

# XU HƯỚNG MỚI TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CỦA THẾ GIỚI

*Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang*

## THÁCH THỨC

Trong 20 năm tới, cứ trung bình 1 tỷ dân sẽ tiêu thụ 65 triệu tấn gạo (tương đương 100 triệu tấn thóc). Năm **2035**, tổng sản lượng thóc phải tăng thêm so với bây giờ là **114 triệu tấn**. Năng suất trung bình có xu hướng đứng lại (hoặc tăng rất chậm). Nhưng có 3 điều đáng lo: đất lúa mất dần, người lao động trồng lúa giảm dần, nước tưới cho lúa thiếu, khiến cho mục tiêu tăng thêm 114 triệu tấn: trở nên vô cùng khó khăn.

Điều đáng lo nữa là chỉ có ít hơn **5%** vật liệu di truyền trong ngân hàng gen của IRRI được sử dụng trong các chương trình cải tiến giống lúa.

## GIẢI PHÁP

### 1. LẤY CHẤT LƯỢNG BÙ SỐ LƯỢNG

#### 1-1. Về năng suất lúa gạo

Trước hết, vẫn phải giữ vững được năng suất lúa tăng đều với nhịp độ mà chúng ta có thể quản lý được. Năng suất lúa là yếu tố cơ bản cho phép việc điều chỉnh mục đích sử dụng diện tích trồng lúa. Tại Hội nghị di truyền quốc tế về lúa tại Manila (Philippin) vào tháng 11.2009, một số giải pháp tăng năng suất lúa xét về khía cạnh khoa học thuần túy đã được đưa ra gồm: (1) Ảnh hưởng di truyền của năng suất và ưu thế lai được khảo sát trên cơ sở bản đồ di truyền chi tiết (khoảng cách giữa 2 chỉ thị phân tử: 0,35 cM) với kỹ thuật đọc trình tự mới nhất; (2) Xây dựng các quần thể con lai đặc biệt để nghiên cứu 16 vị trí trên nhiễm sắc thể bao gồm 6 loci quy định năng suất và ảnh hưởng ưu thế lai; (3) Xác định hệ thống điều hòa gen giữa nguồn và sức chứa vì mục tiêu năng suất. Các nhà khoa học xác định rằng, năng suất lúa lai sẽ tăng so với lúa thuần 15-20% và nếu sử dụng công nghệ sinh học tạo giống lúa quang hợp theo chu trình sẽ giúp tăng năng suất hơn 40% (tối đa sẽ đạt 12-16 tấn/ha). Bên cạnh đó, việc cải tiến kỹ thuật bón làm gia tăng hiệu quả sử dụng phân bón từ 40% hiện nay lên 70% trong tương lai, kỹ thuật tưới tiết kiệm nước cùng với một số giải pháp kỹ thuật đồng bộ khác sẽ góp phần quan trọng vào việc giảm giá thành lúa gạo.

#### 1-2. Về phẩm chất gạo

Gia tăng chất lượng lúa gạo được hiểu theo cả 2 nội dung: phẩm chất thương mại và phẩm chất dinh dưỡng.

##### **Phẩm chất dinh dưỡng**

Chất lượng hạt gạo gồm: chất lượng xay chà, chất lượng cơm và chất lượng dinh dưỡng. Thị hiếu của người tiêu dùng thường chú ý đến chất lượng cơm sau khi nấu. Chất lượng cơm bao gồm hàm lượng amylose (AC - khả năng giữ nước trong hạt gạo), độ trở hồ, độ bền thể gel; hàm lượng dinh dưỡng bao gồm lượng protein, vitamin, khoáng vi lượng. Để cải tiến tính trạng AC, các nhà khoa học trong nước đã dành nhiều công sức nghiên cứu điều khiển thành công gen waxy trên nhiễm sắc thể số 6.

Hàng năm, trên thế giới có khoảng 1 triệu người chết do hội chứng anemia. Nhu cầu sắt mỗi ngày là 1 mg nhưng chỉ có 10-15% sắt được hấp thu vào cơ thể trong khi tỷ lệ bổ sung sắt mỗi ngày cho người trưởng thành là 10-15 mg, trẻ em từ 8-10 mg. Trên thực tế, gạo thông thường chỉ cho 2 mg sắt trong 200 g nhưng sắt trong gạo bị phytate giữ chặt.

Năm 2009, trong công trình nghiên cứu về hiện tượng thiếu sắt với hội chứng anemia (IDA) tại các nước đang phát triển, GS Gyn Ahn cùng các cộng sự thuộc Đại học Pohang (Hàn Quốc) đã nghiên cứu việc chuyển gen “ferritin” của đậu tương vào lúa giúp gia tăng hàm lượng sắt trong cơm; tập trung nghiên cứu nicotianamine (NA) như một “chất vận chuyển” đối với ion kim loại - là thành phần chủ chốt trong trạng thái tối ưu chuyển hóa sắt trong cây lúa (iron homeostasis). Từ đó, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 3 gen NAS, trong đó có 2 gen quan trọng là *OsNAS3* trên nhiễm sắc thể số 7 và *OsNAS2* trên nhiễm sắc thể số 3.

Giáo Sư Naoko K. Nishizawa cùng các cộng sự thuộc Đại học Tokyo (Nhật Bản) trong công trình nghiên cứu về sự hấp thu sắt và cách thức sắt chuyển hóa vào trong hạt gạo (mặc dù sắt có nhiều trong đất nhưng hầu hết ở dạng không hòa tan  $Fe^{3+}$ ) (Inoue và ctv. 2009). Lúa tiết ra mugineic acid phytosiderophores để bắt giữ  $Fe^{3+}$  trong đất và tạo ra  $Fe^{3+}$  phytosiderophore. Nicotianamine, tiền chất trực tiếp của phytosiderophore, là một chất thải của nhiều kim loại di động, đặc biệt là  $Fe^{2+}$  đóng vai trò quan trọng trong chuyển hoá sắt vào các cơ quan sinh dưỡng và sinh thực của cây lúa. Việc gia tăng hấp thu sắt từ đất là tiền đề làm gia tăng hàm lượng sắt trong hạt gạo. Các nhà khoa học Nhật Bản đã đạt được nhiều thành tựu trong nghiên cứu, phân lập thành công nhiều gen điều khiển sự hấp thu và vận chuyển sắt trong cây lúa (ví dụ, gen mã hoá enzym trong sinh tổng hợp phytosiderophore). Gen mã hoá enzym sẽ vận chuyển  $Fe^{3+}$  phytosiderophore hoặc  $Fe^{2+}$  nicotianamine, 3 yếu tố phiên mã trong cây lúa: IDEF1, IDEF2 và IRO2, tham gia trong cơ chế phân tử điều hòa gen dưới điều kiện thiếu sắt đã được phân lập. Họ sử dụng các gen này làm gia tăng sự tích tụ hàm lượng sắt trong hạt gạo.

Hàm lượng protein trong cây lúa (GPC) biến động từ 6-12% (tỷ lệ này cao hay thấp thường do yếu tố giống quyết định 40% và còn 60% do ảnh hưởng của môi trường và thời gian bảo quản hạt (thời gian tồn trữ lúa trong kho càng lâu, hàm lượng protein càng giảm). Hàm lượng protein bị ảnh hưởng của giống và môi trường khá nhiều nhưng thành phần axit amin của lúa rất cân đối, ví dụ lysin luôn chiếm trung bình từ 3,5-4,0% (cao hơn rất nhiều so với ngô). Chưa kể yếu tố di truyền của tính trạng hàm lượng protein trong hạt rất phức tạp và bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường, thời gian sinh trưởng. Chi thị RM234 định vị trên nhiễm sắc thể số 7, cho đa hình với 3 alen với kích thước lần lượt là 163 bp, 156 bp, 145 bp đã được Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long khai thác trong cải tiến giống lúa có hàm lượng protein cao (> 8%). Arthur Z. Wang và các cộng sự (2009) thuộc Đại học National Chung - Hsing (Đài Loan) đã nghiên cứu proteomics cám gạo với 12-20% protein và là nguồn để phát triển thực phẩm chức năng mới. Kết quả điện di 2 chiều cho thấy sự khác biệt của cám trong gạo với thành phần bên trong nội nhũ (cụ thể, có 238 protein spot được phân lập bằng sắc khí khối phổ - linear ion trap mass spectrometer và 87 proteins được tìm thấy). UP01-PINHA, UP03-PINHA, REF-HEVBR, REHYA-ORYSI và REHYB-ORYSI biểu hiện trong hầu hết các mẫu protein. Protein cám gạo đóng góp 14 “terms” của hợp phần tế bào, 6 “terms” của tiến trình sinh học và 7 “terms” của chức năng phân tử theo dữ liệu GOA (gene ontology annotation) của EMBL-EBI. Trong trường hợp không biết về dữ liệu (để giải thích trình tự), hầu hết những điểm protein như vậy đều định vị trong tế bào chất, tham gia tiến trình biến dưỡng, hoạt động xúc tác “oxidoreductase”. Tất cả các điểm protein này có chức năng của enzym, kết hợp với tính kháng stress. Điều này cho thấy các protein cám gạo có chức năng đồng nhất và biểu thị nhiều chức năng mới.

Kết quả điều tra của WHO cho thấy, 40% trẻ em dưới 5 tuổi; 30% trẻ em trong tuổi đến trường và 50% phụ nữ mang thai có triệu chứng thiếu vitamin A. Giáo sư Ingo Potrykus và Peter Beyer cùng cộng sự (trong dự án quốc tế HarPlus) đã tạo ra giống lúa vàng (Golden Rice) bằng biến đổi gen chứa nhiều vitamin A, sắt, kẽm phù hợp với các quốc gia thuộc khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam (Potrykus 2000). Dự kiến giống này sẽ được trồng ở Philipines. Qua 10 năm thử nghiệm cho thấy, Golden Rice cho các kết quả tốt về chất lượng dinh dưỡng nhưng

trong các văn bản pháp lý của nhiều quốc gia ASEAN, cây trồng biến đổi gen chưa được thừa nhận nên giống này chưa được đưa vào sản xuất.

Hàm lượng axit phytic có trong hạt gạo giúp ruột non dễ dàng hấp thu sắt. Giống lúa có gen *lpa* do một đột biến được ghi nhận, làm giảm đáng kể phytic acid trong gạo, đã và đang được khai thác trong các chương trình cải tiến giống lúa. Đột biến axit phytic thấp được tạo ra do các tác nhân đột biến trên ngô, lúa gạo, lúa mạch và đậu nành. Đột biến *lpa2* làm giảm lượng axit phytic nhưng làm tích lũy InsP<sub>3</sub>, InsP<sub>4</sub> và InsP<sub>5</sub> (Raboy và ctv. 2003) trong khi đột biến *lpa1* làm giảm lượng axit phytic nhưng không tích lũy inositol polyphosphate. Tại Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long, các nhà khoa học đã sử dụng OM 1490 và OMCS 2000 xử lý phóng xạ (bằng hóa chất và tia gamma) giúp tạo ra gen lặn *lpa* mới định vị trên nhiễm sắc thể số 3, tuy nhiên điểm hạn chế của gen là kiểu hình kém ổn định. Gần đây, phát hiện của Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long về quần thể lúa hoang ở Đồng Tháp Mười *Oryza rufupogon* có chứa hàm lượng axit phytic đã được các chuyên gia của IAEA đánh giá cao. Tính đến nay, lĩnh vực công nghệ sinh học có thể tạo ra những giống lúa làm thực phẩm chức năng như sau: 1- Lúa biotech ngăn ngừa bệnh cao huyết áp (gen mã hóa GABA và NA); 2- Lúa biotech tích tụ “Type II collagen telogeneric” trong mô sụn giúp phòng chống và chữa trị bệnh viêm khớp; 3- Lúa biotech thể hiện protein ACE chống bệnh cao huyết áp; 4- Lúa biotech tạo ra vaccine chống lại giun sán.

### **Phẩm chất thương mại**

*Chiều dài hạt gạo:* là tính trạng ổn định nhất, ít bị ảnh hưởng bởi môi trường, được điều khiển bởi đa gen. Thứ tự mức độ tính trội được ghi nhận như sau: hạt dài > hạt trung bình > hạt ngắn > hạt rất ngắn. Thị hiếu người tiêu dùng về dạng hạt rất khác nhau, có nơi thích hạt tròn, có nơi thích hạt gạo dài trung bình, nhưng được tiêu thụ nhiều nhất trên thị trường quốc tế là hạt gạo thon dài. Tỷ lệ vỏ trấu trung bình từ 20-22%, dao động ở mức 18-26%. Cám và phôi hạt chiếm 8-10%, do đó, tỷ lệ gạo trắng thường ở vào khoảng 70%. Tỷ lệ gạo nguyên biến động rất lớn và chịu ảnh hưởng lớn bởi môi trường, đặc biệt là nhiệt độ và độ ẩm trong suốt thời gian chín cho đến cả sau khi thu hoạch, đặc biệt là điều kiện phơi sấy, bảo quản.

Kích thước hạt do gen đa gen tương tác cộng tính điều khiển. Chiều dài và hình dạng hạt di truyền theo số lượng. Độ trong suốt của hạt gạo phụ thuộc vào tính chất của phôi nhũ, vết đục xuất hiện ở lưng, bụng hoặc trung tâm hạt gạo. Hạt tinh bột ở vùng bạc bụng sắp xếp rời rạc, có cấu trúc kém chặt chẽ hơn vùng trong suốt, tạo khe hở chứa không khí giữa các hạt tinh bột hình thành vết đục. Tính trạng này di truyền độc lập với các đặc tính nông học khác. Sự thay đổi của khí hậu (nhiệt độ cao khi lúa trở bông) có ảnh hưởng đáng kể đến việc tăng độ bạc bụng. Các thí nghiệm thực hiện tại vùng lúa của Viện Nghiên cứu lúa quốc tế - IRRI cho thấy, ở thời kỳ lúa từ trở đến chắc hạt, nếu điều kiện nhiệt độ đêm/ngày vào khoảng 20/30 °C, lúa sẽ đạt 80% số hạt chắc, tuy nhiên độ bạc bụng lại khá cao (80%). Trong khi đó, trong điều kiện nhiệt độ đêm/ngày là 15/25°C, tỷ lệ hạt chắc đạt thấp hơn nhưng tỷ lệ bạc bụng của hạt gạo lại rất thấp (thấp hơn 20%). Độ bạc trắng ở trung tâm hạt do gen *wc* điều khiển, còn độ bạc trắng ở bụng hạt do gen *wb* [6].

*Độ dẻo của cơm:* amylose được xem là tính trạng có ý nghĩa quyết định đến sự mềm cơm. Hàm lượng amylose cao có tính trội không hoàn toàn so với hàm lượng amylose thấp, do một gen điều khiển kèm theo một số modifiers (gen phụ có tính chất cải tiến). Gen điều khiển sự co giãn hàm lượng amylose *ae* (amylose extender) được xác định trên nhiễm sắc thể số 2 (Kaushik và Khush 1991). Thành tựu có ý nghĩa trong nghiên cứu di truyền phân tử về chất lượng cơm có thể được ghi nhận qua công trình bản đồ liên kết gen hệ enzyme III của tinh bột trong hạt gạo trên nhiễm sắc thể số 2, với hai chỉ thị kế cận CDO 718 và RG 157. Amylose được đo lường bằng phương pháp hấp thu phổ sóng “amylose - iodine complex”. Trên thế giới, mạng lưới chất lượng lúa gạo (INQR - International Network for Quality Rice) đã điều tra số liệu biến thiên giữa các phòng thí nghiệm khi phân tích amylose và xác định tại sao có sự sai lệch này. Phương pháp

phân tích amylose không hề đơn giản và đòi hỏi độ chính xác với điều kiện chuẩn mực hơn. **Phân tích QTL** (phân tích di truyền các gen điều khiển tính trạng số lượng) kiểm soát hàm lượng amylose cho thấy, vùng giả định nằm trên nhiễm sắc thể số 5 và 6 với gen *wx* và các alen khác, giải thích biến thiên kiểu hình 91,1% trong quãng giữa hai marker RG573-C624. Yanagisawa và các cộng sự (2003) đã dùng kỹ thuật SNP (single nucleotide polymorphism) và dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) để tìm kiếm gen *Wx-D1* trong lúa và lúa mì mã hóa protein *wx-D1* thông qua phân tích immunoblot. Hàm lượng amylose còn chịu ảnh hưởng của tương tác: tính cộng x tính cộng, và tương tác trội x trội, trong phân tích epistasis [7]. Nguyễn Thị Lang và các cộng sự (2004) đã phát hiện AC được kiểm soát bởi gen chính định vị trên nhiễm sắc thể số 5 và 6 liên kết với chỉ thị RM42 (nhiễm sắc thể số 5) và *wx* (nhiễm sắc thể số 6).

Nhiệt độ hóa hồ (GT) do gen *alk* và *qASS-6* điều khiển. Trong một số nghiên cứu cho thấy, nhiệt độ hóa hồ có liên quan đến hàm lượng amylose. Gen *alk* và *qASS-6* có sự liên kết với gen *wx* (McKenzie và Rutger 1983). Nhiệt độ hóa hồ quyết định rất lớn đến hàm lượng amylose (Jennings và các cộng sự, 1979). Gen chính và gen phụ liên quan đến nhiệt độ hóa hồ đều nằm trên nhiễm sắc thể số 6, quãng giữa hai chỉ thị CT201- RZ450 (Lu và ctv. 1996; Matsuki và ctv. 2003, He và ctv. 1999).

*Mùi thơm của cơm*: 2-acetyl-1-pyrroline được tìm thấy trong giống Basmati 370 và Jasmine quyết định mùi thơm. Ngoài ra, còn có pentanol, hexanol, benzaldehyde tham gia vào mùi thơm của gạo. Ahn cùng các cộng sự (1992) đã xác định gen *fgr* định vị trên nhiễm sắc thể số 8 thông qua kỹ thuật RFLP, điều khiển mùi thơm. Gen lặn *fgr* liên kết chặt chẽ với chỉ thị RG 28 với khoảng cách di truyền 4,5cM.. Nguyễn Thị Lang và các cộng sự (2002) đã sử dụng chỉ thị RM223 liên kết với *fgr* trên nhiễm sắc thể số 8 với khoảng cách di truyền 1,6 cM trong chọn tạo giống lúa cao sản có mùi thơm và phát triển thành công giống OM 4900, OM 6161, OM 6162.

Năm 2009, Mariafe Calingacion cùng các cộng sự thuộc IRRI và Đại học Cornell (Mỹ) đã nghiên cứu nguồn gốc của lúa thơm trên cơ sở di truyền thông qua xác định gen *betaine aldehyde dehydrogenase* (BADH2) điều khiển mùi thơm (Chen và ctv. 2000). Khi phân lập 8 alen không có chức năng theo giả định của BADH2 cho thấy có sự khác biệt về địa lý và nguồn gốc di truyền. Cho dù nguồn gốc khác biệt nhiều, nhưng có một alen *badh 2.1*, được xem như alen ưu thế trội trong tất cả giống lúa thơm đã biểu hiện kể cả ở giống Basmati và các loại hình Jasmine khác. Phân tích haplotype cho thấy nguồn gốc của alen *badh 2.1* trong loại hình *japonica* và nó chứng minh rằng có sự du nhập alen này từ *japonica* vào *indica*. Các mẫu giống “Basmati-like” rất gần với tổ tiên *japonica* (haplotype) của chúng trên vùng có độ lớn 5,3 Mb chứa BADH2. Điều này cho thấy, có sự tiến hóa giữa các giống Basmati và nguồn gen *japonica*. Năm 2009, Vito M. Butardo cùng cộng sự thuộc CSIRO, Đại học Queensland (Australia) đã kết hợp với Melissa A. Fitzgerald (IRRI) thực hiện nghiên cứu di truyền chỉ số glycemic và “tinh bột kháng” (resistant starch) trong cây lúa bằng kỹ thuật làm im lặng gen (RNAi) (Fitzgerald và ctv. 2009, Butardo Vito et al. 2011). Chỉ số glycemic thấp và mức độ “resistant starch” cao rất có ích cho nghiên cứu di truyền phẩm chất gạo ở mức độ phân tử. Các dạng đồng phân của enzym có tính chọn lọc đối với tinh bột có thể biểu hiện (hoặc không biểu hiện) làm cho lộ trình hình thành tinh bột khá đa dạng trong quá trình làm ra amylose và amylopectin.

Thách thức đặt ra cho nhân loại là diện tích và lượng nước tưới cho nông nghiệp đang giảm đi trong khi dân số gia tăng. Như vậy, nhu cầu lương thực sẽ tăng gấp đôi vào năm 2050 so với 2000. Phẩm chất dinh dưỡng, phẩm chất thương mại là vấn đề mà các nước đang phát triển xuất phát từ nền nông nghiệp như nước ta cần quan tâm. **Với khẩu phần ít nhưng có tỷ lệ năng lượng trong hạt gạo cao, hàm lượng dinh dưỡng tốt và sẽ là lời giải hiệu quả cho cả bài toán lương thực và xuất khẩu nếu muốn thực hiện hiệu quả mục tiêu “dân giàu, nước mạnh”.**

Muốn vậy, chúng ta cũng nên dành nhiều cơ hội cho công nghệ sinh học phát triển một cách thuận lợi.

## 2. KHAI THÁC CÓ HIỆU QUẢ NHỮNG NGHIÊN CỨU GENOMICS

IRRI chú trọng cải tiến phương pháp nghiên cứu genomics như “**Sequenced breeding populations with predictive power on gene-phenotype relationships**” (thí dụ MAGIC: Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross, NAM: nested association mapping).

Có 3000 bộ gen của giống lúa được tiếp tục giải trình tự với 200.000 SNPs, trên cơ sở hợp tác của BGI, IRRI và CAAS nhằm khắc phục hiệu quả sử dụng vật liệu trong ngân hàng gen thấp.

Một tổ chức IRIC (International Rice Informatics Consortium) mới được thành lập khai thác kết quả giải trình tự và phân tích 3.000 genome cây lúa (2013). Cơ sở dữ liệu của “Rice Microbiome Database” trên cơ sở phân tích của hơn 18.000 giống lúa với 1.526 strains.

Năm 2005, IRRI đã đề nghị giải mã trình tự các vật liệu trong IRRI GeneBank, điều ấy đã trở thành hiện thực. Công nghệ mới “Nanopore Technology” sẽ giúp IRRI giảm được giá thành trong nội dung này. Họ tiến hành sequencing và đánh giá được ~10,000 mẫu giống lúa. Có 3.000 dòng lúa rất đa dạng, được xếp nhóm bằng chỉ thị phân tử (với mật độ cao - một triệu SNPs, trong genotyping Affy. arrays). Tham khảo <http://www.ricesnp.org> để tìm hiểu nội dung này. Đây là kết quả hợp tác với Cornell, USDA, AfricaRice, CIRAD, Bayer CropSciences, Syngenta, CIAT, BGI – CAAS, USAID.

Con đường mới của cải tiến giống lúa sẽ là “**Phenotype sequenced lines to support breeding**”. Đó là một nỗ lực có tính chất toàn cầu. IRRI đã cải tiến việc đánh giá kiểu hình bằng công cụ hiện đại “highthroughput phenotyping”. Đó là “**Tractor-based Field Scanner**” (máy quét trên ruộng nhờ máy cày di chuyển để đánh giá kiểu hình bằng robot, máy định vị). Người ta có thể áp dụng đánh giá kiểu hình các tính trạng có liên quan đến chống chịu khô hạn.

### 2-1. Năng suất hạt

Di truyền **năng suất hạt** trên cơ sở phân tích các gen có liên quan đến **nguồn và sức chứa** được Dr Naoki Hirotsu và ctv. thuộc ĐH Tokyo, Nhật công bố (2013). Gen *qTGW6* làm gia tăng khối lượng hạt mà không làm giảm đi tỷ lệ hạt chắc định vị trên nhiễm sắc thể số 6. **Sức chứa** (sink): tính trạng số hạt được qui định do hoạt động các gen đã được dòng hóa thành công: *Gn1a* (Ashikari et al 2005), *DEP1* (Huan et al 2009), *WFP* (Miura et al 2010). Tính trạng kích thước hạt (grain size) do các gen *GS3* (Fan et al 2006), *GW2* (Song et al 2007), *SW5* (Shomura et al 2008), *GS5* (Li et al 2011), *GL3* (Zhang et al 2012). Tính trạng có liên quan đến **nguồn** (source) hiện rất ít nghiên cứu, đáng kể là gen *GIF1* (Wang et al 2008) và *NALI* (Takai et al 2013). Kết quả dòng hóa thành công *qTGW6* được xem là sự kiện nổi bật đăng trên tạp chí Nature trong năm 2013

**Q. Qian** và ctv. (2013) Viện Nghiên Cứu Lúa Trung Quốc công bố về các gen qui định năng suất cao. Một series các gen *IPAI* (ideal plant architecture 1), *DEP1* (dense and erect panicle), *GW8* (grain weight) đã được dòng hóa, một QTL chủ lực trên giống japonica “Shaonijin”, mã hóa một TF có chứa SBP box, có khả năng làm giảm đẻ nhánh, làm thân rạ cứng, làm tăng số hạt, khối lượng hạt và năng suất.

### 2-2. Kháng bệnh đạo ôn và rầy nâu

Việc tạo một giống lúa mới mất 5-8 năm, nhưng tính kháng bệnh đạo ôn sẽ bị mất trong vòng 3-4 năm. Do đó, người ta phải tập trung nghiên cứu tương tác giữa ký chủ và ký sinh. Việc lập bản đồ và dòng hóa gen kháng (R) được nhiều tác giả công bố. Phân lập protein “effectors” và định tính protein này là nội dung đang được thực hiện tại các phong thí nghiệm của thế giới.

Các khái niệm về PTI (PAMP-triggered immunity) và ETI (effector-triggered immunity) được tập trung nghiên cứu và ứng dụng trong các chương trình chọn giống. Thêm vào đó, xu hướng áp dụng phương pháp phân tích GWAS (genome wide association study), lập bản đồ gen trên cơ sở LD (linkage disequilibrium), với số markers phủ trên vùng cần thiết cho GWAS trong nhóm indica là 50 kb, japonica nhiệt đới là 150 kb, và japonica ôn đới là 500 kb. GWAS là phương pháp rất hiệu quả để phân tích kiến trúc di truyền phức tạp trong tính kháng đạo ôn của cây lúa. Các protein “effectors” của *Magnaporthe oryzae* hiện được thảo luận khá chi tiết trong các hội thảo bệnh lúa.

Bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe grisea* gây ra nhiều thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều vùng trồng lúa của thế giới và Việt Nam (Khush và Jena 2009; Liu và ctv. 2010). Năng suất có thể mất 20-50% nếu không có gen kháng thích ứng ở vùng sản xuất lúa (Savary và ctv. 2000). Người ta quan tâm nhiều nhất về ảnh hưởng tương tác của “gen đối gen” (gene-for-gene) trong các mô phỏng về chiến lược tạo chọn giống lúa (Jia và ctv. 2000). Do tính chuyên biệt rất mạnh mẽ của nòi địa lý, tính kháng của đơn gen thường bị phá vỡ theo thời gian nhanh hay chậm còn tùy thuộc vào điều kiện áp lực chọn lọc của vùng trồng trọt (Hittalmani và ctv. 2000). Đến nay có hơn 86 gen kháng đạo ôn được thông báo (Huang và ctv. 2010; Xiao và ctv. 2010; Liu và ctv. 2005, 2010, Lin và ctv. 2007; Ballini và ctv. 2008; Chen và ctv. 2006; Xu và ctv. 2008; Deng và ctv. 2006). Hầu hết các gen kháng đều là alen trội, trừ gen *pi21*, và một vài trường hợp có tính chất kháng số lượng (Fukuoka và Okuno 2001; Hayashi và ctv. 2004; Zhou và ctv. 2004; Xu và ctv. 2008). Nhiều gen kháng định vị trên một chuỗi nhóm gen (gene clusters) tập trung ở nhiễm sắc thể 6, 9, 11, và 12 (Ballini và ctv. 2008; Qu và ctv. 2006; Lin và ctv. 2007). Cho đến nay, các gen được dòng hóa (cloned) bao gồm 18 gen kháng: *Pi37, Pit, Pish, Pib, Pi9, Pi2, Piz-t, Pi-d2, Pid3, Pi25, Pi36, Pi5, Pikm, Pi54, Pia, Pik-p, Pik*, và *Pita* (Liu và ctv. 2010; Sharma và ctv. 2010; Okuyama và ctv. 2011; Chen và ctv. 2011; Zhai và ctv. 2011; Yuan và ctv. 2011); 2 QTL, *pi21* và *Pb1* (Fukuoka và ctv. 2009; Hayashi và ctv. 2010).

Bệnh đạo ôn là đối tượng nguy hiểm cho sản xuất lúa Việt Nam, với DT gây hại xấp xỉ 10% DT gieo trồng. Tính kháng của giống bị phá vỡ sau hai năm ở ĐBSCL với mô hình canh tác thâm canh cao. Các loại thuốc được sử dụng phổ biến là FILIA-525EC, Kabim 30WP, Fujione 40EC, New Hynosan 30EC, Triazole 20WP, Beam 20WP, Rabcide 30WP. Giống kháng tương đối ổn định: IR1820, IR17494 ở miền Bắc; OM3536, OM2517 ở miền Nam. Các gen *Pi-1, Pi-5(t), Pi-3, Pi-4(t)* còn biểu hiện tính kháng đối với hầu hết các mẫu phân lập miền Bắc. Hai gen *Pi-z, Pik-m* biểu hiện tính kháng với các mẫu phân lập ở miền Nam. Giống Tẻ Tép của Việt Nam có 4 gen kháng: *Pi-k<sup>h</sup>* trên NST 11; *Pi-ta* trên NST 12; *Pitp* trên NST 1; và *Pi1* trên NST 11. Có 102 quần thể lúa hoang được phân tích với 38 SSRs đa hình với 4 cluster di truyền. *Oryza rufipogon*, *O. nivara* được khai thác có hiệu quả (gen *Pit, Pi20*). Năng hương (Acc 550) và Tẻ Tép (Acc 704) biểu hiện tính kháng cao với 11 mẫu phân lập /13 mẫu có độc tính mạnh nhất ở ĐBSCL

**H. Ji** và ctv. (2013) thuộc NICS, Korea đã công bố kết quả cloning gen kháng rầy nâu phổ rộng *Bph18*. Hiện có 28 gen chủ lực đã được công bố trên các tạp chí lớn của thế giới. Gen *Bph14* (*O. officinalis*) được dòng hóa thành công, ghi nhận những đóng góp của các nhà khoa học Trung Quốc trong khai thác gen kháng này vào lúa cao sản. Gen *Bph18* định vị trên nhiễm sắc thể 12 có cấu trúc 3 exon và 2 intron, mã hóa protein với những domain CC, NB, NBS, và LRR. Các tác giả đã thiết kế thành công vec tơ chuyển nạp trong pCAMBIA1300, với kích thước 14 kb, nhằm nghiên cứu sâu hơn về chức năng của gen kháng này (có nguồn gốc từ lúa hoang *Oryza australiensis*). Họ sử dụng GFP (green fluorescent protein) và RFP (red fluorescent protein) để theo dõi dấu vết của transgene. Kết luận: (1) gen *BPH18* định vị trên nhiễm sắc thể 12 mã hóa CC-NB-NBS-LRR protein thông qua kỹ thuật map-based cloning; (2) gen này biểu

hiện đặc biệt trong bó libe của bẹ lá thông qua dấu vết của GFP và RFP; (3) Protein BPH18 chủ yếu tập hợp tại bộ Golgi của tế bào cây lúa.

Jena và Kim (2010) đã sắp xếp danh mục gồm 21 gen kháng rầy nâu, trong đó, có 18 gen được xác định trên 6 nhiễm sắc thể với tài liệu minh chứng rõ ràng, thông qua phân tích di truyền phân tử. Các gen *Bph-1*, *bph-2*, *Bph-9*, *Bph-10*, *Bph-18* và *Bph-21* định vị trên vai dài của nhiễm sắc thể 12. Các gen *Bph-12*, *Bph-15*, *Bph-17* và *Bph-20* định vị trên vai ngắn của nhiễm sắc thể số 4. Các gen *bph-11*, *Bph-14* định vị trên vai dài của nhiễm sắc thể số 3 và *Bph-13(t)*, *bph-19* trên vai ngắn của nhiễm sắc thể này. Có 6 gen *Bph-11*, *bph-11*, *Bph-12*, *bph-12*, *Bph-13*, *bph-13* có nguồn gốc từ các loài lúa hoang, biểu thị tính chất lặp đoạn trên nhiễm sắc thể hoặc do định danh không được tạo ra những nhầm lẫn, cần phải được trắc nghiệm alen (allelism tests). Bên cạnh những nghiên cứu xác định gen chủ lực, người ta cũng quan tâm đến các QTLs liên quan đến kiểu hình kháng rầy nâu trên tám nhiễm sắc thể (Jena và Kim 2010). Hầu hết các giống lúa của IRRI phát triển từ một đến hai gen chủ lực kháng rầy nâu. Trong đó, IR64 là vật liệu có nhiều QTLs liên quan đến tính kháng rầy nhiều nhất. Hai gen kháng rầy nâu được phân lập từ lúa hoang *Bph-14*, *Bph-18* đã được dòng hóa (cloned) thành công. Một gen qui định lectin của cây hoa tuyết (*GNA*) cũng được phân lập và được sử dụng để phát triển giống lúa kháng rầy transgenic. Thành công trong việc đưa những gen *Bph-1*, *bph-2*, *Bph-3*, *Bph-14*, *Bph-15*, *Bph-18*, *Bph-20*, *Bph-21* vào giống lúa cao sản nhờ chỉ thị phân tử đã giúp cho các quốc gia trồng lúa xây dựng được bộ giống kháng rầy nâu ổn định trong chiến lược phát triển sản xuất ở vùng nhiệt đới và ôn đới (Jena và Kim 2010).

Dòng hóa gen mục tiêu nhờ BAC clone được thực hiện trên gen *Xa-21*, *Bph-10* (Lang và Bửu 2003). Gần đây, gen giả định điều khiển tính chống chịu hạn trên nhiễm sắc thể số 9 cũng được dòng hóa (Lang và ctv. 2010) trên cơ sở thành lập thư viện BAC của Viện Lúa ĐBSCL. Nguồn gen cho từ lúa hoang đã và đang được khai thác có hiệu quả. *Oryza rufipogon* (2n=24), genome AA, phân bố rộng khắp trên các vùng sinh thái Việt Nam. Một dòng dẫn xuất từ *O. rufipogon* có nguồn gốc ở Đồng Tháp Mười được khai thác thành công trong 20 năm qua là AS996 (mẹ là IR64, trong hồi giao nhờ chỉ thị phân tử). Nó là nguồn cho (donor) đối với tính kháng rầy nâu, đạo ôn và các tính trạng phi sinh học (abiotic) trong chương trình cải tiến giống lúa ở miền Nam. Dòng dẫn xuất từ loài *Oryza nivara* (Bà Rịa-VT) được khai thác thành công tạo dòng lúa kháng đạo ôn. Dòng dẫn xuất từ loài *Oryza rufipogon* (Đồng Tháp Mười), và *Oryza officinalis* (Bán đảo Cà Mau) trở thành nguồn cho gen kháng rầy nâu, gen *Bph-10*, thông qua phân tích quần thể con lai phân ly trồng đôn (bulk segregants), gen đích nằm trong khu vực 4,6 cM bao gồm sự hiện diện của 11 microsatellites và RFLPs trên nhiễm sắc thể 12. Gen kháng bệnh virus RSV, GSV do rầy nâu lan truyền cũng được phân tích. Hai chỉ thị STS được thiết kế từ trình tự RG457 có thể giúp nhà chọn giống xác định được các alen đồng hợp tử và dị hợp tử điều khiển gen *Bph-10* trong quần thể dòng phân ly. Chỉ thị SSR được đề nghị sử dụng trong chọn giống nhờ marker là RM227 và RM260 định vị trên nhiễm sắc thể 12. Hai dòng BAC là 7 I<sub>2</sub> và 16 C<sub>4</sub> (thư viện BAC của IRRI) được xác định nhờ kết quả chồng lấp tại locus RG457 trong bản đồ vật lý (đoạn phân tử 105 kb).

### 2-3. Chống chịu khô hạn

Khô hạn được xem là thách thức khó nhất, chưa có giải pháp chọn giống lúa nào được xem là hoàn hảo. Dr **Lizhong Xiong** (2013) thuộc ĐH Nông Nghiệp Huazhong, TQ, trình bày về chức năng của **SNAC1-OsSRO1c-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** trong việc điều khiển đóng mở khí khổng khi lúa bị stress do khô hạn. Tính trạng chống chịu khô hạn (DR) của cây lúa có nền tảng di truyền vô cùng phức tạp. Phương pháp đánh giá kiểu hình chưa được sự đồng thuận cao, rất khó thực hiện. Đây vẫn còn là thách thức lớn, là vấn đề tồn tại sau nhiều hội nghị quốc tế về di truyền cây lúa đã qua, để người ta có thể dòng hóa được các gen DR, thông qua sự tiếp cận với di truyền hiện đại.

Nghiên cứu này cho thấy nguồn các gen nội sinh tỏ ra khá triển vọng cho cải tiến giống lúa chịu hạn, nhưng cách ứng dụng phải được tối ưu hóa trong từng trường hợp riêng biệt. Ảnh hưởng của transgene trong các gen chứng minh được chức năng của mình về DR tùy thuộc rất lớn vào nền tảng di truyền của giống cho cụ thể nào đó (donors), không thể nói rằng tùy vào các giống cây trồng khác nhau. Phương pháp “Map-based cloning” rất khó vì mức độ chính xác của đánh giá kiểu hình trong một quần thể lớn để đồng hóa một QTL của DR có ảnh hưởng di truyền hẹp. Những gen ứng cử viên đã được công bố là:

1. SNAC1 (PNAS 2006)
2. LEA3 (TAG 2007)
3. CIPK12 (Plant Physiol 2007)
4. bZIP23 (Plant Physiol 2008)
5. TIFY11a (PMB 2009)
6. GTL1 (PMB 2009)
7. SKIPa (PNAS 2009)
8. DSM1 (Plant Physiol 2010)
9. DSM2 ((Plant Physiol 2010)
10. ILA1 (Plant Cell 2011)
11. bZIP46 (Plant Physiol 2012)
12. OsGH3-2 (JEB, 2012)
13. OsSRO1c (JEB, 2013)
14. DWA1 (PNAS 2013)

*SNAC1* được kích hoạt bởi tế bào có chức năng bảo vệ cây chống lại khô hạn. Sự thể hiện vượt trội của gen *SNAC1* làm cho khí khổng đóng lại, không ảnh hưởng gì đến quang hợp.

Tại VLDBSCL, phân tích QTL quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> cải tiến OM1490 / WAB880-1-38-18-20-P1-HB và khai thác BAC clone 13A9 liên kết với RM703 / nst 9, chỉ thị RM201, RM703 / nst9; Nguyễn Thị Lang và ctv. (2013) đã phát triển thành công các giống thích nghi với khô hạn ở giai đoạn mạ: OM6162, OM7347, OM7341, OM7345, OM8900

#### 2-4. Chống chịu stress phi sinh học khác

Mặn, độ độc nhôm, độc độc sắt, thiếu lân trong đất phèn, nhiệt độ nóng, ngập úng, v.v... là những stress phi sinh học có nhiều thành tựu trong phân tích genomics, hiện đang được ứng dụng khá hiệu quả. Khó khăn lớn nhất là đánh giá kiểu hình trên nhiều địa điểm khác nhau để hiểu được tương tác GxE vô cùng phức tạp. Trình tự di truyền của genome cây lúa như một tiêu chuẩn vàng cho ngành genome học của các cây mẽ cốc, với 37.544 gen mã hóa protein (Sakai và ctv. 2011). So sánh phương pháp “**Genomewide selection**” với phương pháp “Marker-assisted recurrent selection” trong cải tiến tính chống chịu stress như vậy cho thấy phương pháp mới **genomewide** sẽ rất hữu dụng cho chọn tạo giống lúa trong tương lai. Thách thức lớn nhất vẫn là nội dung đánh giá kiểu hình rất đồ sộ, phải có công cụ thích hợp như máy quét laser của IRRI hiện nay để giảm công lao động và chi phí thí nghiệm.

Zhikang Li và ctv. (2005) (CAAS, IRRI) đã sử dụng 260 vật liệu (trong đó có **OM1723** của Việt Nam) từ 15 quốc gia để thực hiện hồi giao với IR64 và Teqing. Kết quả thành công trên nhiều đối tượng như chống chịu khô hạn, mặn và sâu bệnh hại.

#### 2-5. Khai thác đa dạng nguồn vật liệu di truyền trong cải tiến giống lúa và vai trò tin sinh học

Chương trình quốc tế « **Rice Annotation Project 1** » (RAP1) từ năm 2004, bao gồm các nội dung: đặt tên và cho ký hiệu thống nhất trong ngân hàng dữ liệu, nghiên cứu genome học có tính chất so sánh với genome khác, ứng dụng thành tựu của genome học chức năng.

Các phần mềm chuyên dụng như *Fgenesh*, *Genscan*, *Glocate*, *BlatRice* đang được khuyến khích sử dụng để tìm kiếm gen mục tiêu, sau giai đoạn giải mã gen cây lúa thành công vang dội. Hiện có 69.002 loci đã được dự đoán, và 40.557 loci chồng lấp trên FL cDNA (trong đó, có 3892 vùng chồng lấp EST của cây lúa, và 3049 của cây một lá mầm khác).



Phương pháp tìm kiếm mỏ gen mục tiêu (**allele mining**) cũng được tập trung khai thác locus mới hoặc alen mới (Ebaka và Yano, Trung Tâm nghiên cứu tài nguyên genome cây lúa, Nhật) (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp>)

Bộ gen của lúa japonica đã được công bố với tổng số DNA trong lục thể (chloroplast) chiếm 0.04%, 134.551 cặp base; trong ty thể bộ chiếm 0,13%, 490.669 cặp base; trong nhân chiếm 99,84%, 382.151.945 cặp base. Tổng số cặp base là: 382.776.165. Đa hình trong loài phụ indica được phân tích với **2.500.000 SNP**, trong đó có 160.000 insertions + 160.000 deletions, với trung bình **6,8 SNP/kb**.

Ứng dụng này thể hiện cụ thể qua công trình của **Hei Leung** và ctv. (2013) tại IRRI, trên quần thể MAGIC trong nghiên cứu di truyền và chọn tạo giống lúa. MAGIC là chữ viết tắt của “**Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross**”. Tác giả thực hiện các bộ giống MAGIC trên đồng ruộng, với mục tiêu kháng stress sinh học và phi sinh học. Thực hiện khảo nghiệm kiến trúc quần thể với 634 SNP sites trên 12 nhiễm sắc thể cây lúa. Kết quả có 200 S4 indica MAGIC lines và 8 founders (tự tái bản). Thuật toán kèm theo phân tích này đã được hoàn thiện (MAGIC và MAGIC Plus). Tương tác GxE trong khảo nghiệm năng suất được phân tích bằng MAGIC Multi-Environment Trials (METs).