995). Kết quả phân tích QTL và epistasis cho thấy kiểu gen có năng suất cao như IR64 có thể kết hợp với nguồn cho gen chống chịu độ độc nhôm của *Oryza rufipogon*, làm tăng cường tính chống chịu của IR64 thông qua biểu hiện kiểu hình của con lai. Trong việc khai thác chiến lược MAS (marker-assisted selection), QTL chính liên kết với CDO1395 định vị trên nhiễm thể số 3 có thể được xem như ứng cử viên để áp dụng việc chọn con lai có gen chống chịu độ độc nhôm (Bảy và ctv. 2003)

Chiều dài rễ tương đối (RRL) là một thông tin vô cùng quan trọng, liên quan trực tiếp đến tính chống chịu nhôm của cây lúa. Do đó, QTL điều khiển tính trạng RRL được sử dụng để so sánh với những tư liệu tham khảo có liên quan. Có 5 QTL điều khiển tính trạng RRL đã được công bố trong một quần thể mapping khác. Khu vực *QAlRr.1* (R²=9,0%) định vị trên nhiễm thể số 1, được tìm thấy tương tự như vậy ở quần thể IR1522 x Azucena (Wu và ctv. 2000), CT9993 x IR62266 (Nguyễn và ctv. 2002), OM269 x Chiêm bầu (Nguyễn và ctv. 2001) (Hình 5-5)

Khu vực *QAlRr9.1* định vị trên nhiễm thể số 9, được tìm thấy tương tự như vậy trên quần thể IR1552 x Azucena (Wu và ctv. 2000), CT9993 x IR62266 (Nguyễn và ctv. 2002) (Hình 5-5)

Nhằm xác định những QTL chung cho lúa và loài mễ cốc khác, Bảy và ctv. (2003) đã so sánh với kết quả được công bố trên lúa mì (Riedle và Anderson 1996), trên cây lúa mạch

đen “rye” (Miftahudin và ctv. 2002), cây bắp (Sibov và ctv. 1998), và cây lúa mạch (barley) (Tang và ctv. 2000), trên cơ sở sử dụng bản đồ so sánh (Ahn và Tanksley 1993), Gale và Devos 1998) và trên cơ sở sử dụng một bộ “RFLP probe” có tính chất so sánh của Đại Học Cornell. Phân tích này cho thấy khu vực *QALRr3.1* có ảnh hưởng kiểu hình lớn nhất được giải thích bởi QTL ($R^2=24,9\%$) trong quần thể IR64 x *Oryza rufipogon*, và chúng có ảnh hưởng khá thấp ($R^2=9\%$) trong quần thể IR1552 x Azucena (Wu và ctv. 2000), định vị trên nhiễm thể số 3, tương đồng với gen điều khiển chống chịu độ độc nhôm thuộc nhóm số 4 của Triticeae (hình 5-6)

5-2-5. Ứng dụng marker trong chọn giống chống chịu và gen ứng cử viên

Những marker phân tử liên kết chặt chẽ với những QTL sẽ vô cùng hữu ích cho nhà chọn giống trong chiến lược MAS, để chúng ta có thể chọn lọc cá thể mong muốn ở những thế hệ đầu tiên. Nhiễm sắc thể số 1 đã được các nhà khoa học Nhật thực hiện kỹ thuật đọc trình tự (sequencing), với 418 BAC clone, trong đó 353 clone đã được đọc xong vào tháng Tư năm 2002. Họ sử dụng bản đồ tổng hợp (integrated genetic map) và tìm ra RG406, một trong những marker liên kết với QTL ở nhiễm thể này (*QALRr1.1*), với khoảng cách di truyền là 0,3 cM. Marker này được neo bởi BAC clone ký hiệu là OSJNBa0014K08f trên contig số 20 thuộc bản đồ vật lý cây lúa “Clemson”. Chuỗi ký tự của BAC đã được gửi đi để phân tích gen mục tiêu theo chương trình “rice genome” tại Nhật Bản. Không có trình tự nào liên quan đến cơ chế loại trừ acid hữu cơ được tìm thấy trong BAC.

Đối với *QALRr9.1*, người ta tìm thấy trong CT9993 là giống có tính chống chịu độ độc nhôm mạnh nhất (Nguyễn và ctv. 2000). Một QTL chủ lực khác điều khiển tính chống chịu nhôm được tìm thấy trong CT9993 x IR62266 ($R^2=28,7\%$), định vị trên nhiễm thể số 8 liên kết với hai marker kế cận là C1121 và M53. Một trong những QTL chủ lực được xác định trong nghiên cứu của Bảy và ctv. (2003) cũng được tìm thấy trên nhiễm thể số 8 ($R^2=20,8\%$), liên kết với RG28 và RZ650. Theo kết quả bản đồ tổng hợp của “Japanese Oryzabase”, marker C1121 cách khoảng với marker RG333 là 27,7 cM, và giữa hai marker RG28 với RG333 là 21,8 cM. Điều này cho thấy, những QTL này định vị trên cùng một vùng của nhiễm sắc thể. Như vậy QTL này có thể được xem là một trong hai quần thể có nền tảng di truyền khác nhau.

QTL có ảnh hưởng lớn nhất là *QALRr3.1* ($R^2=22,9\%$) trong quần thể IR64 x *Oryza rufipogon*, nhưng một QTL có ảnh hưởng nhỏ hơn ($R^2=9,0\%$) trong quần thể IR1552 x Azucena đều cùng định vị trên nhiễm sắc thể số 3. Xét theo hiện tượng “synteny” trong chương mở đầu, chúng tương đồng với chromosome thuộc nhóm số 4 của Triticeae (Gale và Devos 1998). Những công bố trước đó khẳng định rằng có một vùng genome được bảo tồn trên vai nhánh dài của nhiễm thể tương đồng số 4 điều khiển tính chống chịu nhôm trong cây lúa mì (*Alt_{BH}*), trong cây rye (*Alt3*), trong cây lúa mạch (*Alp*) (Miftahudin và ctv. 2002). Gen điều khiển tính chống chịu độ độc nhôm trong lúa mì và “rye” liên kết khá chặt với marker BCD1230, và liên kết không chặt chẽ lắm với CDO1395, nhưng riêng cây lúa mạch, gen này liên kết rất chặt với CDO1395. Như vậy, điều này gợi ra một ý tưởng rằng *Alt_{BH}*, *Alt3* và *Alp* là những gen có loci tương đồng (orthologous loci) vì mức độ cao của hiện tượng “synteny” giữa những nhiễm sắc thể 4DL, 4RL, và 4HL. Chúng có thể cùng chia sẻ một chức năng chung. Một trong những cơ chế chống chịu trong Triticeae là cơ chế loại thải nhôm (Al exclusion) (Kochian 1995). Cơ chế này được trung gian bởi tiến trình phóng thích nhôm hoạt động từ acid hữu cơ (chủ yếu là malic acid), acid hữu cơ giữ chặt Al^{+++} theo dạng “chelate” trong vùng rễ và ngăn cản nhôm xâm nhập vào đỉnh rễ lúa. Minh chứng về hiện tượng sinh lý học này đã được giải thích rất rõ ràng nhờ những loci tương đồng điều khiển tính trạng chống chịu nhôm trong Triticeae.

QTL chủ lực điều khiển tính chống chịu nhôm được ghi nhận trên nhiễm sắc thể số 3 biểu hiện sự tương đồng với các gen điều khiển tính chống chịu nhôm thuộc nhóm số 4 của Triticeae. Nhưng sự biểu hiện về mặt sinh lý thực vật của tính chống chịu này rất thiếu trong

cây lúa so với các cây trong nhóm Triticeae. Đánh giá kiểu hình những cây bố mẹ cho thấy *Oryza rufipogon* có khả năng chống chịu nhôm cao nhất so với các giống thuộc *Oryza sativa*.

Bây và ctv. (2003) đã cố gắng tìm những gen ứng cử viên liên quan đến tính chống chịu nhôm trên nhiễm sắc thể số 3 trên cơ sở số liệu sau khi đọc trình tự (sequencing). Trong 160 BAC clone phân lập từ nhiễm sắc thể số 3, chỉ có 53 clone được xác định trình tự chuỗi mã. Điều không may mắn trong nghiên cứu này là: hầu hết những clone này định vị trên nhánh vai dài của nhiễm sắc thể, trong khi gen điều khiển tính chống chịu nhôm được xác định trên nhánh vai ngắn. Tuy nhiên, người ta rất cần phải thực hiện một sự kết nối rất tốt giữa bản đồ di truyền và bản đồ vật lý để tìm hiểu những gen ứng cử viên như vậy trên nhiễm sắc thể số 3. Chuỗi mã di truyền của bản đồ gen cây lúa đã được công bố (Goff và ctv. 2002, Yu và ctv. 2002) là điều kiện vô cùng thuận lợi.

5-2-6. Tạo ra clone của những QTL điều khiển tính chống chịu nhôm từ lúa hoang

Những QTL được xác định trong genome của *Oryza rufipogon* là những ứng cử viên đầy tiềm năng đối với việc phát triển các dòng gần như đẳng gen (NILs) để cloning các gen điều khiển tính chống chịu nhôm trong cây lúa. Những QTL chủ lực trên nhiễm sắc thể số 3 sẽ được chú ý trước tiên. Chúng giải thích khoảng 25% biến thiên kiểu hình và biểu hiện tương đồng với những gen chống chịu nhôm thuộc nhóm số 4 của Triticeae

QAlRr1.1 trên nhiễm sắc thể số 1 có ảnh hưởng rất thấp (9,0%) đối với biến thiên kiểu hình. Tuy nhiên, khu vực của chúng biểu hiện một cách ổn định với một QTL đã được phát hiện từ những công trình nghiên cứu trước đây thuộc 3 quần thể mapping khác.

QAlRr7.1 trên nhiễm sắc thể số 7 có ảnh hưởng lớn đứng hàng thứ hai (22,5%) đối với biến thiên kiểu hình. Hiện nó tạm thời là QTL duy nhất trong quần thể mapping này, chưa được báo cáo trong các quần thể trước đó.

QAlRr8.1 trên nhiễm sắc thể số 8 có ảnh hưởng lớn (20,8%) đối với biến thiên kiểu hình. Nó biểu hiện một QTL trên cùng một khu vực của nhiễm sắc thể trong quần thể mapping của CT9993 x IR62266, trong đó, giống CT9993 được xác định là giống có khả năng chống chịu nhôm tốt nhất trong *Oryza sativa* (Nguyễn và ctv. 2000)

Tuy nhiên, vì các vùng trong genome chứa những QTL giả định (*QAlRr7.1*, *QAlRr8.1*) vẫn còn rất rộng (29,8 và 31,0 cM, theo thứ tự), chúng ta cần phải nghiên cứu thêm những marker để bổ sung và lấp đầy khoảng trống, nhằm thỏa mãn mục tiêu cloning chính xác hơn

QAlRr9.1 trên nhiễm sắc thể số 9 có ảnh hưởng thấp (9,9%) đối với biến thiên kiểu hình. Nhưng nó biểu hiện khá ổn định trong 3 quần thể mapping khác nhau. Nó liên kết chặt chẽ với marker WAL17 (2,0 cM), một cDNA của genome cây lúa mì

Phát triển quần thể NIL sẽ giúp cho các nhà chọn giống đánh giá đúng đắn ảnh hưởng của các alen điều khiển tính chống chịu nhôm của lúa hoang *Oryza rufipogon* du nhập vào giống lúa trồng. Các quần thể hồi giao qui mô lớn dẫn xuất từ quần thể NIL đặc biệt, cũng có thể được khuyến cáo trong thực hiện yêu cầu “fine mapping” và “cloning” những QTL mục tiêu (Bây và ctv. 2003)

Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế sinh lý cây trồng và các gen điều khiển tính chống chịu nhôm trong cây lúa sẽ cho chúng ta biết được sự tiến hóa và tính chất đa dạng của hiện tượng chống chịu nhôm trong cây lúa và những loài mễ cốc khác có quan hệ gần gũi.

5-3. CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỐNG CHỊU NHÔM

Viện Lúa ĐBSCL đã tiến hành thu thập mẫu quần thể lúa hoang *Oryza rufipogon* trong năm 1989-1991 tại Tràm Chim, Đồng Tháp Mười, ký hiệu acc.106412, acc.106423, acc.106424 (Ngân hàng gen IRRI), nơi được xem là đất phèn nặng. Viện Lúa Quốc Tế thực hiện cặp lai giữa IR64 và những quần thể này. Con lai F₂ được chuyển về Viện Lúa ĐBSCL để thanh lọc trong điều kiện đất phèn ở Trại Hoà An, Phụng Hiệp, Cần Thơ.

Ba dòng có triển vọng đã được khảo nghiệm là
 AS1007 IR64 / *Oryza rufipogon* (Acc.106412)
 AS833 IR64 / *Oryza rufipogon* (Acc.106424)
 AS996 IR64 / *Oryza rufipogon* (Acc.106412)

Chúng đều có thời gian sinh trưởng ngắn (95-100 ngày), dạng cây cải tiến, năng suất cao, chống chịu rầy nâu và bệnh đạo ôn, chống chịu được độc nhôm, thích nghi trên đất phèn ở ĐBSCL, đặc biệt là giống AS996. Từ 38064 ha năm 2000, giống AS996 đã phát triển gần 100 nghìn ha vào năm 2002

Bảng 7: Kết quả thanh lọc nhôm (30ppm Al) ở giai đoạn mạ

Vật liệu	Chiều dài rễ tương đối (RRL)
<i>Oryza rufipogon</i> (acc.106412)	1.158
AS996	1.133
OM1490	1.058
OM1314	0.899
Cà đung đỏ (chuẩn chống chịu)	0.843
IR29 (chuẩn nhiễm)	0.514
LSD0.05	0.230

Bảng 8: Khảo nghiệm năng suất giống lúa vụ đông xuân 2000 trên vùng đất có vấn đề

Giống	Tân Thạnh	Mộc Hóa 1	Mộc Hóa 2	Thủ Thừa 1	Thủ Thừa 2	Tân Trụ	Vĩnh Hưng	Thị Xã	Châu Thành	Trung bình
AS996	7.93	7.15	5.40	8.30	7.20	5.98	5.53	6.50	5.60	6.62
OM1870	7.87	7.01	4.25	7.13	6.86	5.89	5.87	6.73	5.23	6.31
OM2401	7.47	6.30	4.34	7.00	7.53	5.88	5.93	6.26	5.53	6.24
IR64	7.33	6.94	4.68	7.20	6.40	5.69	6.47	5.93	4.80	6.16
CM16-27	7.13	6.44	3.88	7.67	7.67	5.88	5.73	6.38	4.63	6.15
OM2031	6.60	7.08	3.89	7.10	6.83	5.57	5.53	6.26	4.47	5.92
<i>T.bình</i>	7.73	6.82	4.41	7.42	7.08	5.82	5.84	6.35	5.04	
LSD 0.05										0.435

Bảng 9: Phân tích tương tác giữa kiểu gen và môi trường (đông xuân 2000, hè thu 2000)

Đông xuân 2000			
Giống	Trung bình	Hệ số gốc	SE
AS996	6.48	0,84	0,141
OM1840	6.41	1,13	0,082
IR64	6.30	0,81	0,183
OM2401	6.24	0,89	0,128
CM16-27	6.19	1,19	0,108
OM2031	5.93	1,12	0,113
Hè thu 2000			
Giống	Trung bình	Hệ số gốc	SE
OM2401	4.60	1.85	0.238
AS996	4.52	0.71	0.251
OM2395	4.49	1.42	0.409
CM42-94	4.33	0.68	0.172
OM2031	4.25	1.12	0.235
IR64	4.14	0.22	0.271

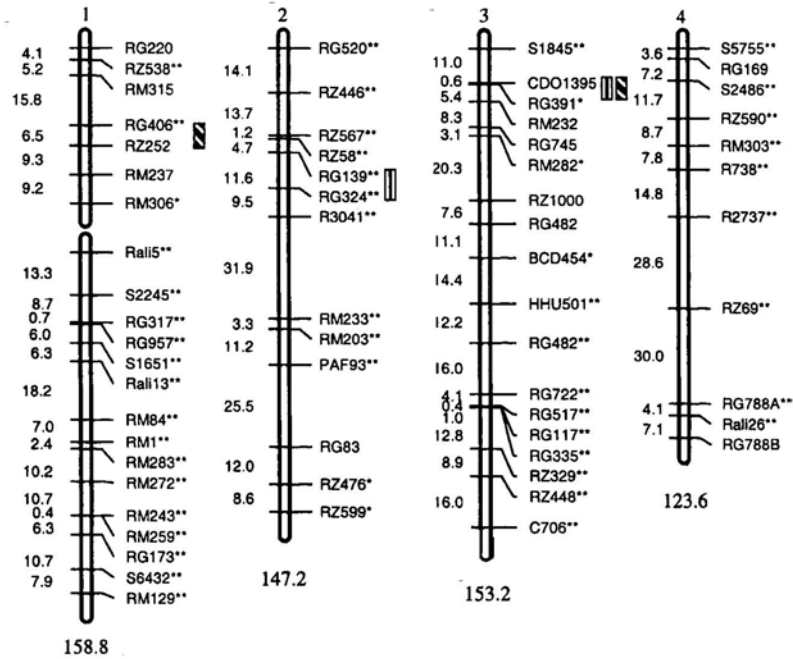
Bảng 10: Khảo nghiệm AS996 trên vùng đất phù sa có nước tưới, đông xuân 2000 (t/ha)

Giống	Tân Châu	Châu Phú	Phú Tân	Long Xuyên	Thoại Sơn	Trung bình
Đông xuân 2000						
OM2031	5.90	7.73	6.33	8.00	7.33	7.05
AS996	8.67	8.25	5.67	8.14	7.73	7.69
OM1870	7.50	7.53	7.00	7.55	7.17	7.35
CM16-27	6.83	7.65	6.50	7.04	7.70	7.14
OM2401	6.51	7.45	6.73	7.68	7.37	7.14
IR64	6.85	8.57	6.33	7.61	7.00	7.27
Hè thu 2000						
Giống	An Phú	Thoại Sơn	Long Dien	Phú Tân	Chợ Mới	Trung bình
OM2031	6.70	4.40	5.00	5.80	5.30	5.44
AS996	7.60	5.30	4.90	6.10	5.50	5.88
OM2395	6.70	5.00	4.70	7.06	4.90	5.67
CM42-94	6.30	5.10	5.60	5.90	4.80	5.54
OM2401	6.23	5.30	5.40	5.30	5.00	5.44
IR64	6.80	5.40	4.80	5.80	4.60	5.48

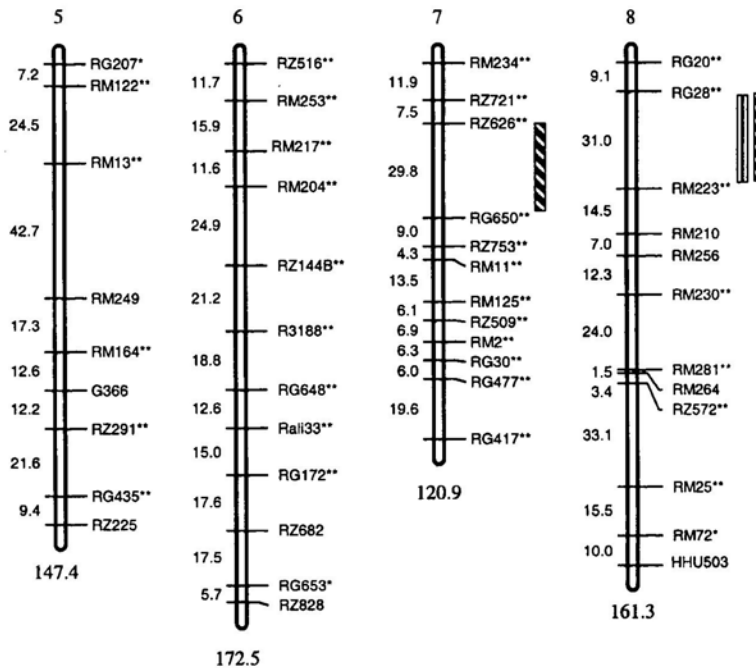
Bảng 11: Tương tác giữa kiểu gen x môi trường trên vùng đất phù sa có nước tưới

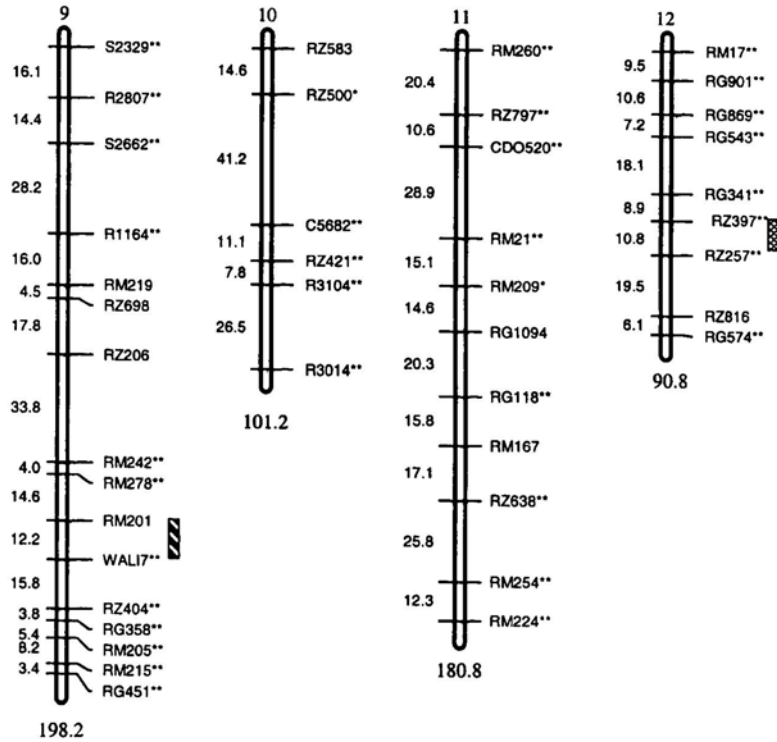
	Đông xuân 2000			Hè thu 2000		
	Trung bình	Hệ số gốc	SE	Trung bình	Hệ số gốc	SE
AS996	7.06	1.304	0.529	5.90	1.255	0.247
OM2031	7.69	1.555	0.798	5.49	1.043	0.209
OM2395	7.35	0.334	0.169	5.69	1.254	0.370
OM2401	7.14	0.728	0.326	5.47	0.499	0.181
CM42-94	7.15	0.711	0.304	5.55	0.679	0.204
IR64	7.27	1.367	0.365	5.31	1.270	0.055

Giống AS996 được công nhận giống quốc gia vào năm 2002, là giống được lai tạo thành công theo chiến lược du nhập gen mục tiêu từ lúa hoang vào lúa trồng chống chịu được độ đục nhôm

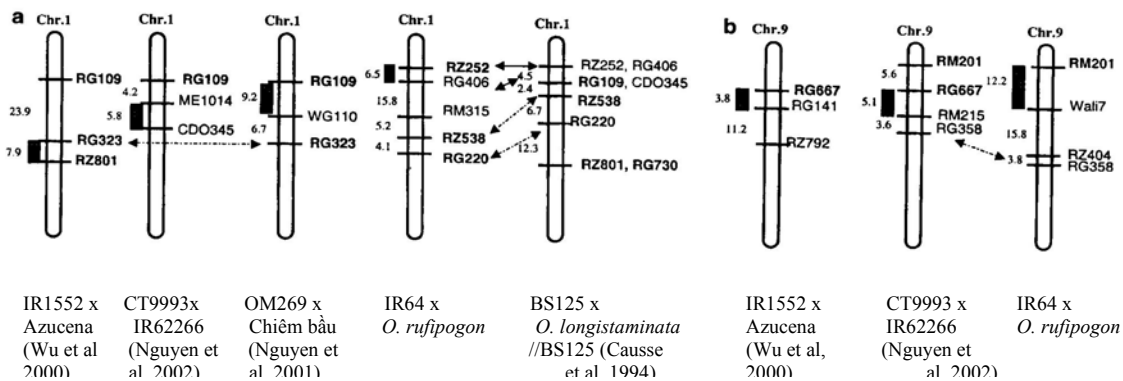


- ☐ Control root length (CRL)
- ▨ Stress root length (SRL)
- ▩ Relative root length (RRL)

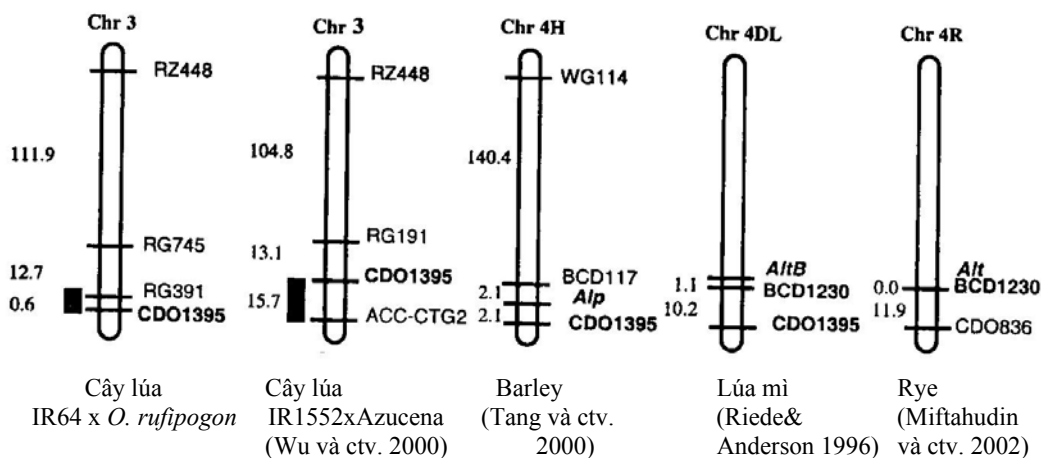




Hình 5-4: Bản đồ QTL các tính trạng chống chịu nhôm với 151 marker loci từ 171 dòng RIL của IR64 x *Oryza rufipogon* (acc 106424). Tính trạng CRL: chiều dài rễ đối chứng, SRL: chiều dài rễ trong điều kiện xử lý nhôm, RRL: chiều dài rễ tương đối (Bảy và ctv. 2003)



Hình 5-5: So sánh QTL điều khiển tính chống chịu nhôm trên (a) nhiễm sắc thể số 1, và (b) nhiễm sắc thể số 9 (Bảy và ctv. 2003)



Hình 5-6: So sánh QTL điều khiển tính trạng chống chịu nhôm giữa những cây thuộc nhóm mễ cốc (Bây và ctv. 2003)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahn S, SD Tanksley. 1993. Comparative linkage maps of rice and maize genomes. Proc Natl Acad Sci USA 90:7980 -7984
- Aniol A, IP Gustafson. 1984. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye, and triticale. Can J Genet Cytol 26:701-707
- Bona L, BF Carver, RJ Wright, VC Baligar. 1994. Aluminium tolerance of segregating wheat population in acid soil and nutrient solutions. Commu Soil Sci Plant Anal 25:327 – 339
- Bây ND, DS Brar, BC Buu, NV Tao, PN Luong, HT Nguyen. 2003. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from new source, *Oryza rufipogon* Griff, into indica rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 106:583-593
- Bùi chí Bửu. 1987. Nghiên cứu một vài đặc tính quan trọng của các giống lúa nước sâu địa phương ở Đồng Bằng Sông Cửu long cho công tác chọn giống. Luận án PTS Khoa học nông nghiệp. Viện KHKTNNVN, Hà Nội. 112 pp.
- Causse MA, TM Fulton, YG Cho, SN Ahn, J Chunwongse, K Xu, J Xian, Z Yu, PC Ronald, SE Harrington, G Second, SR McCouch, SD Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics 138:1251-1274
- Coronel VP. 1980. Response of rice and wheat at seedling stage to aluminium. Paper presented at IRRI. Saturday seminar, Nov. 8, 1980, Los Banos, Philippines. 55 p. Gale MD, KM Devos. 1998. Comparative genetics in the grasses. Proc Natl Acad Sci USA 95:1971-1974
- Gallego FJ, B Calles, C Benito. 1998. Molecular markers linked to the aluminum tolerance gene *Alt1* in rye. Theor Appl Genet 97:1104 - 1109
- Goff SA, D Ricke D, TH Lan, G Presting G, et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92-100
- Gomez KA and AA Gomez. 1984. Statistical procedures for Agricultural Research, IRRI, Second edition. 680 pages

- Harushima Y, M Yano, A Shormura, M Sato, T Shimano, Y Kuboi, T Yamamoto, SY Lin, BA Antinio, A Parco, H Kajiya, N Huang, K Yamamoto, N Nagamura, N Kurata, GS Khush, T Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2,275 markers using a single F2 population. *Genetics* 148:479–494
- HilleRisLambers D, and P Sittiyos. 1985. Rice breeding for deepwater areas. Paper presented at the Int. Rice Research conference, 1-5 June 1985. IRRI. 17p. (mimeo).
- Howeler RH and LP Cadacid. 1976. Screening of rice cultivars for tolerance to Al - toxicity in nutrient solutions as compares with a field screening method. *Agron.J.* 68 (4): 551-555.
- Khatiwada SP, D Senadhira, AL Carpena, RS Zeigler, PG Fermadez. 1996. Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 93:675–681
- Kochian LV. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:237-260
- Lander ES, D Bostein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-181
- Lander ES, P Green, J Abrahamson, A Barlow, DJ Daly, SE Lincoln, L Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Lima M, M Filho, PR Furlani. 1995. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. *Braz J Genet* 18:579-584
- Magnacava R, CO Gardner, RB Clark. 1987. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: Gabelman HW, Loughman BC (eds): Genetic aspects of plant mineral nutrition. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 201-212
- Martinez CP. 1976. Aluminum toxicity studies in rice (*Oryza Sativa* L.) Ph.D. Thesis, Oregon State University, Corvallis, Oregon. 113g.
- McCart GD and EJ Kamprath. 1965. Supplying Ca and Mg for cotton on sandy low cation exchange capacity soils. *Agronomy. J.* 57: 404-406.
- Miftahudin G, J Scoles, JP Gustafson. 2002. AFLP markers tightly linked to the aluminum tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 104:626-631
- Nguyen VT, BD Nguyen, S Sakarung, C Matinez, AH Paterson, AH Nguyen. 2002. Mapping genes controlling Al tolerance in rice: comparing different genetic backgrounds. *Mol Genet Genomics* (in press)
- Nguyen VT, LD Thanh, AH Paterson, LT Binh, HT Henry. 2000. Rapid screening method for aluminum tolerance in rice in nutrient solution (in Vietnamese with English abstract, ISSN: 0866-8566). *J Genet Appl* 2:5-11
- Nguyen VT, MD Burrow, HT Nguyen, BT Le, TD Le, AH Paterson. 2001. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 102:1002-1010
- Panaud O, X Chen, SR McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet* 252:597-607
- Paterson AH, ES Lander, JD Hewitt, S Paterson, S Lincoln, SD Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726
- Riede CR, JA Anderson. 1996. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance in wheat. *Crop Sci* 36:905-909

- Sibov ST, M Gaspar, MJ Silva, LMM Ottoboni, P Arruda, AP Souza. 1998. Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome* 42:475-482
- Singh K, T Ishii T, A Parco, N Huang, DS Brar, GS Khush. 1996. Centromere mapping and orientation of the molecular linkage map of rice (*Oryza sativa*). *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6163-6168
- Tang Y, ME Sorrells, LV Kochian, DF Garvin. 2000. Identification of RFLP markers linked to barley aluminum tolerance gene *Alp*. *Crop Sci* 40:778-782
- Temnykh S, G DeClark, A Lukashova, L Lipovich, S Cartinhour, SR McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa*): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. *Genome Res* 11:1444-1452
- Thawornwong N and A van Dinst. 1974. Influence of high acidity and aluminum on the growth of lowland rice. *Plant and soil* 41: 141-159.
- van Breemen N, and LJ Pons. 1978. Acid sulfate soil and rice. Pages 739-761. *Soil and rice*. IRRI, Los Banos Philippines.
- Wang D, J Zhu, Z Li, AH Paterson. 1999. Manual for QTLMapper. Version 1.0. A computer software for mapping QTLs
- Wang GL, DJ Mackill, JM Bonman, SR McCouch, MC Champoux, RJ Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* 136:1421-1434
- Wu P, CD Liao, B Hu, KK Yi, WZ Jin, JJ Ni, C He. 2000. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. *Theor Appl Genet* 100:1295-1203
- Xiao J, J Li, S Grandillo, SN Ahn, L Yuan, SD Tanksley, SR McCouch SR. 1998. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150:899-909
- Xiong L, KD Lui, XK Dai, SW Wang, CG Xu, DP Zhang, MAS Maroof, T Sasaki, Q Zhang. 1997. A high density RFLP map based on the F₂ population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon* using Cornell and RGP markers. *Rice Genet Newslett* 14:110-115
- Xuan VT, LT Duong, and VT Guong. 1982. Deepwater rice trials in farmer field in the Mekong Delta in Vietnam. Pages 271-278 in *Proceeding of the 1981 Int. Deepwater rice Workshop* IRRI, Los Banos, Philippines.
- Yoshida S, DA Forno, JA Cock, KA Gomez. 1976. Laboratory manual for plant physiological studies of rice, 3rd edn. International Rice Research Institute, Manila, The Philippines
- Yu J, S Hu, J Wang, GKS Wong et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296:79-92
- Zhang WP, XY Shen, P Wu, B Hu, CY Liao. 2001. QTLs and epistasis for seminal root length under a different water supply in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 103:118-123

Chương 6

CƠ SỞ DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU THIẾU LÂN

6-1. GIỚI THIỆU CHUNG

Hiện tượng thiếu lân trong đất canh tác rất phổ biến trong vùng trồng lúa ở Châu Á, nhất là đất phèn, đất acid ở miền Nam Việt Nam. Hiện tượng thiếu lân do nhiều nguyên nhân khác nhau, tùy theo tính chất của đất trồng lúa: khả năng cố định lân của đất, hàm lượng lân dễ tiêu và lân tổng số quá thấp trong đất. Ở Châu Á, diện tích đất trồng lúa bị thiếu lân nghiêm trọng ước khoảng 35 triệu ha (Ni và ctv. 1998). Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giống lúa chống chịu hay không chống chịu với điều kiện thiếu lân đã được ghi nhận (IRRI 1971, 1976, Katyal và ctv. 1980, Gunawardena và ctv. 1978, Ikehashi và Ponnampereuma 1978, Senanayake 1984, Fageria và ctv. 1988), mở ra triển vọng chọn tạo giống lúa năng suất cao kết hợp với tính chống chịu thiếu lân (phosphorous deficiency). Những giống lúa như vậy có thể được chia thành hai dạng hình

- Giống chống chịu điều kiện P trong đất cao, nhưng khả năng cố định P rất lớn
- Giống chống chịu điều kiện P trong đất rất thấp, không có hiện tượng cố định

Trong dạng hình thứ hai, biện pháp bón thêm phân lân có tính khả thi và hiệu quả hơn hết, nhưng ở những vùng lúa nước trời, người ta khó có thể thuyết phục nông dân bón phân lân cho đến khi họ thấy được bón lân thực sự mang lại hiệu quả về năng suất, và chứng minh cho họ thấy đáp ứng của phân lân rất chậm và từ từ cho cây lúa sử dụng, so với hiệu quả tức thì của việc bón phân đạm.

Lân là một nguyên tố vô cùng cần thiết đối với sinh vật. Nó là thành phần quan trọng trong kiến trúc của phosphate đường, nucleic acid, coenzyme, và phospholipid. Là một thành phần của nucleic acid, nó tham gia trong quá trình phân cắt tế bào và truyền tín hiệu di truyền đối với những tính trạng. Nó còn có chức năng dự trữ năng lượng dưới dạng adenosine triphosphate cũng như vận chuyển năng lượng trong suốt quá trình tổng hợp đường, tinh bột và protein. Dưới dạng “nicotamide adenine dinucleotide phosphate”, lân đóng vai trò vận chuyển ion H^+ trong chu trình Krebs và chu trình phân giải glucose (glycolysis)

Cây trồng hấp thu lân từ trong đất. Tất cả P trong đất bắt nguồn từ microcrystallite apatite của đá mẹ “magmatic” (Chaubey và ctv. 1994)

6-1-1. Đất thiếu lân

Thông thường, hiện tượng thiếu dinh dưỡng trong đất đi kèm theo độ pH đất. Cả hai nhóm đất acid và đất kiềm đều có hiện tượng thiếu lân. Tính chất acid của đất làm gia tăng hàm lượng nhôm, mangan và sắt trong dung dịch đất (Ikehashi và Ponnampereuma 1978, Clark và Brown 1974). Lân tác động với Al, Mn, và Fe dưới dạng hợp chất khó hòa tan. Trong đất kiềm, P dễ tiêu tùy thuộc vào hoạt tính của Ca. Phân P được bón vào bị giữ lại ở mặt ngoài theo cơ chế hấp phụ (adsorption) và bị kết tủa ở dạng calcium phosphate, nếu chúng duy trì ở dạng này, cây không thể hấp thụ được, dần dần, lân được chuyển đổi thành những hợp chất apatite khó tan.

Sự thiếu lân xảy ra khá phổ biến trong đất trồng lúa ở Bangladesh, Cambodia, Nhật, Nepal, Philippines, Đông Nam Trung Quốc, Sri Lanka, Đài Loan, Thái Lan và Việt Nam (Ikehashi và Ponnampereuma 1978)

6-1-2. Hiện tượng thiếu lân trên cây lúa

P là một nguyên tố di chuyển trong cây nói chung. Xét trên góc độ dinh dưỡng, lân di chuyển từ lá già sang lá non. Hiện tượng đầu tiên được ghi nhận trên lá già, biểu thị màu xanh

đậm. Trong suốt thời gian bị stress do thiếu lân, sắc tố đỏ trên lá lúa cũng có thể xuất hiện, cho kết quả pha trộn giữa hai màu xanh đỏ. Cây giảm cường lực và năng suất. Rễ cây trở nên mọc dài ra, mảnh khảnh, đôi khi ở dạng sợi mỏng như chỉ.

Trong trường hợp cây lúa, hiện tượng thiếu lân biểu hiện ở giai đoạn rất sớm, cây thấp lùn, cằn lại, đẻ chồi kém. Lá lúa trở nên ngắn, hẹp chiều ngang, mọc thẳng và có màu xanh đậm. Bởi vì P di chuyển, nên lá lúa non vẫn còn thể hiện sự khỏe mạnh bình thường so với lá già, có thể lá già đã chuyển sang màu nâu và chết.

6-1-3. Biểu hiện của giống lúa chống chịu thiếu lân

Một giống lúa được gọi là chống chịu với stress do thiếu P khi giống ấy sản xuất ra một khối lượng chất khô nhiều hơn giống nhiễm khi chúng được trồng trong điều kiện thiếu lân (Chaubey và ctv.1994), và chúng sản sinh ra lượng chất khô tương đương với các giống nhiễm khi được cung cấp lân tối hảo. Ưu điểm của giống chống chịu như vậy là chúng có thể duy trì khá ổn định ở cả hai điều kiện có lân bình thường, hoặc lân được cung cấp với một lượng ít cho cây (Gerloff 1987).

Một giống cây trồng vừa chịu được điều kiện đất nghèo lân, vừa chịu được điều kiện bón lân thấp hay bón bình thường được định nghĩa là giống không đáp ứng với P (P-non responsive genotype) (Gerloff 1987)

Người ta chưa thể định tính một cách chính xác những thuộc tính của sự kiện “ mức độ hiệu quả của lân đối với cây trồng” (*P-efficiency*). Khái niệm *P-efficiency* là một ý tưởng được nhiều nhà khoa học đề cập. Do đó, có nhiều định nghĩa khác nhau của các nhà nghiên cứu đối với khái niệm này.

- Clark và Brown (1974 a) cho rằng: “*hiệu quả đáp ứng của P*” là khả năng của cây trồng ở một mức độ P cho phép để tích lũy hàm lượng P cao hơn.
- Koyama và ctv. (1973) cho rằng: một giống biểu hiện tính chống chịu lân phải có năng lượng dinh dưỡng cao hơn đối với P trong đất so với giống nhiễm.
- Giống chống chịu thiếu lân là giống có số lượng chất khô được sản sinh ra trên đơn vị hàm lượng P được hấp thu bởi cây trồng (Chaubey và ctv. 1994)

Tuy nhiên, những định nghĩa này trên đều thống nhất: chỉ số thu hoạch (HI = harvest index) là thuộc tính quan trọng của “*hiệu quả đáp ứng của P*”

- Fox (1978) cho rằng “ *hiệu quả đáp ứng của P*” là số lượng chất khô có thể thu hoạch được trên một đơn vị thời gian, trong điều kiện cây được trồng trong đất thiếu lân
- Clark (1976) cho rằng cây có hiệu quả đáp ứng với P cao phát triển tốt hơn, sản sinh nhiều chất khô hơn, biểu hiện hiện tượng thiếu lân ít hơn so với cây có hiệu quả đáp ứng với P thấp, khi chúng được trồng so sánh trong điều kiện đất thiếu lân
- Vài tác giả khác định nghĩa về “*hiệu quả đáp ứng của P*” như là những giá trị đo lường của trọng lượng chất khô trên đơn vị lân được sử dụng, và trên đơn vị lân hấp thu (Chaubey và ctv. 1994)
- Blair và Cordero (1978) cho rằng một cây có “*hiệu quả đáp ứng với P*” khi nó biểu hiện khả năng hấp thu P cao trên đơn vị chiều dài rễ, hoặc trên đơn vị diện tích

Những kết quả nghiên cứu về sinh môi học được thực hiện đối với các loài hoang dại cho thấy khả năng hấp thu P trên một đơn vị chiều dài rễ hay trên một đơn vị diện tích và việc sử dụng P bên trong cây, không có thể được xem như chức năng thích nghi của cây trong điều kiện bị stress do thiếu lân (Chapin 1980)

Do đó, mức độ thích nghi của các thông số này được xem như những tiêu chuẩn có tính chất phân lập giống chống chịu và giống nhiễm, vẫn còn là câu hỏi lớn chưa có giải đáp. Một trong những tiêu chuẩn phải lựa chọn để đánh giá “*hiệu quả đáp ứng với P*” có thể là sự tích lũy P trên đơn vị trọng lượng chất khô được tích lũy trên một đơn vị thời gian (Chesholm và Blair 1988b)

Tốc độ tăng trưởng chậm làm giảm stress có tính chất biến dưỡng của cây trồng trong điều kiện đất thiếu lân, là một tiến trình rất có hiệu quả để chọn lọc cây có hiệu quả đáp ứng với P cao (Chapin 1980).

Chesholm và Blair (1988a) cho rằng tốc độ tăng trưởng tương đối và sự phân bố chất khô đến rễ và chồi thân có thể được sử dụng làm tiêu chuẩn chọn lọc cây chống chịu và cây nhiễm với stress do thiếu lân tốt hơn so với phương pháp thu hoạch trọng lượng chất khô ở giai đoạn cuối cùng

Trong cây lúa, nhất là cây lúa dạng hình cải tiến, năng suất cao, sự thiếu lân thể hiện các yếu tố hạn chế rất nghiêm trọng cho sự tăng trưởng (Gunawardena và Wijeratne 1978). So sánh với các loài cây trồng khác, cây lúa có sức chống chịu thiếu lân tốt hơn hết (Chaubey và ctv. 1994)

Giống lúa chống chịu thiếu lân sẽ tạo ra khả năng hấp thu lân cao hơn giống nhiễm (Koyama 1973). Giống lúa có hiệu quả đáp ứng với P có xu hướng hấp thu một lượng lớn P và sử dụng nó một cách có hiệu quả trong điều kiện trồng chúng ở đất nghèo lân (Katyal 1984)

Tính chống chịu sự thiếu lân của giống lúa được đo lường bằng giá trị: số chồi / cây, năng suất (Gunawardena 1979). Trọng lượng khô của chồi là tính trạng rất nhạy cảm với hiện tượng thiếu lân (Fageria và ctv. 1988), kể đến là trọng lượng khô của rễ, số chồi.

6-2. KỸ THUẬT THANH LỌC

Kỹ thuật thanh lọc giống lúa chống chịu stress do thiếu lân được IRRI đề xuất:

Bốn hạt thóc nảy mầm được chọn từ mỗi giống lúa được đặt trên một tấm lưới nylon, có khung là tấm xốp trắng, giúp cây nổi trong dung dịch dinh dưỡng Yoshida có chứa 0,5 mg / lít P đặt trong thau nhựa có thể tích 5 lít (Ponnamperuma 1977). Một nghiệm thức khác với 4 hạt nảy mầm / giống được trồng trong môi trường dinh dưỡng đối chứng với 10 mg / l P.

Giống lúa IR26 được xem như giống đối chứng chống chịu (T), và IR36 là đối chứng nhiễm (S). Sau mỗi loạt bao gồm 50 giống thanh lọc là xen giữa bởi giống đối chứng T và S. Điều chỉnh độ pH của môi trường dinh dưỡng hàng ngày ở pH 6,0, và dung dịch dinh dưỡng được thay mỗi tuần một lần

Bốn tuần sau khi gieo, hiệu quả đáp ứng với P của mỗi giống lúa được quan sát và cho điểm theo phần trăm số chồi tương đối (relative tiller % = RT %)

$$RT\% = \frac{\text{Số chồi trong dung dịch chứa } 0,5 \text{ ppm P}}{\text{Số chồi trong dung dịch chứa } 10,0 \text{ ppm P}} \times 100$$

RT% được chuyển đổi thành thang điểm chuẩn trong hệ thống đánh giá (SES) của Viện Lúa Quốc Tế

<i>RT%</i>	<i>Thang điểm SES</i>	<i>Hiệu quả đáp ứng với P</i>
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

Trong điều kiện đồng ruộng, IRRI đề nghị phương pháp thí nghiệm trên ruộng nông dân. Phân tích P tổng số, P dễ tiêu trước và sau khi ngập nước. Hai lô có bón lân và không bón lân đều được cày, xới, đánh bùn, và san mặt ruộng giống nhau. Bón 50-25-20 kg NPK / ha cho lô đối chứng và 50-0-20 kg NPK / ha cho lô xử lý thiếu lân. Các giống lúa được cấy thành hàng dài 5m, khoảng cách cây 20x20 cm. Giống chuẩn nhiễm được trồng sau 20 dòng,

và giống chuẩn chống chịu được trồng ngẫu nhiên trong các giống trắc nghiệm. Vào lúc 4-8 tuần sau khi cấy, người ta tiến hành đo đếm số chồi / cây. Vào lúc lúa chín, chọn 20 khóm lúa / giống ở hàng giữa để thu hoạch, rồi ghi nhận năng suất.

Hoạt động của acid phosphatase (APA) được xét nghiệm bằng cách sử dụng p-nitrophenyl-phosphate làm hoạt chất ở pH 4,0 (Clark 1976)

Xác định hàm lượng lân trong chồi và rễ lúa tính bằng mg / cây và xác định hiệu quả sử dụng P ở chồi (SPUE), ở rễ (RPUE) trên một đơn vị lân được hấp thụ (Ni và ctv. 1996)

6-3. CƠ CHẾ CHỐNG CHỊU THIẾU LÂN

Tính trạng chống chịu stress do thiếu lân của cây lúa có thể được xem xét trên hai cơ chế khác nhau (Ni và ctv. 1998): (1) hiệu ứng bên trong (internal efficiency), và (2) hiệu ứng bên ngoài (external efficiency).

- Hiệu ứng bên trong biểu thị yêu cầu lân của cây ở mức độ thấp
- Hiệu ứng bên ngoài là khả năng bắt giữ, hấp thụ lân không dễ tiêu trong đất

Cơ chế hiệu ứng bên trong có thể được nghiên cứu thông qua phương pháp thanh lọc trong dung dịch Yoshida như mô tả ở trên với 2 nghiệm thức P = 0,5 mg / l và P = 10 mg/l

Ni và ctv. (1996) đã thực hiện một thí nghiệm để giải thích cơ chế này như sau:

Chọn 6 cây mạ non / mỗi giống lúa xử lý ở 2 nghiệm thức đủ lân (10ppm) và thiếu lân (0,5ppm) trong dung dịch dinh dưỡng Yoshida. Lấy mẫu vào lúc 2 tuần, 4 tuần sau khi nuôi cấy. Phân tích hàm lượng lân trong chồi (SPC) và trong rễ (RPC), phân tích hiệu quả sử dụng P trên tổng lượng chất khô ở chồi (SPUE: shoot-P use efficiency) và rễ (RPUE: root-P use efficiency), tính bằng mg hàm lượng lân hấp thụ. Biến thiên kiểu gen đối với tính trạng chống chịu thiếu lân được định nghĩa là hiệu số giữa hai giá trị thu được trong hai điều kiện đủ lân và thiếu lân (Gouley và ctv. 1993)

Bảng 1: So sánh giá trị trung bình SPC, RPC (mg / cây) và SPUE, RPUE (g/mg) trong hai nghiệm thức xử lý đủ lân và thiếu lân, vào lúc 2 tuần sau khi nuôi cấy (Ni và ctv. 1996)

Giống	0,5 ppm P		10 ppm P		Giảm	
	SPC	RPC	SPC	RPC	SPC	RPC
Tesanai 2	0,35a	0,13a	1,60a	0,28a	1,25a	0,15a
IR55178	0,29b	0,09b	1,54a	0,28a	1,25a	0,19a
IR20	0,19c	0,06c	0,89b	0,21b	0,70b	0,15a
pp2462-11	0,36a	0,13a	2,06c	0,32a	1,70c	0,19a
IR31406	0,16c	0,09b	1,82d	0,41c	1,66c	0,25b
Giống	0,5 ppm P		10 ppm P		Tăng	
	SPUE	RPUE	SPUE	RPUE	SPUE	RPUE
Tesanai 2	0,33a	0,36a	0,11a	0,11a	0,22ab	0,25a
IR55178	0,37a	0,44b	0,12a	0,10a	0,25ab	0,34b
IR20	0,29b	0,48b	0,10a	0,09a	0,19a	0,39b
pp2462-11	0,37a	0,34a	0,10a	0,10a	0,27b	0,24a
IR31406	0,36a	0,33a	0,12a	0,09a	0,24ab	0,24a

Những số theo sau cùng một chữ không khác biệt có ý nghĩa ở mức độ 0,01 (DMRT)

Biến thiên kiểu gen có ý nghĩa đối với SPC, RPC, với sự giảm giá trị giữa 2 nghiệm thức quan sát 10ppm P và 0,5ppm P. Giống IR20 thể hiện tính chống chịu cao đối với stress do thiếu P, chênh lệch giá trị trung bình thấp nhất ở chồi và rễ (bảng 1), trong khi đó IR31406 được xem là giống nhạy cảm nhất với stress

Biến thiên kiểu gen của SPUE và RPUE có ý nghĩa ở nghiệm thức 0,5ppm P, nhưng không có ý nghĩa ở nghiệm thức 10ppm P. Khác biệt giá trị tăng lên của SPUE và RPUE rất có ý nghĩa trong khi giảm hàm lượng lân từ 10ppm xuống 0,5ppm (bảng 1). IR20 thể hiện sự khác biệt rõ nhất đối với giá trị SPUE

Bảng 2: Hoạt động của acid phosphatase ở rễ (RAPA) và hoạt động acid phosphatase tiết ra bên ngoài (EAPA) tính bằng $\mu\text{mol PNP/g}$ trọng lượng rễ tươi / giờ, trong điều kiện thiếu lân và đủ lân, giai đoạn 2 và 4 tuần sau khi nuôi cấy trong môi trường (Ni và ctv. 1996)

Giống	0,5ppm P		10ppm P		P-stress kích hoạt	
	RAPA	EAPA	RAPA	EAPA	Psi-RAPA	Psi-EAPA
(2 tuần sau khi trồng)						
Tesanai 2	172,94a	29,73a	121,71a	12,57ac	51,23a	17,16a
IR55178	98,26b	27,37c	68,97b	13,22ab	29,29b	14,15b
IR20	141,26c	37,93b	116,68a	15,23b	24,58c	22,02c
pp2462-11	183,32a	25,37c	129,90a	13,35ab	53,42d	12,02d
IR31406	80,84c	19,75d	96,00b	10,66c	-15,16e	9,09e
(4 tuần sau khi trồng)						
Tesanai 2	179,16a	26,55a	158,10a	15,81a	21,06a	10,74a
IR55178	200,48b	33,13b	175,26b	21,75b	25,22b	11,38a
IR20	147,81c	30,14c	144,55c	19,07c	3,26c	11,07a
pp2462-11	176,77a	22,65d	155,16a	14,90d	18,61d	7,75b
IR31406	117,55d	21,29d	107,87d	13,62d	9,68c	7,67b

Những số theo sau cùng một chữ không khác biệt có ý nghĩa ở mức độ 0,01 (DMRT) Psi: viết tắt từ chữ “P-stress induced”

Hoạt động của men acid phosphatase trong rễ (RAPA: root-acid phosphatase activities) và acid phosphatase tiết ra bên ngoài (EAPA: excreted acid phosphatase activities) được xác định. Sau đó, người ta ước đoán giá trị P-stress kích hoạt RAPA và EAPA bằng cách tính hiệu số chênh lệch giữa RAPA và EAPA trong 2 nghiệm thức đủ lân và thiếu lân. Khi thiếu lân, giống lúa bị kích hoạt sản sinh ra men acid phosphatase ở rễ và bên ngoài vùng rễ. Biến thiên kiểu gen đối với giá trị RAPA và EAPA rất có ý nghĩa ở mức độ 0,01 (bảng 2) Giá trị Psi-RAPA không ổn định giữa các giống so với giá trị Psi-EAPA. Sau 2 tuần, giá trị Psi-RAPA của giống pp2462-11 cao nhất, và giá trị Psi-EAPA của IR20 cao nhất, sau đó là giống Tesanai-2. Biến thiên kiểu gen của giá trị Psi-EAPA giảm theo thời gian sinh trưởng của cây (bảng 2). Hayashi và Takijima (1953) quan sát hoạt động phosphatase ngoại bào ở rễ lúa trong điều kiện thiếu lân sẽ gia tăng gấp 2-fold so với rễ lúa mọc trong điều kiện bình thường. Những nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rễ cây lúa 12 ngày tuổi có hoạt động phosphatase cao gấp 5 lần trong đất thiếu lân so với cây lúa bình thường, và sau đó hoạt động này giảm xuống sau 20 ngày tuổi (Hirata và ctv. 1982)

Psi thay đổi theo hàm lượng lân ở trong rễ và trong chồi. Sau hai tuần, Psi-EAPA tương quan chặt với sự giảm SPC, và sau 4 tuần Psi-EAPA tương quan chặt với sự giảm RPC (Ni và ctv. 1996). Tương quan âm cũng được ghi nhận giữa sự giảm SPC và sự tăng RPUE, giữa sự giảm SPC và sự giảm RPC.

Giống lúa chống chịu thiếu lân được đánh giá trên cơ sở mức độ suy giảm hàm lượng lân tích lũy và mức độ gia tăng hiệu quả sử dụng P trong điều kiện hàm lượng P thấp ở dung dịch dinh dưỡng

Cơ chế tránh né stress do thiếu lân của cây trồng được thể hiện bằng cách điều tiết sự tăng trưởng chậm lại trong đất nghèo lân, thí dụ như các loài thuộc *Agrostis*, *Eucalyptus*, *Carex*, v.v.. (Chaubey và ctv. 1994)

6-3. DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU THIẾU LÂN

Người ta đã cố gắng tìm hiểu những tính trạng di truyền có liên quan đến hiện tượng chống chịu sự thiếu lân, thông qua tính trạng hình thái học, sinh lý học, sinh hóa học trong quá trình hấp thu khoáng chất, cơ chế hấp thu

Tính trạng hình thái học có liên quan là chiều dài rễ, đường kính rễ, lông hút, nhưng chúng thường thể hiện với giá trị biến thiên cao do ảnh hưởng mạnh mẽ của môi trường chưa kiểm soát được trong thí nghiệm

Tính trạng hấp thu P trong đất và tính trạng sử dụng P được hấp thu ở trong cây là hai yếu tố không liên kết với nhau

Những giống lúa IR8, IR20, IR36, IR64, Mahsuri, TCNJ1, H4, Bg90-2 được đánh giá là giống có hiệu quả đáp ứng với P cao, và chúng có mức thích nghi rộng, nên được xem như vật liệu cho nghiên cứu di truyền và tạo giống mới

Thuận lợi của kỹ thuật sinh học phân tử đã giúp cho các nhà nghiên cứu có thể thực hiện bản đồ di truyền dễ dàng hơn, nhất là đối với tính trạng số lượng như thế này. Majumder và ctv. (1989) đề xuất giả thuyết rằng tính trạng chống chịu thiếu lân của cây lúa là một tính trạng di truyền số lượng với ảnh hưởng rất mạnh mẽ về ưu thế lai. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của Chaubey và ctv. (1994) cho những nhận xét khác hơn

QTL điều khiển tính chống chịu thiếu lân đã được thực hiện trên quần thể con lai của Nipponbare x Kasalath (japonica x indica) (Wissuwa và ctv. 1998). Tính chống chịu này biểu hiện thông qua sự khác biệt giữa các kiểu gen về mức độ hấp thu P (P-uptake) và mức độ hiệu quả sử dụng P bên trong. Một QTL điều khiển tính trạng “P-uptake” được tìm thấy trên bản đồ ở vai nhiễm dài thuộc nhiễm sắc thể số 12, quãng 13,2 cM, liên kết với marker kế cận C443-G2140. Vị trí xác định ở 54,5 cM, và cách marker C443 một khoảng cách di truyền có giá trị 3,0 cM. Những QTL thứ yếu được tìm thấy trên nhiễm sắc thể số 2, 6 và 10 (Wissuwa và ctv. 2002).

Công trình đầu tiên của Ni và ctv. (1998) về sự có mặt của một QTL chủ lực điều khiển tính chống chịu thiếu lân đã được công bố trên nhiễm sắc thể số 12. Nó dường như chưa rõ ràng về ảnh hưởng của QTL đối với mức độ hấp thu P hoặc hiệu quả sử dụng P.

Một nghiên cứu sâu hơn trên quần thể dòng gần như đẳng gen (NIL) được phát triển bởi ba lần hồi giao với Nipponbare. Dòng NIL này có tên là “NIL-C443” với 91% nền tảng di truyền của Nipponbare, nhưng mang trong nó một đoạn Kasalath 50-cM trên nhiễm sắc thể số 12, thể hiện cặp marker thuộc quãng C443-G2140, nơi định vị của một QTL giả định điều khiển tính chống chịu thiếu lân. Ảnh hưởng của QTL chủ lực này một lần nữa xác định cả trong hai điều kiện thí nghiệm: đồng ruộng và trong chậu (Wissuwa và Ae 2001a, 2001b). trong điều kiện trồng lúa trên đất thiếu lân, dòng NIL-C443 có khả năng hấp thu P gấp 3 lần so với Nipponbare. Trong khi đó, cả hai không biểu hiện sự khác biệt gì khi trồng chúng trong đất có đủ lân. Ảnh hưởng của QTL C443 rất chuyên biệt đối với hiện tượng thiếu lân.

Đối với yêu cầu phát triển chiến lược MAS (chọn giống nhờ marker phân tử), hay yêu cầu “map-based cloning”, vị trí của một QTL cần được biết rõ với mức độ tin cậy và chính xác cao (Paterson và ctv. 1990, Yano và Sasaki 1997, Yano và ctv. 2000)

Hiện nay, QTL C443 được thực hiện bản đồ với một quãng 13,2 cM, và việc xác định QTL C443 đã dựa trên cơ sở một dòng NIL có chứa “50-cM Kasalath segment”. Điều này chưa đủ cho yêu cầu thực hiện MAS, bởi vì một quãng 13 cM có thể còn chứa nhiều gen không mong muốn khác xen vào, nhất là đối với giống Kasalath, donor của QTL C443, một giống lúa bản địa có đặc tính nông học tổng quát rất kém.

Hơn nữa, có thể một QTL được hình thành trên bản đồ có quãng giả định quá rộng như vậy tương ứng với một “cluster” của những gen, mỗi gen có ảnh hưởng tương đối nhỏ.

Quần thể “mapping” được phát triển bằng phương pháp hồi giao hoàn toàn phù hợp với yêu cầu thành lập bản đồ QTL (Yano 2001) vì hầu hết các yếu tố di truyền không liên quan đến QTL này trong quần thể phân ly quá lâu

6-3-1. Lập bản đồ QTL bằng AFLP

Quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) F₈ của cặp lai IR20 x IR55178-3B-9-3 bao gồm 285 dòng đã được sử dụng trong nghiên cứu (Ni và ctv. 1998). IR20 được xem là giống cho gen chống chịu.

Phân tích AFLP theo phương pháp của Vos và ctv. (1995). cả hai hệ thống *PstI/MseI* và *EcoRI/MseI* đều được sử dụng để phát sinh ra những marker đa hình AFLP, với 58 cặp primer. Một bộ AFLP marker trên bản đồ của quần thể đơn bội kép IR64/Azucena và quần thể RIL của IR74/FR13A đã được sử dụng như những marker có tính chất neo đối với mỗi nhóm liên kết gen. tất cả những AFLP marker được tìm thấy trên 12 nhóm liên kết gen ở LOD > 3, trong phân tích MAPMARKER (Lander và ctv. 1987). Khoảng cách trên bản đồ di truyền (cM) được tính dựa theo hàm Kosambi (Kosambi 1944)

Điều tra DNA trên bố mẹ cho thấy: có 26 RFLP marker đa hình. Như vậy 26 RFLP marker này và 30 AFLP đã được dùng như những “anchor” (neo) để hình thành bản đồ di truyền (Ni và ctv. 1998), với tổng số chiều dài là 1371,8 cM, trung bình của quãng là 7,62 cM, với giá trị nhỏ nhất trên nhiễm sắc thể số 4 (2,07 cM), và giá trị lớn nhất trên nhiễm sắc thể số 3 (11,49 cM). Có 7 đoạn còn trống >30cM, và 2 đoạn >50cM trên nhiễm sắc thể số 1 và 2 (hình 6-1).

Bảng 3: QTL điều khiển các tính trạng có liên quan đến hiện tượng chống chịu thiếu lân: RTA: khả năng đẻ nhánh tương đối, RSDW: trọng lượng khô tương đối của chồi, RRDW: trọng lượng khô tương đối của rễ, theo phương pháp phân tích SMA (single-marker analysis) (Ni và ctv. 1998)

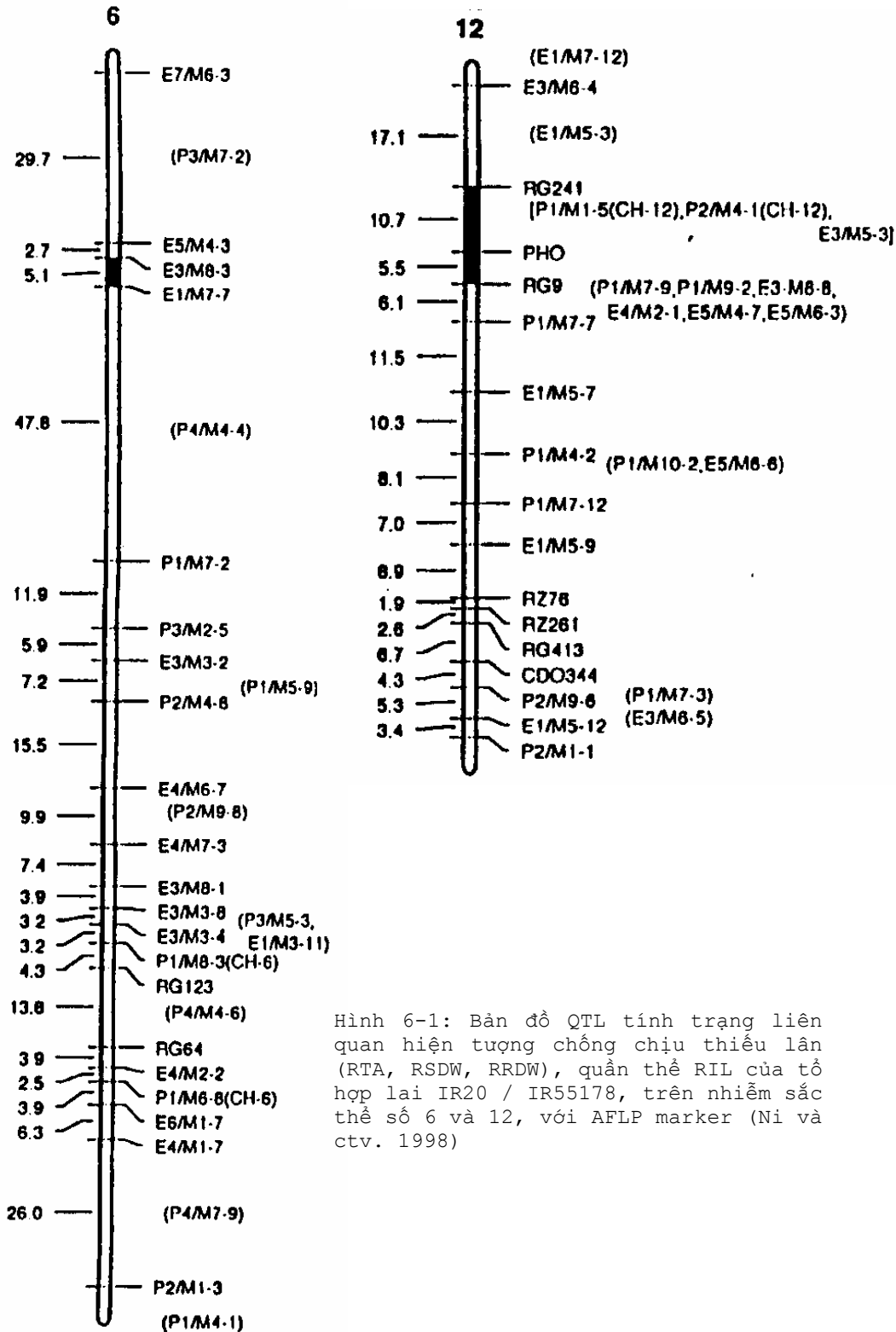
Tính trạng	QTL	Quãng giữa 2 marker	NST	LOD	Marker	Trung bình alen		Pe	R ² (%)
						IR20	IR55178		
RTA	1	E4/M1-8- E4/M3-8-	1	2,42	E4/M1-8	93,1	73,7	27,0	9,9
					2	E3/M8-3- E1/M7-7-	6	7,82	E3/M8-3
	E5/M4-3	68,8	99,8	-31,0					27,5
	E1/M7-7	71,0	98,8	-27,8					23,1
	3	RG9-RG241	12	16,51	RG9	104,6	61,7	42,9	54,0
					P1/M7-7	100,8	64,5	36,3	37,7
					RG241	102,1	66,9	35,2	35,6
					E1/M5-7	97,5	64,5	33,0	31,7
	E3/M6-4	96,6	67,2	29,4	25,4				
RSDW	1	E4/M1-8- -E4/M3-8	1	2,66	E4/M1-8	68,3	54,1	14,3	10,8
					2	E3/M8-3- -E1/M7-7	6	7,90	E3/M8-3
	E5/M4-3	50,4	71,5	-21,1					30,7
	E1/M7-7	52,7	70,8	-18,1					22,7
	3	E1/M7-7-75- RG451	9	2,47	E1/M7-5	68,6	52,5	16,1	14,9
					4	RG9-RG241	12	16,98	RG9
	RG241	74,3	49,2	25,1					40,4
	P1/M7-7	72,8	48,9	23,9					35,7
	E3/M6-4	70,6	49,8	20,8					28,0
	E1/M5-7	69,3	50,6	18,7	23,3				
RRDW	1	E4/M1-8- ~E4/M3-8	1	2,42	E4/M1-8	126,2	104,9	21,3	8,9
					2	E4/M8-3~ ~E1/M7-7	6	5,80	E3/M8-3
	E5/M4-3	100,4	132,1	-31,7					23,4
	E1/M7-7	103,2	131,6	-28,4					18,9
	3	RG9~RG241	12	12,05	RG9	139,9	92,9	47,0	44,2
					RG241	138,9	96,8	42,1	37,4

					E3/M6-4	131,8	98,7	33,1	24,2
					P1/M7-7	131,1	99,3	81,8	24,6
					E1/M5-7	128,6	101,5	27,1	16,8

NST: nhiễm sắc thể, Pe: ảnh hưởng kiểu hình, R²: phần trăm biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL

Nhiễm sắc thể số 6

Nhiễm sắc thể số 12



Hình 6-1: Bản đồ QTL tính trạng liên quan hiện tượng chống chịu thiếu lân (RTA, RSDW, RRDW), quần thể RIL của tổ hợp lai IR20 / IR55178, trên nhiễm sắc thể số 6 và 12, với AFLP marker (Ni và ctv. 1998)

Gen chủ lực điều khiển tính chống chịu thiếu lân được ký hiệu là *PHO*. Gen này được phát hiện nhờ AFLP marker: P1/M7-7 và E1/M5-7, và RFLP marker RG9 – RG241 trên nhiễm sắc thể số 12 (hình 6-1) (Ni và ctv. 1998). QTL điều khiển tính trạng khả năng đẻ nhánh giải thích được 54% biến thiên kiểu hình, tương tự, QTL điều khiển tính trạng trọng lượng khô của chồi: 60,8% và QTL điều khiển tính trạng trọng lượng khô của rễ: 44,2% (bảng 3).

QTL được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 6 ở marker loci E3/M8-3 và E1/M7-7 giải thích được 33,6% biến thiên kiểu hình của tính trạng khả năng đẻ nhánh, 34% trọng lượng khô của chồi, 25,2% trọng lượng khô của rễ (hình 6-1, bảng 3)

QTL được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 1 ở marker loci E4/M1-8 và E4/M3-8 giải thích được 9,9% biến thiên kiểu hình của tính trạng khả năng đẻ nhánh, 10,8% trọng lượng khô của chồi, 8,9% trọng lượng khô của rễ

Chỉ có một QTL được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 9 ở marker loci E1/M7-5 và RG451 giải thích được 14,9% biến thiên kiểu hình của tính trạng trọng lượng khô của chồi.

Ở cây bắp, trọng lượng khô trung bình được sử dụng như một thống số để đánh giá tính chống chịu thiếu lân (Reiter và ctv. 1991). Tuy nhiên, khả năng đẻ nhánh tương đối (RTA) vẫn được xem như dấu chuẩn có mức độ tin cậy cao nhất trong đánh giá tính chống chịu thiếu lân của cây lúa (Hung 1985, Chaubey và ctv. 1994). Chúng ta vừa thảo luận ở trên với 3 tính trạng: khả năng đẻ nhánh tương đối (RTA), trọng lượng khô tương đối của chồi (RSDW) và trọng lượng khô tương đối của rễ (RRDW). Chúng tham gia rất tích cực vào hiện tượng chống chịu thiếu lân. Trong đó, RTA có thể được xác định một cách dễ dàng hơn trong mối quan hệ với tính chống chịu và được xem như tiêu chuẩn chọn lọc then chốt.

6-3-2. Lập bản đồ QTL bằng RFLP

Công trình nghiên cứu của Wissuwa và ctv. (1998) ở Nhật Bản có thể được xem như thí nghiệm kiểu mẫu trong phân tích QTL có liên quan đến tính trạng chống chịu thiếu lân. Nhóm tác giả này căn cứ trên hai hiện tượng cơ bản: khả năng hấp thu P và hiệu quả sử dụng P trong cây.

Giống lúa japonica có tên “Nipponbare” (có nguồn gốc ở Nhật) được lai với giống lúa indica “Kasalath” (có nguồn gốc ở Assam, Ấn Độ). Con lai F₁ được lai lui với giống tái tục Nipponbare. Chọn ngẫu nhiên 98 dòng con lai BC₁F₁, thu hoạch mỗi dòng một đến hai hạt theo phương pháp “SSD” (single seed descent) trong suốt 5 thế hệ liên tục (Lin và ctv. 1998). Tác giả sử dụng lá của quần thể BC₁F₅ để ly trích DNA và phân tích RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Trong khi đó, tác giả thực hiện đánh giá kiểu hình ở quần thể BC₁F₁₆. Quần thể này còn được gọi là BIL (Backcross inbred lines).

6-3-2-1. Đánh giá kiểu hình

Bên cạnh đó, nhóm tác giả đã đánh giá kiểu hình của 14 giống lúa có khả năng hấp thu P khác nhau làm chuẩn giá trị để so sánh: IR26, IR36 (IRRI, Philippines), Yamadanishiki (Nhật), Oryza Sabana-6, IAC47, IAC1246, CT11891-2-2-7 (CIAT, Colombia), Progreso, CNA4143, CNA4128, CNA4291, CNA7013 (Brazil), Morogsol (Ấn Độ), WAB 99-84 (WARDA, Tây Châu Phi).

Nghiệm thức không bón lân trên đất nghèo lân là nghiệm thức xử lý. Nghiệm thức đối chứng được bón 60kg P₂O₅ / ha. Sau khi trồng 125 ngày, cây lúa thí nghiệm được đếm số chồi / cây. Số chồi này được cắt và mang về phòng thí nghiệm, sấy khô ở 65°C trong 5 ngày. Mẫu được nghiền sau khi xác định trọng lượng khô của từng mẫu, cho qua rây “1-mm mesh”.

Hàm lượng P trong mô được tính trên 1mg mẫu bột lá, sử dụng máy sắc ký để đo P theo phương pháp Hanson (1950), sau khi xử lý với HNO₃, HClO₄, H₂SO₄ (3:1:1). Hàm

lượng P tổng số được hấp thu được tính theo trọng lượng chất khô và P trong mô, và hiệu quả sử dụng lân được biểu thị bằng trọng lượng chất khô (g) / mg P được hấp thu

Bảng 4: Ảnh hưởng stress do thiếu lân (-P) so với nghiệm thức có bón lân (+P) trong 14 giống lúa đối chứng (Wissuwa và ctv. 1998)

Thông số	+P	-P	Giảm (%)	Mức độ giảm trong quang (%)
P hấp thu (mg / cây)	8,95	3,48	61,0	28,9-96,5
Hàm lượng P ở mô (mg P / g)	0,86	0,67	22,9	6,8-40,4
Trọng lượng khô (g / cây)	10,45	5,19	50,4	5,3-94,1
Số chồi	9,37	5,00	46,7	15,4-87,5

+P: thí nghiệm được bón 60kg P₂O₅ / ha

-P: thí nghiệm trên đất thiếu P, lân dễ tiêu (1,0 mg P. kg⁻¹ đất, Truog-P; 4,5 mg P / kg đất, Bray2-P)

Bảng 5: Hệ số tương quan giữa các tính trạng mục tiêu trong 98 dòng BILs (Wissuwa và ctv. 1998). Tất cả hệ số tương quan đều có ý nghĩa ở mức độ 0,01.

	Hiệu quả sử dụng P	Trọng lượng khô	Số chồi
Khả năng hấp thu P (mg/cây)	-0,72	0,96	0,75
Hiệu quả sử dụng P (g trọng lượng khô / mg P)		-0,60	-0,52
Trọng lượng khô (g / cây)			0,74

6-3-2-2. Xây dựng bản đồ QTL

Bản đồ liên kết gen bao gồm 245 RFLP marker có nguồn gốc từ chương trình RGP (Rice genome program) của Nhật được mô tả bởi Lin và ctv.(1998). Số liệu về số chồi / cây và hàm lượng lân trong cây được chuyển đổi thành giá trị *log* trước khi phân tích.

Phân tích QTL theo phương pháp CIM (composite interval mapping) của Zeng (1994), trên cơ sở phần mềm PLABQTL (Utz và Melchinger 1996, Haley và Knott 1992)

Bởi vì mô hình chuyên môn để phân tích trên quần thể BIL chưa hoàn thiện, các tác giả đã sử dụng số liệu này như số liệu “F₂ backcross” và marker dị hợp tử xem như số liệu thiếu. Bước một, qui trình SIM (simple interval mapping) phải được hoàn tất để chọn lọc các giá trị “cofactor”. Chọn trên computer các ngưỡng “F-to-enter” và “F-to-drop” ở mức độ 6.0 nhằm ngăn ngừa trường hợp nhiều marker liên kết với một QTL như là những cofactor. Sử dụng những cofactor này để giảm biến thiên do yếu tố cận. Tác giả đã tìm kiếm QTL giả định với phương pháp CIM ở thang điểm LOD > 2,80.

RFLP và phân tích liên kết trong trường hợp dòng BIL (backcross inbred lines) được mô tả khá chi tiết bởi Lin và ctv. (1998). Giá trị khoảng cách trung bình giữa 245 RFLP marker trong bản đồ QTL là 4,8 cM. Phần trăm dị hợp (4,6%) khác biệt không có ý nghĩa với giá trị hi vọng 3,1%, và tỉ lệ phân ly phù hợp với định luật Mendel 3:1 đối với hầu hết các marker.

Bốn QTL giả định đối với tính trạng hấp thu P đã được tìm thấy trên nhiễm sắc thể số 2, 6, 10 và 12 (hình 6-2, bảng 6), giải thích được 54,5% biến thiên kiểu hình của tính trạng hấp thu P. Một trong những QTL này liên kết với C443 trên nhiễm sắc thể số 12, có ảnh hưởng chính, và đóng góp rất lớn đến biến thiên kiểu hình (Wissuwa và ctv. 1998)

Bảng 6: QTL giả định đối với tính trạng hấp thu P, hiệu quả sử dụng P, trọng lượng khô, số chồi trong điều kiện stress do thiếu lân (Wissuwa và ctv. 1998)

	Quãng giữa hai marker	Nhiễm thể	Vị trí (cM)	Khoảng cách (cM)	LOD	R ² (%)	Ảnh hưởng thay thế	Alen dương tính
Hấp thu P	<u>G227-C365</u>	2	106	+3	2,82	5,8	+971	K
	<u>C498-R1954</u>	6	13	+2	3,52	9,8	+705	K
	<u>R162-R2447</u>	10	32	+6	4,70	7,7	-621	N
	<u>G2140-C443</u>	12	30	-3	10,74	27,9	+1938	K
	Total				16,25	54,5		
Hiệu quả sử dụng P	<u>G227-C365</u>	2	106	+3	5,22	9,8	-0,346	N
	<u>C946-R1854</u>	4	86	-4	4,35	9,4	+0,303	K
	<u>G2140-C443</u>	12	28	-4	6,57	19,1	-0,465	N
	Total				11,40	42,1		
Trọng lượng chất khô	<u>C1488-C63</u>	3	86	-1	3,08	6,4	-992	N
	<u>C191-C498</u>	6	10	+1	4,71	9,7	+1560	K
	<u>G2140-C443</u>	12	30	-3	10,50	26,5	+3193	K
	Total				12,89	45,4		
Số chồi	<u>R347-C335</u>	4	32	+2	4,37	9,8	+1,84	K
	<u>C901-G1406</u>	12	2	-1	3,90	9,5	+1,54	K
	<u>G2140-C443</u>	12	30	-3	7,87	20,6	+1,86	K
	Total				10,97	40,3		

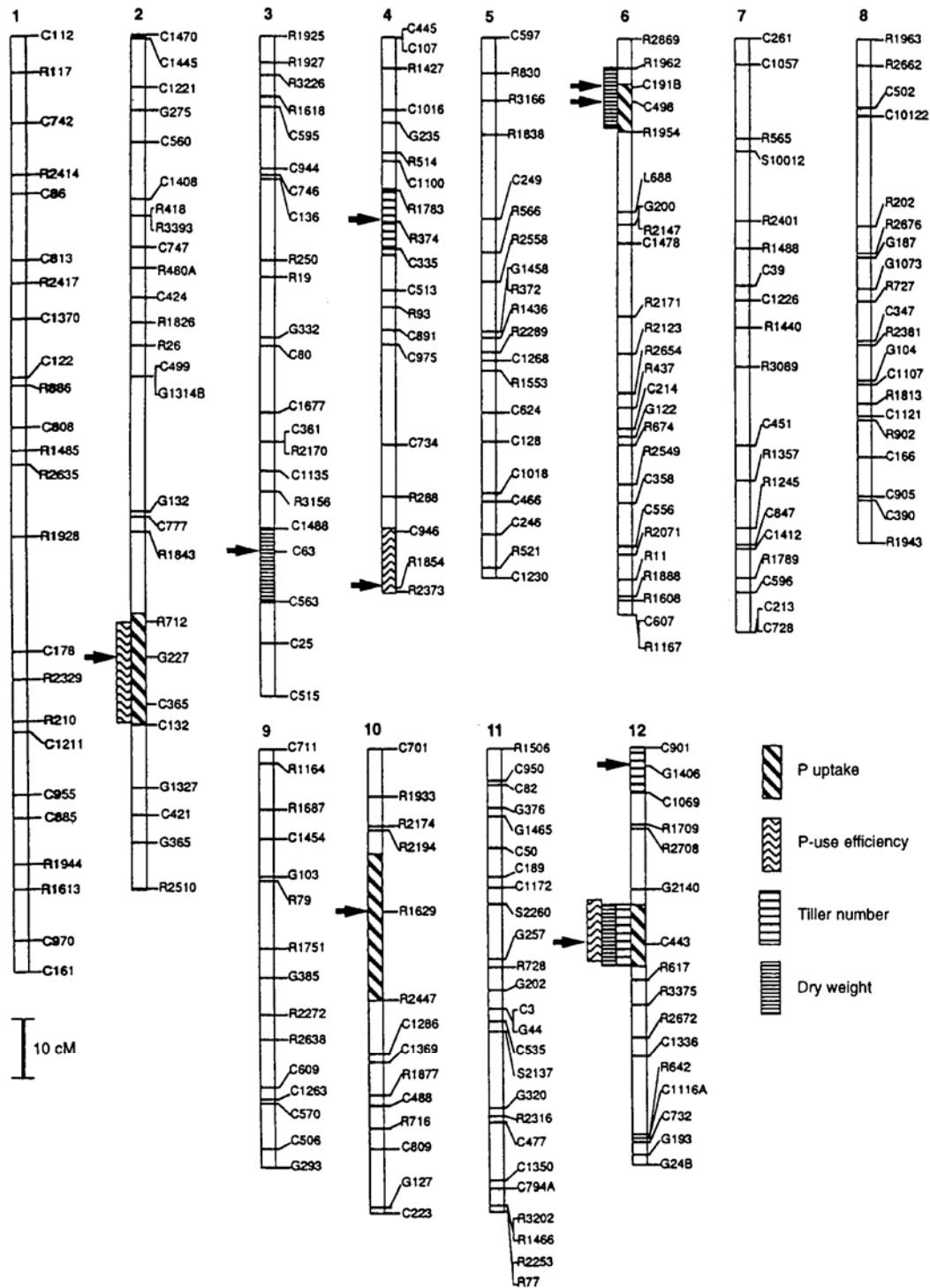
Những marker nằm gần QTL nhất được gạch dưới chữ số trong cột 2

Khoảng cách tính từ marker gần nhất (cM) trong cột 5

Ảnh hưởng thay thế cả hai alen Nipponbare và Kasalath trên cơ sở giá trị chưa chuyển đổi thành logarit

Cột cuối cùng biểu thị alen ảnh hưởng kiểu hình của K (Kasalath) và N (Nipponbare)

Giá trị “total” của khoảng cách bao gồm tất cả QTL giả định theo mô hình ” multiple-QTL”



Hình 6-2: Bản đồ QTL các tính trạng trọng lượng khô (dry weight), hấp thu P (P uptake), hiệu quả sử dụng P (P-use efficiency), và số chồi (tiller number), trên quần thể BILs của tổ hợp lai Nipponbare x Kasalath, với RFLP marker (Wissuwa và ctv. 1998)

Ba trong số bốn QTL chủ lực, có một QTL rất quan trọng thuộc về giống Kasalath. Trong 3 QTL điều khiển tính trạng trọng lượng khô, có 2 QTL định vị trên nhiễm thể số 6 và 12 cùng với tính trạng hấp thu P

QTL liên kết với **C443** trên nhiễm thể số **12** có ảnh hưởng rất lớn đối với cả 4 tính trạng mục tiêu, giải thích 27,9% biến thiên kiểu hình của hấp thu P, 19,1% đối với hiệu quả sử dụng P, 26,5% đối với trọng lượng chất khô, và 20,6% đối với khả năng đẻ nhánh (Wissuwa và ctv. 1998). Kết luận này tương đương với nhận xét của Ni và ctv. (1998).

Không có QTL nào liên quan đến trọng lượng chất khô được tìm thấy trên nhiễm sắc thể số 2 và 10, nhưng các đỉnh ở cùng những quãng đối với “tính trạng hấp thu P” đã được phát hiện trong trường hợp quãng giữa G222-C365 (LOD=2,30) trên nhiễm thể số 2, và quãng giữa R1629-R2447 (LOD=2,19) trên nhiễm thể số 10. Tương tự, QTL đối với tính trạng trọng lượng chất khô trên nhiễm thể số 3 thể hiện đồng thời với một đỉnh thấy được với hấp thu P nhưng LOD quá thấp (2,24)

Đối với tính trạng hiệu quả sử dụng P, có 3 QTL giả định giải thích 42,1% biến thiên kiểu hình (bảng 6). QTL chủ lực trên nhiễm thể số 12 và QTL thứ yếu trên nhiễm thể số 2 xuất hiện đồng vị trí với QTL của tính trạng hấp thu P (hình 6-2).

Ảnh hưởng alen của Nipponbare làm gia tăng hiệu quả sử dụng P, và alen của Kasalath làm gia tăng khả năng hấp thu lân, đã được ghi nhận (Wissuwa và ctv. 1998).

QTL giả định trên nhiễm thể số 4 không tương ứng với đỉnh trong tất cả tính trạng mục tiêu

Đối với tính trạng khả năng đẻ nhánh, 3 QTL giả định giải thích 40,3% biến thiên kiểu hình (bảng 6), trong đó C443 đã giải thích 20,6%. Ảnh hưởng alen của Kasalath làm gia tăng tính trạng này (Wissuwa và ctv. 1998), một tính trạng được xem như tiêu chuẩn chọn lọc của nhiều nhà chọn giống (Ni và ctv. 1998)

Những giống chống chịu stress do thiếu lân cần phải phối hợp được cả hai tính trạng hấp thu P và sử dụng P có hiệu quả ở bên trong cây lúa. Như vậy có hai QTL chung cho cả hai tính trạng này định vị trên nhiễm sắc thể số 2 và 12 với cùng quãng giữa 2 marker G227-C365 và G2140-C443. Ảnh hưởng alen của Kasalath trong 2 QTL này: làm gia tăng hấp thu P, nhưng làm giảm hiệu quả sử dụng P. Hiện tượng như vậy do sự xuất hiện cả hai loci giữa những quãng đều có ý nghĩa, cả hai liên kết rất chặt chẽ theo kiểu thúc đẩy (repulsion, dạng *trans*), hoặc chỉ có một loci nằm bên trong quãng với biểu hiện ảnh hưởng ngược đối với hấp thu P và sử dụng hiệu quả P. Chọn lọc các alen của Kasalath dương tính để cải tiến tính trạng hấp thu lân, đồng thời nó làm giảm hiệu quả sử dụng P, là không thể chấp nhận được (Wissuwa và ctv. 1998). Tuy nhiên, chính khả năng hấp thu P cao là điều kiện chính để giúp cây lúa chống chịu hiện tượng thiếu lân, trong khi đó hiệu quả sử dụng lân có ảnh hưởng thứ yếu trong việc gia tăng tính chống chịu thiếu lân. Nhìn lại hệ số tương quan ở bảng 5, chúng ta sẽ thấy rõ hơn điều đó.

Trong thí nghiệm này, trọng lượng khô vào lúc 125 ngày sau khi trồng là một giá trị chỉ thị tính chống chịu thiếu lân, bởi vì chúng ta không thể dùng năng suất hạt để xác định trong điều kiện các dòng BIL thể hiện rất khác nhau về thời gian sinh trưởng, dẫn đến ngày thu hoạch rất chênh lệch. Trọng lượng chất khô trong điều kiện đất thiếu lân thay đổi tùy theo khả năng hấp thu P của giống lúa. Fageria và ctv. (1988) không tìm thấy một sự tương quan có ý nghĩa giữa năng suất hạt và khả năng hấp thu P, trong điều kiện thí nghiệm của nhóm tác giả này không quá nghiêm trọng về ảnh hưởng stress do thiếu lân. Các tác giả ghi nhận: năng suất hạt chỉ giảm khoảng 14% tương ứng với mức độ P được bón vào, và hàm lượng P ở mô vẫn còn duy trì khá tốt, trên 1mg P / gr chất khô, mà ở mức độ này, người ta định nghĩa đó là ngưỡng thiếu lân đối với cây lúa ở giai đoạn đẻ nhánh.

Một thí nghiệm khác tại IRRI (1994) cho thấy tương quan giữa hấp thu lân và năng suất hạt $r = 0,40$, và Koyama (1973) ghi nhận rằng: năng suất hạt tùy thuộc chủ yếu vào khả năng hấp thu P, với khả năng hấp thu P càng cao, mức độ chống chịu thiếu lân càng lớn.

Trọng lượng chất khô có tương quan khá chặt với khả năng hấp thu lân so với năng suất hạt trong rất nhiều nghiên cứu trước đó, do sự khác biệt về giống, khác biệt về khả năng chuyển vị P từ mô sinh trưởng sang mô sinh dục (Wissuwa và ctv. 1998), và do sự khác biệt về chỉ số thu hoạch (HI). Những nhà chọn giống đã cố gắng phát triển chương trình cải tiến giống mới, kết hợp khả năng hấp thu P với gia tăng chỉ số HI trong mục tiêu gia tăng sự chống chịu thiếu lân, hơn là tập trung mục tiêu cải tiến hiệu quả sử dụng lân. Gia tăng hiệu quả sử dụng P sẽ thu được những ảnh hưởng ngược lại, bởi vì hàm lượng P trong hạt thấp là vấn đề của chất lượng hạt (Hedley và ctv. 1994). Hàm lượng P trong hạt có ảnh hưởng rất lớn đến cây mạ, rễ phát triển nhanh trong giai đoạn đầu, ảnh hưởng đến khả năng hấp thu lân.

Khả năng đẻ nhánh tuyệt đối và khả năng đẻ nhánh tương đối chính là những thông tin gián tiếp đối với tính trạng chống chịu thiếu lân của cây lúa (Hung 1985, Chaubey và ctv. 1994), được đề nghị làm giá trị chỉ thị (indicator). Nó có thuận lợi là dễ xác định trong suốt giai đoạn tăng trưởng, không giống như trọng lượng khô hoặc khả năng hấp thu lân. Trong 3 QTL điều khiển tính trạng khả năng đẻ nhánh, có một QTL thể hiện đồng vị trí với QTL(C443) đối với khả năng hấp thu lân và trọng lượng khô. Một trong những yếu điểm của giá trị chỉ thị gián tiếp (khả năng đẻ nhánh) để tìm kiếm QTL đối với tính trạng có liên quan (chống chịu thiếu lân) là: những QTL như vậy có thể đại diện cho những giá trị khác nhau về kiểu gen chỉ có liên quan đến số chồi mà không có ý nghĩa đối với tính trạng mục tiêu sau cùng. Khả năng đẻ nhánh tổng quát và mức độ nhạy cảm đối với hiện tượng thiếu lân có mối liên quan khá cao nếu chúng ta sử dụng số liệu số chồi tuyệt đối, và ngược lại nếu chúng ta sử dụng số liệu số chồi tương đối (tỉ lệ giữa giá trị số chồi bị stress do thiếu lân trên giá trị số chồi ở lô bón lân đầy đủ). Những QTL đối với số chồi trong hình 6-2 cho thấy: chúng định vị ở khu vực 32 cM trên nhiễm thể số 4 và 2 cM trên nhiễm thể số 12, trong quãng có mức độ ý nghĩa cho phép, ảnh hưởng di truyền đến tính trạng số chồi trong điều kiện không có stress (Ray và ctv. 1996). QTL chính trên nhiễm thể số 12 (C443) không kết với với cả hai tính trạng: số chồi (Ray và ctv. 1996) và số bông / bụi (Lin và ctv. 1996). Sử dụng số chồi (một tính trạng gián tiếp) có thể cho chúng ta xác định được một QTL chính của tính trạng chống chịu thiếu lân, nhưng Wissuwa và ctv. (1998) đã thất bại trong việc tìm kiếm những QTL giả định có ảnh hưởng phụ trong tính trạng hấp thu lân, hoặc tính trạng trọng lượng khô.

Khả năng hấp thu lân trong đất nghèo lân dường như còn lệ thuộc vào đặc điểm của rễ lúa. Người ta đã tập trung nghiên cứu nhằm giải thích những QTL giả định biểu thị ảnh hưởng của chúng đối với tính trạng chống chịu thiếu lân. Một vị trí trên nhiễm sắc thể số 6 đã được phát hiện (C498, 13-cM) với một QTL phủ lên khu vực ấy liên quan đến khả năng hấp thu lân (Ray và ctv. 1996). QTL này giải thích 10% biến thiên kiểu hình của tổng số rễ trong một cặp lai indica x japonica, và alen của indica có ảnh hưởng dương tính.

QTL trên nhiễm sắc thể số 2, 6, và 12 là những ứng cử viên tốt đối với tính trạng khả năng hấp thu lân, bởi vì alen dương tính có nguồn gốc từ Kasalath, giống chống chịu thiếu lân rất ưu việt. Wissuwa và ctv. (1998) đề nghị thiết lập quần thể NIL (nearlly-isogenic lines) để tách biệt rõ ràng vùng trên nhiễm sắc thể có chứa QTL giả định đối với khả năng hấp thu lân, và để thực hiện những nghiên cứu cơ bản về sinh lý học, tìm hiểu cơ chế hấp thu P của cây lúa (Yano và Sasaki 1997). Khi ấy, nhà chọn giống có thể áp dụng chiến lược MAS trên cơ sở QTL được xác định rõ ràng, để chuyển khả năng hấp thu P từ giống bản địa Kasalath vào giống cải tiến, có chỉ số HI cao, có năng suất cao, trong điều kiện bị thiếu lân.

6-3-3. Gen *Pup-1*: một QTL chủ lực làm gia tăng khả năng hấp thu lân

Nghiên cứu của tập thể tác giả Wissuwa tại Nhật được phát triển sâu hơn thông qua bản đồ gen *Pup-1* (Wissuwa và ctv. 2002). Một QTL được lên bản đồ với sự đáp ứng khá rộng của quãng giữa hai marker bao hàm một “cluster” của các gen, mỗi gen sẽ có một ảnh

hường nhất định so với một locus đơn độc. Quần thể “mapping” được phát triển theo dạng quần thể NIL trên cơ sở hồi giao với bố mẹ là giống tái tục (recurrent) hoàn toàn thỏa mãn với yêu cầu của kỹ thuật “fine mapping” đối với QTL. Khái niệm này được áp dụng thành công đối với “fine mapping” những QTL mục tiêu trên cây bắp (Dorweiler và ctv. 1993), trên cây cà chua (Alpert và Tanksley 1996), trên cây lúa (Yamamoto và ctv. 1998). Những kết quả cho thấy vài QTL có thể được xử lý giống như gen đơn theo di truyền Mendel.

Wissuwa và ctv. (2002) đã hình thành quần thể lập bản đồ QTL thứ hai bằng cách hồi giao NIL-C443 với Nipponbare. Tại một đoạn phân tử 50-cM marker của Kasalath, người ta đã công bố rất nhiều kết quả trong chương trình genome cây lúa của Nhật. Các họ F₂ được chọn lọc và đánh giá ở ngoài đồng có hàm lượng lân rất nghèo trong đất. Phân tích QTL tiêu chuẩn được hoàn thiện bởi mô hình “substitution mapping” do Paterson và ctv. (1990) đề xuất.

NIL-C443 được hình thành thông qua hai lần hồi giao bổ sung của một dòng BC₁F₂ đã được tuyển chọn trong quần thể “mapping” đầu tiên, với Nipponbare được dùng là giống tái tục. Điều tra kiểu gen nhằm duy trì những alen của Kasalath ở QTL C443, cũng như chọn những alen không phải Kasalath ở các loci không có liên quan, thông qua qui trình sử dụng 118 RFLP marker trên genome cây lúa. Bổ sung thêm chi tiết đoạn nhiễm thể 12 chứa 50-cM Kasalath, NIL-C443 còn chứa những đoạn ngắn Kasalath trên nhiễm thể số 1, 8 và 10, chúng không liên kết với khả năng hấp thu lân trong phân tích QTL sơ khởi (Hình 6-3). Quần thể “mapping” thứ cấp được dùng trong kỹ thuật “fine map” đối với QTL chủ lực điều khiển tính trạng hấp thu P được phát triển thông qua hồi giao giữa NIL-C443 với Nipponbare. Tác giả đã thu thập 150 cây F₂ để đánh giá kiểu gen với 42 RFLP marker, và một nhóm phụ gồm 50 gia đình F₂ được chọn lọc để đánh giá kiểu hình.

Đánh giá kiểu gen được thực hiện với 42 RFLP marker được chọn lọc từ bản đồ gốc, mật độ cao RFLP, với 3267 marker, thuộc chương trình genome cây lúa của Nhật (chúng ta có thể theo dõi trên web site <http://rgp.dna.affrc.go.jp/Publicdata.html>). Trên nhiễm sắc thể 12, có 22 marker, trong đó 16 marker định vị một đoạn lớn của Kasalath, giữa 30,0 và 72,5 cM. Những marker còn lại phủ trên nhiễm sắc thể số 1 của Kasalath (8 marker), nhiễm sắc thể số 8 (4 marker), và nhiễm sắc thể số 10 (8 marker) (Wissuwa và ctv. 2002). Phân tích QTL được hoàn thành bằng cách sử dụng số liệu của 50 họ F₂ để đánh giá kiểu hình.

Kết quả đánh giá kiểu hình cho thấy số chồi tương đối trong điều kiện thiếu lân so với điều kiện đủ lân được khẳng định là một dự đoán gián tiếp đối với khả năng hấp thu lân (Ni 1998, Wissuwa và ctv. 1998, 2002)

Chúng ta thực hiện một kỹ thuật được gọi là “substitution mapping” (tạm dịch là lập bản đồ chi tiết theo phương pháp loại trừ dần) đối với gen *Pup1*.

6-3-3-1. Bản đồ QTL của *Pup-1*

Bảng 7: Bản đồ gen *Pup-1* đối với tính trạng khả năng hấp thu lân trên nhiễm thể số 12 (Wissuwa và ctv. 2002)

Quãng giữa marker	Vị trí (cM)	LOD	R ²	Ảnh hưởng cộng	Ảnh hưởng trội
Bản đồ trên cơ sở F ₂ (n=50)					
<u>S14025-S13126</u>	53,6	16,6	78,9	0,56**	0,05ns
Bản đồ trên cơ sở F ₃ (n=160)					
<u>S14025-S13126</u>	54,8	11,5	28,1	0,69**	0,38*
Bản đồ QTL đầu tiên của Wissuwa và ctv. 1998					

Trong kỹ thuật “fine mapping” ở F_2 , một QTL định vị trên nhánh vai dài của nhiễm thể số 12 đã giải thích 78,9% biến thiên kiểu hình (bảng 7), với 2 marker kế cận S14025 và S13126, nó liên kết với S14025 với khoảng cách 1,3 cM. Nhóm tác giả đã sử dụng ký hiệu *Pup-1* (viết tắt từ chữ phosphorous uptake 1) để chỉ định QTL này. Phân tích QTL cho thấy *Pup-1* là do hoạt động của gen cộng tính, trong khi đó ảnh hưởng gen trội không có ý nghĩa.

Bên cạnh khu vực rất lớn trên nhiễm thể 12 của Kasalath, NIL-C443 còn có những đoạn quan trọng khác của Kasalath trên nhiễm thể số 1, 8, và 10 (hình 6-3) ảnh hưởng đến tính trạng khả năng hấp thu lân.

Trong kỹ thuật “fine mapping” ở F_3 , biến thiên do kiểu hình được giải thích bởi QTL giảm xuống còn 28,1%. Đây là kết quả tốt, bởi vì các số liệu từ cá thể được thu thập không có tính chất lặp lại. *Pup1* liên kết với 2 marker kế cận S14025 và S13126, và liên kết chặt với S13126

Trong thí nghiệm đầu tiên về bản đồ QTL (Wissuwa và ctv. 1998), *Pup1* nằm giữa hai marker C443-G2140, và liên kết chặt với C443 ở khoảng cách di truyền là 3 cM. Trong thí nghiệm này, nhóm tác giả đã sử dụng bản đồ liên kết gen của Kurata và ctv. (1994). Vị trí của C443 ở cột mốc tương ứng với vị trí 54,5 cM, cộng thêm khoảng cách 3 cM của gen *Pup-1* (hình 6-3)

Số chồi được phân bố trong quần thể đồng hợp tử F_3 theo biểu đồ hình chuông (phân bố chuẩn), trong khi đó quần thể dị hợp F_3 không phân bố chuẩn

Thực hiện kỹ thuật “substitution mapping” trên đoạn mục tiêu của nhiễm sắc thể số 12 giống Kasalath, Wissuwa và ctv. (2002) đã chọn ra 6 họ có chất lượng thông tin cao trong số 160 cá thể F_3 . Các họ (family) khác biệt nhau trên 5 đoạn của nhiễm thể số 1, 8 và 10 trong genome cây lúa Kasalath (hình 6-3), nhưng tất cả các cây trong cùng một họ đều chứa đựng đoạn giống nhau của Kasalath. Biến thiên kiểu gen trong những họ chỉ được ghi nhận trên nhiễm sắc thể số 12. Vị trí của gen *Pup-1* có thể được xem xét theo qui trình loại dần từng bước một (step-wise exclusion). Trong kiểu gen của họ 14, gen *Pup-1* định vị giữa hai marker S10705-C449. Trong kiểu gen họ 92 và 93, người ta có thể rút ngắn quãng chứa gen *Pup-1* giữa hai marker S10704-G2140, bởi vì nó thể hiện một biến thiên kiểu gen nằm ở bên ngoài quãng mà nó không có liên quan đến biến thiên của kiểu hình (số chồi).

Tất cả các dòng của họ số 6 có chứa đoạn nhiễm sắc của Nipponbare thuộc quãng giữa marker R1869-S14025, biểu hiện sự phân ly của kiểu hình. Như vậy, S14025 có thể được xem như một marker kế cận trong phân tích QTL như vậy.

Trong họ số 97 và 114, có xu hướng loại ra quãng S13752-G21410 (-C449). Như vậy, theo phương pháp loại dần các yếu tố, người ta có thể xác định rằng chỉ có marker S13126 là một “thể đồng dạng phân ly” (co-segregates) với gen *Pup-1* (Wissuwa và ctv. 2002).

Gen *Pup-1* vẫn tiếp tục thể hiện ảnh hưởng của nó trong khi xác định genome của giống cho (donor) (Wissuwa và Ae 2001a, 2001b)

Sử dụng quần thể NIL có thể sẽ có những rủi ro như đoạn nhiễm thể rất nhỏ của “giống cho” tồn tại và ảnh hưởng tiềm ẩn của chúng lại không đóng góp gì (Paterson và ctv. 1990). Kiểu tồn tại như vậy (relics) sẽ biểu hiện một cách ngẫu nhiên trong quần thể phân ly. Trong thí nghiệm của Wissuwa và ctv. (2002) không có “relics” trong NIL-C443 gây ảnh hưởng đến tính trạng khả năng hấp thu lân và hơn 80% biến thiên về số chồi đã được giải thích bởi locus *Pup-1*. Tương tác theo kiểu epistasis giữa *Pup-1* và vùng còn lại trong genome cũng không có ý nghĩa.

Phương pháp tiếp cận có thể được sử dụng để xác định chính xác vị trí gen *Pup-1*: phân tích QTL, đặt vị trí *Pup-1* trong quãng 3 cM liên kết với marker S14025 và S13126.

Phương pháp lập bản đồ chi tiết bằng cách loại trừ dần (substitution mapping) cho thấy: *Pup-1* chỉ đồng phân ly với marker **S13126**. Quãng định vị như vậy được giới hạn bởi S14025-S13752, nằm bên ngoài quãng có chứa gen *Pup-1* (Wissuwa và ctv. 2002).

Hiện tượng tái tổ hợp trong quãng S14025-S13126 của họ số 6, trong quãng S13126-S13752 của họ số 97, 114 (hình 6-5) cho thấy chính sự tái tổ hợp sẽ có thể giúp cho giá trị bản đồ cao hơn về giải thích sự kiện. Tuy nhiên, nhóm tác giả này đề xuất phải đưa thêm nhiều marker trong các quãng như vậy để định vị chính xác hơn *Pup-1*. Chính *Pup-1* là QTL chủ lực gây ảnh hưởng chính đến tính trạng mục tiêu đáp ứng yêu cầu thí nghiệm về bản đồ. Yamamoto và ctv. (1998) chứng minh rằng những QTL thứ yếu cũng có khả năng cung cấp thông tin chính xác cao.

Một QTL có thể được xem như một yếu tố di truyền gen đơn theo Mendel hoặc là kết quả của một “cluster” của những gen thứ yếu? Đó là câu hỏi đã được đặt ra rất sớm. Trong trường này, chỉ có một QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 12, giải thích hơn 80% biến thiên kiểu hình, có thể được xem tương đương với yếu tố trong di truyền Mendel. Tuy nhiên, với quãng 3 cM chứa *Pup-1* quá đủ rộng rãi để chứa nhiều gen. Như vậy, *Pup-1* được giả định do hậu quả của nhiều gen liên kết rất chặt (Wissuwa và ctv. 2002)

6-3-3-2. Ứng dụng trong chọn giống

Ứng dụng marker phân tử trong chọn giống (MAS) là mục tiêu của nghiên cứu di truyền tính chống chịu thiếu lân. Ở đây, giống Kasalath được xem như “giống cho”. Giống Kasalath là giống bản địa, có nguồn gốc ở bang Assam, Ấn Độ, thân cao, dễ đổ ngã, hạt nhỏ, và dễ rụng. Phương pháp tiếp cận được ưa thích nhất là chuyển gen *Pup-1* vào giống lúa cải tiến theo kiểu hồi giao, với sự trợ giúp của MAS (Melchinger 1990, Hospital và Charcosset 1997). Người ta phải chọn lựa marker liên kết chặt với gen *Pup-1* biểu thị mức độ chính xác cao khi đánh giá so sánh kiểu gen với kiểu hình đối với tính trạng hấp thu P trong điều kiện đất thiếu P.

Việc ứng dụng MAS sẽ giúp nhà chọn giống tiết kiệm công sức lao động và thời gian khi đánh giá trên đồng ruộng. Chọn lọc cá thể đồng hợp tử đối với alen của giống tái tục (recurrent) (giống có dạng hình cải tiến, năng suất cao) trên một số lượng lớn marker loci, phủ hết bộ genome của cây sẽ làm giảm đi số thế hệ cần thiết để phục hồi genome giống tái tục ở những loci không có liên quan (Hospital và Charcosset 1997).

Frisch và ctv. (1999) ước đoán chỉ cần bốn thế hệ hồi giao được sự hỗ trợ của MAS, chúng ta có thể ứng dụng trên một quần thể nhỏ có số “marker point” khá hạn chế để chuyển một alen mục tiêu vào giống cải tiến. Điều này có thể giúp chúng ta rút ngắn hơn 2 thế hệ so với phương pháp hồi giao truyền thống. Nếu quần thể lớn và “marker point” nhiều, chúng ta sẽ rút ngắn hơn 3 thế hệ.

Pup-1 được xác định giữa hai marker kế cận S14025 và S13126 (S13752) là tiền đề để các nhà chọn giống áp dụng MAS để hội tụ gen này vào con lai có triển vọng, nhằm đáp ứng mục tiêu chọn tạo giống lúa chống chịu thiếu lân. Với một quãng 3-4 cM vừa đủ nhỏ để giảm thiểu ảnh hưởng “linkage drag” (liên kết không định hướng), sự hội tụ các tính trạng không mong muốn với alen mục tiêu ở mức độ chấp nhận được của các nhà chọn giống (Frisch và ctv. 1999). Đối với mục tiêu “map-based cloning”, quãng 3-4 cM được xem như quá lớn. Như vậy muốn clone được gen *Pup-1*, chúng ta cần phải bổ sung thêm nhiều marker liên kết chặt chẽ với gen này trong một bản đồ có tên chuyên môn là “high-resolution”.

6-3-3-3. Sử dụng dòng gần như đẳng gen trong nghiên cứu sinh lý học

Quần thể NIL không những là công cụ có tiềm năng trong nghiên cứu di truyền, mà còn cho phép chúng ta xét nghiệm những tiến trình sinh lý cây trồng liên quan đến gen mục

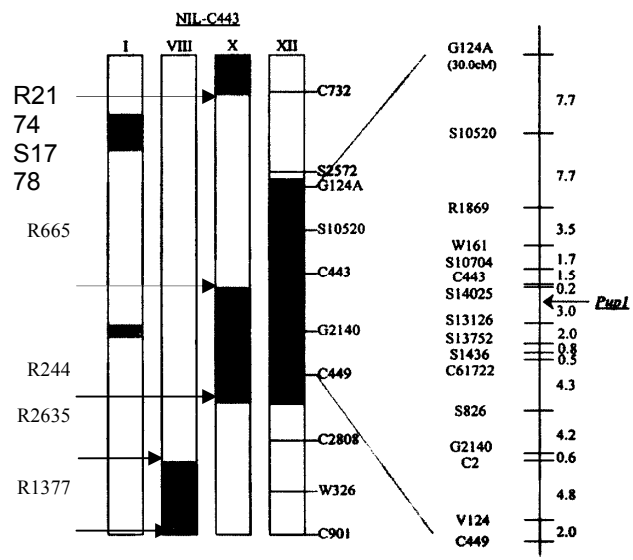
tiêu, bởi vì quần thể NIL làm giảm biến thiên không có liên quan đến tính trạng mục tiêu. Nhóm tác giả đã sử dụng quần thể NIL-C443 trong so sánh với Nipponbare và NIL bổ sung có chứa đoạn nhiễm thể của Kasalath thuộc nhiễm sắc thể số 1, 8 và 10, thiếu đoạn nhiễm sắc thể số 12, để định tính QTL điều khiển sự hấp thu P (Wissuwa và Ae 1999). Nghiên cứu như vậy cho thấy rằng: chỉ có nhiễm sắc thể số 12 tham gia vào sự khác biệt khả năng hấp thu lân của cây lúa

Nhóm tác giả chưa xác định được cơ chế sinh lý của tính trạng hấp thu P tương ứng với từng kiểu gen khác nhau. Những thí nghiệm tiếp sau đó đã khẳng định khả năng hấp thu lân cao của NIL-C443 là do sự tăng trưởng mạnh hơn của rễ lúa so với dòng hấp thu lân thấp, hoặc do hiện tượng hấp thu P có hiệu quả tốt hơn trên một đơn vị rễ lúa (tính theo kích cỡ)(còn được gọi là hiệu quả của rễ = root efficiency). Tốc độ tăng trưởng của rễ lúa trong giai đoạn mạ của NIL-C443 được kích thích trong điều kiện thiếu lân (Wissuwa và Ae 2001a). Dòng NIL-C443 duy trì khả năng hấp thu lân cao hơn trong khi mức độ khác biệt về tăng trưởng của rễ giảm. Điều này gợi ra một khái niệm: gen *Pup-1* ảnh hưởng cả hai tính trạng tăng trưởng của rễ và hiệu quả của rễ. Giả định rằng có một QTL, một gen, hoặc một cơ chế sẽ không đúng. *Pup-1* có thể chứa một “cluster” của những gen, mỗi gen sẽ ảnh hưởng đến một cơ chế khác nhau, hoặc điều tiết gen khi đáp ứng với tín hiệu “stress” theo kiểu “up” hoặc “down” hàng loạt các gen khác không định vị cùng khu vực với QTL này.

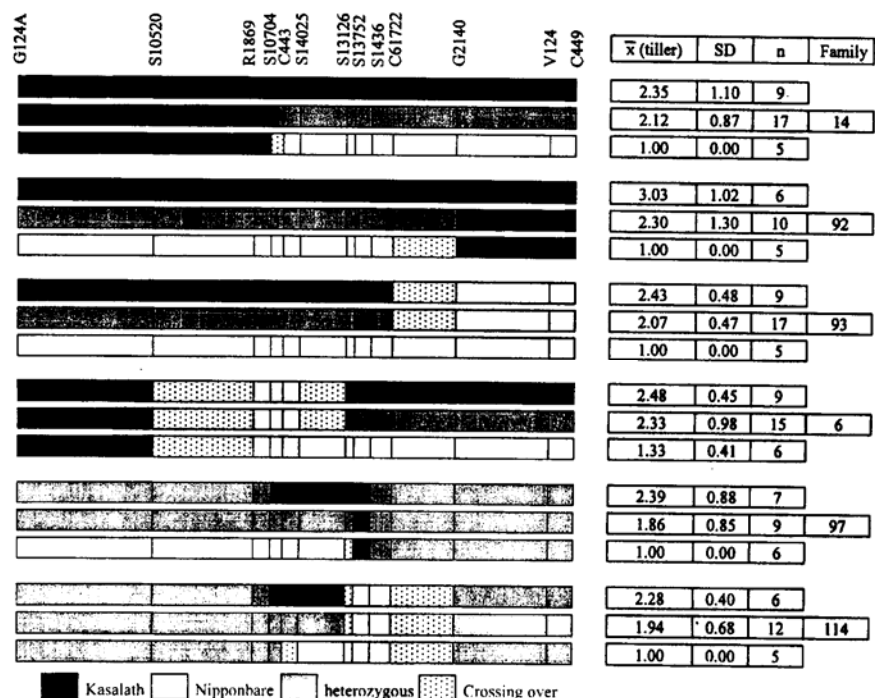
Khả năng gen *Pup-1* chỉ ảnh hưởng cơ chế có tính chất nguyên nhân, thí dụ như hiệu quả của rễ và tăng trưởng của rễ đóng vai trò thứ yếu. Dòng NIL-C443 có 91% alen của Nipponbare và 9% alen của Kasalath. Do đó những ảnh hưởng thứ yếu có thể là nguyên nhân gây ra sự khác biệt alen ở những loci bên ngoài quãng chứa gen *Pup-1*. Nếu một gen (hay nhiều gen) ở một QTL giả định nào đó được “clone”, chức năng của chúng sẽ có thể có ảnh hưởng số liệu căn bản của gen (gene-databases)(Wissuwa và ctv. 2002).

Chỉ có những tính trạng đồng phân ly với QTL, với khả năng hấp thu P cao, dường như có liên quan trực tiếp đến cơ chế chống chịu thiếu lân như vậy (Wissuwa và ctv. 2002).

Những dòng NIL mới có thể được phát triển thông qua kỹ thuật “fine mapping”. Những họ được sử dụng trong kỹ thuật “substitution mapping” (hình 6-4) sẽ có thể nhận được một điểm khởi động tuyệt hảo, vì những dòng NIL khác biệt về kích cỡ và vị trí của đoạn nhiễm thể Kasalath đã được ly trích một cách trực tiếp, hoặc sau một thế hệ nối tiếp. Các tác giả đề nghị sử dụng toàn bộ NIL trong thí nghiệm sinh lý học để có những giải thích cụ thể hơn về cơ chế chống chịu trên cơ sở sinh lý và di truyền.



Hình 6-3: Kiểu gen của NIL-C443 cho thấy đoạn nhiễm thể số 1, 8, 10 và 12 của Kasalath, và bản đồ liên kết gen trên nhiễm thể số 12 trên cơ sở số liệu marker của 150 cây F₂ thuộc quần thể QTL thứ cấp (Wissuwa và ctv. 2002)



Hình 6-4: Những kiểu gen biểu thị trên giản đồ của đoạn nhiễm sắc thể số 12 Kasalath được thu thập từ 160 cá thể chọn lọc F3 có nguồn gốc từ 6 họ F2, với giá trị trung bình số chồi, độ lệch chuẩn, và n cá thể (Wissuwa và ctv. 2002)

6-4. PHÂN TÍCH DI TRUYỀN SỐ LƯỢNG

Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long trong những năm 1990 trên cơ sở phân tích di truyền số lượng theo phương pháp truyền thống, thông qua lai diallel với 6 giống lúa: OM723-11, OM850 chống chịu tốt sự thiếu lân, IR64, IR50404 chống chịu trung bình, IR59606, OM997 chống chịu kém (Cân và ctv. 1998)

Nền có bón lân áp dụng công thức 100-60-0 kg NPK / ha và nền không có bón lân 100-0-0 kg NPK / ha. Cả hai nền đất đã trải qua 8 vụ (4 năm) thí nghiệm dài hạn với cùng công thức. Bốn tính trạng được ghi nhận theo tiêu chuẩn chọn lọc của IRRI là: khả năng đẻ nhánh, thời gian sinh trưởng, số hạt chắc trên bông, và trọng lượng khô của rế.

Xét theo khả năng đẻ nhánh, OM723-11, OM850 có giá trị khả năng phối hợp chung (gca) cao nhất, IR59606 có giá trị gca cao nhất đối với thời gian sinh trưởng, OM997, OM723-11 có giá trị gca cao nhất đối với trọng lượng khô của rế, IR50404 có giá trị gca cao nhất đối với tính trạng số hạt chắc trên bông, trong điều kiện thiếu lân (Cân và ctv. 1998).

Khả năng đẻ nhánh được xem như tiêu chuẩn chọn lọc rõ nhất. Đối với các tính trạng nghiên cứu, hoạt động của gen không cộng tính có ưu thế trong phân tích phương sai, ngoại trừ tính trạng thời gian sinh trưởng (bảng 8 và 9). Thời gian sinh trưởng có xu thế kéo dài ra trong điều kiện thiếu lân, tính trạng này được điều khiển bởi ưu thế của nhóm gen cộng tính. Xu thế giống chống chịu sự thiếu lân có thời gian sinh trưởng sớm hơn được kiểm định bằng tỉ lệ +ve/-ve.

Bảng 8: ANOVA về khả năng phối hợp trong Griffing I, model 1

Nguồn	Tính trạng	Không lân		Có bón lân	
		MS	F	MS	F
GCA	Thời gian sinh trưởng	84,80	188,40**	133,90	278,90**
SCA		130,50	512,50**	294,90	614,30**
REC		1,43	3,17**	12,30	25,60**
GCA	Số hạt chắc / bông	137,7	2,1*	67,6	1,8 ns
SCA		1691,0	21,2**	796,0	21,9**
REC		242,9	3,0 ns	84,6	2,3*
GCA	Trọng lượng khô của rễ	8,85	4,58**	11,05	4,31**
SCA		34,30	17,70**	31,10	12,10**
REC		1,83	0,94 ns	1,16	0,45 ns
GCA	Khả năng đẻ nhánh	15,47	4,40**	12,19	3,27**
SCA		125,02	53,60**	131,10	35,20**
REC		6,43	1,80 ns	10,52	2,82*

Bảng 9: Thống số di truyền của những tính trạng nghiên cứu trong điều kiện thiếu lân

Tính trạng	Mức độ tính trội		
	$(H_1/D)^{1/2}$	$\frac{2\sigma^2_{gca}}{2\sigma^2_{gca} + \sigma^2_{sca}}$	H^2_{ns} (%)
Khả năng đẻ nhánh	1,94	0,16	19,70
Thời gian sinh trưởng	0,98	0,56	33,90
Số hạt chắc / bông	5,80	0,01	3,10
Tr. lượng khô của rễ	0,81	0,03	20,90

Trọng lượng khô của rễ có giá trị $K_D/K_R = 1,6$ biểu thị tần suất alen trội cao hơn alen lặn trong điều kiện thiếu lân, đồng thời tỉ số $H_2/4H_1 = 0,37$ biểu thị kiểu hình có trọng lượng khô rễ cao hơn trong giống lúa chống chịu thiếu lân.

Giá trị dự đoán hoạt động của gen cộng tính được tính theo hệ số di truyền H^2 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, ngoại trừ thời gian sinh trưởng

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alpert KB, SD Tanksley. 1996. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: a major fruit weight quantitative trait locus in tomato. Proc Natl Acad Sci USA 93:15503-15507
- Blair GJ, DC Cordero. 1978. Sulfur nutrition of wet land rice. IRRI Res Paper Series 21
- Cân NT, ND Bậy, BC Bửu. 1998. Genetic analysis on phosphorous deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). OMonRice 6:20-28
- Chapin DC. 1980. Iron toxic soil. In: Soil and Rice, pp.781-800. IRRI, Los Banos, Philippines
- Chaubey CN, D Senadhira, GB Gregorio. 1994. Genetic analysis of tolerance for phosphorous deficiency in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 89:313-317
- Chesholm DC, GJ Blair. 1988a. Genetic analysis of salinity tolerance in rice. Theor Appl Genet 86:333-338

- Chesholm DC, GJ Blair. 1988b. Sodium-potassium ratio in soil solution and plant response under saline condition. *Soil Sci Soc Am J* 45:80-86
- Clark RB. 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J Agric Food Chem* 23:458-460
- Clark T. 1976. Greenhouse screening techniques for tolerance to phosphorous deficiency. *Crop Sci Soc of the Philippines*, pp.1-7
- Clark T, J Brown. 1974a. Techniques for breeding improved rice varieties for problem soil in genetic evaluation and utilization of rice for problem traing course 1990. Special project report, 10pp.
- Clark T, J Brown. 1974b. Factors affecting rice growth in acid sulfate soil. *Soil Sci Soc Am* 153:471-476
- Dorweiler J, A Stec, J Kermicle, J Doebley. 1993. *Teosinte glume architechture 1*: a single locus controlling a key step in maize evolution. *Science* 262:233-235
- Fageria NK, OP Morais, VC Baligar, RJ Wright. 1988. Response of rice cultivars to phosphorous supply on an oxisol. *Fert Res* 16: 195-206
- Fox MD. 1978. The salt tolerance of rice. *Inst Rice Commun Newsl* 10:1-4
- Frisch M, M Bohn, AM Melchinger. 1999. Comparision of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Sci* 39:1295-1301
- Gerloff GC. 1987. Intact plant screening for tolerance to nutrient deficiency stress. *Plant Soil* 99:3-15
- Gunawardena SDIE, HMS Wijeratne. 1978. Screening of rice under phosphorous deficient soil in Sri Lanka. *Int Rice Res Conf 1978 (No.34)*. International Rice Research Institute, LosBanos, Philippines
- Gunawardena I. 1979. Field screening for tolerance to iron toxicity in plant. *Journal of Plant Nutrition* 11(3):303-319
- Haley CS, SA Knott. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315-324
- Hanson WC. 1950. The photometric determination of phosphorous in fertilizers using the phosphovanado-molybdate complex. *J Sci Food Agric* 1:172-173
- Hedley MJ, GJD Kirk, MB Santos. 1994. Phosphorous efficiency and the forms of soil phosphorous utilized by poland rice cultivars. *Plant Soil* 158:53-62
- Hospital F, A Charcosset. 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics* 147:1469-1485
- Hung HH. 1985. Studies on tillering ability of rice under phosphorous stress. PhD thesis, Texas A&M University, Texas, USA
- Ikehashi H, FN Ponnampereuma. 1978. Varietal tolerance of rice for adverse soils. In: *Soil and Rice*. Symp IRRI, LosBanos, Philippines, pp 801-823
- IRRI. 1971. Annual report for 1970. LosBanos, Philippines
- IRRI. 1976. Annual report for 1975. LosBanos, Philippines
- IRRI. 1994. Program report for 1993. LosBanos, Philippines
- Katyal JC. 1984. Screening of rice for adverse soil tolerance. In: Bassam NEL et al. (eds), *Genetic aspects of plant mineral nutrition*, Kluver Acad Publisher, the Netherlands, pp.523-531

- Katyal JC, BD Sharma. 1980. Commun Soil Sci Plant Anal 15:1065-1081
- Kosambi DD. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann Eugen 12:172-175
- Koyama MT. 1973. Phosphorous deficient effects on growth of rice at heading stage of development. Soil Sci. 96:105-111
- Koyama MT, C Chammek, P Snitwongse. 1973. Varietal differences of Thai rice in the resistance to phosphorous deficiency. Trop Agric Res Cent Jpn Tech Bull 4
- Kurata N, Y Nagamura, K Yamamoto, Y Harusima, N Sue, J Wu, BA Antonio, A Shomura, T Shimizu, S-Y Lin, T Inoue, A Fukuda, T Shimano, Y Kuboki, T Toyama, Y Miyamoto, T Krihara, K Hayasaka, A Miyao, L Monna, HS Zhong, Y Tamura, Z-X Wang, T Momma, Y Umehara, M Yano, T Sasaki, Y Minobe. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. Nature Genet 8:365-372
- Lander ES, P Green, J Abrahamson, A Barlow, MJ Daly, SE Lincoln, L Newburg. 1987. Mapmarker: an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181
- Lin HX, HR Qian, JY Zhuang, J Lu, SK Min, ZM Xiong, N Huang, KL Zheng. 1996. RFLP mapping of QTLs for yield and related characters in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 92:920-927
- Lin SY, T Sasaki, M Yano. 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice (*Oryza sativa* L.) using backcross inbred lines. Theor Appl genet 96:371-375
- Majumder ND, DN Borthakur, SC Rakshit. 1989. heterosis in rice under phosphorous stress. Indian J Genet 49:231-235
- Melchinger AE. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. Plant Breed 104:1-19
- Ni JJ, P Wu, AC Lou, YS Zhang, QN Tao. 1996. Low phosphorous effects on the metabolism of rice seedlings. Commun Soil Sci Plant Anal 27(19-20):3073-3084
- Ni JJ, P Wu, D Senadhira, N Huang. 1988. Mapping QTLs for phosphorous deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 97:1361-1369
- Paterson AH, JW Deverna, B Lanini, SD Tanksley.. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato. Genetics 124:735-742
- Ponnaperuma FN. 1977. Screening for rice tolerance to mineral stresses. IRRI Res Paper Series 6, IRRI, LosBanos, Philippines.
- Ray JD, L Yu, SR McCouch, MC Champoux. 1996. Mapping quantitative trait loci associated with root penetration ability in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 92:627-636
- Reiter RS, JG Coors, Sussman, WH Gableman. 1991. Genetic analysis of tolerance to low-phosphorous stress in maize using restriction fragment length polymorphism. Theor Appl genet 82:561-568
- Senanayake N. 1984. Varietal tolerance to phosphorous deficiency in wetland rice soils. Trop Agric 140:69-78
- Utz HF, AE Melchinger. 1996. PLABQTL: a program for composite interval mapping of QTL. J Quant Trait Loci <http://probe.nalusda.gov.8000/otherdocs/jqtl>

- Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T van der Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Paleman, M Kruijer, M Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407-4414
- Wissuwa M, 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* 105:890-897
- Wissuwa M, M Yano, N Ae. 1998. Mapping of QTLs for phosphorous-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 97:777-783
- Wissuwa M, N Ae. 2001a. Genotypic variation for tolerance to phosphorous deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement. *Plant Breed* 120:43-48
- Wissuwa M, N Ae. 2001b. Further characterization of two QTLs that increase phosphorous uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorous deficiency. *Plant Soil* 237:275-286
- Wissuwa M, N Ae. 1999. Molecular markers associated with phosphorous uptake and internal-phosphorous use efficiency in rice. In: Gissel-Nielsen G, A Gensen (eds) *Plant Nutrition – Molecular Biology and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 433-439
- Wissuwa M, Y Kuboki, SY Lin, T Sasaki, M Yano. 1998. Fine mapping of quantitative trait loci Hd-1, Hd-2 and Hd-3, and controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theor Appl Genet* 97:37-44
- Yamamoto T, Y Kuboki, SY Lin, T Sasaki, M Yano. 1998. Fine-mapping of quantitative trait loci Hd-1, Hd-2, Hd-3, and controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theor Appl Genet* 97:37-44
- Yano M, T Sasaki. 1997. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Plant Mol Biol* 35:145-153
- Yano M, Y katayose, M Ashikari, U Yamanouchi, L Monna, T Fuse, T Baba, K Yamamoto, Y Umehara, Y Nagamura, T Sasaki. 2000. *Hdi*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANT*. *Plant Cell* 12L:2473-2483
- Yano M. 2001. Genetic and molecular dissection of naturally occurring variation. *Curr Opin Plant Biol* 4:130-135
- Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1468

Chương 7

CƠ SỞ DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU ĐỘ ĐỘC SẮT

7-1. GIỚI THIỆU CHUNG

Độ độc sắt có thể làm giảm nghiêm trọng năng suất hạt (Genon và ctv. 1994). Trong đất phèn trồng lúa ở Đồng Bằng Sông Cửu Long, độ độc sắt được xem là yếu tố hạn chế chính, cùng với hàm lượng hữu cơ cao, phản ứng với ion sắt trong điều kiện đất ngập nước. Trong điều kiện canh tác cây trồng cạn, thí dụ lúa được canh tác trên đất có điều kiện thoáng khí, rất khó tìm hiện tượng ngộ độc do sắt (Quijano và Mendoza 1994). Trong các biểu loại đất có vấn đề, độ độc sắt thường gặp khi điều kiện pH đất thấp, khả năng trao đổi cation (CEC) thấp, trạng thái base thấp, cung cấp Mn thấp, và mức độ thoát nước kém (Ponnapuruma 1974, Ponnapuruma và Solivas 1982). Độ độc sắt thường được tìm thấy trên đất phèn trẻ (*Sulfaquepts*), đất phù sa cổ và đất phù sa cát kém thoát nước (*Hydraquepts*, *Fluvaquepts*) ở các thung lũng, đất acid phù sa và phù sa cổ *Tropaquepts* và *Tropaquents*, đất than bùn (Quijano và Mendoza 1994).

Độ độc sắt trong cây lúa biểu thị ra bên ngoài các triệu chứng như sau: những đốm nâu nhỏ li ti ở lá thứ hai sau lá trên cùng, dần dần các vết nhỏ này lan rộng làm lá có màu nâu, tím, vàng cam tùy theo giống lúa. Có khi lá lúa cuộn tròn lại. Trong trường hợp ngộ độc sắt quá nặng, lá thứ hai trở xuống sẽ trở nên nâu sậm rồi chết. Mức độ tăng trưởng và khả năng đẻ nhánh sẽ bị ức chế, hệ thống rễ trở nên thô cứng, và có màu nâu sậm. Nếu hiện tượng ngộ độc sắt xảy ra muộn, khả năng tăng trưởng không bị ảnh hưởng, nhưng năng suất hạt sẽ bị giảm do tính chất bất thụ. Rễ lúa kém phát triển, đen, thối và có sắt bao bọc bên ngoài (Benckiser và ctv. 1982).

Biến đổi về độ độc sắt rất rộng cho nên ảnh hưởng của nó rất đa dạng. Tanaka và ctv. (1966) ghi nhận hàm lượng sắt trong đất có thể gây độc cho cây lúa biến thiên từ 10 đến 1000 mg/L. Mức biến thiên rộng như vậy khiến cho người ta rất khó xác định tiêu chuẩn gây hại của sắt, dạng hiện diện của nó, giai đoạn cây lúa nhạy cảm nhất, giống lúa, sự có mặt của chất ức chế hô hấp, tình trạng dinh dưỡng của cây, và yếu tố môi trường khác. Trên đất phèn, độ độc sắt thường được phát sinh do Fe hoà tan ở mức độ rất cao (Moormann và van Breemen 1978). Trong đất có mức độ dinh dưỡng thấp, hoặc bị ức chế hô hấp, hàm lượng Fe từ 20 đến 40 mg / L sẽ gây độc cho cây lúa (van Breemen 1978). Trong đất cát, độ độc sắt xảy ra khi hàm lượng sắt trong đất biến thiên từ 40 đến 100 mg/L (van Breemen và Moormann 1978)

Trong điều kiện đất acid, ion SO_4^{2-} và Cl^- gây ra hiện tượng hấp thu ion Fe^{2+} (van Menswoort và ctv. 1985)

Độ độc sắt có thể là kết quả tổng hợp của hàng loạt các stress liên quan đến dinh dưỡng, chứ không phải chỉ đơn thuần do ion Fe dư thừa. Tương quan thuận giữa Ca trong dung dịch đất và tăng trưởng cây lúa trong đất phèn đã được báo cáo (Attananda và ctv. 1982). Vai trò của calcium đối với độ độc sắt đã được nghiên cứu bởi Benckiser và ctv (1984), Howeler (1973), Ottow và ctv. (1983). Độ độc sắt được quan sát trên cây lúa thiếu Ca nếu hàm lượng cation trong dung dịch đất chủ yếu là sắt hoà tan (Moore và Patrick 1989).

Bode (1990) nghiên cứu độ độc sắt trên cơ sở hàm lượng oxygen vùng rễ và những enzyme có liên quan. Những giống lúa chống chịu độ độc sắt thể hiện hoạt tính cao hơn về superoxide dismutase và peroxidase trong điều kiện bị stress do sắt. Giống lúa IR9764-45-2 được xem như một genotype chống chịu độ Fe. Người ta ly trích trong rễ lúa hàm lượng superoxide dismutase và peroxidase cao gấp hai lần so với giống IR64 (đối chứng) (Bode 1990). Nếu chúng ta gia tăng hàm lượng Fe trong môi trường thí nghiệm, hoạt tính của

peroxidase sẽ tăng lên rất mạnh ở giống chống chịu. Trong khi đó hoạt tính của catalase hơi tăng một chút trong giống nhiễm và không đáp ứng với gia tăng hàm lượng sắt.

Kỹ thuật xử lý cây lúa bị ngộ độc do sắt có thể là: bón vôi, thoát thủy, bón phân hữu cơ, bón N, P, K và Zn cân đối để cây lúa ở trạng thái dinh dưỡng tốt. Trong trường hợp đất có tỉ lệ Fe/Mn rất cao, người ta bón thêm MnO_2 có thể làm giảm thiểu độ độc sắt (Nueu và Singh 1984, Ponnampereuma và Solivas 1982)

Giống lúa biểu thị rất đa dạng về tính chống chịu độ độc sắt. Việc cải tiến giống có tính chống chịu sắt cũng được đặt ra rất sớm, nhưng cái khó nhất là qui trình thanh lọc, bởi vì nó phức tạp hơn thanh lọc nhôm rất nhiều, làm sao duy trì được môi trường ở trạng thái Fe^{++} , giảm sự chuyển hoá sang Fe^{+++} .

Biến thiên trong giống lúa đối với tính chống chịu như vậy đã được tư liệu hóa tạo điều kiện cho các nhà chọn giống lựa chọn vật liệu lai thích hợp để có giống chống chịu Fe ở ngưỡng cho phép (Gunawarkena và ctv. 1982, Lai và Hou 1976). Chọn lọc để cải tiến giống chống chịu sắt phải có hai điều kiện: (1) thông số chọn lọc trên cơ sở một tính trạng “indicator” đáng tin cậy, với một cơ chế đặc biệt về tính chống chịu, (2) hiểu rõ căn bản di truyền của cơ chế chống chịu này (Wu và ctv. 1997)

Phản ứng làm nâu (bronzing) màu lá được xem như phương pháp xác định mức độ chống chịu đã được biết rất sớm (IRRI 1965, Ota 1968), nhưng người ta biết rất ít về cơ sở di truyền của cơ chế chống chịu tương ứng với mức độ “nâu”. Kỹ thuật marker phân tử đang giúp các nhà nghiên cứu tìm hiểu cơ sở di truyền trên cả hai phương diện: tính trạng đơn gen và tính trạng đa gen, tương tác epistasis... (Tanksley 1993). Khả năng áp dụng bản đồ liên kết gen rất khả thi trong việc phân tích tính trạng này (Causse và ctv. 1994, Kurata và ctv. 1994)

7-2. KỸ THUẬT THANH LỌC

Thanh lọc có thể được thực hiện trong nhà lưới hoặc trên đồng ruộng. Phương pháp thanh lọc trong dung dịch dinh dưỡng, trong cát, trong đất có xử lý thêm ion Fe^{2+} là phương pháp thường được áp dụng.

Fageria và Robelo (1987) sử dụng 100 ppm Fe^{2+} ở pH 4, trong khi Yamaguchi và Yoshida (1981) sử dụng 200 ppm Fe^{2+} ở pH 5. Trong một báo cáo khác, Aranda và Orticio (1978) sử dụng 500 ppm Fe với sucrose được dùng làm chất “anti-oxidant” (chống ô-xi hóa). Đây là biện pháp nhằm ngăn ngừa Fe^{++} chuyển hóa thành Fe^{+++} .

Trong thí nghiệm trong chậu: đất có độc sắt được mang về lô thí nghiệm. Người ta tiến hành nghiền mẫu đất đã được sấy khô trước đó, xong bón thêm NPK và cho vào những chậu đất. Chậu đất này được đặt trong bể nước sao cho ngập khỏi mặt đất, với điều kiện nước đã được khử khoáng. Sử dụng 4 cây mạ được 2 tuần tuổi cấy vào mỗi chậu. Sau khi cấy được 4-6 tuần, cây lúa được đánh giá kiểu hình theo SES (IRRI 1988) về mức độ tăng trưởng. Phương pháp này đã được áp dụng tại IRRI và có thay đổi một ít tại IITA và WARDA.

Trong thí nghiệm ngoài đồng, IRRI đã thiết kế kiểu thí nghiệm nhằm thanh lọc các dòng con lai có triển vọng. Chọn ruộng thí nghiệm có độc sắt và cấy những dòng thí nghiệm trên ruộng ấy, với tuổi mạ là 3 tuần, mỗi dòng cấy thành 3 hàng dài 5m / hàng. Khoảng cách cây 20 x 20 cm, với 2-3 cây mạ / khóm lúa. Giống chuẩn chống chịu được cấy xen vào một cách ngẫu nhiên giữa các dòng, và giống chuẩn nhiễm được cấy sau mỗi 10 dòng thí nghiệm. Nếu ruộng không đồng đều, có thể cấy giống chuẩn nhiễm sau mỗi 5 dòng, trong từng khối ngẫu nhiên. Cho điểm thiệt hại theo SES vào giai đoạn 4 tuần, và 8 tuần sau khi cấy (Quijano và Mendoza 1994)

Bảng 1: Tiêu chuẩn đánh giá độ độc sắt (SES) (IRRI 1988)

Điểm	Triệu chứng
1	Tăng trưởng và đẻ nhánh bình thường
2	Tăng trưởng và đẻ nhánh bình thường, những đốm nâu đỏ hoặc vàng cam xuất hiện ở đầu lá già
3	Tăng trưởng và đẻ nhánh bình thường, lá già có màu đỏ nâu, tím, hay vàng cam
5	Tăng trưởng và đẻ nhánh chậm lại, nhiều là đổi màu
7	Tăng trưởng và đẻ nhánh ngưng hẳn, hầu hết các lá đều bị đổi màu hoặc chết
9	Tất cả cây chết khô

Thanh lọc quần thể con lai qui mô lớn trên đồng ruộng
 Những giống lúa chống chịu độc Fe được giới thiệu là:

Nguồn gốc	Tên giống
Bangladesh	BR52-8-2, BR95-75-2
Colombia	Colombia II, CICA 4
India	IET 4082, IET 2911, IET 5551, Pokkali
Indonesia	Sigadis, Banih Kuning
Liberia	Gissi 27, Suakoko 8
Malaysia	Mahsuri
Philippines	IR20, IR38, IR40, IR44, IR46, IR52, IR54
Sri Lanka	BW78, BW100, BW247-6
Thái Lan	Khao Dwak Mali, Nahng Kiew
Việt Nam	Cà Đung Gò Công

7-3. NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN PHÂN TỬ TÍNH CHỐNG CHỊU ĐỘC SẮT

7-3-1. Tính chống chịu độ độc sắt trong quần thể đơn bội kép IR64 x Azucena

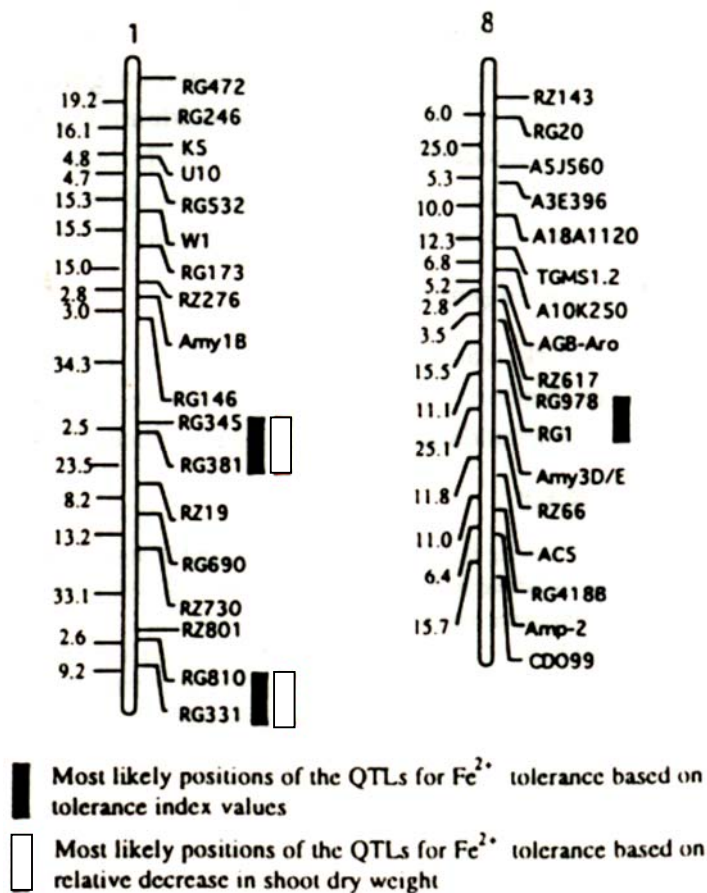
Căn cứ vào điều tra DNA trên bố mẹ vào năm 1995 tại IRRI, người ta ghi nhận IR64 (indica) là giống nhiễm, và Azucena (japonica) là giống chống chịu tốt, do đó, người ta thiết lập một quần thể đơn bội kép (double haploid = DH) với 123 dòng được phát triển từ cặp lai này (Wu và ctv. 1997, Guiderdoni và ctv. 1992). Sau đó, người ta phát triển một quần thể BC₁F₁ từ 100 dòng DH lai lui với Azucena, do vậy nó còn được gọi là DHBC₁F₁.

Hạt giống của bố mẹ, 123 dòng DH và 100 dòng DHBC₁F₁ được cấy trong khay cát thạch anh (quartz sand). Sau một tuần, mỗi dòng chọn 12 cây, mỗi bố mẹ chọn 24 cây, rồi chuyển chúng vào chậu nhựa plastic chứa 30 lít dung dịch dinh dưỡng (Yoshida và ctv. 1976). Xử lý độ độc sắt bằng cách cho vào dung dịch dinh dưỡng 250 mg Fe⁺⁺ / lít ở dạng Fe₂(SO₄)₃, độ pH dung dịch được điều chỉnh mỗi ngày sao cho điều kiện thí nghiệm ở pH 4,5 và người ta phải thay mới dung dịch dinh dưỡng sau mỗi 3 ngày. Nhiệt độ trong nhà kính được điều chỉnh 20-32⁰C ban ngày và 12-20⁰C ban đêm. Sau 4 tuần lễ, người ta thu hoạch mỗi cây với điểm đánh giá SES bằng mắt (IRRI 1988) với triệu chứng “leaf bronzing”, xác định trọng lượng khô của chồi (SDW) và hàm lượng Fe trong cây. Giá trị tương đối của mỗi tính trạng được tính bằng cách lấy hiệu số giá trị tuyệt đối của 2 nghiệm thức chia cho giá trị tuyệt đối của nghiệm thức đối chứng và nhân cho 100.

Thí dụ giá trị tương đối của trọng lượng khô chồi thân:

$$RSDW = \frac{(\text{SDW đối chứng} - \text{SDR xử lý})}{\text{SDR đối chứng}} \times 100$$

Wu và ctv. (1997) đã sử dụng 175 marker để thành lập bản đồ trên nhiễm sắc thể số 12 thông qua quần thể DH của IR64 x Azucena, trong đó bao gồm 76 marker của genome cây lúa (RG), 16 marker của genome cDNA cây "oat" (CDO), 49 marker của cDNA clone (RZ), 15 gen và 19 marker khác. Tần suất của alen cây IR64 đối với hầu hết những marker sử dụng biểu thị một phân bố đối xứng, minh chứng một sự cân bằng trong vật liệu di truyền của mỗi bố mẹ truyền sang cho con thông qua kỹ thuật nuôi cấy túi phấn (Huang và ctv. 1997)



Hình 7-1: Bản đồ QTL tính chống chịu độ độc sắt trên quần thể DH của IR64 x Azucena tại nhiễm sắc thể số 1 và số 8, thanh màu đen biểu thị QTL chỉ số chống chịu, thanh màu trắng biểu thị QTL giá trị tương đối của trọng lượng khô rễ (Wu và ctv. 1997)

175 marker biểu hiện đa hình được sử dụng để lập bản đồ liên kết gen theo MAPMARKER (Lander 1993). Giá trị $LOD > 2,4$ và $p < 0,001$ đối với sai số Type 1 được sử dụng để làm tiêu chí xác định mức độ ý nghĩa của QTL liên kết với marker loci.

Azucena được khẳng định là giống có khả năng chống chịu độ độc sắt và IR64 là giống nhiễm ở ngưỡng $250 \text{ mg } Fe^{++} / \text{lít}$ trong môi trường dinh dưỡng Yoshida (Bode và ctv. 1995)

Hàm lượng sắt trong dung dịch dinh dưỡng giảm khoảng 50% sau 3 ngày trong khi cây tăng trưởng. Do vậy, chúng ta phải thay mới môi trường sau mỗi 3 ngày. Cho dù có thay mới, nhưng hàm lượng Fe^{++} vẫn có xu hướng suy giảm giữa những lần thay đổi như vậy

Bảng 2: Chỉ số điểm chống chịu và trọng lượng khô của chồi giảm tương đối (RSDW) với những marker loci tương ứng (p , 0,001) (Wu và ctv. 1997)

Thông số	Marker	Nhiễm thể	Xác suất	R ²	II Kiểu gen IR64	J J Kiểu gen Azucena
Chỉ số chống chịu	RG345	1	0,001	0,33	4,17	1,99
	RG381	1	0,001	0,29	4,02	1,99
	RG810	1	0,001	0,12	2,14	3,37
RSDW	RG345	1	0,001	0,17	39,74	28,43
	RG381	1	0,001	0,15	38,63	28,65
	RG810	1	0,001	0,23	27,02	37,55
	RG331	1	0,001	0,21	26,96	38,24
	RG978	8	0,005	0,11	35,83	26,33

Bảng 3: Phân tích QTL theo phương pháp bản đồ cách quãng (Wu và ctv. 1997)

Thông số	Vị trí	Nhiễm thể	Giá trị tính cộng	R ² (%)	LOD
Chỉ số chống chịu	RG345-RG381	1	-1,06	32,3	10,10
	RG810-RG331	1	0,63	12,6	3,53
RSDW	RG345-RG381	1	-5,51	15,5	4,73
	RG810-RG331	1	5,66	21,5	6,38
	RG978-RG1	8	-4,61	10,0	2,75

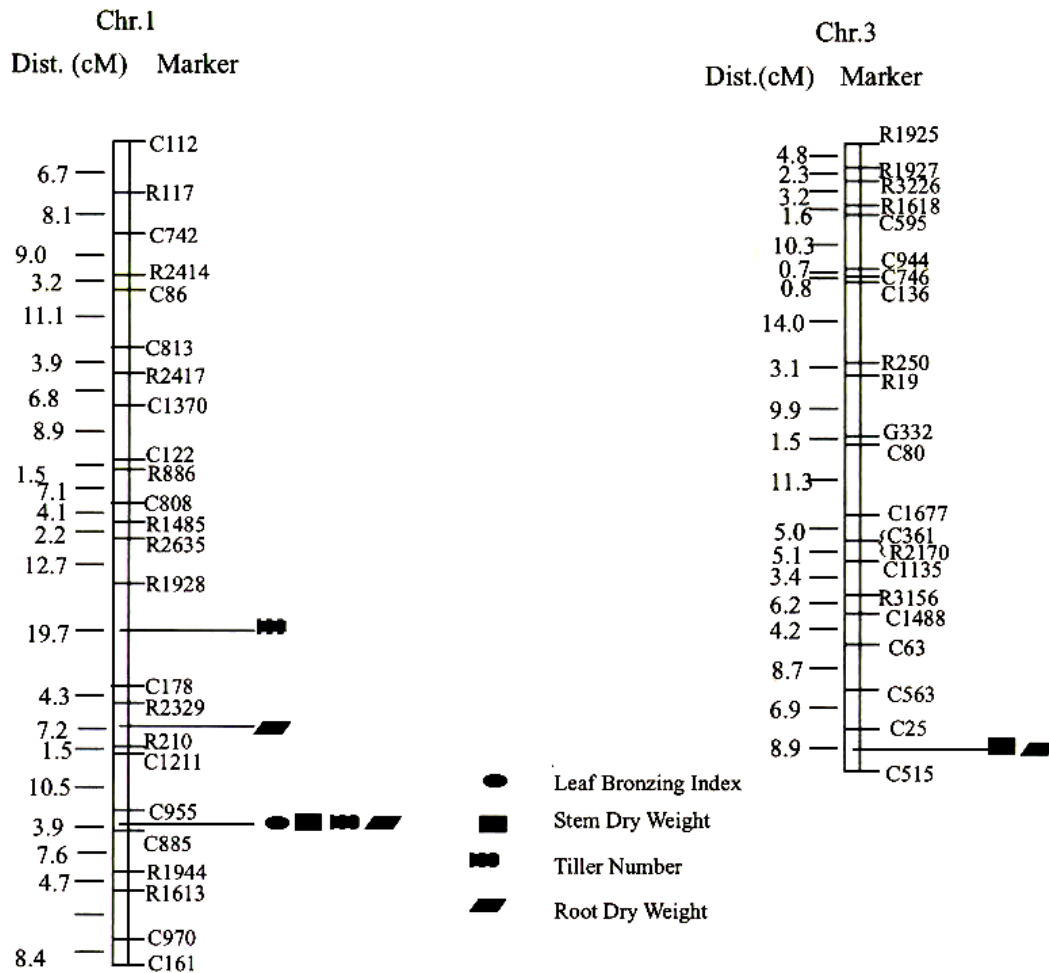
Chỉ số chống chịu và trọng lượng khô của chồi tương đối được phân tích cả hai phương pháp SMA (bảng 2) và IMA (bảng 3).

Bốn loci của marker trên nhiễm sắc thể số 1 và một marker trên nhiễm sắc thể số 8 đã được ghi nhận (hình 7-1). QTL điều khiển chỉ số chống chịu đã giải thích từ 12,6 đến 32,2% biến thiên kiểu hình, trong phân tích bản đồ cách quãng. QTL điều khiển RSDW đã giải thích từ 15,5 đến 21,5% biến thiên kiểu hình trên nhiễm sắc thể số 1 và 10% kiểu hình trên nhiễm sắc thể số 8. Hai loci của gen được xác định bởi hai marker kế cận RG345 và RG381, và liên kết với marker 810 trên nhiễm sắc thể số 1 đối với cả hai tính trạng: chỉ số chống chịu và RSDW. So sánh trung bình kiểu gen giữa hai marker cho thấy alen của tính chống chịu xuất phát từ Azucena định vị tại locus thứ nhất trên nhiễm sắc thể số 1 và một locus khác trên nhiễm sắc thể số 8. Alen từ locus thứ nhì trên nhiễm sắc thể số 1 xuất phát từ IR64. Wu và ctv. (1997) cũng đang thực hiện kỹ thuật “substitution mapping” trên quần thể chọn lọc từ các dòng chống chịu với giảm thiểu tối đa genome của Azucena trong nghiên cứu tiếp theo, nhằm đáp ứng yêu cầu ứng dụng MAS trong chọn giống lúa chống chịu độ độc sắt.

7-3-2. Tính chống chịu độ độc sắt trong quần thể cận giao được lai lui giữa Nipponbare / Kasalath // Nipponbare

Wan và ctv. (2002) đã thực hiện một quần thể cận giao backcross (BILs = backcross inbred lines) từ Nipponbare (japonica) / Kasalath (indica) // Nipponbare, với 96 dòng BIL để phân tích bản đồ QTL tính chống chịu độ độc sắt của cây lúa.

Đánh giá kiểu hình được thực hiện trên bố mẹ và quần thể con lai BIL này, với sự hiện diện của các giống đối chứng IR26, IR64, IR74, Mahsuri, và Suakoko 8. Đất thí nghiệm ngộ độc sắt thuộc Trại thí nghiệm của Đại Học Nông nghiệp Nanjing – Trung Quốc. Đất có độ độc sắt trong vùng trồng lúa của Trung Quốc chiếm khoảng 7,5-8,0 triệu ha, làm năng suất giảm 10-20% tùy theo đất và tùy theo giống canh tác (Li và ctv. 1991)



Hình 7-2: QTL xác định tính chống chịu độc sắt trong quần thể Nipponbare / Kasalath // Nipponbare (BIL), với tính trạng leaf bronzing index (LBI): chỉ số chống chịu dựa trên lá bị nâu, stem dry weight: trọng lượng khô của thân lúa, tiller number: số chồi, root dry weight: trọng lượng khô của rễ lúa (Wan và ctv. 2002)

Chỉ số chống chịu dựa trên hiện tượng lá bị nâu (LBI), trọng lượng khô của thân rạ (SDW), số chồi (TN), và trọng lượng khô của rễ lúa (RDW) được sử dụng như những tiêu chuẩn chọn lọc tính chống chịu độ độc do sắt sau 4 tuần cấy trong môi trường dinh dưỡng Yoshida có xử lý 250 ppm Fe⁺⁺

Phân bố chuẩn (normal) được ghi nhận trong tính trạng LBI, lệch trái theo Kasalath cả 3 tính trạng còn lại, trong 96 cá thể của quần thể BIL, và có sự khác biệt rất ý nghĩa giữa Nipponbare và Kasalath

Bảng 4: Phân tích QTL của 4 tính trạng: chỉ số chống chịu (LBI), trọng lượng khô của thân (SDW), số chồi (TN), và trọng lượng khô của rễ (RDW) trọng giai đoạn mạ, theo phương pháp bản đồ cách quãng (Wan và ctv. 2002)

Tính trạng	Quãng giữa hai marker	Nhiễm thể	LOD	R ² (%)	Tính cộng
LBI	C955-C885	1	3,17	20,5	0,0210
SDW	C955-C885	1	7,03	36,9	-0,0114
	C25-C515	3	5,85	47,9	0,0072
TN	R1928-C178	1	3,49	42,4	0,1300
	C955-C885	1	6,89	43,9	0,0679

RDW	R2329-R210	1	4,32	39,2	-0,0055
	C955-C885	1	6,59	6,59	-0,0095
	C25-C515	3	5,35	5,35	0,0029

Chúng ta chưa tìm ra mối quan hệ giữa hai kết quả của hình 7-1 và hình 7-2 trên nhiễm sắc thể số 1

Trong kết quả phân tích quần thể BIL, giá trị LOD đều lớn hơn 3,17 (bảng 4), bản đồ RFLP và số liệu đều được thu thập từ chương trình Rice Genome của Nhật phục vụ nghiên cứu QTL.

Wan và ctv. (2002) đã xác định 8 QTL liên kết với tính chống chịu độ độc sắt, sử dụng computer chương trình Mapmarker/QTL (Lincoln và ctv. 1993).

Một QTL giả định được tìm thấy có liên quan đến tính trạng LBI trên nhiễm sắc thể số 1, giải thích 20,5% biến thiên kiểu hình trong quần thể BILs (bảng 4, hình 7-2).

Hai QTL được tìm thấy có liên quan đến tính trạng SDW, một định vị trên nhiễm sắc thể số 1 cùng vị trí với tính trạng LBI.

Ba QTL được tìm thấy có liên quan đến tính trạng RDW, hai định vị trên nhiễm sắc thể số 1 và 1 định vị trên nhiễm sắc thể số 3

QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 3 vừa có liên quan đến tính trạng trọng lượng khô của thân, vừa có liên quan đến tính trạng trọng lượng khô của rễ (hình 7-2)

Tất cả những QTL giả định này đều giải thích biến thiên kiểu hình của tính trạng khá lớn trong quần thể BILs từ 20,5% đến 47,9%

Chúng ta chú ý, quãng giữa hai marker C955-C885, là nơi định vị của QTL giả định có liên quan đến cả 4 tính trạng tiêu chuẩn (hình 7-2).

Nhà chọn giống có thể lợi dụng đặc điểm này để tìm QTL hữu ích cho chiến lược MAS nhằm hội tụ gen chống chịu độc sắt vào giống cải tiến có chỉ số thu hoạch cao, gia tăng năng suất giống lúa trồng trên đất có độc sắt cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Attananda T, S Vacharotayan, K Kyuma. 1982. Chemical characteristics and fertility status soils of Thailand. Pages 137-156 in Proc Bangkok Symposium on Acid Sulfate Soils. ILRI, Wageningen, Netherlands
- Benckiser G, JCG Ottow, S Santiago, I Watanabe. 1982. Physicochemical characterization of iron toxic soil in some Asian countries. IRRRI Res Paper Series 85
- Benckiser G, S Santiago, HU Nueu, I Watanabe, JCG Ottow. 1984. Effect of fertilization on exudation, dehydrogenase activity, iron-reducing population and Fe⁺⁺ formation in the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.) in relation to iron toxicity. Plant and Soil 79:305-316
- Bode K, O Doring, S Luthje, HU Nueu, M Bottger. 1995. The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). Protoplasma 184:249-255
- Causse M, TM Fulton, YG Cho, SN Ahn, J Chungwongse, K Wu, J Xiao, ZH yu, PC Ronald, SB Harrington, GA Second. 1994. Saturated molecular map of the rice genome, based on an inter-specific backcross population. Genetics 138:1251-1274
- Fageria NK, NA Robelo. 1987. Tolerance of rice cultivar to iron toxicity. J Plant Nutr 10(6):653-661

- Genon JG, N Hepcee, JE Duffy, B Delvaux, PA Hennebert. 1994. Iron and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi, *Plant and Soil* 166(1):109-661
- Gunawarkena I, SS Virmani, FJ Sumo.. 1982. Breeding for tolerance to iron toxicity. *Oryza* 19:5-12
- Howeler RH. 1973. Iron induced orange disease of rice in relation to physicochemical changes in a flooded Oxisol. *Soil Sci Soc Am Proc* 37:893-903
- IRRI. 1965. Annual Report 1964, The International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines
- IRRI. 1988. Standard Evaluation System (SES). IRRI, Los banos, Philippines
- Kurata N, Y Nagamura, K Yamamoto, Y Harusima, N Sue, J Wu, BA Antonio, A Shomura, T Shimizu, S-Y Lin, T Inoue, A Fukuda, T Shimano, Y Kuboki, T Toyama, Y Miyamoto, T Krihara, K Hayasaka, A Miyao, L Monna, HS Zhong, Y Tamura, Z-X Wang, T Momma, Y Umehara, M Yano, T Sasaki, Y Minobe. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet* 8:365-372
- Lai KL, C Hou. 1976. Studies on the differentiation of physiological characteristics of the roots of different type rice plant (*Oryza sativa* L.). Taiwan Agric Center, Bull of the Phytotron Oct 10, pp. 17-21
- Lincoln SE, MJ Daly, ES Lander. 1993. Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMARKER/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual. 2nd ed. Cambridge Mass: Whitehead Institute for Biometrical Research.
- Moore PA, WH Jr Patrick. 1989. Iron availability and uptake in acid sulfate soils. *Soil Sci Soc Am J* 53:471-476
- Moormann FR, N van Breemen. 1978. Rice: soil, water, and land. Int Rice Res Inst, Los banos, Philippines
- Nueu HU, VP Singh. 1984. Management of outland rice and fishponds on problem soils in the tropics. Pages 352-366 *in* Ecology and management of problem soils in Asia. FFTC Book Series No. 27, Taipei
- Ota Y. 1968. Studies on the occurrence of the physiological disease called "bronzing". *Bull Natl Inst Agric Sci (Japan)* D 18: 31-104
- Ottow JCG, G Benckiser, I Watanabe, S Santiago. 1983. Multiple nutritional stress as the prerequisite for iron toxicity of wet land rice (*Oryza sativa* L.). *Trop Agric (Trinidad)* 60:102-106
- Ponnamperuma FN, JL Solivas. 1982. Field amelioration of an acid sulfate soil with manganese dioxide and lime. Pages 213-222 *in* Proc of Bangkok Symp on Acid Sulfate Soils. H Dost and N van Breemen (eds.), IILRM, Wageningen.
- Ponnamperuma FN. 1974. Problem rice soils. Proc. IRRI Conf., April 22-25, 1974, LosBanos, Philippines, 11p.
- Quijano C, R Mendoza. 1994. Mineral Toxicities in rice. Breeding rice for flood-prone and problem soil areas. IRRI 1994. pp 99-116
- Tanaka A, SA Navasero. 1966. Interaction between iron and manganese in the rice plant. *Soil Sci Plant Nutr* 12:29-33
- Tanksley SD. 1993. Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27:205-233

- van Breemen N. 1978. Landscape, hydrology and chemical aspects of some problem soils in the Philippines and in Sri Lanka. A terminal report submitted to IRRI, Los Banos, Philippines pp. 247-282
- van Breemen N, FR Moormann. 1978. Iron toxic soils. PP. 781-800 *in* Soils & Rice, IRRI, LosBanos, Philippines
- van Menswoort ME, SR Lantin, R Brinkman, N van Breemen. 1985. Toxicities of wetland soils. PP 123-138 *in* Wetland soils: Characterization, Classification, & Utilization. IRRI, LosBanos, Philippines
- Wu P, A Luo, J Zhu, J Yang, N Huang, D Senadhira. 1997. Molecular marker linked to genes underlying seedling tolerance for ferrous iron toxicity. In: T Ando et al.(eds.) Plant Nutrition for sustainable food production and environment. Kluwer Academic Publishers, pp. 789-792
- Yamaguchi M, S Yoshida. 1981. Physiological mechanism of rice tolerance for iron toxicity. IRRI, Saturday Seminar, June 6.
- Guiderdoni E, E Galinato, J Luistro, G Vergara. 1992. Anther culture of tropical japonica x indica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 62:219-224
- Yoshida S, D Forno, JH Cock, KA Gomez. 1976. Laboratory Manual for Physiological studies of rice. The third edition. IRRI, LosBanos, Philippines
- Huang N, A Parco, TW Mew, G Magpantay, SR McCouch, E Guiderdoni, J Xu, P Subudhi, R Angeles, GS Khush. 1997. RFMP mapping of isozymes, RAPD and QTLs for grain shape, brown plant hopper resistance in a double haplod rice population. *Molecular Breeding*
- Lander ES.1993. Mapmaker/Exp 3.0 and Mapmarker/QTL 1. 1. Tutorial and Reference manual. Whitehead Institute. 9 Cambridge Center, Cambridge MA 02141
- Li DM, JJ Tang, JL Zhou, SQ Li. 1991. The eco-physiological mechanism of rice tolerance for gleyic soil stress and the breeding varieties tolerance for soil-related stress. *Rice Review and Abstracts* 10:1-4
- Wan JL, HQ Zhai, JM Wan, H Ikehashi. 2002. Detection and analysis of QTLs for ferrous iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Genetics Newsletter* 19:56-58

Chương 8

CƠ SỞ DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU NHIỆT ĐỘ LẠNH

8-1. GIỚI THIỆU CHUNG

Cây lúa thuộc nhóm cây nhạy cảm với nhiệt độ lạnh, nhất là đối với những giống có nguồn gốc nhiệt đới và cận nhiệt đới. Những tổn thương do nhiệt độ lạnh gây ra có thể được quan sát ở nhiều giai đoạn tăng trưởng khác nhau của cây lúa: hạt không nảy mầm, cây mạ kém phát triển, hiện tượng cây lùn, cần cổ, hiện tượng biến đổi màu sắc, hiện tượng thoái hóa đỉnh bông lúa, gia tăng tỉ lệ hạt lép, và hiện tượng hạt chín bất bình thường (Kaneda và Beachell 1973).

Ở phía bắc nước Nhật, hiện tượng bất thụ do nhiệt độ lạnh được xem như vấn đề nghiêm trọng nhất làm năng suất lúa giảm rất nhiều (Saito và ctv. 2001). Đối với kiểu gen cây lúa mẫn cảm với tính trạng bất thụ do nhiệt độ lạnh, giai đoạn tăng trưởng nhạy cảm nhất là giai đoạn làm đông, đặc biệt là giai đoạn vi bào tử chuyển từ pha “tetrad” sang pha đầu tiên của nhiễm thể thu nhỏ lại, xét trên cơ sở gián phân nhiễm thể trong di truyền tế bào (Satake và Hayase 1970). Nhiệt độ thấp trong suốt quá trình phát sinh vi bào tử (microsporogenesis) sẽ làm cho thoái hóa vi bào tử và tạo ra hiện tượng phình to tế bào hạt phấn. Mặt khác, cơ quan của noãn vẫn duy trì được khả năng thụ tinh một cách bình thường, nhưng tiến trình phát triển microspore hoàn toàn bị ức chế (Hayase và ctv. 1969). Do đó, hiện tượng thoái hóa microspore, và/hoặc hiện tượng phình to tế bào hạt phấn được xem như phản ứng của kiểu gen bất thụ đối với sự tổn thương do nhiệt độ lạnh (Nishiyama 1976).

Cơ chế chống chịu lạnh hiện nay vẫn chưa được nghiên cứu một cách chi tiết, còn nhiều câu hỏi chưa được giải đáp thỏa đáng. Muốn đạt được một kết quả thành công về thụ phấn, cây lúa cần có đủ số lượng hạt phấn cần thiết trong túi phấn. Số lượng hạt phấn giảm theo nghiệm thức xử lý lạnh làm cho tỉ lệ bất thụ gia tăng rất có ý nghĩa (Satake 1991). Những giống lúa chống chịu lạnh thường sản sinh ra số lượng hạt phấn nhiều hơn giống nhiễm (Satake và Shibata 1992). Như vậy, chúng ta có thể nói rằng số lượng hạt phấn là một yếu tố quan trọng trong cơ chế chống chịu lạnh. Người ta còn ghi nhận số lượng hạt phấn tương quan thuận với chiều dài túi phấn (Oka và Morishima 1967, Suzuki 1981), và dường như chiều dài túi phấn có tương quan với hiện tượng chống chịu lạnh (Tanno và ctv. 1999).

Hiện tượng chống chịu lạnh là tính trạng di truyền số lượng và chưa có một gen chủ lực nào được xác định (Saito và ctv. 2001). Futsuhara và Toriyama (1966) ước đoán rằng: số gen chống chịu lạnh có thể là 4 gen hoặc nhiều hơn 4 gen. Chúng liên kết rất chặt với gen *Pr* (tính trạng võ trấu màu tím), *Rc* (tính trạng võ lụa hạt gạo màu nâu), *d₂* (tính trạng lùn), *gh* (tính trạng võ trấu màu vàng), *nl* (neck leaf), và *bc* (tính trạng thân rạ giòn, dễ bẻ gãy = brittle) trên nhiễm sắc thể số 3, 4, 5 và 7 (Futsuhara và Toriyama 1966, Takahashi và ctv. 1973, Sawada 1978)

8-2. DI TRUYỀN TÍNH CHỐNG CHỊU LẠNH

8-2-1. Bản đồ QTL trên nhiễm sắc thể số 4

Giống lúa “Norin-PL8” có gen chống chịu lạnh kế thừa từ giống lúa Silewah (japonica). Saito và ctv. (2001) đã quan sát trên hai đoạn nhiễm sắc thể được hội tụ gen mục tiêu từ Silewah, định vị trên nhiễm thể số 3 – vai ngắn, và trên nhiễm thể số 4 – vai dài (Saito và ctv. 1995). Các tác giả này đã tiến hành lập bản đồ QTL theo kiểu “fine mapping”, tập trung trên nhiễm thể số 4, trên cơ sở quần thể hồi giao (BC) và NIL (nearly isogenic lines).

Norin-PL8 là giống lúa chống chịu lạnh được phát triển nhờ lai hồi giao giữa giống japonica chống chịu lạnh Silewah với một dòng lúa Nhật Hokkai 241, trong đó dòng Hokkai 241 được dùng làm dòng tái tục (recurrent parent), và Silewah là giống cho gen mục tiêu (donor). Saito và ctv. (2001) đã chọn được một dòng Syo6 từ tổ hợp lai Kirara 397 / Norin-

PL8 // Kirara 397 (quần thể BC₁F₅). Dòng Syo6 có chứa đoạn nhiễm sắc thể số 3 và 4 hội tụ gen mục tiêu từ Norin-PL8. Sau hai lần hồi giao, tác giả đã chọn một cây dị hợp tử đối với hội tụ gen mục tiêu ở nhiễm thể số 4, nhưng không có gen mục tiêu ở nhiễm thể số 3. Cho cây này tự thụ phấn, người ta phát triển quần thể phân ly ký hiệu là BT4, và 114 cây BT4 này được chọn để sử dụng trong phân tích bản đồ cách quãng.

Mẫu DNA được ly trích từ lá lúa theo phương pháp CTAB (Murray và Thompson 1980). RFLP marker được sử dụng có nguồn gốc từ chương trình genome cây lúa của Nhật (RGP) ký hiệu là “R” và “C”, có nguồn gốc từ Saito và ctv. (1991) ký hiệu là “XNpb”.

Phương pháp đánh giá kiểu hình tính trạng chống chịu lạnh trong nước có nhiệt độ lạnh (Futsuhara và Toriyama 1964), được xem như là phương pháp thống nhất trong thanh lọc giống chống chịu lạnh quốc tế. cây lúa được xử lý ở nhiệt độ nước 19°C từ giai đoạn tượng khối sơ khởi đến giai đoạn trổ. Độ sâu mực nước 20 cm ở thí nghiệm ngoài đồng và 24 cm ở trong nhà lưới. Đánh giá hạt hữu thụ để kết luận về thanh lọc chống chịu lạnh.

Saito và ctv. (2001) đã sử dụng phần mềm MAPL97 (Ukai và ctv. 1991, Hayashi và Ukai 1994) để phân tích QTL và bản đồ QTL.

Muốn xác định chính xác vị trí QTL trên nhiễm sắc thể số 4, người ta phát triển một quần thể hồi giao cải tiến, chọn Kirara 397 làm giống tái tục. Bổ sung thêm 5 RFLP marker (R738, R740, R1427, R2737 và C1016), 2SCAR marker (SCAB1 và SCAM20) để phân tích. Những marker được thể hiện trên bản đồ (hình 8-1B). Saito và ctv. (2001) đã sử dụng 117 cá thể của quần thể BT4 phân ly để phân tích theo phương pháp cách quãng đối với tính trạng chống chịu lạnh. Hình 8-1A cho thấy giá trị LOD trên đoạn hội tụ gen mục tiêu của nhiễm thể số 4, với thang điểm khá cao (LOD>25) từ trung tâm đến điểm cuối của hội tụ (introgression). Giá trị tối đa của LOD được ghi nhận tại quãng giữa R2737 và XNpb102. Điều này cho thấy rằng QTL phần lớn định vị trong quãng R2737 và XNpb102.

Saito và ctv. (2001) còn phát triển quần thể NIL để thực hiện kỹ thuật “fine mapping” QTL điều khiển tính trạng chống chịu lạnh. Người ta chọn lựa 12 dòng tái tổ hợp (recombinants) giữa R738 và R1427 trong quần thể BT4. Con lai của mỗi “recombinant” được phát triển thành những dòng ổn định (fixed) thông qua phương pháp MAS (marker-aided selection). Kiểu gen của mỗi dòng NIL được thể hiện trong hình 8-1B. Kiểu hình chống chịu lạnh được đánh giá thông qua giá trị trung bình của hạt hữu thụ.

Kiểu gen của BT4-9-7 là kiểu gen của Norin-PL8 đối với marker R738.

Tính trạng chống chịu lạnh của BT4-76-2 và BT4-76-7 là kiểu gen của Norin-PL8 đối với marker R738 và R2737.

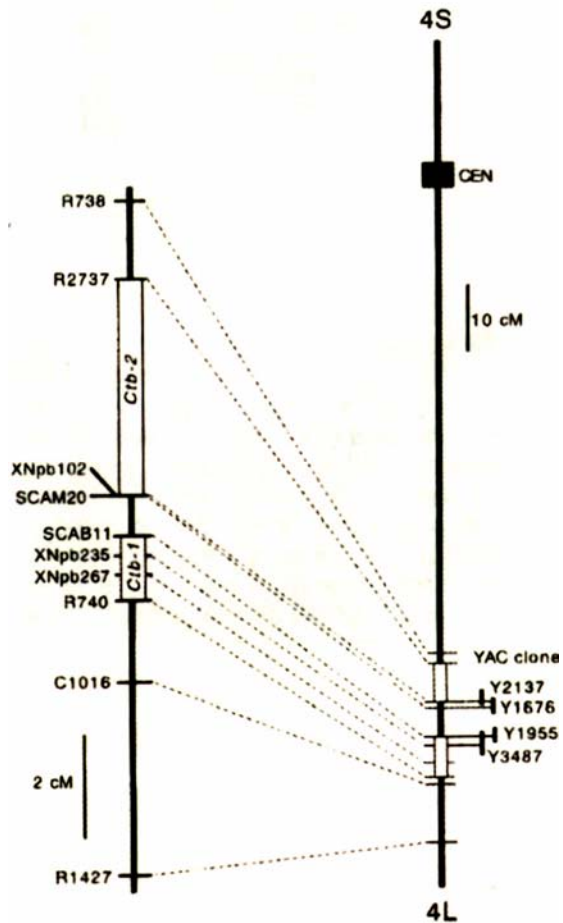
Kết quả như vậy cho thấy rằng QTL điều khiển tính trạng chống chịu lạnh định vị giữa marker R738 và XNpb102

Bảng 1: Tương quan giữa những đoạn hội tụ gen mục tiêu trên nhiễm sắc thể số 3 và 4 với tính trạng chiều dài túi phấn (Saito và ctv. 2001)

Nhiễm sắc thể	Marker	Chiều dài túi phấn		t	P
		Kirara 397 [n]	Norin-PL8 [n]		
3	XNpb345	2,42 (22)	2,51 (33)	2,048	0,0455
4	R2737	2,38 (26)	2,55 (26)	4,257	<0,0001

Trước đó, người ta đã tìm thấy QTL điều khiển tính trạng chống chịu lạnh định vị trên vai ngắn của nhiễm thể số 3 và trên vai dài của nhiễm thể số 4 (Saito và ctv. 1995). Người ta cũng đã xác định dòng chống chịu lạnh Hokkai-PL4, một dòng cùng bố mẹ với Norin-PL8, cũng có vùng hội tụ gen mục tiêu trên nhiễm thể số 4, nhưng thiếu vùng mục tiêu trên nhiễm thể số 3. Chính QTL chống chịu lạnh trên nhiễm thể số 4 cũng được khám phá trong một

Hình 8-2: Vị trí trên bản đồ của *Ctb-1* và *Ctb-2*. Bản đồ bên trái được hình thành trên cơ sở tái tổ hợp trong quần thể BT4. Bản đồ bên phải được hình thành trên cơ sở bản đồ liên kết gen theo chương trình RGP của Nhật (Harushima và ctv. 1998). YAC clones được định vị trên bản đồ theo kết quả nghiên cứu của Koike và ctv. (1997)



Hình 8-1 còn thể hiện một QTL chống chịu lạnh khác định vị giữa R740 và SCAB11. Người ta tìm thấy hai QTL chống chịu lạnh khác nhau định vị trên nhiễm sắc thể số 4, một thể hiện tính chất ngoại biên (distal), ký hiệu là *Ctb-1*, một thể hiện tính chất nội biên (proximal), ký hiệu là *Ctb-2*. Ba dòng NIL (BT4-112-1, BT4-10-6, và BT4-50-1) có cả *Ctb-1* và *Ctb-2*, nhưng tính trạng chống chịu lạnh của chúng thể hiện giống với các dòng NIL chỉ có một *Ctb-1* hoặc *Ctb-2* (thí dụ như BT4-76-2, BT4-70-1). Kết quả này cho thấy tương tác giữa *Ctb-1* và *Ctb-2* không có tính chất cộng tính (additive) (Saito và ctv. 2001).

8-2-2. Vị trí trên bản đồ của *Ctb-1* và *Ctb-2*

SCAB11 và SCAM20 là những marker SCAR được phát triển từ phân tử DNA đa hình được khuếch đại một cách ngẫu nhiên (RAPDs). Người ta sử dụng những marker RFLP trên bản đồ theo chương trình genome cây lúa (RGP) của Nhật (Kurata và ctv. 1994, Harushima và ctv. 1998), nhưng vị trí của SCAB11 và SCAM20 trên bản đồ vẫn chưa được xác định. Do đó, người ta không thể ước đoán chính xác khoảng cách di truyền giữa *Ctb-1* và *Ctb-2*. Để xác định được những vị trí của SCAR marker trên bản đồ di truyền RGP, người ta đã sử dụng bản đồ vật lý trên cơ sở YAC clone (yeast artificial chromosome) của RGP (Koike và ctv. 1997).

Marker SCAM20 ở trong YAC clone “Y1676”, phủ kín một vùng 102,0 cM – 102,6 cM trên bản đồ.

Marker SCAB11 ở trong YAC clone “Y1955”, phủ kín một vùng 106,7 cM trên bản đồ (hình 8-2).

Ctb-1 định vị tại vùng có độ lớn 6,7 cM, quét trên một đoạn từ 106,7 cM đến 113,4 cM.

Ctb-2 định vị tại vùng có độ lớn 5,8 cM, quét trên một đoạn từ 96,2 cM đến 102,0 cM. Giá trị khoảng cách từ *Ctb-1* đến *Ctb-2* ước khoảng 4,7 đến 17,2 cM (hình 8-2).

8-2-3. Tính chống chịu lạnh và chiều dài túi phấn

Chiều dài túi phấn của giống Norin-PL8 là 2,85mm và Hokkai 241 là 2,13mm (Saito và ctv. 2001). Chiều dài túi phấn của các dòng con lai F₇ phân bố theo biểu đồ hình chuông (phân bố chuẩn), cho thấy không thể khẳng định chiều dài túi phấn do một gen chủ lực quyết định. Sự phối hợp giữa chiều dài túi phấn và các đoạn nhiễm thể hội tụ trên nhiễm sắc thể số 3 và 4 được thử nghiệm thông qua phân tích phương sai với mỗi marker được xem như một nghiệm thức. Mặc dù marker R2737 trên nhiễm sắc thể số 4 tương quan có ý nghĩa với chiều dài túi phấn, nhưng mức độ tương quan có ý nghĩa của XNpb345 trên nhiễm sắc thể số 3 khá thấp (bảng 1). Kết quả này dẫn đến một suy luận rằng QTL điều khiển tính trạng chiều dài túi phấn định vị trên vai dài của nhiễm sắc thể số 4 (Saito và ctv. 2001).

Cả hai *Ctb-1* và *Ctb-2* có khả năng kết hợp với tính trạng chiều dài túi phấn, và sự tương tác của những gen này không có tính chất cộng tính.

8-2-4. Bản đồ QTL tính trạng chống chịu lạnh ở giai đoạn làm đòng

Giai đoạn nhạy cảm nhất đối với nhiệt độ lạnh là giai đoạn làm đòng, vào khoảng 11 ngày trước khi lúa trổ (Andaya và Mackill 2003). Giống lúa japonica được ghi nhận có khả năng chống chịu lạnh tốt hơn giống lúa indica (Glaszmann và ctv. 1990, Dilday và ctv. 1990).

Người ta sử dụng giống lúa japonica có nguồn gốc ở California là M-202, và giống lúa indica có nguồn gốc ở IRRI là IR50 làm bố mẹ cho quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) với 191 dòng con lai ở thế hệ F₅ và F₆ (Andaya và Mackill 2003).

Tác giả đã sử dụng 300 microsatellite marker và kỹ thuật PCR để phân tích QTL trên quần thể RIL về tính trạng chống chịu lạnh.

Đánh giá kiểu hình được thực hiện trong phytotron trong điều kiện 12°C, 12 giờ sáng / ngày, ẩm độ tương đối trong phòng là 72%

Bản đồ liên kết gen được thiết kế theo phần mềm MAPMARKER 2.0 (Lander và ctv. 1987), với chuẩn giá trị LOD = 5,0.

Tổng số 175 microsatellite marker trên 181 loci được sử dụng để thiết kế bản đồ QTL, với chiều dài tổng cộng trên bản đồ là 1.276,8 cM, chiều dài trung bình giữa hai marker là 7,1cM.

Tác giả sử dụng phần mềm PLABQTL (Utz và Melchinger 1996) trong phân tích bản đồ cách quãng.

QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 12 được xác định vai trò điều khiển tính trạng chống chịu lạnh ở giai đoạn làm đòng.

Số marker điều tra tính chất đa hình trên mỗi nhiễm sắc thể biến thiên từ 15 đến 41, tỉ lệ đa hình biến thiên từ 27% (nhiễm sắc thể số 8) đến 88% (nhiễm sắc thể số 5). Trung bình đa hình ghi nhận được trong cặp lai giữa japonica x indica là 67%. Phân tích độ lệch phân ly (segregation distortion) thông qua phép thử χ^2 với giả định tần suất alen là 1:1 (indica : japonica). Kết quả tần suất alen của IR50 là 0,52 và của M-202 là 0,48. Trong số 181 loci được xác định trên bản đồ, có 12% nghiêng về alen của IR50 và 5% nghiêng về alen của M-202 (hình 8-3). Tần suất alen đối với IR50 biến thiên từ 0,19 đến 0,72 với tất cả marker định vị trên nhiễm sắc thể số 5, 6, 9, 10 và 11, biểu thị một sự phân bố chuẩn của alen. Các đoạn nhiễm sắc thể 1, 3 và 8 thể hiện sự lệch lạc trong phân ly, xu hướng nghiêng về alen của giống japonica (Andaya và Mackill 2003).

Biến thiên kiểu hình và sự hiện diện QTL được thực hiện trên cơ sở thanh lọc stress do nhiệt độ lạnh 12°C, thông qua sự quan sát tỉ lệ hạt bất thụ SFPa của M-202 từ 70% xuống 60%, và SFPa của IR50 từ 30% xuống 20% vào lúc 5-6 ngày sau khi xử lý nhiệt độ lạnh,

trong đó, kết quả quan sát 5 ngày đầu tiên cho thấy: IR50 giảm đột ngột SFPa. Trái lại, SFPb của IR50 biểu thị rất thấp vào lúc 6 ngày sau xử lý, trong khi SFPb của M-202 vẫn duy trì giá trị 70% cho đến ngày thứ 7 (Andaya và Mackill 2003).

Bảng 2: Phân tích QTL tính trạng chống chịu lạnh theo phương pháp cách quãng, quần thể RIL từ tổ hợp lai IR50 x M-202 (Andaya và Mackill 2003)

QTL	Nhiễm thể	Quãng giữa 2 marker	Giá trị cM	LOD	R ²	Tính cộng	Ảnh hưởng DFE ^b
% hạt hữu thụ					(17,5) ^a		
SFPa							
qCTB2a	2	RM234-RM301	2,6	6,0**	16,8	5,83	M
qCTB9	9	RM257-RM242	5,1	3,7*	10,7	4,68	M
SFPb					(27,7)		
qCTB1	1	RM151-RM259	14,5	5,1**	14,6	5,81	M
qCTB2b	2	RM324-RM301	2,6	3,6*	10,5	4,02	M
qCTB3	3	RM156-RM214	3,1	5,9**	16,5	5,76	M
% hoa lúa không phát triển (USP)					(15,9)		
qCTB5	5	RM26 –RM334	10,4	4,3**	12,8	-10,63	M
qCTB6	6	RM50 –RM173	14,9	4,3**	12,6	7,42	I
qCTB7	7	RM129-RM81b	10,1	4,0*	11,7	5,13	I
qCTB12	12	RM292-RM260	3,1	3,9*	11,6	- 9,11	M

(a): biểu thị tổng cộng ảnh hưởng QTL trong giải thích biến thiên kiểu hình, (b): DPE viết tắt từ chữ direction of phenotypic effect, có nghĩa là xu hướng ảnh hưởng kiểu hình thuộc về M (giống M-202) và thuộc về I (giống IR50).

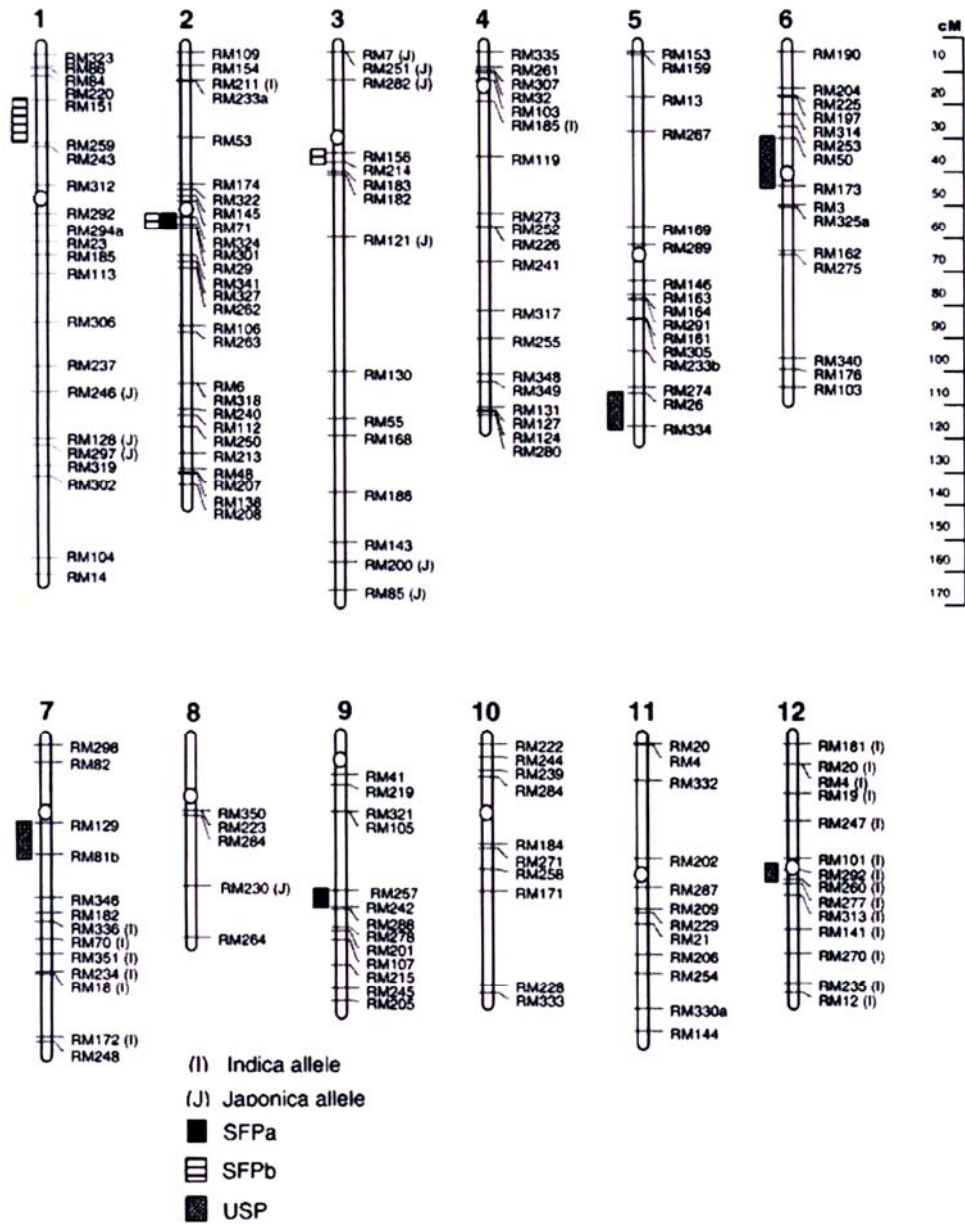
Theo kết quả này:

- Tỷ lệ phần trăm hạt hữu thụ có xu hướng nghiêng về kiểu gen của giống chống chịu lạnh M-202.
- Tỷ lệ phần trăm hoa lúa không phát triển USP (undeveloped spikelet percentage) có xu hướng nghiêng về kiểu gen của cả hai giống: giống nhạy cảm với nhiệt độ lạnh IR50, và giống chống chịu M-202.

SFPa được điều khiển bởi 2 QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 2 và 9 (bảng 2, hình 8-3), ký hiệu là *qCTB2a* và *qCTB9*.

- *qCTB2a* được xác định giữa hai marker RM234-RM301, giải thích 16,8% biến thiên kiểu hình
 - *qCTB9* được xác định giữa hai marker RM257-RM242, giải thích 10,7% biến thiên kiểu hình
- SFPb được điều khiển bởi 3 QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 2 và 3, giải thích 27,7% biến thiên kiểu hình (bảng 2)

Đây là công trình đầu tiên phân tích QTL tính chống chịu lạnh ở giai đoạn làm đòng với quần thể RIL, nghiệm thức xử lý nhiệt độ lạnh trong phòng. Bởi vì trước đó, có nhiều công trình thanh lọc trong nước đông lạnh, và nhiễm sắc thể số 3 và 4 được xác định là vùng định vị của QTL điều khiển tính chống chịu lạnh (Saito và ctv. 1995, 2001). Nhưng QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 3 của công trình Andaya và Mackill (2003) không giống với QTL của Saito và ctv. (2001). Gần đây những QTL định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 7 và 11 điều khiển tính chống chịu lạnh ở giai đoạn làm đòng cũng được công bố trong tổ hợp lai giữa hai giống japonica (Takeuchi và ctv. 2001)



Hình 8-3: Bản đồ QTL tính chống chịu lạnh ở giai đoạn làm đòng, trên cơ sở 191 dòng RIL (IR50 x M-202) (indica x japonica), với microsatellite marker phủ trên 12 nhiễm sắc thể (Andaya và Mackill 2003)

Như vậy có 8 vùng định vị trên 8 nhiễm sắc thể được ghi nhận có sự thể hiện của những QTL giả định điều khiển tính chống chịu lạnh ở giai đoạn làm đòng. Kết quả này khuyến cáo một phương pháp mới thay vì thanh lọc mặn trong điều kiện xử lý nước lạnh, người ta có thể dùng phòng có nhiệt độ lạnh để đánh giá kiểu hình.

Hướng lâu dài, người ta cố gắng xác định chiến lược sử dụng microsatellite marker để áp dụng MAS trong chọn giống chống chịu, nhằm chi phí và công sức trong thanh lọc tính chống chịu lạnh.

8-3. SỰ TRUYỀN TÍN HIỆU & PHẢN ỨNG ĐIỀU TIẾT ÁP SUẤT THẨM THẤU

Khô hạn, mặn và lạnh là 3 yếu tố môi trường “phổ biến” ảnh hưởng đến cơ chế điều tiết chất áp suất thẩm thấu trong tế bào (OA = osmotic adjustment) (Boyer 1982, Thomashow 1994, Bohnert và ctv. 1995).

Người ta nghĩ rằng cần phải hiểu biết một cách đầy đủ cơ chế nhận và truyền tín hiệu của tế bào như một chìa khóa để biết được phản ứng của cây và cơ sở di truyền tính chống chịu lạnh, từ đó chúng ta mới có thể cải tiến giống cây trồng theo mục tiêu mong muốn.

Phản ứng đối với stress gây ra sự biến đổi áp suất thẩm thấu do thiếu nước, do nồng độ muối cao đã được báo cáo thông qua sự thể hiện của nhiều gen làm thay đổi tình trạng của cây (xem chương 2 và 3). Phản ứng này cũng được quan sát trong điều kiện nhiệt độ lạnh, với thuật ngữ “osmotic stress responsive genes”, viết tắt là gen “OR” (Nodin và ctv. 1991, Thomashow 1994, Giraudat 1995).

Cả hai loại stress đối với áp suất thẩm thấu và đối với nhiệt độ lạnh đều làm gia tăng hàm lượng ABA (abscisic acid) (Chandler và Robertson 1994). Sự thể hiện của những gen OR có thể được kích hoạt bởi việc gia tăng hàm lượng ABA (Zhu và ctv. 1997). Tuy nhiên, trong phân tích sự thể hiện gen OR trong các dòng đột biến thiếu ABA (ABA-deficient) và dòng đột biến không nhạy cảm ABA (ABA-insensitive), người ta thấy rằng sự thể hiện của một vài gen OR tỏ ra khá độc lập với ABA (Gilmour và Thomashow 1991, Nordin và ctv. 1991, Gosti và ctv. 1995).

Bên cạnh đó, một nguyên tố điều tiết DNA có tính chất “cis-acting”, được xem như là nguyên tố phản ứng với triệu chứng mất nước (DRE = dehydration-responsive element), nguyên tố này chỉ phản ứng với stress do lạnh và stress do tổn thương chất nguyên sinh, mà không phản ứng đối với ABA (Vasil và ctv. 1995).

Như vậy, tiến trình truyền tín hiệu có tính chất độc lập với ABA và tiến trình lệ thuộc ABA đều có thể xảy ra, để gen điều khiển tính chống chịu lạnh thể hiện và điều tiết áp suất thẩm thấu, bảo vệ cây giảm thiệt hại do stress (Gosti và ctv. 1995, Shen và Ho 1995, Ishitani và ctv. 1997, Stockinger và ctv. 1997).

Người ta làm thí nghiệm xem xét tiến trình truyền tín hiệu OR trong sinh vật đơn bào *Saccharomyces cerevisiae* và ghi nhận nhiều thông tin bổ ích về sự xác định và thể hiện các gen OR (Brewster và ctv. 1993, Posas và Saito 1997, Zhu và ctv. 1997), trong đó, người ta ghi nhận cơ chế nhạy cảm trong áp suất thẩm thấu vẫn còn là vấn đề thử thách rất lớn cho các nhà khoa học.

Người ta mô tả: “phospholipase C”, “nhiều yếu tố chuyển mã” và những “protein kinase” mang mã di truyền của gen OR, nhưng chức năng nhiệm vụ của chúng về tiến trình truyền tín hiệu vẫn chưa có gì rõ ràng (Hirayama và ctv. 1995, Urao và ctv. 1994, Stockinger và ctv. 1997, Nishihama và ctv. 1995).

Ishitani và ctv. (1997) đã phát triển các dòng đột biến của *Arabidopsis thaliana* để nghiên cứu tiến trình truyền tín hiệu đối với stress do lạnh và tổn thương chất nguyên sinh, hiện tượng điều tiết gen OR và sự thể hiện gen này. Người ta chuyển nạp gen thể khảm, có chứa luciferase reporter của con đom đóm, *RD29A-LUC* vào cây *Arabidopsis*, công thức gen này được khởi động bởi DRE/C-repeat- và ABRE-có chứa *RD29A* promoter (Yamaguchi-Shinozaki và Shinozaki 1994). Cây được chuyển nạp sẽ thể hiện tính chất phát quang sinh học (bioluminescence) khi phản ứng với stress do lạnh, xử lý ABA. Hạt của cây chuyển nạp ở dạng đồng hợp tử về “transgene”, được xử lý đột biến bằng hóa chất EMS (ethyl methanesulfonate). Cây M₂ được thanh lọc dựa trên phản ứng phát quang sinh học. Kiểu hình của nhiều dòng đột biến vẫn không thể giải thích hiện tượng truyền tín hiệu OR. Ishitani và ctv. (1997) đã tìm cách thiết lập một mô hình khác trong nghiên cứu tiến trình truyền tín hiệu này trên cơ sở hai phương án: tiến trình độc lập với ABA và tiến trình lệ thuộc ABA.

8-3-1. Điều tiết phản ứng phát quang sinh học của cây *Arabidopsis*

Cây *Arabidopsis thaliana* chuyển nạp gen *RD29A-LUC* là vật liệu thí nghiệm được xem xét tại Đại học Arizona, Mỹ. Việc chọn lựa một promoter và một reporter tương ứng là

điều kiện cần thiết để thanh lọc các dòng đột biến đối với mục tiêu nghiên cứu về điều tiết gen và truyền tín hiệu. *RD29A* là một promoter và *LUC* là một reporter được chọn để thanh lọc các “mutants” của gen *OR*. Chức năng của *RD29A* có thể được biết với *cor78*, hoặc *Iti78* (Howarth và ctv. 1993, Nordin và ctv. 1993), nhưng sản phẩm của gen vẫn chưa được biết rõ. Người ta xác định rằng promoter này có thể được kích hoạt bởi stress do nhiệt độ lạnh và do áp suất thẩm thấu (Yamaguchi-Shinozaki và Shinozaki 1994). Bên cạnh đó, phản ứng đa dạng của ABRE/ABA điều hòa ABA, mà *RD29A* cũng có chứa yếu tố DRE, yếu tố này được kích hoạt bởi stress do lạnh, nhưng không bị kích hoạt do ABA. Như vậy, promoter này sẽ tạo điều kiện để chúng ta nghiên cứu cả hai tiến trình: “độc lập với ABA và lệ thuộc ABA”.

Reporter *LUC* được chọn trong trường hợp này bởi vì sự thể hiện của nó trong cây có thể được phát hiện bằng cách sử dụng hình ảnh video có thuật ngữ chuyên môn là “low-light video imaging” thông qua hiện tượng phát quang sinh học của con đom đóm.

Công thức gen *RD29A-LUC* được chuyển nạp vào cây *Arabidopsis* (ecotype C24) theo phương pháp chuyển gián tiếp nhờ *Agrobacterium tumefaciens*, chuyển qua rễ (Valvekens và ctv. 1988). Người ta chọn được một cây trong 9 cây chuyển nạp có tính chất độc lập, thể hiện cao nhất hoạt tính của *LUC* trong điều kiện bị stress ở chất nguyên sinh và bị stress do lạnh.

Hai primer của promoter này là:

5'-TCGGGATCCGGTGAATTAAGAGGAGAGAGGAGG-3'

5'-GACAAGCTTTGAGTAAAACAGAGGAGGGTCTCAC-3'

Đánh giá kiểu hình được thực hiện trên cây mạ 1 tuần tuổi trồng trong môi trường agar, ở điều kiện nhiệt độ 0°C, thời gian thí nghiệm 48 giờ, và đo giá trị phát quang sinh học bằng máy “low-light CCD imaging”.

Kết luận: Stress do lạnh kích thích rất mạnh hiện tượng phát quang sinh học trong cây chuyển nạp gen *RD29A-LUC* (Ishitani và ctv. 1997).

8-3-2. Phân lập dòng đột biến có mức độ phát quang sinh học thay đổi

Một số lượng lớn các dòng đột biến thuộc dạng:

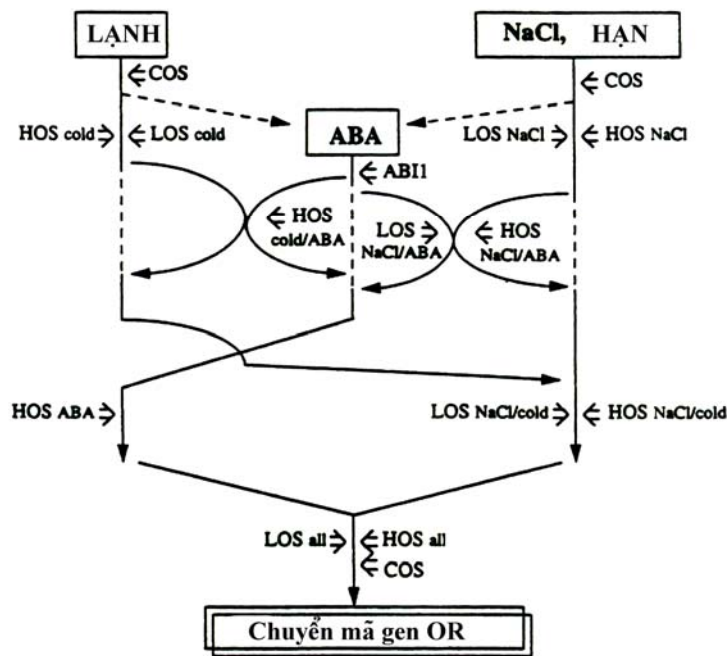
- *cos*: được viết tắt từ thuật ngữ: “constitutive expression of osmotically responsive genes” có nghĩa là dạng thể hiện cơ bản của gen phản ứng với điều tiết nguyên sinh chất
- *los*: được viết tắt từ thuật ngữ “low expression of osmotically responsive genes” có nghĩa là dạng thể hiện thấp của gen phản ứng với điều tiết nguyên sinh chất
- *hos*: được viết tắt từ thuật ngữ “high expression of osmotically responsive genes” có nghĩa là dạng thể hiện cao của gen phản ứng với điều tiết nguyên sinh chất

Chúng được phân lập trong các dòng mutant nhờ kỹ thuật cao trong hệ thống “luminescence imaging”. Những dòng đột biến *los* và *hos* được gom vào thành 14 lớp tùy thuộc vào tính chất khiếm khuyết trong phản ứng với một stress hoặc kết hợp nhiều stress và tín hiệu ABA (Bảng 3). Trên cơ sở phân lớp như vậy, người ta đề nghị một mô hình truyền tín hiệu trong thực vật bậc cao (hình 8-4)

Bảng 3: Số dòng đột biến được xếp hạng vào những lớp khác nhau (Ishitani và ctv. 1997)

Lớp	1 ^a	2 ^b	3 ^c
<i>cos</i>	9	16	8
<i>los</i>			
Tất cả	34	139	198
Lạnh	3	7	23
NaCl	3	15	47

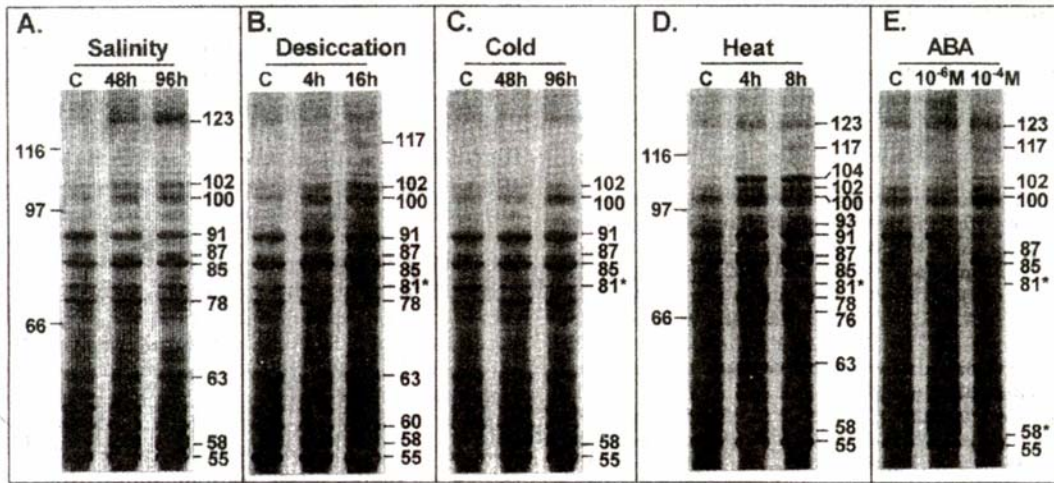
ABA	0	6	18
Lạnh/NaCl	3	2	17
NaCl/ABA	2	4	12
Lạnh/ABA	0	6	9
<i>hos</i>			
Tất cả	21	12	10
Lạnh	9	9	32
NaCl	1	20	32
ABA	3	11	16
Lạnh/NaCl	1	9	12
NaCl/ABA	11	10	11
Lạnh/ABA	3	5	14
^a Đột biến có kiểu hình biểu thị phát quang mạnh (tổng cộng 103) ^b Đột biến có kiểu hình biểu thị phát quang trung bình (tổng cộng 271) ^c Đột biến có kiểu hình biểu thị phát quang yếu (tổng cộng 459)			



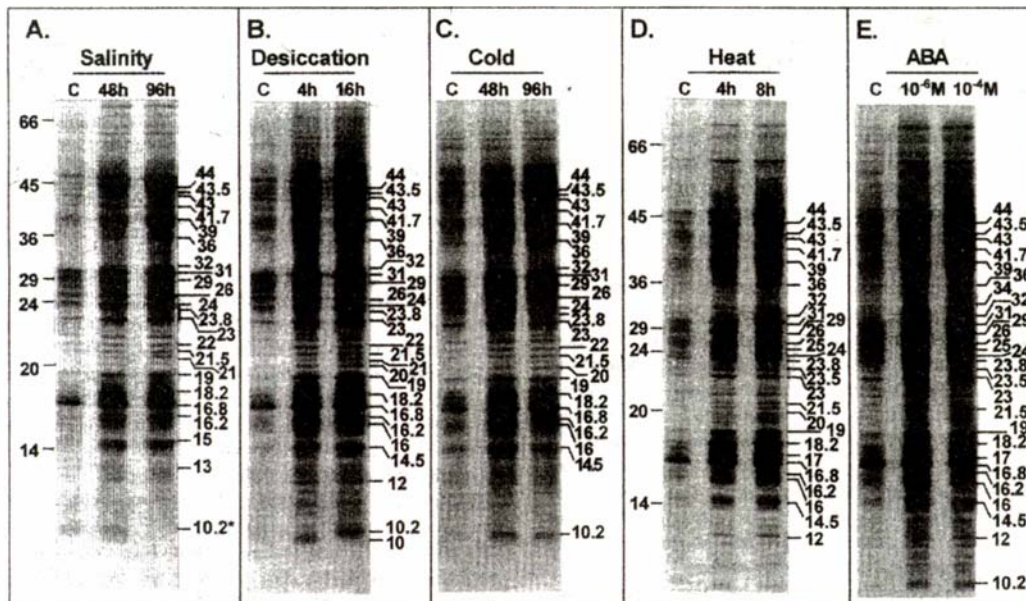
Hình 8-4: Mô hình truyền tín hiệu trong điều kiện bị stress do lạnh (Ishitani và ctv. 1997)

8-4. SỰ BIẾN ĐỔI PROTEIN THEO NHIỆT ĐỘ, MẶN & KHÔ HẠN

Tại Đại học New Delhi, Ấn Độ, người ta sử dụng giống lúa Lal nakanda có tính chống chịu khô hạn rất tốt làm vật liệu nghiên cứu (Pareek và ctv. 1998) với các nghiệm thức xử lý: lạnh, nóng, ABA, khô hạn, và mặn. Sự thay đổi protein của giống lúa thử nghiệm với trọng lượng phân tử biến thiên từ 10,2 kDa (phản ứng với mặn, khô hạn, lạnh và ABA) đến 123 kDa (phản ứng với mặn, và ABA), thay đổi tùy theo loại hình bị stress, thời gian xử lý và tùy theo nơi ly trích ở thân hoặc rễ (hình 8-5, và 8-6)

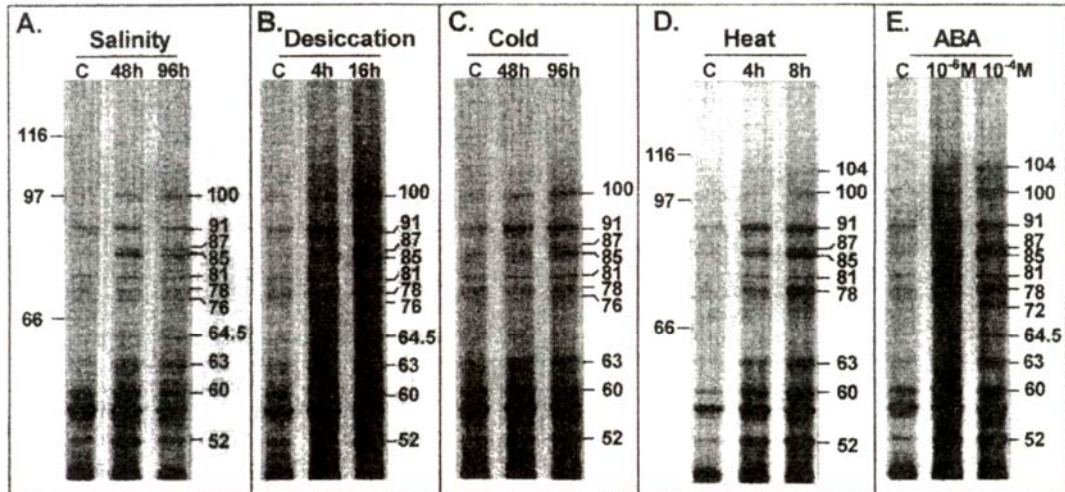


Hình 8-5: Điện di protein phân tử cao, ly trích từ thân cây mạ, acrylamide SDS-gel 7,5%, thông qua nghiệm thức xử lý mặn (salinity), khô hạn (desiccation), lạnh (cold), nóng (heat), ABA (Pareek và ctv. 1998)

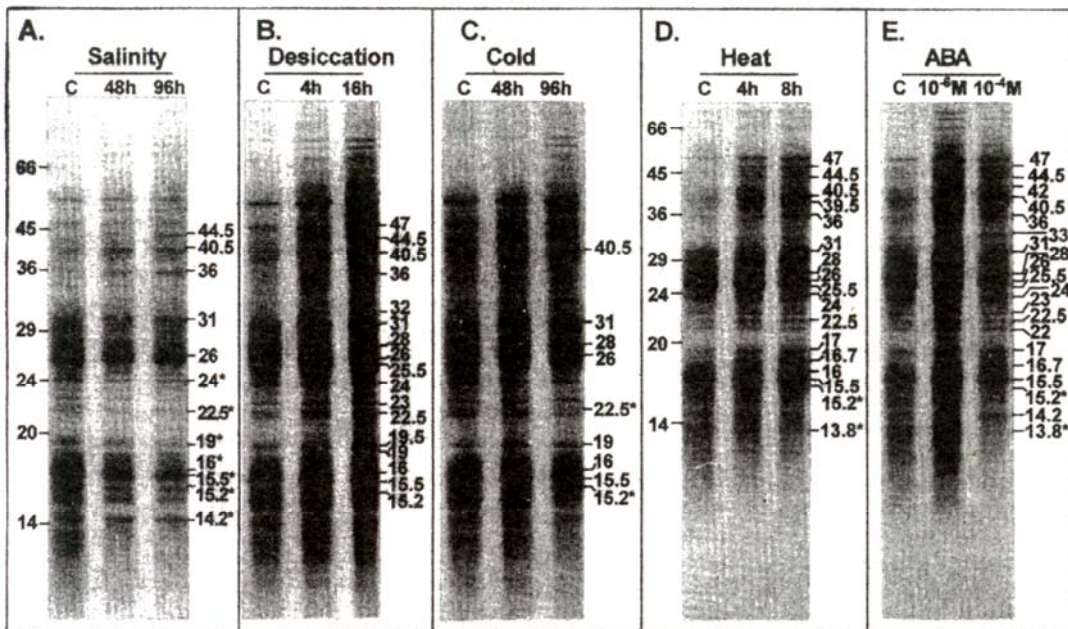


Hình 8-6: Điện di protein phân tử thấp, ly trích từ thân cây mạ, acrylamid SDS-gel 15-22%, thông qua nghiệm thức xử lý mặn (salinity), khô hạn (desiccation), lạnh (cold), nóng (heat), ABA (Pareek và ctv. 1998)

Nhiều protein thể hiện các vạch chồng lấp lên nhau theo mức độ nhạy cảm với stress. Những protein có trọng lượng phân tử 102, 100, 87, 85, 55, 44, 43.5, 43, 41.7, 39, 36, 32, 31, 29, 26, 24, 23.8, 23, 21.5, 19, 18.2, 16.8 và 16.2 kDa trong rễ lúa phản ứng với những stress khác nhau (hình 8-9, và 8-10)



Hình 8-7: Điện di protein phân tử cao ở rễ lúa trong điều kiện nồng độ acrylamide SDS-gel 7,5%, thông qua nghiệm thức xử lý mặn (salinity), khô hạn (desiccation), lạnh (cold), nóng (heat), ABA (Pareek và ctv. 1998)



Hình 8-8: Điện di protein phân tử thấp ở rễ lúa trong điều kiện nồng độ acrylamide SDS-gel 15-22%, thông qua nghiệm thức xử lý mặn (salinity), khô hạn (desiccation), lạnh (cold), nóng (heat), ABA (Pareek và ctv. 1998)

Nghiệm thức xử lý ABA có tính chất bắt chước trong tự nhiên trong cơ chế truyền tín hiệu và phản ứng chống chịu, cũng cho ra kết quả đa hình protein như những stress trong thí nghiệm.

Mặt khác, người ta ghi nhận tính chống chịu lạnh của nhiều loài cây trồng có liên quan mật thiết với các mức độ khác nhau về tính không bão hòa của acid béo trong phosphatidyl glycerol (PG) có trong các lớp màng của lục thể (chloroplast). Thực vật có tỉ lệ acid béo không bão hòa cao, thí dụ như *Arabidopsis thaliana*, sẽ có khả năng chống chịu rét tốt hơn. Enzyme “ glycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase” (GPAT) có trong lục thể đóng vai trò quan trọng trong việc xác định mức độ không bão hòa của acid béo PG (Yokoi và ctv. 1998).

Người ta phân lập một cDNA đối với enzyme GPAT có tính chuyên biệt đối với oleate của genome cây *Arabidopsis thaliana* dưới sự kiểm soát của promoter cây bắp *Ubiquitin*, gen này được chuyển nạp vào cây lúa bằng phương pháp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens*.

Công thức gen chuyển nạp: Km^R-*Ubiquitin*-GPAT-NOS ter-Hyg^R-pBIN19

Các mức độ của acid béo không bão hòa trong phosphatidyl glycerol trong cây lúa chuyển nạp gen đạt giá trị 20% cao hơn giống lúa không chuyển nạp, ở nhiệt độ xử lý 17°C. Như vậy, việc du nhập cDNA của GPAT trong cây *Arabidopsis* vào cây lúa tạo ra một sự không bão hòa acid béo lớn hơn và liên quan đến tính chống chịu lạnh trong quá trình quang hợp của cây lúa (Yokoi và ctv. 1998).

Bertin và ctv. (1997) đã sử dụng hiện tượng huỳnh quang của diệp lục tố để thanh lọc các giống lúa chống chịu rét. Nhóm tác giả đã khai thác sự biến dị tế bào soma của cây lúa để thanh lọc các tính trạng mục tiêu.

Ký hiệu Fo biểu thị giá trị tối thiểu huỳnh quang diệp lục khi mở phản ứng trung tâm PSII, Fm: biểu thị giá trị tối đa, Fv: biểu thị giá trị của giống (=Fm – Fo), Fv/Fm là hiệu quả của “PSII photochemistry”.

Để đánh giá hiệu quả của hệ thống quang hợp II (PSII): “photochemistry” Fv/Fm ở nhiệt độ lạnh đối với các dòng soma, người ta đo mức độ huỳnh quang diệp lục tố của từng dòng soma trong thí nghiệm này, so với giống bố mẹ ban đầu, bằng một công cụ xách tay “fluorometer” (PEA analyser, Hansatech, Anh Quốc). Nghiệm thức lạnh trong phytotron được duy trì 10/5°C (ngày/đêm) trong 72 giờ, trước khi xử lý lạnh, cây lúa ở điều kiện nhiệt độ là 28/22°C (ngày/đêm). Mẫu lá lúa được lấy để đo giá trị Fv/Fm sau 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 75, 144, và 147 giờ và so sánh với mẫu đối chứng được duy trì ở nghiệm thức 28/22°C. Nghiệm thức lạnh làm kích hoạt một sự giảm đáng kể Fv/Fm trong ban ngày, và được bù đắp lại vào ban đêm. Tính chất này còn tùy thuộc vào giống chịu lạnh hay giống nhạy cảm. Lá lúa của những dòng soma có tính chống chịu lạnh được xử lý cùng điều kiện như trên trong 6 ngày, được thu thập để đo đêm. Người ta quan sát sự khác biệt rất lớn giữa các dòng soma với giống gốc của chúng về Fv/Fm.

Như vậy, phương pháp đo huỳnh quang của chất diệp lục trong các nghiệm thức xử lý lạnh sẽ giúp chúng ta phát hiện sự thay đổi tính trạng chống chịu rét của cây lúa (Bertin và ctv. 1997). Kết luận: nghiên cứu này cho thấy hiện tượng huỳnh quang thay đổi trong diệp lục tố là một tiêu chuẩn quan trọng để nghiên cứu tính chống chịu lạnh của cây lúa, một vài cơ chế nhạy cảm với lạnh có thể xảy ra mà không tùy thuộc vào sự thay đổi của huỳnh quang diệp lục. Những cơ chế khác thường như vậy có thể ghi nhận được trong khai thác biến dị tế bào soma, và những dòng soma này phải được trải nghiệm tiếp tục trên đồng ruộng sau khi có kết quả trong phòng thí nghiệm (Bertin và ctv. 1997)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andaya VC, DJ Mackill. 2003. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from japonica x indica cross. *Theor Appl Genet* 106:1084-1090
- Bertin P, J Bouharmont, JM Kinet. 1997. Somaclonal variation and improvement of chilling tolerance in rice: Changes in chilling-induced chlorophyll fluorescence. *Crop Sci* 37:1727-1735
- Bohnert HJ, DE Nelson, RG Jensen. 1995. Adaptation to environmental stress. *Plant Cell* 7:1099-1111
- Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448
- Brewster JL, T de Valoir, ND Dwyer, E Winter, MC Gustin. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760-1763
- Dilday RH. 1990. Contribution of ancestral lines in the development of new cultivars of rice. *Crop Sci* 30:905-911
- Futsuhara T, K Toriyama. 1964. Studies on testing methods of cold resistance in rice. *Jpn J Breed* 14:166-172
- Futsuhara Y, K Toriyama. 1966. Genetic studies on cool tolerance in rice. III. Linkage relations between genes controlling cool tolerance and marker genes of Nagao and Takahashi. *Jpn J Breed* 16: 19-30
- Gilmour SJ, MF Thomashow. 1991. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 17:1233-1240
- Giraudat J. 1995. Abscisic acid signaling. *Curr Opin Cell Biol* 7:232-238
- Glaszmann JC, RN Kaw, GS Khush. 1990. Genetic divergence among cold tolerant rices (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 45:95-104
- Gosti F, N Bertauche, N Vartanian, J Giraudat. 1995. Abscisic acid-dependent and – independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 246:10-18
- Harushima Y, M Yano, A Shomura, M Sato, T Shimano, Y Kuboki, T Yamamoto, SY Lin, BA Antonio, A Parco, H Kajiya, N Huang, K Yamamoto, Y Nagamura, N Kurata, GS Khush, T Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* 148:479-494
- Hayase H, T Sasake, N Nishiyama, N Ito. 1969. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. II. The most sensitive stage to cooling and the fertilizing ability of pistils. *Proc Crop Sci Soc Japan* 38:706-711
- Hayashi T, Y Ukai. 1994. Detection of additive and dominance effects of QTLs in interval mapping of F₂ RFLP data. *Theor Appl Genet* 87:1021-1027
- Hirayama T, C Ohto, T Mizoguchi, K Shinozaki. 1995. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3903-3907
- Howarth DP, BK Mclarney, MF Thomashow. 1993. Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) *cor78* in response to low temperature. *Plant Physiol* 103:1047-1053

- Ishitani M, L Xiong, B Stevenson, JK Zhu. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell* 9:1935-1949
- Kaneda C, HM Beachell. 1973. Response of japonica – indica rice hybrids to low temperatures. *SABRAO J* 6:17-32
- Koike K, K Yoshino, N Sue, Y Umehara, I Ashikawa, N Kurata, T Sasaki. 1997. Physical mapping of rice chromosome 4 and 7 using YAC clones. *DNA Res* 4:27-33
- Kurata N, Y Nagamura, K Yamamoto, Y Harusima, N Sue, J Wu, BA Antonio, A Shomura, T Shimizu, S-Y Lin, T Inoue, A Fukuda, T Shimano, Y Kuboki, T Toyama, Y Miyamoto, T Krihara, K Hayasaka, A Miyao, L Monna, HS Zhong, Y Tamura, Z-X Wang, T Momma, Y Umehara, M Yano, T Sasaki, Y Minobe. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet* 8:365-372
- Lander ES, P Green, J Abrahamson, A Barlow, M Daly, SE Lincoln, L Newburg. 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Murray MG, WF Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids res* 8:4321-4325
- Nishihama R, H Banno, W Shibata, K Hirano, M Nakashima, S Usami, Y Machida. 1995. Plant homologues of pathways in yeast and animals. *Plant Cell Physiol* 36:749-757
- Nishiyama I. 1976. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XIII. Ultrastructure of tapetal hypertrophy without primary wall. *Proc Crop sci Soc japan* 45:270-278
- Nodin K, P Heino, ET Palva. 1991. Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* 17:1233-1240
- Nordin K, T Vahala, ET Palva. 1993. Differential expression of two related, low temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* 21:641-653
- Oka H, H Morishima. 1967. Variations in the breeding systems of a wild rice, *Oryza perennis*. *Evolution* 21:249-258
- Pareek A, SN Singla, A Grover. 1998. Protein alterations associated with salinity, desiccation, high and low temperature stresses and abscisic acid application in Lal nakanda, a drought-tolerant rice cultivar. *Current Sci* 75(11):1170-1174
- Posas F, H Saito. 1997. Osmotic activation of the HOGMAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276:1702-1705
- Saito A, M Yano, N Kishimoto, M Nakagahra, A Yoshimura, K Saito, S Kuhara, Y Ukai, M Kawase, T Nagamine, S Yoshimura, O Ideta, R Oshawa, Y Hyano, N Iwata, M Sigiura. 1991. Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Jpn J Breed* 41:665-670
- Saito K, K Miura, K Nagano, Y Hayano-Saito, A Saito, H Araki, A Kato. 1995. Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety “Norin-PL8”. *Breed Sci* 45:337-340
- Saito K, K Miura, K Nagano, Y Hayano-Saito, H Araki, A Kato. 2001. Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theor Appl Genet* 103:862-868

- Satake T, H Hayase. 1970. . Male sterility caused by cool treatment at the young microspore stage in rice plants. V. Estimation of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. Proc Crop Sci Soc Japan 39:468-473
- Satake T, M Shibata. 1992. Male sterility caused by cool treatment at the young microspore stage in rice plants. XXXI. Four components participating in fertilization. Jpn J Crop Sci 61:454-462
- Satake T. 1991. Male sterility caused by cool treatment at the young microspore stage in rice plants. XXX. Relation between fertilization and the number of engorged pollen grains among spikelets cooled at different pollen developmental stages. Jpn J Crop Sci 60:523-528
- Sawada S. 1978. Study of sterile-type cool injury in rice plants with special reference to the mechanism and inheritance of sterility. Res Bull Obihiro Univ 10:837-883
- Shen Q, THD Ho. 1995. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ANA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. Plant Cell 7:295-307
- Stockinger EJ, SJ Gilmour, MF Thomashow. 1997. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proc Natl Acad Sci USA 94:1035-1040
- Suzuki S. 1981. Cold tolerance in rice plants with special reference to the floral characters. I. Varietal differences in anther and stigma lengths and the effects of planting densities on these characters. Jpn J Breed 31:57-64
- Takahashi M, T Kinoshita, K Takeda. 1973. Character expression of some major genes in rice and their agronomic application. J Facul Agr Hokkaido Univ 57:275-293
- Takeuchi Y, H Hayasaka, B Chiba, I Tanaka, T Shimano, M Yamagishi, K Nagano, T Sasaki, M Yano. 2001. Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at the booting stage in temperate japonica rice. Breed Sci 58:240-245
- Tanno H, J Xiong, L Dai, C Ye. 1999. Some characteristics of cool weather-tolerant rice varieties in Yunnan province, China. Jpn J Crop Sci 68:508-514
- Thomashow MF. 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. *In Arabidopsis* C Somerville and EM Meyerowitz (Eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pp. 807-834
- Ukai Y, R Oshawa, A Saito. 1991. MAPL: a package of microcomputer programs for RFLP linkage mapping. Rice Genetics Newsl 8:155-158
- Urao T, T Katagiri, T Mizoguchi,, K Yamaguchi-Shinozaki, N Hayashiba, K Shinozaki. 1994. Two genes that encode Ca⁺⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet 244:331-340
- Utz HF, AE Melchinger. 1996. PLABQTL: a program for composite interval mapping of QTLs. J Quant Trait Loci 2: (<http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/jqtl1996-8001/utz.html>)
- Valvekens D, M van Montagu, M van Lijsebettens. 1988. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. Proc Natl Acad Sci USA 85:5536-5540
- Vasil V, WR Marcotte Jr, L Rosenkrans, SM Cocciolone, IK Vasil, RS Quatrano, DR McCarty. 1995. Overlap of Viviparous1 (VP1) and abscisic acid response elements in

the *Em* promoter: G box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell* 7:1511-1518

Yamaguchi-Shinozaki K, K Shinozaki. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high salt-stress. *Plant cell* 6:251-264

Yokoi S, SI Higashi, S Kishitani, N Murata, K Toriyama. 1998. Introduction of the cDNA for *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Mol Breed* 4:269-275

Zhu JK, PM Hasegawa, RA Bressan. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit Rev Plant Sci* 16:253-277

CHỈ DẪN (INDEX)

ABA
Abebe
abiotic stress
ABRE
abscisic acid
ACIAR
acid phosphatase (APA)
actin depolymerase
ADC
adenosine triphosphate
adh
Adsorption
AFLP
Agrobacterium tumefaciens
Agrotis
Ahn
Akbar
allele mining
aluminum toxicity tolerance
anaerobic protein
Anchor
anchor probe
Andaya
ảnh hưởng cộng
ảnh hưởng trội
anisomeric genes
ANOVA một chiều
ANP (anaerobic protein)
Anti-oxidant
Apatite
Apium graveolens
Arabidopsis thaliana
Arumugam Pillai
AS1007
AS883
AS996
ascorbate peroxydase
ASI
association genetics

Ba bông
Ba chúc
Ba sào
Babu
BAC clone
BAC contig
backcross inbred lines
bản đồ AFLP
bản đồ RFLP
bản đồ QTL
bản đồ QTL của *Pup-1*
bản đồ so sánh
bản đồ vật lý
Banih Kuning
Basmati 370
Basten
Bảy
BC
Beachell
Benckiser
Bertin
BetA
biến đổi protein theo nhiệt độ
biểu đồ Venn
BIL
binding protein
bioinformatics
bioluminescence
biotic stress
Blair
Bohnert
Bostein
Boyer
Brachiaria decumbens
bronzing
Bửu

Cà đung đỏ
Cà Đung Gò Công
Cà Đung Phèn
CaMV35S
Cân
cận giao tái tổ hợp
candidate genes
carbohydrate
Carex
Causse
Causse
CBF1
cDNA
CGIAR
chalcone synthase
Chang
Chapin
Chaubey
chelate
Chenab Sel 64-117
Chesholm

bản đồ cách quãng	Chệt cụt
bản đồ chi tiết theo phương pháp thay dần	chỉ số X_F
bản đồ gen	chiều dài rễ bị stress
bản đồ liên kết gen	chiều dài rễ đối chứng
chiều dài rễ tương đối	DFE (direction of phenotypic effect)
chiều dài túi phấn Norin-PL8	diệp lục tố
chip sinh học	distal
chloroplast	dominant marker
chống chịu độ độc nhôm	dòng cận giao tái tổ hợp (RILs)
chống chịu độ độc sắt	dòng đẳng gen
chống chịu khô hạn	dòng đơn bội kép (DH)
chống chịu lạnh	dòng gần như đẳng gen (NILs)
chống chịu mặn	dòng hồi giao (BC)
chống chịu ngập	dòng hồi giao cải tiến (ABC)
chống chịu ngập hoàn toàn	donor
chống chịu nhiệt độ lạnh	DRE (dehydration-responsive element)
chống chịu thiếu lân	DREB1A
chồng lấp theo hình tháp	Dubcovsky
Choudhury	<i>Dw1</i>
chu trình Krebs	<i>Dw2</i>
chu trình phân giải glucose	
chương trình genome cây lúa	Đại Học Cornell
chuyển mã gen <i>OR</i>	Đại Học New Delhi
chuyên nạp gen	Đại Học Nông Nghiệp Nanjing
CIAT	đánh giá kiểu gen
CICA 4	đánh giá kiểu hình
CIMMYT	đất acid
CIP	đất bạc màu
<i>cis</i> -element	đất mặn
Clark	đất thiếu lân
cơ chế chống chịu in-vitro	điện di protein phân tử cao
cơ chế chống chịu ngoài đồng	điện di protein phân tử thấp
co nguyên sinh	điều tiết áp suất thẩm thấu
CO39 / Moroberekan	điều tiết nguyên sinh chất
coastal salinity	điều tra đa hình trong bố mẹ
<i>CodA</i>	Độc Đỏ
codominant marker	Độc Phụng
comparative mapping	đơn bội kép
comparative survival (CS)	Đuôi Trâu
composite interval mapping	
contig	EAPA
<i>cor78</i>	EC
Coronel IR1552 / Azucena	Elicitor
<i>cos</i>	ELON
co-segregates	empirical approach
CRL	EMS
crop replacement	Epistasis
CSR10	Escherichia coli
CSR13	E. coli

Ctb-1	EST
Ctb-2	ethyl methanesulfonate
Cù là	Ethylene
<i>cysOs1</i>	<i>Eucalyptus</i>
<i>cysOs2</i>	expressed sequence tags
deep water rice	Fageria
deletion tilling	FAO
fine mapping	Hedley
fingerprinting	hiệu quả đáp ứng của P
flash flood	hiệu quả sử dụng P
flood prone	HilleRisLambers
Flowers	hội giao
fluorometer	Hội Nước Quốc Tế
Fluvaquents	hội tụ gen
Fox	Hokkai 241
FR13A	homeologous segment
Frisch	homeologue region
functional genomics	homeology
Futsuhara	<i>Hordeum vulgare</i>
Fv/Fm	<i>hos</i>
Gale	Howarth
gen cộng tính	Howeler
gen không cộng tính	Huang
Gene isolation	HVA1
Gene machines	<i>Hydraquents</i>
Gene manipulation	hydrophobic barrier
genetic drag	ICARDA
genetic map	ICRISAT
genome học	ideotype breeding approach
genomics	IET4082
Genon	Igarashi
genotyping	IITA
giá trị dự đoán hoạt động của gen cộng tính	Ikehashi
giai đoạn làm đồng	indica
gibberellic acid	indicator
Gilmour	Ingram
giống cho	inland salinity
giống chống chịu	Inouye
giống không đáp ứng với P	interval mapping
giống tái tục	<i>INTN</i>
Gissi 27	introgression
Glaszmann	IR11141-6-1-4
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	IR20
glycerol-3-phosphate <i>O</i> -acyltransferase	IR20 x IR55178-3B-9-3
glycine betaine	IR26
Goff	IR28
Gomosta	IR29
GPAT	IR36
	IR38

Graminae	IR40
Gregorio	IR42
Guiderdoni	IR442
Gunawardena	IR442-2-58
	IR46
Hàm lượng Fe trong cây	IR50 x M-202
Hamamura	IR50404
hấp thu có chọn lọc	IR52
Harushima	IR54
Hayashi	IR59606
hệ số Kurtosis	IR64
hệ số skewness	IR64 / <i>Oryza rufipogon</i>
IR64 x Azucena	low-light CCD imaging
IR74 x Jalmagna	lúa mạch đen
IR74/FR13A	lúa nổi
IR9764-45-2	lúa nước sâu
IRDWON	Lúa Thuóc
IRRI	luciferase
Ishitani	luminescence imaging
Iti78	
IWRA	Mackill
Jackson	Mahsuri
japonica	main-effect QTL
jasmonate	mannitol-1-phosphate dehydrogenase
Jensen	map-based cloning
Kaneda	MAPL97
Kasalath	MAPMARKER
Kasalath segment	MAPMARKER 2.0
Katyal	MAPMARKER/EXP version 3.0
Kawasaki	MAPMARKER/QTL
khả năng đẻ nhánh	marker-assisted selection
khả năng phối hợp chung (gca)	Martinez
khả năng vuron lóng	MAS
Khao Daeng	Mazarado
Khô hạn	McCouch
Khush	Melchinger
Kihara	Melchinger
Kihara 397	Mendoza
Kilian	microarray
Knapp	microsatellite
knockout populations	microsatellite marker
Koike	microsporegenesis
Kosambi	microsyteny
Koyama	Milan
Kupkanchanakul	Mishra
Kurata	mixed flood
kỹ thuật 2DE	mô phỏng tối đa
kỹ thuật chồng gen	Mohanty
kỹ thuật cloning	Móng chim
	Monsanto
lai diallel	Moon
Lander	Moore

Lang
 LE
 LEA (late-embryogenesis abundant)
 leaf brozing
 leaf brozing index (LBI)
 Leb Mue Nahng
 Leung
 Li
 likelihood
 Lin
 Liu
 LOD
 logarith likelihood
los
 Nàng tây đùm
 Nàng tri đỏ
 Nelson
 Nếp vắn
 Nhóm Tư Vấn về Nghiên Cứu Nông
 Nghiệp Quốc Tế
 Ni
Nicotiana plumbaginifolia
 NIL-C443
 Nipponbare
 Nipponbare x Kasalath
 Northern blot
 Nueu
O. breviligulata
O. longistaminata
O. nivara
 OA
 Oka
 OM1314
 OM1490
 OM269 x Chiêm bầu
 OM723-11
 OM850
 OM997
 OR
Oryza glaberrima
Oryza officinalis
Oryza rufipogon
Oryza sativa
 OsGAPDH
 osmolyte
 osmotic adjustment

P5CS
 Paterson
 P-efficiency
 peroxidase
 Peroxidase

 Moormann
 Morishima
 mRNA
 Mse1
MtID
 mức độ hấp thu P
 mức độ hóa già của lá
 multiple QTL effect analysis
 multiple-locus
 Murray
 Murty
 Nahng Kiew
 Nàng Côi
 Nàng son
 PLABQTL
 p-nitrophenyl-phosphate
 Pokkali
 polyamine
 Ponnampereuma

Porteresia coarctata
 PR protein
 Price
 profile
 proline
 promoter
 promoter *rd29A*
 protein cảm ứng
 protein cấu trúc
 protein Salt
 proteinase
 proteomics
 proximal
 Pst1
 Pup-1
 P-uptake
 putrescine
 pyruvate decarboxylase

 QTL
 quần thể cận giao tái tổ hợp
 quần thể đơn bội kép
 quần thể F₂
 quần thể gần như đẳng gen
 quần thể hội giao
 quần thể knockout
 quantitative trait loci
 Quijano

 R2737
 Ramaswami
 Ramiah

phân bố chuẩn	RAPA
phân tích epistasis	RAPD
phân tích QTL	RAPDs
phần trăm sodium trao đổi (ESP)	RD19
phát quang sinh học	RD29A-LUC
phenotyping	recombinant
phép thử χ^2	recombinant inbred lines
PHO	recurrent
phosphatyl glycerol	Reddy
photochemistry	relative root length
phương pháp CTAB	relative tiller %
phương pháp đo huỳnh quang chất diệt lục	reporter
physical map	RFLP
phytotron	RGA (rapid generation advance)
Pingaew 56	RGP
<i>Pisum sativum</i>	Ribaut
RIL	Stuber
RM223	sự thể hiện gen
Rpg1	Suakoko 8
RPUE	Sub1
RRL	submergence tolerance
RSDW	substitution mapping
RUBISCO	Sulfaquepts
RUBISCO activase	superoxide dismutatase
RuBP	Suzuki
rye	Swaminathan
RZ730-RZ801	Syngenta
Sa quay	synteny
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Saito	tái hấp thu
Salekdeh	Tài Nguyên
Sasaki	Takeuchi
Satake	tần suất alen
SCAB11	Tanksley
SCAB20	Tanno
SCAR	Tàu binh
SD (survival days)	Tàu nút
Senadhira	Tây Sông Hậu
senescence	Temnykh
SES	Tenasai 2
Setter	Terwilliger
SGT	Thạch
Shinozaki	Thakur
siêu trội	thể đồng dạng phân ly
Sigadis	thí nghiệm dài hạn
Silewah	<i>Thinopyrum bessabaricum</i>
simple interval mapping	thoái hóa đỉnh bông lúa
single marker analysis	thoái hóa microspore
single nucleotide polymorphism	Thoday
single seed descent	Thomashow
single-QTL	Thompson

sinh học phân tử
skewness
SMA
SNP
Solivas
Southern blot
spermidine
spermine
SPUE
Sripongpankul
SRL
SSD
SSR
stagnant flood
stay-green trait
step-wise exclusion
stress
Strizhov
STS
transgene
transgressive
transgressive segregation
trehalose
Triticeae
trọng lượng khô của chồi (SDW)
trọng lượng khô của rễ
Tropaquents
Tropaquepts
truyền tín hiệu
Tứ Giác Long Xuyên
tương tác GxE
tương tác QTL x E

ubiquitin
Uchimiya
Ukai
Umeda
USP
Utz
van Breeman
Vergara

Thư viện cDNA
Thư viện DNA
tỉ lệ +ve/-ve
tỉ lệ cây ngoi lên mặt nước
tỉ lệ hấp thu sodium (SAR)
tỉ lệ hạt lép
tỉ lệ Na^+/K^+
tiêu chuẩn đánh giá độ độc sắt
TILLING
tín hiệu Cy3 / Cy5
tính chất ngoại biên
tính chất nội biên
tính trạng thành phần
Tolerance
Toriyama
Tràm Chim
Trắng chùm
transcript
trans-element
Vigna aconitifolia
Vos
vượt trội
Wan
Wang
Weller
Wissuwa
Wu
WUE
Xu
Xuân
YAC clone
Yamada
Yamaguchi-Shinozaki
Yano
Yeo
Yokoi
Yoshida
Yu
Zea mays
Zhang
Zhu