

Chọn dòng lúa (*Oryza sativa* L.) chống chịu nóng bằng chỉ thị phân tử ở các tỉnh phía Nam

Nguyễn Thị Lang^{1*}, Phạm Thị Thu Hà¹, Phạm Công Trứ¹

Trần Triệu Quân², Lương Thế Minh², Lý Hậu Giang²

Hoàng Văn Bằng³, Trần Thị Diễm Phượng³, Nguyễn Thị Giang³, Nguyễn Thị Hối³,

Trương Vĩnh Hải⁴, Mai Bá Nghĩa⁴, Bùi Chí Bửu^{1*}

¹Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long (CLRR)

²Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam (IAS)

³Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Đồng Tháp Mười, IAS

⁴Trung tâm Nghiên cứu và chuyển giao tiến bộ kỹ thuật, IAS

*: Tác giả chính

Phân tích 310 dòng BC₂F₂ của tổ hợp lai OM5930/N22 trở bông trong điều kiện nóng. Từ đó, bản đồ di truyền được tạo ra nhờ 264 chỉ thị SSR đa hình để phát hiện liên kết giữa chỉ thị phân tử và tính trạng nghiên cứu. Kết quả ghi nhận số chỉ thị của bản đồ phủ trên 2.741,63 cM với khoảng cách trung bình giữa hai chỉ thị là 10,55 cM. Những chỉ thị phân tử liên kết với tính chống chịu nóng hầu hết định vị trên nhiễm sắc thể (NST) 3, 4, 6, 8, 10 và 11. Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL mục tiêu tại chỉ thị RM3586 (36,2%), RM160 (17,1%) trên NST 3 và RM3735 (32,6%) trên NST 4. Kết quả thật sự được ghi nhận tại quãng giữa RM3586-RM160 trên NST 3 với độ lớn 8,1 cM đối với tính trạng tính theo điểm chống chịu nóng và chỉ thị RM3586 được đặc biệt chú ý trong ứng dụng chọn giống nhờ chỉ thị phân tử. Từ đó, dòng HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4 được chọn nhờ các chỉ thị SSR này, từ quần thể BC₄F₂ của 10 tổ hợp lai.

***Từ khóa:* bản đồ cách quãng (IM), hồi giao nhờ chỉ thị phân tử, phân tích marker đơn, QTL.**

Chỉ số phân loại 4.6

Mở đầu

Nhiệt độ nóng có ảnh hưởng rất lớn đến sự trở hoa của cây lúa, sự thụ phấn và thụ tinh, sự vận chuyển chất khô vào hạt. Kết quả nghiên cứu của Viện Lúa quốc tế (IRRI) đã ghi nhận: khi nhiệt độ môi trường tăng lên 1°C, sản lượng thóc sẽ giảm đi 10% (Peng và ctv, 2004). Sự ấm lên của trái đất đặt ra yêu cầu cải thiện giống lúa cao sản, có khả năng chịu nóng, bảo đảm ổn định tính trạng phẩm chất hạt và năng suất trong điều kiện bị stress nóng.

Tại miền Nam Việt Nam, Trung tâm Dự báo khí tượng thủy văn đã theo dõi trong 5 năm (2004-2008) và ghi nhận rằng: nhiệt độ cao nhất và thấp nhất lần lượt là 38,3°C và 24,0°C. Nhiệt độ trung bình trong năm 2008 dao động từ 26,4°C đến 27,6°C. Trong mùa hè, có những ngày nhiệt độ lên 37-40°C (ngưỡng gây hại cho cây lúa trong giai đoạn thụ phấn).

Đối với cây lúa, nhiệt độ cao 35°C là ngưỡng cực trọng, bông lúa sẽ cho ra những giá bị lép và làm thiệt hại năng suất (Osada và ctv, 1973; Stake và Yoshida, 1978; Matsushima và ctv, 1982), khả năng thiệt hại năng suất đến 80% (Li, 2003).

Zhu và ctv (2005) đã tiến hành nghiên cứu ở giai đoạn làm đầy hạt trên cây lúa với quần thể BIL (backcross inbred lines) từ tổ hợp lai Nipponbare/Kasalath. Kết quả cho thấy, có 3 QTL nằm trên NST số 1, 4, 7 kiểm soát tính trạng chống chịu stress do nhiệt độ cao. Chuyên biệt hơn, QTL định vị tại quãng giữa hai marker C1100-R1783 trên NST số 4 cho thấy: không bị sự tác động của môi trường (tương tác QTL x môi trường) và không có ảnh hưởng tương tác không alen (epistasis).

Zhang và ctv (2009) thuộc Đại học Nông nghiệp Hồ Nam, Trung Quốc và Viện Hàn lâm nông nghiệp Trung Quốc đã cùng hợp tác nghiên cứu gen điều

RICE LINES WITH HEAT TOLERANCE VIA MARKER-ASSISTED SELECTION

Summary

A total of 310 lines (BC_2F_2) derived from the cross of OM5930/N22 have been evaluated for heat stress at flowering. Genetic map has been set up with 264 polymorphic SSR markers to detect linkage to the target traits. The map covers 2,741.63 cM with an average interval of 10.55 cM between marker loci. Markers associated with heat tolerance have been located mostly on chromosomes 3, 4, 6, 8, 10, and 11. The proportions of phenotypic variation explained by each QTL of markers RM3586, RM160 on chromosome 3 and RM3735 on chromosome 4 have been 36.2, 17.1 and 32.6 percent respectively. Four QTLs have been detected for filled grains per panicle on chromosome 4 at the interval of RM468-RM7076 and RM241-RM26212, explaining 13.1% and 31.0% of the total phenotypic variation respectively. Two QTLs controlling unfilled grain percentage have been also detected at loci RM554, RM3686 on chromosome 3, explaining only 25.0% and 11.2% of the total phenotypic variation. One QTL has been detected for 1,000-grain weight located at the locus RM103 on chromosome 6, explaining 30.6% of the total phenotypic variation. A single QTL at the locus RM5749 on chromosome 4 was identified explaining 10.8% of the total phenotypic variation of grain yield. Attentions have been paid to the interval of RM3586- RM160 on chromosome 3 at the range of 8.1 cM for heat tolerance score. Promising lines HTL1, HTL2, HTL3 and HTL4 have been selected from BC_4F_2 populations of 10 crosses via marker-assisted selection.

Keywords: backcross through SSR markers, interval mapping (IM), QTL, single marker analysis (SMA).

Classification number 4.6

khả năng chống chịu nóng của cây lúa ở giai đoạn trổ bông. Nhóm tác giả đã sử dụng quần thể F_2 bao gồm 279 cá thể của tổ hợp lai 996 x 4628. Họ phát hiện chỉ thị RM3735 định vị trên NST 4 và RM3586 trên NST 3 liên kết chặt với tính trạng chống chịu nóng thông qua kết quả có 17% biến thiên kiểu hình được giải thích bởi RM3735 và 3% bởi RM3586.

Vị trí QTL ở quãng giữa hai marker C1100-R1783 thuộc NST 4, có từ giống Kasalath, làm giảm 3,31% khối lượng hạt thóc do nhiệt độ nóng. Một QTL định vị giữa R1613-C970 trên NST 1; một QTL khác giữa C1226-R1440 trên NST 7, với ảnh hưởng cộng tính đạt giá trị 2,38 và 2,92%, theo thứ tự (Zhu và ctv, 2005, 2006).

Hai QTL chủ lực ảnh hưởng SSP trong cả hai điều kiện được phát hiện trong quãng giữa marker RM5687-RM471 trên NST 4, giữa RM6132-RM6100 trên NST 10 (Xiao và ctv, 2011).

Chất lượng gạo cũng bị tác động của nhiệt độ nóng xảy ra vào giai đoạn hạt chín ở Nhật Bản (Kobayashi và ctv, 2013). Bằng cách tạo ra quần thể F_7 và F_8 RILs (quần thể cận giao tái tổ hợp) giữa giống chịu nóng Hana-echizen (HE) và giống nhiễm Niigata-wase (NW), xác định được 4 QTL trên NST 3, 4, 6 và 9 (qWB3, qWB4, qWB6 và qWB9).

Bốn QTL (qHAC4, qHAC8a, qHAC8b và qHAC10) có thể làm giảm ảnh hưởng bất lợi về hàm lượng amylose ở điều kiện nhiệt độ nóng. Chúng định vị trên NST số 4, 8 và 10, theo thứ tự (Zhang và ctv, 2014), thông qua quần thể CSSLs (chromosome segment substitution lines) của 9.311 x Nipponbare.

Có 48 protein đã được xác định giúp cây chống chịu nhiệt độ nóng, trong số đó nhiều nhất là HSP (18 protein, đạt tỷ lệ 37,5%). Trong số 18 protein chống sốc nhiệt này, có 3 HSP100, 7 HSP70, 7 sHSP và 1 tiền HSP60. Kết quả tương tự cũng được xác nhận khi tiến hành ủ tế bào cây lúa ở môi trường nuôi cấy 44°C trong 3 ngày (Gammulla và ctv, 2010).

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu

Xác định bản đồ QTL gen quy định tính trạng chống chịu nóng ở điều kiện nhiệt độ 37-40°C vào thời kỳ trổ bông.

Xác định chỉ thị phân tử liên kết với gen chống chịu nóng để ứng dụng được kỹ thuật MAS trong cải thiện giống lúa chống chịu nóng.

Phương pháp nghiên cứu

Thanh lọc 50 dòng BC_1 từ quần thể lai hồi giao giống bố mẹ được làm đối chứng. Tách chiết ADN và chạy PCR (Nguyễn Thị Lang, 2002) với chỉ thị SSR để chọn cá thể

có gen đích, lai hồi giao với dòng tái tục. Chuỗi mã trình tự primers dựa theo kết quả của nhóm tác giả thuộc Trường Đại học Cornell, Hoa Kỳ.

Thực hiện các quần thể lai hồi giao BC_1 , BC_2 , BC_3 và BC_4 của hai tổ hợp lai OM5930/N22 và AS996/Dular. N22 và Dular là nguồn cung cấp gen điều khiển tính chống chịu nóng (ngân hàng gen của IRRI).

Giống mẹ là giống cao sản loại hình indica với OM5930 là đột biến soma của OM3536 (TD8/OM1738); AS996 (IR64/*Oryza rufipogon*).

Bên cạnh đó, có 20 tổ hợp lai đơn và 10 tổ hợp lai hồi giao cũng được thực hiện.

Bảng 1: các dòng chịu nóng có từ những cặp lai hồi giao được chọn bằng chỉ thị phân tử

Dòng	Tổ hợp lai hồi giao
HTL1	OM5930/N22//OM5930
HTL2	OM5930/Dular//OM5930
HTL3	AS996/N22//AS996
HTL4	AS996/Dular//AS996
HTL5	Gayabyeo/N22//Gayabyeo
HTL6	HT114/IR66//IR66
HTL7	H111/Iko547//H111

Tách chiết ADN từ lá non khỏe sau khi ngâm hạt giống theo CTAB.

Các dòng lai đơn được thực hiện từ năm 2006, được chọn trên đồng ruộng theo phương pháp phá hệ; có 10 tổ hợp được chọn nhờ chỉ thị phân tử RM3735 và RM3586.

Phân tích QTL theo phần mềm QGene và MapMarker (Lander và Green, 1987; Lander và ctv, 1987; Nelson, 1997). Phương pháp GGT do Young và Tanksley đề xuất (1989) và sau đó, van Berillo (2008), Milne và ctv (2010) đã xây dựng phần mềm hữu dụng này.

Phân tích marker đơn (SMA): 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 j^{th} ; μ là giá trị trung bình của quần thể; $f(\text{marker}_j)$ là hàm số của kiểu gen marker; ε_j là sai số.

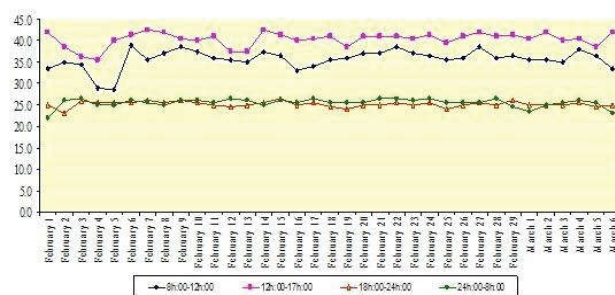
Phân tích bản đồ cách quãng (IMA): QTL liên kết với marker A có giá trị tái tổ hợp là r_1 . QTL liên kết với marker B có giá trị tái tổ hợp là r_2 . Vị trí của QTL được thể hiện bởi một vị trí tương đương với quãng giữa A và B. Trong đó, $\rho = r_1/r$ và $1 - \rho = r_2/r$. Trong phương pháp bản đồ cách quãng, 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”. Kết quả, có 264 SSR đa hình (trong tổng số 360 chỉ thị) được sử dụng để hình thành bản đồ QTL.

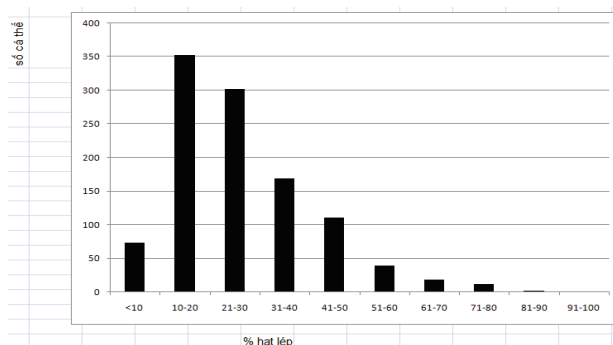
Kết quả và thảo luận

Bản đồ QTL quy định vùng điều khiển chống chịu nóng

Cặp lai AS996/Dular chỉ được thực hiện đến BC_2F_2 vì khi phân tích, chúng có quá nhiều liên kết bất lợi (linkage drags) từ những tính trạng nông học kém phát triển của Dular, làm cho việc chọn cá thể mong muốn rất khó thực hiện. Tuy nhiên, xét về kiểu hình chống chịu nóng, Dular là mẫu giống có phản ứng chống chịu tốt nhất và cường lực cây tăng trưởng mạnh nhất.



Hình 1: diễn biến nhiệt độ trong giai đoạn lúa trổ, quần thể BC_2F_2 của OM5930/N22 (2012)



Hình 2: phân bố chuẩn của tính trạng tỷ lệ hạt lép trên 310 cây của quần thể BC_2F_2 thuộc tổ hợp lai hồi giao OM5930/N22

Kết quả hình 1 cho thấy, từ giữa trưa đến 17h:00 nhiệt độ biến thiên từ 36°C đến 44°C , vào giai đoạn trổ đến hạt chín. Phản ứng đối với stress nóng của N22 (giống cho gen kháng) và OM5930 (giống nhiễm) được quan sát với thang điểm HT là 1-3 và 7-9, theo thứ tự (Buu B.C và ctv, 2012). Hình 2 cho thấy, có sự phân bố chuẩn và liên tục của tính trạng tỷ lệ hạt lép có liên quan đến chống chịu nóng, trong các dòng con lai của quần thể BC_2F_2 . Đây là

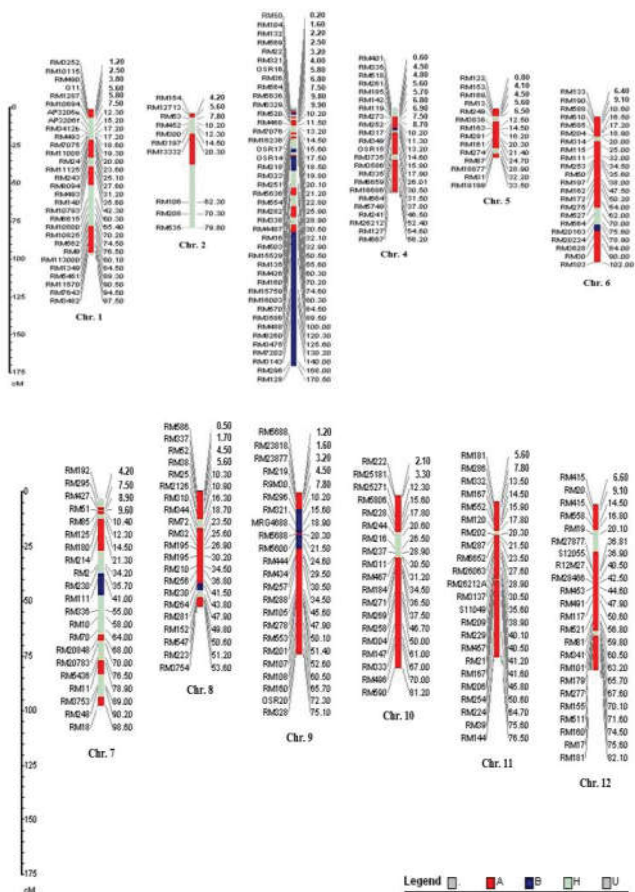
biểu hiện tái tổ hợp tốt đối với phản ứng nóng trong giai đoạn lúa trổ của quần thể con lai. Cây lúa rất nhạy cảm với nhiệt độ nóng trong suốt thời kỳ phát dục, với nhiều mức độ bất thụ khác nhau (biểu hiện qua tính trạng tỷ lệ hạt lép/bông). 310 dòng BC_2F_2 của tổ hợp lai OM5930/N22 được tập trung đánh giá với số liệu của 5 tính trạng xét về kiểu hình trong giai đoạn trổ bông bị stress nóng, và 264 SSR đa hình (trên tổng số 501 chỉ thị SSR ban đầu), để phát hiện liên kết giữa chỉ thị phân tử và QTL điều khiển tính trạng nghiên cứu. Bản đồ liên kết trên cơ sở quần thể BC_2F_2 được hình thành trên 2.741,63 cM với khoảng cách trung bình giữa hai chỉ thị là 10,55 cM (bảng 2).

Bảng 2: bản đồ di truyền tính trạng chống chịu nóng trên 12 NST của quần thể BC_2F_2 thuộc tổ hợp lai OM5930/N22

NST	Số chỉ thị	Chiều dài (cM)	Trung bình (cM)
1	31	367,4	11,85
2	12	56,9	4,74
3	42	296,1	7,05
4	23	279,6	12,15
5	14	111,9	7,99
6	22	290,2	13,19
7	21	352,0	16,76
8	21	189,5	9,02
9	13	231,8	17,83
10	19	159,5	8,40
11	23	182,1	7,92
12	23	224,6	9,77
Tổng cộng	264	2.741,6	10,55

Xác định QTL

QTL được xác định trên 5 tính trạng nghiên cứu: HT (điểm chống chịu nóng), khối lượng 1.000 hạt, số hạt chắc/bông, % hạt lép và năng suất. Tất cả QTL tìm thấy được khẳng định bằng giá trị tương đương tới “ngưỡng mức độ có ý nghĩa” (threshold equivalent) với xác suất $p < 0,01$ (tương ứng với giá trị LOD cho “IM” $> 3,6$ hoặc “composite IM” $> 3,9$). Xác suất của “ngưỡng có ý nghĩa” là $p < 0,05$ được sử dụng để kết luận một QTL có thực sự ý nghĩa hay không, nếu QTL ấy được tạo nên trong cùng vị trí, hay ít nhất tại cùng một môi trường tại $p < 0,01$. Đối với 5 tính trạng này được xử lý trên nhiều môi trường, 47% trong số những QTL như vậy (28 của 60 QTL tổng số) được tìm thấy ít nhất tại 2 địa điểm. Những alen có ích đối với chống chịu nóng qua thuật toán biểu thị bằng màu theo phương pháp GGT ở giai đoạn phát dục của cây lúa (hình 3).



Hình 3: bản đồ liên kết gen trên 12 NST theo phần mềm GGT, quần thể BC_2F_2 của OM5930/N22; màu đỏ là alen đồng hợp tử của OM5930, màu xanh đậm là alen đồng hợp tử của N22, màu xanh nhạt là alen dị hợp tử, vùng màu nâu là tập hợp các alen chưa xác định

- Màu xanh blue: alen đồng hợp tử giống như N22 (chống chịu nóng).
- Màu đỏ: alen đồng hợp tử giống như OM5930 (nhuộm).
- Màu xanh “pale green”: biểu thị dị hợp tử.
- Màu nâu: đoạn NST chưa xác định được.

Trên NST 3, các alen đồng hợp tử của N22 ưu tiên phân bố trên những vùng giả định (putative) có liên quan đến các tính trạng chống chịu nóng.

Liên kết giữa hai SSR trên NST 3 là RM3586 và RM160 là những chỉ định (indicators) đối với tính chống chịu nóng theo kết quả ước đoán bằng thuật toán. Khoảng cách di truyền giữa RM3586 với QTL quy định tính trạng HT là 1,2 cM, giữa RM160 và QTL của HT là 4,5 cM, với LOD là 3,4 và 3,9 trong phân tích marker đơn (SMA).

Kết quả phân tích bản đồ cách quãng (interval mapping) chỉ minh chứng được kết quả marker đơn (SMA) trong trường hợp của RM3586-RM160 trên NST 3 trong khoảng giữa 8,1 cM (LOD = 3,4, $R^2 = 11,52\%$, ảnh hưởng cộng tính = 5,64).

Trên NST 4, không có một quãng (interval) nào được tìm thấy để minh chứng hai marker đơn RM3735 và RM5749 từ phân tích SMA, vì giá trị LOD rất thấp. Phải tiếp tục phân tích sâu hơn những QTL giả định này, vì nó cho kết quả đa hình rất tốt khi chọn lọc cá thể bằng chỉ thị phân tử, theo kết quả nội dung 2.

Bảng 3: phân tích QTL theo SMA, 5 tính trạng có liên quan đến chống chịu stress nóng khi lúa trổ, với 310 cá thể trong quần thể hồi giao của OM5930/N22, LOD > 3,0

Chỉ thị	NST	Tính trạng	Số alen trung bình	F	P	$R^2(\%)$	DPE
RM3586	3	HT Điểm chống chịu nóng	4,150 ± 0,44	10,60	0,000	36,2	B
RM3735	4		5,40 ± 0,44	9,16	0,000	32,6	B
RM160	3		0,42 ± 0,44	4,25	0,004	17,1	A
RM310	8		5,40 ± 0,44	3,73	0,011	28,0	A
RM25181	10	Số hạt chắc/ bông	4,40 ± 0,44	3,80	0,014	15,3	A
RM167	11		5,40 ± 0,44	3,19	0,010	13,1	A
RM554	3	Tỷ lệ hạt lép	4,40 ± 0,44	7,80	0,001	25,0	A
RM3586	3		6,40 ± 0,40	4,59	0,001	11,2	B
RM103	6	Khối lượng 1.000 hạt	4,40 ± 0,44	7,80	0,001	30,6	A
RM5749	4	NĂng suất	4,80 ± 0,44	7,80	0,005	10,8	A
RM337	8		5,8 ± 0,47	2,95	0,005	21,7	A

Ghi chú: DPE (direction of phenotypic effect) là ảnh hưởng kiểu hình từ mẹ hoặc bố; A: OM5930; B: N22; R^2 : giá trị biểu thị % biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL

Phân tích ANOVA một chiều (one-way ANOVA) được thực hiện với chỉ thị phân tử đặc trưng cho nhóm kiểu gen (marker genotype groups). Kết quả phân tích chỉ thị RM3586 và quần thể con lai của hai nhóm từ hai “donor” khác nhau (N22 và Dular) đều khẳng định tỷ lệ hạt lép/bông và điểm chống chịu nóng HT có liên quan một cách ý nghĩa về thống kê giữa các SSR định vị trên NST 4 với kiểu hình nghiên cứu.

Theo phân tích marker đơn, chỉ thị RM3735 và RM310 liên kết chặt với những QTL giả định trên NST 4 và 8, theo thứ tự giải thích được 32,6% biến thiên kiểu hình trên NST 4 và 28% trên NST 8.

Hai QTL được tìm thấy có liên quan đến tính trạng

hạt chắc định vị ở quãng giữa hai chỉ thị RM468-RM7076 trên NST 3 và giữa RM241-RM26212 trên NST 4, giải thích được 13,11% và 31,0% biến thiên kiểu hình, theo thứ tự (bảng 4).

Tính trạng	Quãng giữa hai chỉ thị phân tử	NST	P	Vị trí (cM)
Số hạt chắc/bông	RM468 - RM7076	3	0,000	3,7
	RM241 - RM26212	4	0,000	16,5
	RM16686 - RM564	4	0,000	9,7
Năng suất	RM241 - RM26212	4	0,000	16,5
HT	RM26212 - RM127	4	0,002	14,5
	RM3586-RM160	3	0,040	8,1

Bảng 4: phân tích QTL theo bản đồ cách quãng (IM), 3 tính trạng có liên quan đến chống chịu stress nóng khi lúa trổ, với 310 cá thể trong quần thể hồi giao của OM5930/N22 LOD > 3,0, để thẩm định lại bảng III-3-2

Đối với tính trạng năng suất hạt, có 2 QTLs được tìm thấy tại loci RM5749 thuộc NST 4 và RM337 trên NST 8, chúng giải thích được 10,80% và 21,72% biến thiên kiểu hình, theo thứ tự. Hai QTL này biểu thị ảnh hưởng trội từng phần (partial dominance) trong sự kiện làm giảm năng suất hạt (bảng 3).

Ba QTLs điều khiển tính trạng hạt chắc định vị tại quãng giữa hai chỉ thị RM468-RM7076 (NST 3), RM16686-RM564, và RM241-RM26212 (NST 4) giải thích được 9,7; 13,1 và 31,0% biến thiên kiểu hình, theo thứ tự. Những QTL này biểu thị ảnh hưởng trội từng phần trong làm giảm hạt chắc/bông (bảng 4).

Những QTL điều khiển năng suất hạt định vị tại quãng giữa hai chỉ thị RM241-RM26212 và tính trạng HT tại RM26212-RM127 trên NST 4, với một vùng giả định có độ lớn là 16,5 và 14,5 cM, theo thứ tự.

Kết quả thật sự được ghi nhận tại quãng giữa RM3586-RM160 trên NST 3 với độ lớn 10,1 cM đối với tính trạng tính theo điểm chống chịu nóng, và chỉ thị RM3586 được đặc biệt chú ý trong ứng dụng chọn giống nhờ chỉ thị phân tử.

Trong thí nghiệm này, phân bố tần suất kiểu hình phản ánh mức độ phức tạp của di truyền các gen chống chịu nóng. Một vài dòng chống chịu cao trong khi hầu hết chống chịu rất kém. Phân bố chuẩn bị nghiêng lệch về phía giống nhiễm. Tỷ lệ hạt lép trên bông và năng suất hạt có phân bố khá cân đối nhưng điểm chống chịu nóng HT phân bố quá nghiêng lệch. Hệ số tương quan giữa điểm HT và tỷ lệ hạt lép rất có ý nghĩa về mặt thống kê, giá trị $r = 0.929^{**}$ và $df = 166$ (Bùi Chí Bửu và ctv, 2012).

Kết quả thật sự được ghi nhận tại quãng giữa

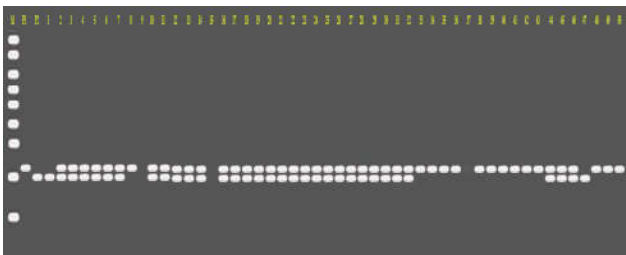
RM3586-RM160 trên NST 3 với độ lớn 8,1 cM đối với tính trạng tính theo điểm chống chịu nóng và chỉ thị RM3586 được đặc biệt chú ý trong ứng dụng chọn giống nhờ chỉ thị phân tử.

Chọn dòng con lai nhờ SSR

Sản phẩm PCR tại locus RM3735 trên NST 4 cho thấy 9 mẫu giống lúa biểu hiện alen đồng hợp tử với N22 (hình 4), và tại locus RM3638 trên NST 3 cho thấy 1 mẫu giống biểu hiện alen đồng hợp tử với N22 (hình 5).



Hình 4: sản phẩm PCR tại locus RM3687 (200-230 bp) trên NST 4, quần thể BC₄F₂ của OM5930/N22



Hình 5: sản phẩm PCR của RM3686 (200-220 bp) trên quần thể BC₄F₂ của OM5930/N22

Bảng 5: tổng hợp kết quả chạy PCR tại loci RM3687, RM3471, RM3735, RM3586 trên tổ hợp BC₄F₂ của OM5930/N22

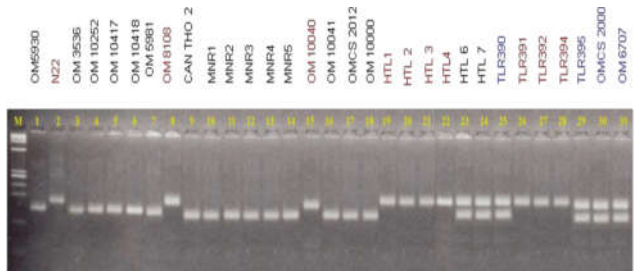
TT	Dòng hồi giao	RM3687	RM 3471	RM3735	RM3586	Phản ứng với stress nóng
Mẹ	P1: OM5930	230	215	200	220	S
Bố	P2: N22	200	200	210	210	R
HTL1	BC4-1-10-1	200	215	210	220	R
HTL12	BC4-2-4-6	230	215	200	220	S
HTL2	BC4-5-8	230	215	210	220	R
HTL3	BC4-5-9-4	230	215	210	220	R
HTL19	BC4-7-5	230	215	200	220	S
HTL20	BC4-6-1	230	215	200	220	S
HTL4	BC4-6-3	230	215	210	220	R
HTL5	BC4-5-6	230	215	210	220	R

Kết quả bảng 5 cho thấy, các dòng được chọn nhờ chỉ thị phân tử. Những dòng này được khảo nghiệm trên đồng ruộng với lịch thời vụ được bố trí sao cho thời gian lúa trổ bông có nhiệt độ đạt ngưỡng gây hại cho lúa.

Bảng 6: năng suất và tính trạng nông học các dòng được chọn (xuân hè 2014; nhiệt độ ban ngày lúc trổ đến thu hoạch 37-40°C) - Bộ giống so sánh sơ khởi

Dòng	TGST (ngày)	Cao cây (cm)	Bông/ m ²	Hạt chắc/ bông	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Rầy nâu	Đạo ôn	Năng suất (tấn/ha)
HTL2	97	97 cd	350 a-d	80 c	29,0 a	1-3	1-3	7,63 a
HTL3	100	99 bc	370 ab	93 ab	26,5 ab	1-3	1-3	6,93 b
HTL4	105	105 a	380 a	98 a	26,5 ab	1-3	1-3	6,90 b
HTL14	90	90 e	370 ab	92 ab	27,0 ab	1-3	1-3	6,53 bc
HTL1	98	96 cd	340 b-e	91 ab	28,0 ab	1-3	1-3	6,21 c
HTL15	103	103 ab	340 b-e	89 ab	28,0 ab	1-3	1-3	5,72 d
OM4900 (ĐC)	100	94 de	360 abc	90 ab	26,0 ab	1-3	1-3	5,64 de
HTL5	98	97 cd	350 a-d	85 bc	24,8 b	1-3	7	5,62 de
HTL7	96	97 cd	320 de	89 ab	26,0 ab	1-3	1-3	5,61 de
HTL13	100	99 bc	360 abc	93 ab	26,0 ab	1-3	5	5,61 de
HTL10	100	101 bc	310 e	86 bc	26,0 ab	1-3	1-3	5,44 de
HTL6	95	94 de	330 cde	92 ab	28,5 a	1-3	1-3	5,20 e
HTL12	100	99 bc	350 a-d	87 bc	27,0 ab	1-3	1-3	4,51 f
CV(%)		2,4	5,7	5,2	6,9	-	-	3,9

Ghi chú: DMRT ở mức độ 0,05; HTL: dòng chịu nóng (heat tolerance lines). Phản ứng với rầy nâu và đạo ôn được thực hiện tại Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.



Hình 6: sản phẩm PCR tại locus RM3735 trên NST 4 cho thấy 9 mẫu giống lúa biểu hiện alen đồng hợp tử với N22 (220 bp), trong khi OM5930 có sản phẩm PCR là 200 bp

Thẩm định lại kết quả bằng chỉ thị RM3735 được trình bày trong hình 6 cho thấy dòng HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4 biểu thị alen đồng hợp tử với giống cho gen kháng N22. Dòng HTL6 và HTL7 biểu thị alen dị hợp tử, cần tiếp tục chọn thêm nhiều vụ nữa. Năng suất cao nhất trong bảng 6 thuộc về dòng BC4-5-8 (HTL2) của quần thể hồi giao OM5930/N22; kế đến là BC4-5-9 (HTL3), BC4-6-3 (HTL4). Trong quần thể hồi giao OM5930/Dular có dòng BC3F2-1-9 cho năng suất triển vọng.

Dòng HTL1 (BC4-4-10-1) cho năng suất thấp nhất (5,0 tấn/ha) trong bộ giống quan sát (bảng III-1-3 của năm 2013), và năng suất trung bình khá (6,21 tấn/ha) trong bộ giống so sánh sơ khởi (bảng III-4-4 của năm 2014).

Dòng HTL2 (BC4-5-8) vẫn cho năng suất cao nhất (7,63 tấn/ha) trong bộ giống so sánh sơ khởi (bảng III-4-4 của năm 2014), kế đến là dòng HTL3, HTL4 và HTL1, theo thứ tự xếp hạng.

Kết luận

1. Quãng giữa RM3586-RM160 trên NST 3 với độ lớn 8,1 cM có đóng góp rõ ràng với tính trạng chống chịu nóng.

2. RM3687, RM 3471, RM3735, RM3586 có thể được sử dụng trong chọn giống chống chịu nóng nhờ chỉ thị phân tử.

3. Tỷ lệ hạt lép là kết quả của hoạt động vào chắc của hạt (grain filling) có đóng góp lớn nhất đến tính chống chịu nóng trong đánh giá kiểu hình.

4. Bước đầu, các dòng HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4 biểu hiện rõ tính ưu việt của chúng thông qua đánh giá kiểu gen và kiểu hình (năng suất).

Tài liệu tham khảo

1. Buu B.C, N.V Hieu, P.V Toan, B.P Tam, V.T Tra My, C.T Nha, N.T Lang (2012), "Assessment of breeding materials for heat tolerance rice breeding (*Oryza sativa* L.)", *Journal J. of Agriculture Agric. and Rural Development Dev. (Vietnamese)*, **12(2)**, pp.38-46.
2. Gammulla C.P.D, B Atwell, P Haynes (2010), "Differential metabolic response of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells exposed to high and low-temperature stress", *Proteomics* **2010**, **10**, pp.3001-3019.
3. Kobayashi A, J Sonoda, K Sugimoto, M Kondo, N Iwasawa, T Hayashi, K Tomita, M Yano and T Shimizu (2013), "Detection and erification of QTLs associated with heat-induced quality decline of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbredlines and near-isogenic lines", *Breeding Science*, **63**, pp.339-346.
4. Lang N.T (2002), "Protocol for basic biotechnology", *Agricultural Publisher*, Ho Chi Minh City, Vietnam.
5. Li C.D (2003), "Analysis on a large of empty grains of rice due to high temperature", *Shanxi J Agric Sci*, **49**, pp.45-47.
6. Matsushima S, H Ikewada, A Maeda, S Honma, N Niki (1982), "Studies on rice cultivation in the tropics 1: yielding and ripening responses of the rice plant to the extremely hot and dry climate in Sudan", *Japan J Trop Agri*, **26**, pp.19-25.
7. Osada A, V Sasiprapa, M Rahong (1973), "Abnormal occurrence of empty grains of indica rice-plants in the dry, hot season in Thailand", *Proc Crop Sci Japan*, **42**, pp.103-109.
8. Peng S.B, J.L Huang, J.E Sheehy, R.C Laza, R.M Visperas, X.H Zhong, G.S Centeno, G.S Khush, K.G Cassman (2004), "Rice yields decline with high temperature from global warming", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **101**, pp.9971-9975.
9. Stake T, S Yoshida (1978), "High temperature induced sterility in indica rice at flowering", *Japan J Crop Sci*, **47**, pp.6-17.
10. Xiao Y.H, Y Pan, L.H Luo, H.B Deng, G.L Zhang, W.B Tang, L.Y Chen (2011), "Quantitative trait loci associated with seed set under high temperature stress at the flowering stage in rice (*Oryza sativa* L.)", *Euphytica*, **178**, pp.331-338.
11. Zhang G.L, L.Y Chen, G.Y Xiao, Y.H Xiao, X.B Chen, S.T Hang (2009), "Bulked segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers", *Agricultural Sciences in China* **2009**, **8(4)**, pp.482-487.
12. Zhang H, L Duan, J.S Dai, C.Q Zhang, J Li, M.H Gu, Q.Q Liu, Y Zhu (2014), "Major QTLs reduce the deleterious effects of high temperature on rice amylose content by increasing splicing efficiency of Wx premRNA", *Theor Appl Genet*, **127**, pp.273-282.
13. Zhu L, Y.H Xiao, C.M Wang, L Jiang, H.Q Zhai, J.M Wan (2005), "Mapping QTLs for heat tolerance during grain filling in rice", *Chinese Journal of Rice Science*, **19**, pp.117-121.