

### **III.**

# **CHỌN TẠO GIỐNG CÂY LƯƠNG THỰC**



**CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỐNG CHỊU NÓNG BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ**Bùi Chí Bửu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lang<sup>2</sup> và ctv.<sup>1</sup> Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Nghiệp miền Nam<sup>2</sup> Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long**TÓM TẮT**

Phân tích QTL quần thể hồi giao BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> giữa OM5930 / N22 với 310 cá thể con lai. Sử dụng 264 SSR đa hình (trong tổng số 501 chỉ thị). Bản đồ liên kết trên cơ sở quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> này, phủ trên **2.741,63 cM** với khoảng cách trung bình giữa hai chỉ thị là **10,55 cM**. Tất cả QTLs được xác định trên cơ sở xác suất tin cậy  $P < 0,01$  (tương ứng với phân tích SMA ở giá trị LOD > 3,6 và đối với IMA ở giá trị LOD > 3,9). Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL mục tiêu tại chỉ thị RM3586 (36,2%), RM160 (17,1%) trên nhiễm sắc thể 3 và RM3735 (32,6%) trên nhiễm sắc thể 4. Kết quả thẩm định lại phân tích bản đồ cách quãng cho thấy vùng mục tiêu tại RM3586 - RM160 trên NST số 3 là 8,1 cM (LOD = 3,4, R<sup>2</sup> = 11,52%, additive effect = 5,64). Có 6 tính trạng (tính trạng gì?) được đánh giá kiểu hình thành công phục vụ cho phân tích QTL tính chống chịu nóng, tỷ lệ hạt lép có giá trị đóng góp lớn nhất. Chọn dòng con lai BC1 đến BC4 với 32 chỉ thị SSR tập trung trên nhiễm sắc thể 3 và 4 cho thấy: dòng HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4 triển vọng nhất về % lép, và năng suất, tuy nhiên hiệu quả chọn lọc tính trạng GFR là GA% = 4,10 chưa đạt. Giống triển vọng OM8108 có giá trị GFR cao >100 mg / bông / ngày, đã được công nhận sản xuất thử.

**Từ khóa:** Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử (MAS), GFR (tốc độ vào chắc của hạt), lúa chịu nóng, QTL, tỷ lệ hạt lép

**I. MỞ ĐẦU**

Trong thời gian gần đây, hiện tượng ấm lên của trái đất đã và đang ảnh hưởng bất lợi đến sản xuất lúa nhất là vùng Duyên hải Nam Trung Bộ. Ảnh hưởng của stress do nhiệt độ cao được thấy rõ nhất ở giai đoạn lúa ra hoa khi nhiệt độ môi trường trên 35°C. Sự ra hoa, thụ phấn, và sự phát triển ống phấn sẽ bị kìm hãm dẫn đến việc gây ảnh hưởng đến khả năng phát triển của hạt (Morita và ctv., 2005; Peng và ctv., 2004; Zhu và ctv., 2005). Nếu nhiệt độ môi trường liên tục cao hơn 35°C trong 5 ngày sẽ dẫn đến bất thụ ở hoa và không có hạt. Ngược lại, stress do nhiệt độ cao xảy ra ở giai đoạn đầy hạt (grain filling) sẽ dẫn đến thiệt hại về mặt kinh tế qua giảm sút sản lượng và chất lượng hạt (Zhu và ctv., 2005). Viện Lúa Quốc tế (IRRI) ghi nhận: nhiệt độ đã tăng từ 0,35°C đến 1,13°C trên toàn cầu. Khi nhiệt độ môi trường tăng lên 1°C, sản lượng thóc giảm đi 10% (Peng và ctv., 2004).

Giai đoạn nhạy cảm và dễ bị tổn thương bởi nhiệt độ nóng là lúc lúa trở bông (Mackill và ctv., 1982; Kuang và ctv., 2002). 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 nhiễm sắc thể số 1, 4, 7 kiểm soát tính trạng chống chịu stress do nhiệt độ cao. Zhang và ctv. (2009) cho thấy các chỉ thị phân tử SSR là **RM3735** trên nhiễm sắc thể số 4 và **RM3586** trên nhiễm sắc thể số 3 tương tác chặt chẽ với tính trạng chống chịu stress do nhiệt độ cao. Wu và ctv. (2009) thành công trong thực hiện chuyển gen *OsWRKY11* vào cây lúa, nó thể hiện trên giai đoạn mạ, trong điều kiện promoter là HSP101, điều khiển được cả hai loại hình stress do khô hạn và do nóng. Hai QTL chủ lực ảnh hưởng đến chống chịu nóng trong được phát hiện trong quãng giữa marker RM5687-RM471 trên nhiễm sắc thể 4, giữa RM6132-RM6100 trên nhiễm sắc thể 10 (Xiao và ctv., 2011). QTL định vị trên nhiễm sắc thể 4 giải thích được 21,3% biến thiên kiểu hình SSP trên dòng ruộng và 25,8% trong phytotron. Một locus chủ lực **OsHTAS** trên nhiễm sắc thể 9 được tìm thấy có liên quan đến tính chống chịu nóng 48°C ở giai đoạn mạ (Wei và ctv., 2013). 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 [số đứng sau cùng là nhiễm sắc thể] (Zhang và ctv., 2014). Lee và ctv., (2007), Gammulla và ctv. (2010) xác định có tất cả 48 protein giúp cây lúa chống chịu nóng; bao gồm 3 HSP100, 7 HSP70, 7 sHSP và

1 tiền HSP60. Có 17 trong số 25 gen mã hóa những protein chức năng nói trên, đã được lập bản đồ di truyền (Liao và ctv., 2013).

#### Mục tiêu nghiên cứu

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

2. 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.

3. Chọn tạo được giống chống chịu nóng phù hợp với điều kiện canh tác của các tỉnh phía Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thực hiện các quần thể lai hồi giao BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub> và BC<sub>4</sub> của hai tổ hợp lai OM5930 / N22 và AS996 / Dular. N22 và Dular (loại hình *aus*) là nguồn cung cấp gen điều khiển tính chống chịu nóng (ngân hàng gen của IRRI). Giống mẹ (loại hình *indica*) là giống cao sản với OM5930 là đột biến soma của OM3536 (TD8 / OM1738); dòng dẫn xuất AS996 (IR64 / *Oryza rufipogon*). Có 22 tổ hợp lai đơn được thực hiện tại Trung Tâm NN Đồng Tháp Mười và 10 tổ hợp lai đơn tại Viện Lúa ĐBSCL, để thực hiện xét nghiệm “fine mapping” và chọn dòng nhờ chỉ thị phân tử. 310 cá thể của quần thể hồi giao BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> thuộc OM5930 / N22, và 1080 dòng thuộc AS996 / Dular, được đo đếm 8 tính trạng. 264 SSR đa hình (trong tổng số 501 chỉ thị) được sử dụng làm bản đồ QTL.

Tách chiết DNA và phân tích PCR được thực hiện tại Viện KHKTNN Miền Nam và Viện Lúa ĐBSCL.

Chọn cá thể có băng điện di đồng hợp tử với giống cho gen chống chịu nóng, để làm nguồn hồi giao với dòng tái tục (với hai chỉ thị RM3735 và RM3586). Tiếp tục thực hiện hồi giao theo cách này để có BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub> và BC<sub>4</sub>. Từ BC<sub>2</sub>, cho tự thụ để có BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>. Tương tự, thu hoạch cho đến thế

hệ BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>, đối với các cặp lai OM5930 / N22 và AS996 / N22, Gatabyeo / N22.

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 Berlo (2008), Milne và ctv., (2010) đã xây dựng phần mềm hữu dụng này. GGT 2.0: “graphical genotyping” là phương pháp mới do nhóm tác giả của Đại Học Wageningen phát triển, cho phép thể hiện alen đồng hợp trội, đồng hợp lặn, dị hợp. Phương pháp phân tích marker đơn (SMA) để xác định vùng giả định trên các đoạn của nhiễm sắc thể có liên quan đến tính trạng đã được đánh giá kiểu hình. Phương pháp phân tích bản đồ cách quãng (interval mapping: IM) để gạn lọc các chỉ thị và làm rõ hơn vùng được giả định, nơi có những gen đích điều khiển tính trạng đang nghiên cứu. Áp dụng thang điểm LOD ≥ 3,0 để xác định những marker thật sự có ý nghĩa về mặt thống kê, liên kết với gen mục tiêu.

Phân tích Western Blot đối với protein chống sốc nhiệt (HSP): Mẫu protein của các dòng, giống lúa trổ bông được tách chiết từ hai nghiệm thức xử lý nóng và không xử lý nóng trong phytotron. Chạy điện di SDS-PAGE (một chiều để xét nghiệm sơ khởi). Thực hiện việc tạo kháng thể để phân tích Western blot, xem xét biểu hiện protein đích trong họ protein HSP. Lấy 50 µg dung dịch protein. Kháng thể sơ khởi được chuẩn bị trong dung dịch có 3µl chitinase trong 45 ml PSB – BSA, ủ ấm 45°C (1-2 giờ). Cho kháng thể kết tụ (immunoprecipitation) ở qui mô 1-2µg trên 100-500 µg protein tổng số.

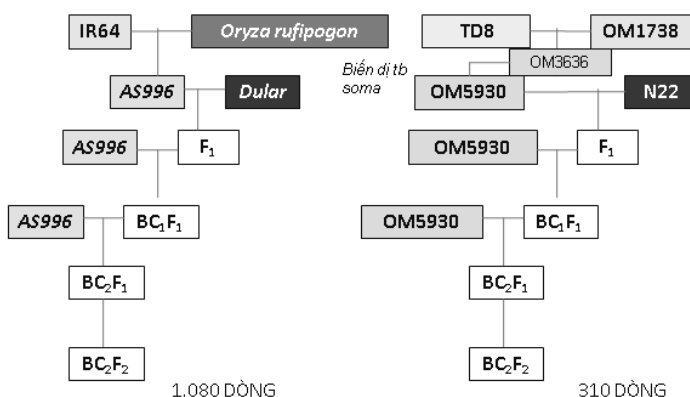
Các mẫu lúa ở giai đoạn làm dòng được thu về để ngoài trời trong 24-48 giờ trước khi cho vào buồng sinh trưởng thực vật (growth chamber) với quy trình nhiệt độ như sau (độ ẩm duy trì 75%).

- 7- 8 giờ sáng : 29°C trong phytotron
- 8-10 giờ sáng: 34°C
- 10-12 giờ sáng: 37°C
- 12-14 giờ trưa: 39°C
- 14-15 giờ trưa: 37°C
- 15-16 giờ chiều: 34°C

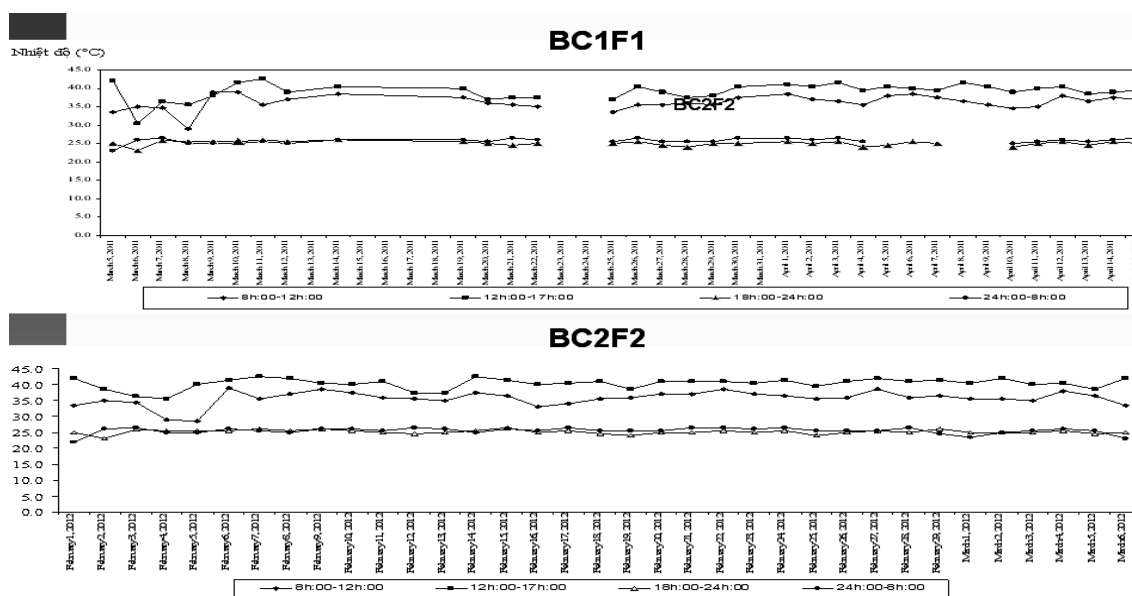
- 16-18 giờ tối: 30°C
- 20-7 giờ hôm sau: 24°C (không chiếu sáng)

Phân tích tương tác GxE về năng suất, sự vào chắc của hạt (grain filling) khi bị stress nóng (HT 2013 và HT 2014): Số nghiệm thức 20-22 mẫu giống, được thực hiện tại 7 địa điểm thuộc các tỉnh: Bình Định, Ninh Thuận, Đồng Nai, Tây Ninh, Long An, Cần Thơ (trong đó Ninh Thuận có 2 địa điểm và là nơi nóng nhất,

đạt tiêu chuẩn xét nghiệm cả nhiệt độ ngày và đêm). Yêu cầu lúc lúa trở đến thu hoạch nhiệt độ cực trọng ban ngày >35°C và nhiệt độ cực trọng ban đêm >27°C. Phân tích AMMI được tổng hợp trên cơ sở các mô hình của Finley và Wilkinson (1963), Eberhart và Russel (1966), Perkins và Jinks (1968), Freeman và Perkin (1971). Phân tích hiệu quả chọn (GA%) dựa trên thông số ma trận (tập hợp phương sai và hợp sai) của kiểu gen và kiểu hình, hệ số di truyền nghĩa rộng.



Hình 1: Sơ đồ lai quần thể hồi giao BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> để xây dựng bản đồ QTL lúa chống chịu nóng



Hình 2: Diễn biến nhiệt độ trong thời kỳ lúa trở đến thu hoạch, trên hai quần thể BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> và BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> tại ruộng thí nghiệm của Viện Lúa ĐBSCL (2011-2012)

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đánh giá kiểu hình các con lai

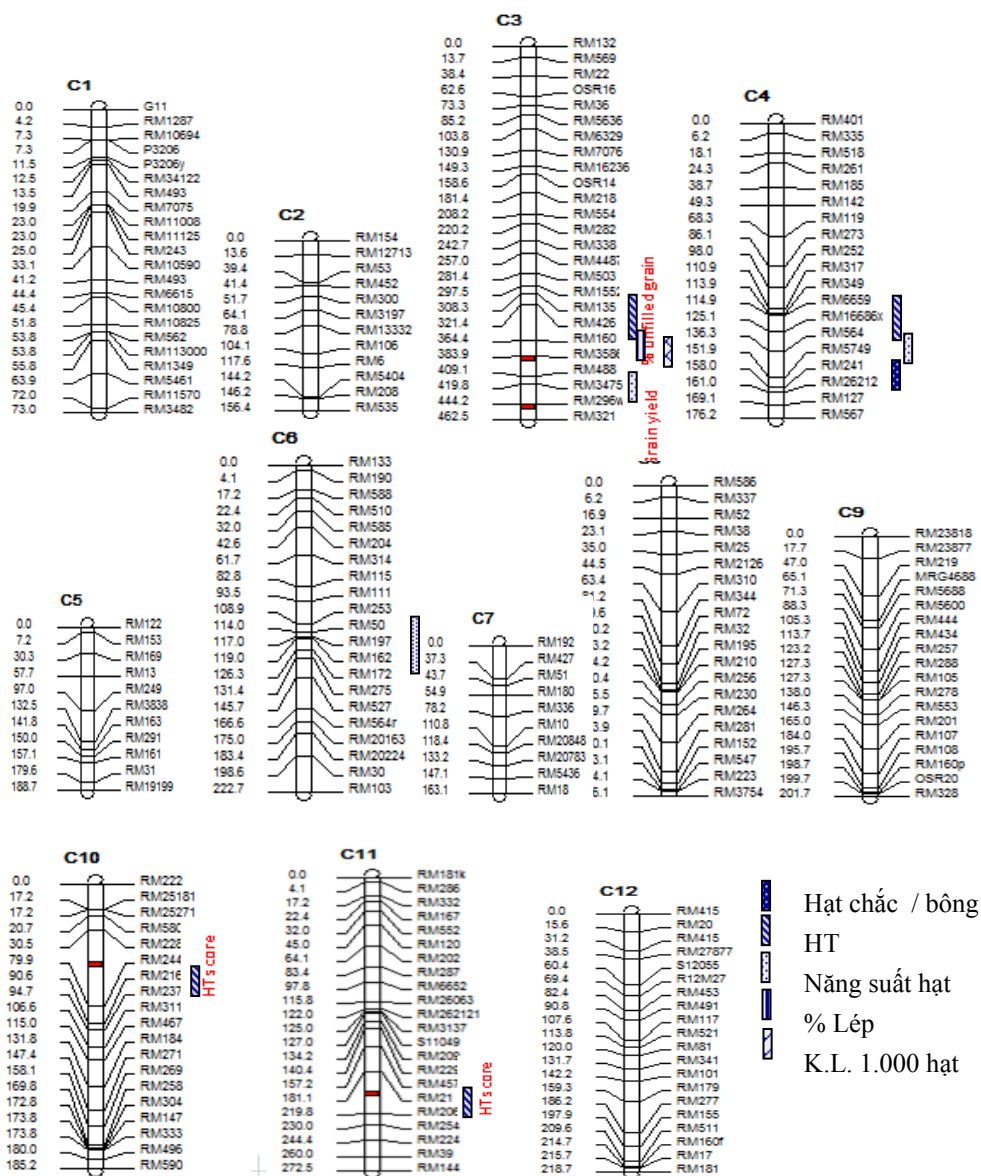
Quần thể hồi giao của tổ hợp lai OM5930/N22 có 310 cá thể con lai được đánh

giá kiểu hình. Tính trạng % hạt lép biểu thị phân bố chuẩn, có mức độ nghiêng lệch sang N22 (giống cho) nhiều hơn OM5930 (giống tái tục), trong khi đó ở quần thể hồi giao của AS996 / Dular, độ lệch có xu hướng nghiêng

sang giống tái tục AS996 nhiều hơn. Phân tích ANOVA: tỷ lệ lép (%) đóng góp có ý nghĩa trong giải thích sự biến thiên của tính trạng tại locus RM3586, trên NST số 4. Bên cạnh đó tính trạng HT (chống chịu nóng theo thang điểm IRRI), nghiêng lệch (skewed) theo “giống cho” N22 là 86,6% và “giống tái tục” OM5930 là 15,3%, trong BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> của OM5930/N22.

### 3.2. Đánh giá kiểu gen

Quần thể AS996 / Dular gặp nhiều khó khăn trong phân tích QTL, có thể do những liên kết bất lợi (linkage drag) đã làm sai lệch, biểu thị qua giá trị LOD thấp trên nhiều vùng giả định, không cho phép chúng tôi xác định QTL cụ thể, với những chỉ thị phân tử mong muốn, trên 12 nhiễm sắc thể.



Hình 3: Bản đồ QTL phủ trên 12 NST, tổng chiều dài 2741,6 cM, trung bình quãng giữa 2 marker là 10,55 cM, quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> của OM5930/N22

Phân tích 310 dòng BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> của tổ hợp lai OM5930/N22, với số liệu đánh giá kiểu hình trong giai đoạn trở bông bị stress nóng. Bản đồ liên kết trên cơ sở quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> phủ trên

**2.741,63 cM** với khoảng cách trung bình giữa hai chỉ thị là **10,55 cM**.

Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL mục tiêu tại chỉ thị RM3586 (36,2%),

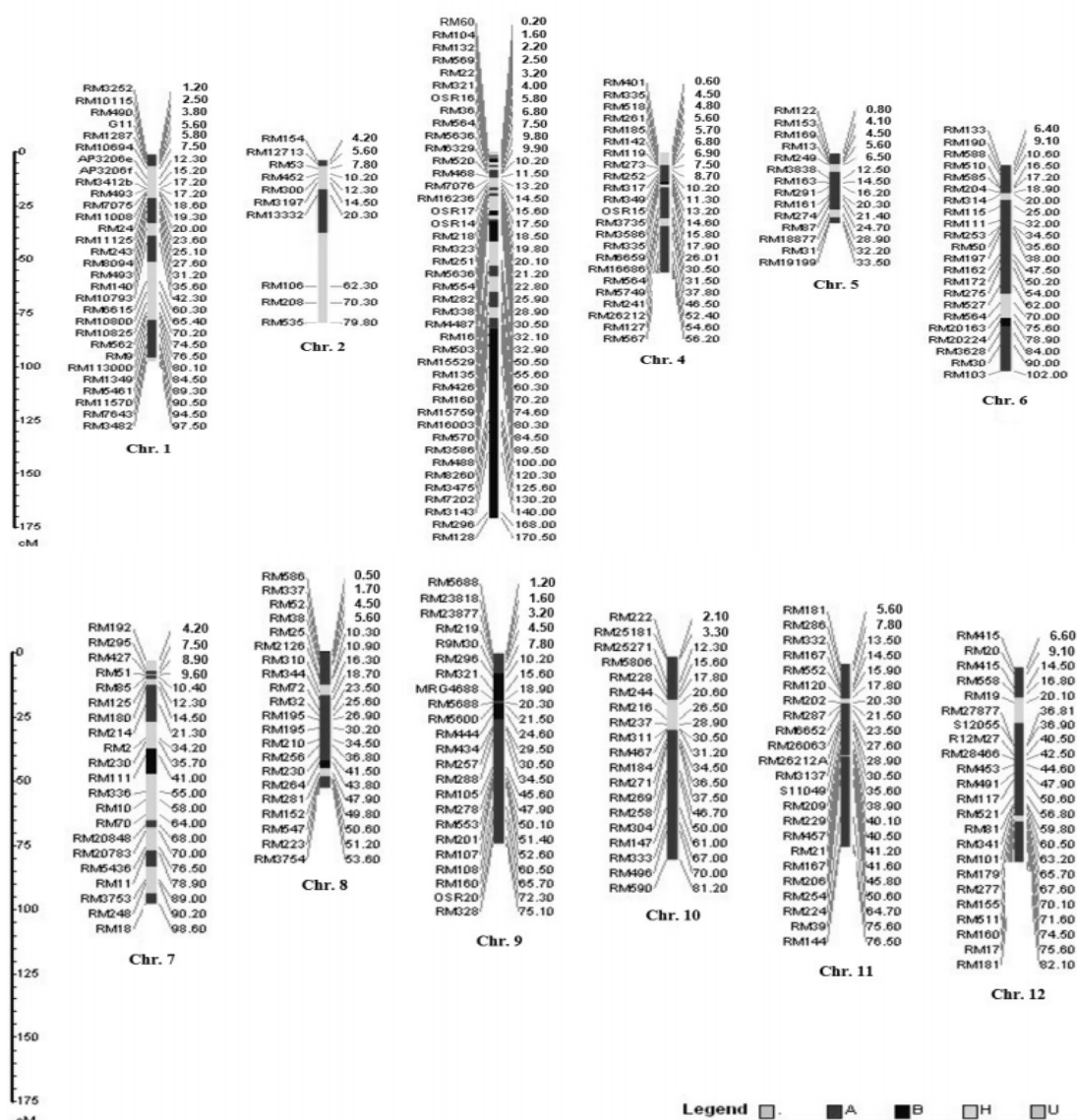
RM160 (17,1%) trên nhiễm sắc thể 3 và RM3735 (32,6%) trên nhiễm sắc thể 4. Bốn QTLs được tìm thấy có liên quan đến số hạt chắc trên bông định vị tại vùng giả định của nhiễm sắc thể 4 ở quãng giữa RM468-RM7076 và RM241-RM26212, giải thích 13,1% và 31,0% biến thiên kiểu hình, theo thứ tự.

Kết quả thật sự được ghi nhận tại quãng giữa RM3586-RM160 trên nhiễm sắc thể 3 với độ lớn 8,1 cM đối với tính trạng tính theo điểm chống chịu nóng, và chỉ thị RM3586 được đặc

biết chú ý trong ứng dụng chọn giống nhờ chỉ thị phân tử.

Hai QTLs kiểm soát tính trạng tỷ lệ hạt lép được tìm thấy ở loci RM554, RM3686 trên nhiễm sắc thể 3 với 25,0% và 11,2% biến thiên kiểu hình theo thứ tự.

Một QTL kiểm soát tính trạng khối lượng 1.000 hạt định vị tại locus RM103 trên nhiễm sắc thể 6, giải thích được 30,6% biến thiên kiểu hình.



Hình 4: Bản đồ liên kết gen trên 12 nhiễm sắc thể, theo phần mềm GGT, quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 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

Một QTL tại locus RM5749 trên nhiễm sắc thể 4 giải thích được 10,8% biến thiên kiểu hình của tính trạng năng suất hạt.

QTL được xác định trên 5 tính trạng nghiên cứu (HT, khối lượng 1.000 hạt, số hạt chắc/bông, % hạt lép, và năng suất). Tất cả QTL được 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 4).

- Màu xanh blue: alen đồng hợp tử giống như N22 (chống chịu nóng).

- Màu đỏ: alen đồng hợp tử giống như OM5930 (nhiễm).

- Màu xanh “pale green”: biểu thị dị hợp tử.

- Màu nâu: đoạn nhiễm sắc thể chưa xác định được.

Khoảng cách di truyền giữa RM3586 với QTL qui 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 nhiễm sắc thể 3 trong khoảng giữa 8,1 cM (LOD = 3,4,  $R^2 = 11,52\%$ , ảnh hưởng cộng tính = 5,64).

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

*Bảng 1: 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 <sup>2</sup> (%)	DPE
RM3586	3	HT	4,150 ± 0,44	10,60	0,000	36,2	B
RM3735	4	Điểm chống chịu nóng	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
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	KL1.000 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

DPE: (Direction of phenotypic effect: ảnh hưởng kiểu hình từ mẹ hoặc bố) A: OM5930, và B: N22  
 R<sup>2</sup>: giá trị biểu thị % biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL

Bảng 2: 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; (Nên giải thích ở dưới chứ không để tiêu đề như thế này thì sẽ hợp lý hơn)

Tính trạng	Quãng giữa hai chỉ thị phân tử	Nhiễm sắc thể	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

Trong nghiên cứu này, khả năng chống chịu nóng của cây lúa được tìm hiểu trên cơ sở chỉ thị phân tử. Các ảnh hưởng bên ngoài được tối thiểu hóa bằng cách trồng cây lúa trong điều kiện lúa trổ có nhiệt độ ngày 35-36 độ C và nhiệt độ đêm xấp xỉ 27 độ C. Trong các điểm thí nghiệm, nhiệt độ ngày thỏa mãn yêu cầu như vậy, nhưng nhiệt độ đêm thường rất thấp (dưới 25 độ C), trừ địa điểm thí nghiệm tại Ninh Thuận. Kết quả nghiên cứu của những năm gần đây cho thấy, cơ sở di truyền của tính chống chịu nóng vẫn chưa được giải thích đầy đủ (Xiao và ctv., 2011). Biến thiên di truyền của các tính trạng số lượng thường do một vài hoặc nhiều loci điều khiển, bị ảnh hưởng mạnh mẽ khi có thêm một vài ảnh hưởng khác tuy nhỏ hơn (Paterson và ctv., 1988). Phân tích quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> của OM5930/N22 cho thấy tính chống chịu nóng được di truyền từ nhiều gen (QTL) định vị trên hai nhiễm sắc thể chính (số 3 và 4). 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

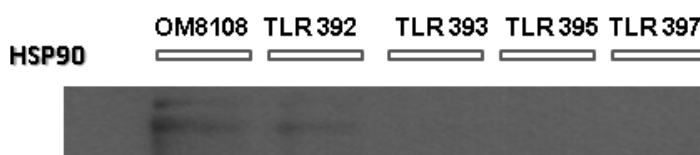
ý nghĩa về mặt thống kê, giá trị  $r = 0.929^{**}$  và  $df = 166$  (Bùi Chí Bửu và ctv., 2012).

### PHÂN TÍCH PROTEIN CHỐNG SỐC NHIỆT

Phản ứng với stress do nhiệt độ cao là một tính trạng di truyền số lượng, bao gồm sự kiện điều hòa gen và protein theo kiểu “up và down” xảy ra đồng thời (Zou và ctv., 2011). Tùy theo khối lượng phân tử, người ta chia HSPs thành 5 họ khác nhau: HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s and sHSPs (Trent 1996).

Phân tích điện di SDS cho khái niệm có sự biểu hiện của những HSP, nhưng chưa khẳng định đó là protein nào. Kết quả khá rõ bởi vì không phải mẫu giống nào cũng thể hiện được HSP khi xử lý nhiệt độ cao (cho dù xét nghiệm PCR có kết quả tương đồng alen với N22). Nghiệm thức không xử lý nhiệt lúc trổ, cho kết quả âm tính, không có băng điện di một chiều.

Bước hai, phải dò tìm kháng thể để thực hiện xét nghiệm Western blot. Đây là bước khó khăn và mất thời gian nhiều nhất. Cuối cùng có chỉ hai mẫu giống OM8108 và TLR392 trong các giống khảo nghiệm biểu hiện HSP90 (hình 5).



Hình 5: Kết quả phân tích Western Blot, HSP90 biểu hiện trong mẫu giống OM8108 và TLR392  
 Kết quả bảng 5 (bảng 5 hay hình 5?) chỉ có tính chất tham khảo, không có tính chất kết luận.

### 3.3. Chọn dòng nhờ chỉ thị phân tử

Bảng 3 cho thấy chỉ thị RM3735 trong quy trình MAS để phát triển dòng lúa chống chịu nóng. Hình 6 cho thấy giống OM8108, OM10040 và 4 dòng lúa được chọn tạo nhờ chỉ

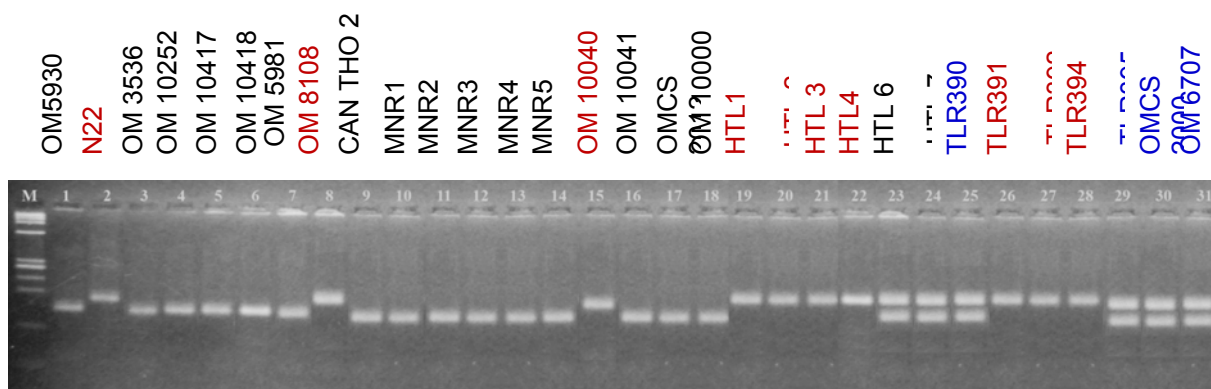
thị phân tử là TLR1, TLR2, TLR3 và TLR4 có alen đồng hợp tử giống như N22. Đây là minh chứng khá rõ ràng về hiệu quả chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử đối với tính trạng chống chịu nóng. Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL tại

quãng giữa hai marker RM3586-RM160. Riêng đối với chỉ thị RM3735 trên nhiễm sắc thể 4 giải thích được 32,28%, 20,73% và 9,95% biến thiên kiểu hình, trên các quần thể hồi giao OM5930/N22, AS996/N22, và AS996/ Dular /AS996, theo thứ tự. OM4900 và IR64 được sử dụng làm đối chứng. Trong quần thể BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> của OM5930 / N22, có 5 dòng được chọn là BC4-1-

10-1 (HTL1), BC4-5-8 (HTL2), BC4-5-9-4 (HTL3), BC4-6-3 (HTL4) và BC4-5-6 (HTL5) theo kết quả điện di tại loci RM3687, RM3471, RM3735, RM35. Dòng HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4 biểu hiện alen đồng hợp với alen của giống cho gen chống chịu nóng N22; dòng HTL6 và HTL7 biểu hiện alen dị hợp tử, cần phải tiếp tục chọn cá thể ưu việt.

Bảng 3. So sánh kiểu gen và kiểu hình tại 4 loci RM3687, RM3471, RM3735, RM3586 trên 50 cây của quần thể BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> thuộc cặp lai OM5930 / N22

Chỉ thị phân tử	Đồng hợp tử kháng	Đồng hợp tử nhiễm	Dị hợp tử	Giá trị dự đoán (%)
RM3735	5	45	0	100,0
RM3687	7	41	2	71,4
RM5900	4	39	7	87,5
RM3471	0	43	7	56,3



Hình 6: Kết quả phân tích Western Blot, HSP90 biểu hiện trong mẫu giống OM8108 và TLR392 (Có chăng đây là Kết quả PCR của các con lai chứ không phải là kết quả của phân tích Western Blot??)

### 3.4. Tương tác kiểu gen với hay gen x? môi trường và hiệu quả chọn lọc

Kết quả phân tích theo mô hình Eberhart & Russel và AMMI (năm nào?) cho thấy: OM10040, TLR391 và HTL3 cho năng suất ổn định trong điều kiện nhiệt độ nóng khi lúa trở trong vụ hè thu. Dòng OM8108, OM6707, TLH3 cho năng suất cao nhất và tỷ lệ hạt lép chấp nhận được.

Tỷ lệ lép là kết quả hoạt động vận chuyển chất khô từ lá đến hoa lúa từ khi lúa trở đến chín sữa, chín sấp và thu hoạch. Thuật ngữ khoa học gọi đó là “grain filling” bao gồm hai nội dung chính: GFR (grain filling rate) – tốc độ vận chuyển chất khô vào bông lúa (mg/ngày); và GFD (grain filling duration) – thời gian vận chuyển chất khô vào bông lúa (ngày).

Tính trạng GFR trong điều kiện nóng của tỉnh Ninh Thuận có hệ số di truyền nghĩa rộng thấp  $H^2_{bs} = 0,2079$ ; hiệu quả chọn lọc GA(%) thấp = 4,10%. Trong điều kiện nhiệt độ ngày và đêm đều bất thuận, TLR397, OM10040, và TLR378 có tốc độ hạt vào chắc tốt nhất, so với đối chứng TH6. Giống triển vọng OM8108, OM6L đứng trong top 10 có giá trị GFR cao >100 mr/bông/ngày. Thời gian vào chắc (GFD: grain filling duration) của những dòng thuộc loại hình indica biến thiên trong vòng 18-22 ngày, trung bình 20 ngày, tại Ninh Phước – Ninh Thuận.

Tốc độ vào chắc của hạt (GFR) tương quan rất chặt chẽ với năng suất ( $r_g = 0,7188 **$ ) và hệ số path là 1,0557, đồng thuận [=ve] với  $r_g$ , đạt giá trị cao nhất, chứng tỏ GFR đã đóng góp trực tiếp vào kết quả năng suất hạt, trong

điều kiện nhiệt độ nóng của Ninh Thuận, khi lúa trổ đến thu hoạch. Hệ số cận  $R_h = 20,51\%$  (< giá trị chuẩn 40%).

#### IV. KẾT LUẬN

1. Có 6 tính trạng được đánh giá kiểu hình thành công phục vụ cho phân tích QTL tính chống chịu nóng, tỷ lệ hạt lép có giá trị đóng góp lớn nhất.

2. Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi QTL mục tiêu tại chỉ thị RM3586 (36,2%), RM160 (17,1%) trên nhiễm sắc thể 3 và RM3735 (32,6%) trên nhiễm sắc thể số 4. Kết quả thật sự được ghi nhận tại quãng giữa RM3586-RM160 trên nhiễm sắc thể số 3 với độ lớn 8,1 cM đối với tính trạng tính theo điểm chống chịu nóng.

3. 32 chỉ thị SSR tập trung trên nhiễm sắc thể 3 và 4 được sử dụng để chọn dòng có cùng băng với alen của nguồn cho gen kháng của N22, Dular, Gayabeyo, tuy nhiên chỉ có 3 chỉ thị cho hiệu quả cao nhất là RM3586 (NST3), RM3735 và RM3687 (NST4). Các dòng được chọn được ký hiệu HTL1, HTL2, HTL3 và HTL4 đã được khảo nghiệm trong bộ giống quan sát và so sánh sơ khởi.

4. Qua phân tích (Đây là gì vậy?) tại 7 địa điểm, dòng có tỷ lệ hạt lép thấp và năng suất cao được ghi nhận là OM8108 (công nhận sản xuất thử), HTL1, TLR391, TLR392, OM6707.

5. Tính trạng tốc độ vào chắc của hạt (GFR) tại Ninh Thuận có hệ số di truyền nghĩa rộng thấp  $H^2_{bs} = 0,2079$ ; hiệu quả chọn lọc GA(%) thấp = 4,10%. Giống triển vọng OM8108 có giá trị GFR cao >100 mg/bông/ngày, đã được công nhận sản xuất thử.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Buu BC, NV Hieu, PV Toan, BP Tam, VT Tra My, CT Nha, NT 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): 38-46.
- Eberhart SA, WL Russel. 1966. Stability parameters for comparing varieties. Crop Sci 6: 36-40
- Finley KW, GM Wilkinson. 1963. The analysis of adaptation in plant breeding programme. Aust J Agric Res 14: 742-757
- Freeman GH, JM Perkins. 1971. Environmental and genotype-environmental components of variability. VIII. Relations between genotypes grown in different environments and measures of these environments. Heredity 27: 15-23
- Gammulla CPD, B Atwell, P Haynes. 2010. Differential metabolic response of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells exposed to high- and low-temperature stress. Proteomics 2010, 10:3001-3019.
- uang HC, SS Wen, GM Liu. 2002. Studies on the heat tolerance of Luhui 17 and its cross II You 7 at head sprouting. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 15, 106-108. (in Chinese)
- Lander ES and P Green. 1987. Construction of multilocus genetic linkage maps in human. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2363-2367
- 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.
- Lee DG, N Ahsan, SH Lee, KY Kang, JD Bahk, IJ Lee, BH Lee. 2007. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. PROTEOMICS 7(18):3369-3383.
- Liao JL, HW Zhou, HY Zhang, PA Zhong and YJ Huang. 2013. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the early milky stage of rice grains during high temperature stress. Journal of Experimental Botany (doi:10.1093/jxb/ert435), p.2-17.
- ackill DJ, WR Coffman, JN Rutger. 1982. Pollen shedding and combining ability for high temperature tolerance in rice. Crop Science, 22:730-733
- Milne I, P Shaw, G Stephen, M Bayer, L Cardle, WTB Thomas, AJ Flavell, and D Marshall. 2010. Flapjack—graphical

- genotype visualization. *Bioinformatics* 26: 3133–3134.
13. Morita S, Ji Yonemaru, Ji Takanashi. 2005. Grain Growth and Endosperm Cell Size Under High Night Temperatures in Rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* 95(4):695-701.
  14. Nelson JC. 1997. QGene: Software for marker-based genomic analysis and breeding. *MolBreed*. 3: 239-245
  15. Peng SB, JL Huang, JE Sheehy, RC Laza, RM Visperas, XH Zhong, GS Centeno, GS Khush, KG Cassman. 2004. Rice yields decline with high temperature from global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 9971-9975.
  16. Perkins JM, JL Jink. 1968. Environmental and genotype-environmental components of variability. III. Multiple lines and crosses. *Heredity* 23:339-356
  17. Trent J. 1996. A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiol Rev* 18:249–258
  18. van Berloo R. 2008. GGT 2.0: Versatile software for visualization and analysis of genetic data. *Journal of Heredity* 99(2): 232–236.
  19. Wei H, JP Liu, Y Wang, NR Huang, XB Zhang, LC Wang, JW Zhang, JM Tu, XH Zhong. 2013. A dominant major locus in chromosome 9 of rice (*Oryza sativa* L.) confer tolerance to 48 °C high temperature at seedling stage. *Journal of Heredity* 104(2):287–294.
  20. Wu X, Y Shiroto, S Kishitani, Yukihiroto, K Yoriyama. 2009. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep* (2009) 28:21–30
  21. Xiao YH, Y Pan, LH Luo, HB Deng, GL Zhang, WB Tang, LY Chen. 2011. Quantitative trait loci associated with seed set under high temperature stress at the flowering stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 178:331–338.
  22. Young ND and SD Tanksley. 1989. Restriction fragment length polymorphisms maps and the concept of graphical genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 77(1): 95–101.
  23. Zhang GL, LY Chen, GY Xiao, YH Xiao, XB Chen, ST 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): 482-487
  24. Zhang H, L Duan, JS Dai, CQ Zhang, J Li, MH Gu, QQ Liu, Y Zhu. 2014. Major QTLs reduce the deleterious effects of high temperature on rice amylose content by increasing splicing efficiency of Wx pre-mRNA. *Theor Appl Genet* 127:273–282.
  25. Zhu L, YH Xiao, CM Wang, L Jiang, HQ Zhai, JM Wan. 2005. Mapping QTLs for heat tolerance during grain filling in rice. *Chinese Journal of Rice Science* 19:117-121.
  26. Zou J, CF Liu, X Chen. 2011. Proteomics of rice in response to heat stress and advances in genetic engineering for heat tolerance in rice. *Plant Cell Rep* 30: 2155–2165

## ABSTRACT

### Rice breeding for heat tolerance via marker-assisted selection in Southern Vietnam

The indica genotypes, OM5939 (high yielding, susceptible to heat) and N22 (heat tolerance under phytotron treatments) were used as parents. The 310 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> plants and their parents were planted during 2012 dry season at the experimental field in Cuu Long Delta Rice Research Institute (CLRRI) for evaluation of heat tolerance during the reproductive period. The low percentage of filled grains may be attributed, at least partially, to a heat activity during grain filling. Of the 501 SSRs tested, 264 markers produced polymorphism, which showed clear and scorable bands between the two parents. These were subsequently used to genotype the BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> population. A linkage map based on BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> populations were then constructed. It covered a total of 2741.63 cM with an average two

loci interval of 10.55 cM. All QTLs were detected above an empirically determined experiment-wise significance threshold equivalent to  $P < 0.01$  (corresponding to an interval mapping LOD  $> 3.6$  or a composite interval mapping LOD  $> 3.9$ ). The linkage relationship between the SSR markers RM3586 and RM160 as indicators for heat tolerance genes were estimated. Results in interval mapping verified the findings of SMA only in the case of RM3586 - RM160 on chromosome 3 at the 8.1 cM interval (LOD = 3.4,  $R^2 = 11.52\%$ , additive effect = 5.64). On chromosome 4, none of the interval confirmed with QTLs found between RM3735 and RM5749 from the single marker analysis, as the value of LOD obtained was low. Yield trials were conducted at 7 sites with 16 genotypes in 2012 dry season. They were subsequently continued in 2013. Some promising varieties, which were selected *via* SSRs assisting as RM3586, could be mentioned as: TLR397, OM8108, OM6707, TLR392, TLR391 due to low unfilled grains and high yield under heat stress (Không thấy có ở phần tóm tắt Tiếng Việt). Attentions would be paid more HTL1, HTL2, HTL3 and HTL4 according to MAS and phenotypical acceptability – based selection. However, the genetic gain (4.10%) of grain filling rate (GFR) was too low to accept.

**Keywords:** grain filling rate (GFR), heat tolerance, marker-assisted selection (MAS), QTL, unfilled grain percentage

**Người phản biện:** GS. TSKH. Trần Duy Quý