

- Phung, N., Mai, C., Mournet, P., Frouin, J., Droc, G., Ta, N., Jouannic, S., Lê, L., Do, V., Gantet, P. and Courtois, B., 2014. Characterization of a panel of Vietnamese rice varieties using DArT and SNP markers for association mapping purposes. *BMC Plant Biology*, 14 (371): 16 pp. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0371-7>.
- Sharma, N. and Khanna, R., 2019. Rice Grain Quality: Current Developments and Future Prospects. *Recent Advances in Grain Crops Research*: 17 pp. DOI: 10.5772/intechopen.89367.
- Tsai, M.-L., Lii, C.Y., 2000. Effect of hot-water-soluble components on the rheological properties of rice starch. *Starch - Stärke*, 52 (2-3): 44-53.

Study on amylose content, gelatinization temperature and gel consistency of local *indica* rice varieties

Hoang Thi Giang, Tran Hien Linh, Hoang Ngoc Dinh,
Do Van Toan, Vu Thi Huong, Vu Manh An

Abstract

Cooking quality is expressed by the ratio of amylose/amylopectin composition and amylopectin structure of rice grain starch. Amylose content, gelatinization and gel strength of 101 local *indica* rice varieties were analyzed and evaluated for further breeding and selection of high quality rice varieties. The rice varieties were planted in Hai Phong in the 2020 Summer crop and grains were harvested for analysing amylose content, gelatinization temperature and gel consistency. The results showed that the amylose content of the rice collection ranged from 1.9 – 20.3%. Most of rice varieties (93,1%) had low to medium amylose content. 21 varieties, accounting for 20.8% had medium gelatinization temperature. Nearly half of the rice collection had soft gel consistency. The standard of high quality rice preferred by the market is amylose content from 10 - 25%, medium gelatinization and soft gel consistency. Based on these criteria, 3 non - glutinous rice varieties, including G32, G140, G141 were selected and 2 glutinous rice varieties G111 and G150 were selected for production and further breeding.

Keywords: Local *indica* rice varieties, amylose content, gelatinization temperature, gel consistency

Ngày nhận bài: 15/11/2021

Ngày phản biện: 25/11/2021

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

Ngày duyệt đăng: 30/11/2021

PHÂN TÍCH QTL TÍNH TRẠNG PHÔI TO Ở LÚA

Nguyễn Thị Thúy Hạnh¹, Nguyễn Quốc Trung¹, Phạm Văn Cường²

TÓM TẮT

Đặc tính phôi to là một trong những mục tiêu quan trọng trong việc cải tiến các giống lúa hiện nay. Tỷ lệ khối lượng phôi/khối lượng hạt có liên quan đến hàm lượng dầu trong cám gạo dùng để sản xuất thức ăn chăn nuôi, nhiên liệu sinh học và dầu ăn. Nghiên cứu xác định QTL liên quan đến khối lượng phôi và diện tích phôi đã được thực hiện với việc sử dụng quần thể F₂ được tạo ra từ việc lai giữa dòng lúa đột biến MGE13-Mizuho-chikara (có kích thước phôi to) và giống Taichung65 (có kích thước phôi trung bình). Phương pháp phân tích sự phân ly theo nhóm lớn (BSA) được sử dụng để xác định các QTL liên quan đến tính trạng khối lượng và diện tích phôi hạt. Kết quả nghiên cứu đã xác định được 2 QTL trên nhiễm sắc thể số 7: qEW7 liên quan đến tính trạng khối lượng phôi và qES7 liên quan đến tính trạng diện tích phôi tương ứng. Cùng với đó, chỉ thị RM21721 liên kết với qEW7 và hai chỉ thị RM445 và RM21721 liên quan đến qES7. Các kết quả thu được từ nghiên cứu này là các thông tin hữu ích và có thể được sử dụng cho việc phát hiện và lựa chọn các cá thể mang QTL/gen quy định tính trạng phôi to trong việc chọn tạo các giống lúa.

Từ khóa: Cây lúa, phôi to, khối lượng phôi, diện tích phôi, bản đồ QTL

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

* Tác giả chính: E-mail: ntthanh.sh@vnua.edu.vn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỷ lệ phôi và nội nhũ rất đa dạng giữa các loài khác nhau. Tuy nhiên, tỷ lệ này có sự tương đối đồng đều trong cùng một loài. Điều này cho thấy, sự hiện diện của các nhân tố di truyền để giữ tỷ lệ kích thước giữa phôi và nội nhũ của hạt ở các loài. Những gen nào kiểm soát tỷ lệ của phôi và nội nhũ trong hạt đang phát triển? Đây là một câu hỏi quan trọng mà phần lớn vẫn chưa được trả lời trong các nghiên cứu sinh học thực vật.

Giống lúa *japonica* có khối lượng hạt lớn, tỷ lệ khối lượng phôi/khối lượng hạt và độ dày vỏ lụa cũng lớn hơn nên hàm lượng dầu trong cám thường cao hơn giống *indica* (Khin *et al.*, 2013). Trên thế giới, một số chương trình chọn tạo giống đã được thực hiện theo hướng tăng kích thước phôi và tăng độ dày vỏ lụa nhằm tăng hàm lượng lipid trong hạt gạo (Maeda *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2012). Một số tác giả đã sử dụng phương pháp xử lý phôi hạt bằng N-methyl-N-nitrosourea (MNU) để gây đột biến gen làm tăng kích thước phôi từ 2 đến 3 lần (Satoh and Omura, 1981). Đối với phân loài *japonica*, lần đầu tiên Satoh và Omura (1981) đã xác định được gen quy định kích thước phôi to - chi Kinmaze, nằm trên nhiễm sắc thể số 7. Cho đến nay, một số giống lúa phôi to đã được báo cáo (Maeda *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2012) và chỉ có hai gen liên quan đến việc tăng kích thước phôi đã được xác định trên nhiễm sắc thể số 7 ở lúa (Satoh and Iwata, 1990; Koh *et al.*, 1996; Nagasawa *et al.*, 2013). Koh và cộng tác viên (1996) xác định gen quy định phôi to - *ge^s* nằm trên nhiễm sắc thể số 7 bằng cách sử dụng quần thể được tạo ra từ Hwacheongbyeon, một giống lúa phôi siêu lớn và giống lúa Myliang 23. Ngoài ra, các tác giả cũng xác định được hai chỉ thị lặp lại trình tự đơn giản (SSR) nằm ở hai đầu của gen *ge^s*, cụ thể là chỉ thị RZ395 và CDO497 với khoảng cách lần lượt là 2,4 và 3,4 cM. Bên cạnh đó, hai chỉ thị đa hình độ dài phân đoạn giới hạn (RFLP) RM18 và RM10 cũng được tìm thấy có liên kết với gen *ge^s* với khoảng cách tương ứng là 7,7 cM và 9,6 cM. Một số tác giả khác đã xác định được gen *ge* cho kích thước phôi lớn nằm trên nhiễm sắc thể số 7 liên kết với cặp chỉ thị phân tử RM243 và RM420 (Yann *et al.*, 2009) và gen *ge^t* (Park *et al.*, 2009). Nagasawa và cộng tác viên (2013) chỉ ra rằng gen *ge* mã hóa CYP78A13, một protein cytochrome P450, và có chức năng xác định kích thước phôi/nội nhũ. Trịnh

Hồng Kiên và cộng tác viên (2010) đã báo cáo gen *re-1* liên quan đến quy định kích thước phôi, nằm trên nhiễm sắc thể số 1 giữa 2 chỉ thị RM315 và RM256 với chiều dài 1,5 cM khi các tác giả nghiên cứu các dòng đột biến của giống Taichung 65. Tuy nhiên, ở Việt Nam hầu như chưa có công bố về bản đồ gen /QTL về tình trạng phôi to ở lúa.

Một trong những phương pháp đang được sử dụng rộng rãi để phát hiện nhanh chóng các chỉ thị DNA và lập bản đồ các tính trạng là việc phân tích sự phân ly theo nhóm lớn (Bulked Segregant Analysis BSA). Cơ sở của phương pháp này, lần đầu tiên được mô tả để sử dụng trong di truyền thực vật bởi Michelmore và cộng tác viên (1991), là tất cả các alen đều hiện diện khi DNA được nhóm lại từ một nhóm cây có cùng kiểu hình. Do đó, hai nhóm lớn các cá thể tách biệt khác nhau về một đặc điểm sẽ chỉ khác nhau ở vị trí quy định đặc điểm đó trên nhiễm sắc thể. Ưu điểm lớn nhất của BSA so với phương pháp phân tích QTL khác là không cần thiết phải xác định kiểu gen và định dạng kiểu hình từng cá thể trong số hàng trăm cá thể trong một quần thể phân ly. Thay vào đó, bằng cách nhóm các cây theo mức độ biến động các giá trị nhỏ nhất và lớn nhất của một tính trạng cụ thể và tách chiết ADN từ hai nhóm này, quá trình phân loại kiểu gen sẽ giảm xuống chỉ còn hai mẫu ADN cần phân tích.

Trong nghiên cứu này, quần thể lúa F₂ được tạo ra từ phép lai giữa hai mẫu giống lúa MGE13 và Taichung 65, và bản đồ chỉ thị phân tử với 56 chỉ thị phân bố trên các nhiễm sắc thể đã được sử dụng để nghiên cứu và phân tích QTL liên quan đến tính trạng phôi to ở lúa sử dụng phương pháp BSA. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là: (1) để kiểm tra sự biến đổi của khối lượng và diện tích phôi ở quần thể lúa thí nghiệm, (2) để xác định các QTL liên quan đến khối lượng và diện tích của phôi và (3) để hiểu rõ hơn về yếu tố quyết định di truyền liên quan đến khối lượng và diện tích phôi. Kết quả thu được từ nghiên cứu này có thể cung cấp thông tin và vật liệu cho việc nhân giống lúa phôi to.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng tổng số 200 cá thể của quần thể F₂ được tạo ra từ phép lai giữa hai mẫu giống lúa MGE13 và Taichung 65. MGE13 là mẫu giống đột biến của Mizuhochikara được xử lý bằng N-methyl-N-nitrosourea (MNU) để tạo ra phôi to

và Taichung 65 là một mẫu giống lúa có kích thước phôi trung bình. Những mẫu giống bố mẹ này được cung cấp bởi Đại học Kyushu, Nhật Bản.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm đồng ruộng

Thí nghiệm đồng ruộng được thực hiện trên ruộng lúa tại Trung tâm Nghiên cứu Thực vật Việt Nam và Nhật Bản - Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 01 đến tháng 6 năm 2020. Tổng số 200 hạt của quần thể F_2 và 50 hạt của mỗi mẫu giống bố và mẹ được gieo riêng trong khay nhựa. Khi cây con được 4 - 5 lá thật, các cây đơn được cấy tuần tự không nhắc lại trong ô thí nghiệm với khoảng cách hàng cách hàng 30 cm, cây cách cây 15 cm. Dải bảo vệ xung quanh ô thí nghiệm là 1 m. Các loại phân bón được bón theo quy định thí nghiệm đồng ruộng với lượng phân bón NPK tương ứng như sau: 120 kg N ha⁻¹; 90 kg ha⁻¹ mỗi loại P₂O₅ và K₂O. Tất cả các loại phân bón đều được bón bằng tay. Quản lý thí nghiệm đồng ruộng, nước tưới và sử dụng hóa chất để kiểm soát sâu bệnh và dịch hại được thực hiện theo quy trình thường áp dụng với cây lúa để tránh mất năng suất trong toàn bộ thời gian sinh trưởng lúa.

2.2.2. Thu mẫu và đo các tính trạng

a) Đo kích thước của phôi

Các hạt chắc của mỗi cá thể F_2 và các mẫu giống bố mẹ được tách bằng tay, sau đó tách bỏ vỏ trấu và ngâm với cồn 70% trong 24 giờ để làm mềm hạt. Các hạt được cắt theo chiều dọc bằng lưỡi lam, sau đó các mặt cắt ngang được chụp ảnh và phân tích trong phần mềm Image J 1.4.3 (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Tỷ lệ phôi được tính bằng diện tích phôi/ diện tích hạt. Mười hạt của mỗi cây được đo và tính trung bình (Sakata *et al.*, 2016).

b) Đo khối lượng phôi khô

Để đo khối lượng phôi khô, chọn 10 hạt chắc của mỗi cá thể F_2 và hai mẫu giống bố mẹ, sau đó tách bỏ vỏ trấu. Các phôi được tách ra từng cái một. Sau khi sấy khô cho đến khi khối lượng ổn định, phôi được đem đi cân.

2.2.3. Khảo sát hệ gen của các mẫu giống bố mẹ và quần thể F_2

a) Tách chiết ADN

Lá của các cây F_2 và hai mẫu giống bố mẹ được lấy mẫu ở 30 ngày sau khi cấy, sau đó đông khô để

bảo quản và dùng để tách chiết ADN. ADN tổng số của mỗi cá thể F_2 và mỗi mẫu giống bố mẹ được tách chiết bằng cách sử dụng potassium acetate-SDS, đã được mô tả bởi Dellaporta và cộng tác viên (1983) bao gồm mười sáu bước trong quy trình với những thay đổi nhỏ. Các mẫu ADN sẽ được sử dụng cho phản ứng chuỗi polymerase (PCR).

b) Chỉ thị phân tử

Nghiên cứu đã sử dụng tổng cộng có 1381 chỉ thị phân tử SSR được lựa chọn từ bộ 2200 chỉ thị đã được công bố bởi McCouch và cộng tác viên (2002) để khảo sát toàn bộ bộ gen.

c) Phản ứng chuỗi polymerase (PCR)

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích dung dịch là 10 μ L, chứa 1 μ L mỗi dung dịch mỗi (tổng cộng 2 μ L cho mỗi thuận và nghịch) ở nồng độ 10 μ mol L⁻¹, 5 μ L hỗn hợp 2X GoTaq[®] Green Master Mix, 1 μ L mẫu DNA và 2 μ L nước không chứa nuclease. Phản ứng PCR được thực hiện trong một bộ tuần hoàn nhiệt (ABI) với 95°C trong 5 phút trong 1 chu kỳ; 94°C trong 30 giây, 53°C đến 55°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây trong 35 chu kỳ; và 72°C trong 7 phút cho 1 chu kỳ. Các sản phẩm PCR có kích thước dao động từ 100 - 400 bp, và từ tất cả 12 nhiễm sắc thể.

d) Điện di và phát hiện chỉ thị đa hình

Các sản phẩm PCR (8 μ L) được điện di trên gel agarose 4% (khối lượng/thể tích) có bổ sung thêm ethidium bromide trong đệm 1×TAE ở 250 V trong 40-50 phút tùy thuộc vào kích thước khác nhau giữa các đoạn ADN được khuếch đại với các chỉ thị SSR tương ứng. Kết quả đã được quan sát dưới đèn chiếu tia cực tím.

e) Xây dựng bản đồ vật lý

Bản đồ vật lý được xây dựng dựa trên vị trí thực tế của các chỉ thị phân tử trên 12 nhiễm sắc thể ở lúa. Việc xác định vị trí của các chỉ thị phân tử dọc theo mỗi nhiễm sắc thể trong số 12 nhiễm sắc thể đã được hoàn thành bằng cách sử dụng phần mềm BLAST. Sau đó, bản đồ vật lý theo thứ tự của các chỉ thị phân tử được xây dựng sử dụng phần mềm MAPMAKER Ver.3.0 để tính toán khoảng cách di truyền (cM) giữa các chỉ thị phân tử theo công thức Kosambi (Kosambi, 1944). Bản đồ liên kết chỉ thị phân tử được vẽ bằng phần mềm GGT Ver.2.0 (Van Berloo and Stam, 1999) sử dụng dữ liệu về khoảng cách di truyền giữa các chỉ thị đã được tính toán.

2.2.4. Phân tích QTL

a) Phân tích thống kê

Số liệu của các tính trạng nghiên cứu đã được xử lý thống kê để xác định phân phối chuẩn với từng bộ số liệu cho từng tính trạng theo dõi.

b) Phân tích sự phân ly theo nhóm lớn (BSA)

Phương pháp phân tích sự phân ly theo nhóm lớn (BSA) được sử dụng để xác định các chỉ thị SSR được liên kết với các locus. Với mục đích này, lượng ADN bằng nhau từ nhóm có giá trị thấp nhất và cao nhất về khối lượng phôi và kích thước phôi của các cá thể F_2 đã được sử dụng để phát hiện các chỉ thị DNA đa hình. Các chỉ thị DNA thể hiện tính đa hình được xác định là có liên quan với các QTL đối với tính trạng khối lượng phôi và kích thước phôi.

c) Danh pháp QTL

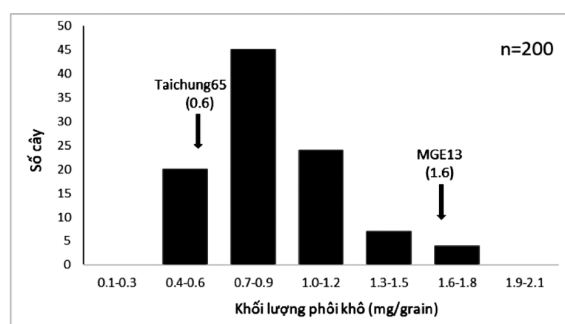
Các QTL được đặt tên dựa vào tính trạng mà QTL có ảnh hưởng và thông tin nhiễm sắc thể nơi xác định có QTL (Zhang *et al.*, 2019). Ví dụ, QTL ảnh hưởng đến tính trạng khối lượng phôi được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 7 được đặt tên là qEW7 (trong đó, q: QTL; EW: khối lượng phôi - Embryo Weight; 7: số thứ tự của NST nơi xác định có QTL).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự biến động và phân ly kích thước phôi ở quần thể F_2

3.1.1. Sự biến động và phân ly tính trạng khối lượng phôi khô ở quần thể F_2

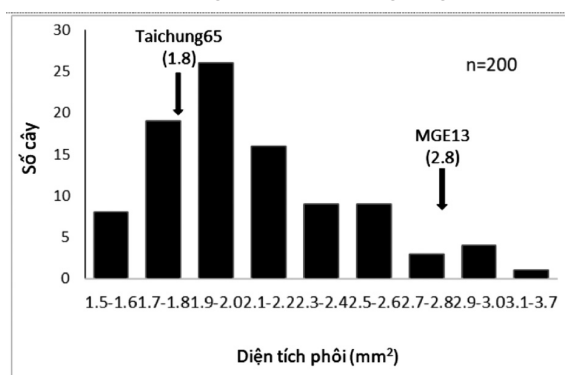
Khối lượng phôi khô được đo sau khi phôi đã tách khỏi nội nhũ và sấy khô đến khối lượng không đổi. Tổng số 200 cá thể F_2 và các mẫu giống bố mẹ đã được đánh giá. Khối lượng phôi của các hạt F_2 dao động từ 0,5 đến 1,8 mg, so với khối lượng của 2 mẫu giống bố mẹ là 0,6 và 1,6 mg tương ứng với mẫu giống Taichung65 và MGE13 (Bảng 1-Phụ lục). Đánh giá sự phân ly tính trạng khối lượng phôi ở F_2 (Hình 1) cho thấy có sự phân ly liên tục từ 0,5 đến 1,8 mg, giá trị kiểu hình của 2 mẫu giống bố mẹ từ 0,6 và 1,6 mg nằm trong khoảng biến động của các cá thể trong quần thể F_2 . Các giá trị khối lượng phôi ở F_2 tuân theo quy luật phân phối chuẩn. Một số cá thể F_2 có giá trị kiểu hình cao hơn giá trị của mẫu giống bố và mẹ.



Hình 1. Phân bố tần suất tính trạng khối lượng phôi khô trong quần thể F_2 và hai mẫu giống bố mẹ

3.1.2. Sự biến động và phân ly tính trạng diện tích phôi ở quần thể F_2

Diện tích phôi hạt của mỗi 200 cá thể F_2 và hai mẫu giống bố mẹ được đánh giá. Diện tích phôi dao động từ 1,5 đến 3,7 mm² ở quần thể F_2 trong khi giá trị tính trạng này ở hai mẫu giống bố mẹ là 1,8 và 2,8 mm² tương ứng đối với Taichung65 và MGE13 (Bảng 2-Phụ lục). Đánh giá sự phân ly tính trạng diện tích phôi ở F_2 (Hình 2) cho thấy các giá trị có sự phân ly liên tục từ 1,5 đến 3,7 mm² và giá trị kiểu hình của 2 mẫu giống bố mẹ là 1,8 và 2,8 mm² nằm trong trong khoảng biến động của các cá thể trong quần thể F_2 . Các giá trị diện tích phôi ở F_2 tuân theo quy luật phân phối chuẩn. Một số cá thể F_2 có giá trị kiểu hình cao hơn giá trị của mẫu giống bố và mẹ.



Hình 2. Phân bố tần suất tính trạng diện tích phôi hạt trong quần thể F_2 và hai mẫu giống bố mẹ

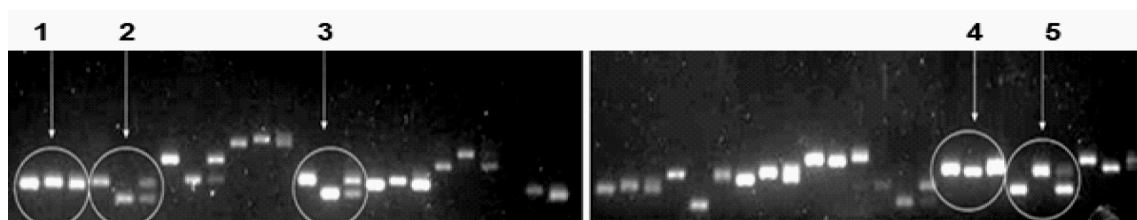
3.2. Khảo sát bộ gen về kích thước phôi ở các dòng bố mẹ và quần thể F_2

3.2.1. Khảo sát bộ gen về kích thước phôi ở hai mẫu giống bố mẹ

DNA tổng số từng mẫu giống bố mẹ: MGE13 và Taichung65 đã được tách chiết thành công. Sau khi tách chiết, DNA đã được kiểm tra với 1381 chỉ thị SSR được lựa chọn trong danh sách 2200 chỉ thị

phân tử được công bố bởi McCough và cộng tác viên (2002). Những chỉ thị đa hình sẽ được chọn là các chỉ thị cho kết quả là các băng vạch DNA rõ ràng, băng vạch phân biệt giữa MGE13 và Taichung65 với kích thước dải PCR nằm trong khoảng từ 100 đến 400 bp (Hình 3). Các chỉ thị được chọn sẽ được dùng để khảo sát tiếp quần thể F_2 .

Kết quả đã xác định được 56 chỉ thị trong số 1381 chỉ thị được khảo sát, chiếm 4,1%. Số lượng chỉ thị phân bố dọc theo mỗi nhiễm sắc thể dao động từ 2 đến 8. Nhiễm sắc thể số 10 chỉ có 2 chỉ thị dọc theo nhiễm sắc thể trong khi nhiễm sắc thể số 9 và 12 có 8 chỉ thị (Bảng 1, Bảng 3-Phụ lục).



Hình 3. Khảo sát bộ gen của MGE13 và Taichung65 với một số chỉ thị phân tử để xác định chỉ thị đa hình
Ghi chú: 2,3,5 là các chỉ thị đa hình với các băng vạch rõ nét và có kích thước phân biệt giữa MGE13 và Taichung65. 1,4 là các chỉ thị không đa hình với các băng có kích thước không phân biệt giữa MGE13 và Taichung65.

Bảng 1. Số lượng chỉ thị phân tử trên mỗi nhiễm sắc thể (NST) của MGE13 và Taichung65

NST	Số chỉ thị phân tử sử dụng để khảo sát	Số chỉ thị đa hình được lựa chọn	NST	Số chỉ thị phân tử sử dụng để khảo sát	Số chỉ thị đa hình được lựa chọn
1	152	5	7	93	3
2	138	4	8	117	4
3	96	4	9	101	8
4	73	5	10	92	2
5	99	4	11	150	6
6	114	3	12	156	8
<i>Tổng số</i>				1.381	56

3.3. Phân tích thống kê và lập bản đồ các QTL liên quan đến kích thước phôi

3.3.1. Phân tích thống kê và lập bản đồ QTL liên quan đến tính trạng khối lượng phôi khô

Để xác định các QTL liên quan đến tính trạng khối lượng phôi khô, phân tích sự phân ly theo nhóm lớn BSA đã được sử dụng. Theo phương pháp này, các cá thể của quần thể F_2 được phân

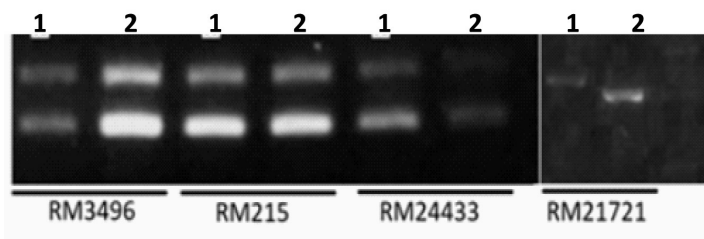
thành 02 nhóm: nhóm có giá trị khối lượng phôi khô thấp nhất: từ 0,5 - 0,6 mg gồm 18 cá thể và nhóm có giá trị khối lượng phôi khô cao nhất: từ 1,5 - 1,8 mg gồm 10 cá thể (Bảng 2). Các mẫu ADN của các cá thể thuộc hai nhóm này được trộn với cùng nồng độ để so sánh chỉ thị ADN. Các locus di truyền khác biệt rõ rệt giữa hai nhóm này sẽ tương ứng với các QTL quy định tính trạng khối lượng phôi khô.

Bảng 2. Kết quả phân nhóm theo phương pháp BSA đối với khối lượng phôi khô (KLPK)

Nhóm	KLPK (mg/grain)	Số lượng cá thể F_2	Cá thể F_2
Nhóm KLPK thấp nhất	0,5 - 0,6	18	15, 18, 34, 35, 47, 49, 54, 55, 75, 87, 136, 140, 144, 154, 158, 161, 171, 184
Nhóm KLPK cao nhất	1,5 - 1,8	10	43, 46, 51, 65, 107, 110, 111, 121, 191, 192
Taichung	0,6		
GME13	1,6		

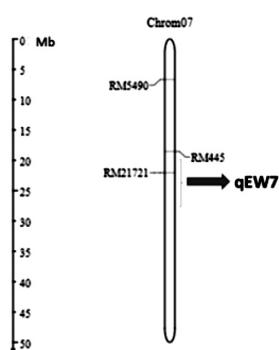
So sánh kết quả PCR xác định kiểu gen của 56 locus bằng chỉ thị đa hình cho thấy chỉ có một chỉ thị RM21721 cho sản phẩm PCR có kích thước khác biệt rõ ràng giữa 2 nhóm cá thể có kiểu hình khối lượng phôi khô cao nhất và thấp nhất, 55/56 chỉ thị không có sự khác biệt về kích thước sản phẩm phản ứng PCR (Hình 4). Kết quả phân tích

QTL bằng phương pháp BSA cho thấy có 1 QTL liên quan đến tính trạng khối lượng phôi khô nằm gần chỉ thị RM21721 trên nhiễm sắc thể số 7 ở vị trí vật lý 20.073.051 bp (Hình 5). Dựa trên nguyên tắc đặt tên QTL, QTL được xác định ở nghiên cứu này liên quan đến tính trạng khối lượng phôi khô là qEW7.



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR một số chỉ thị DNA cho 2 nhóm khối lượng lớn phôi

Ghi chú: 1. Nhóm có kiểu hình khối lượng phôi khô thấp nhất; 2. Nhóm có kiểu hình khối lượng phôi khô cao nhất.



Hình 5. Bản đồ vị trí của QTL qEW7 trên nhiễm sắc thể số 7

3.3.2. Phân tích thống kê và lập bản đồ QTL liên quan đến tính trạng diện tích phôi

Tương tự như xác định QTL liên quan đến khối lượng phôi, các cá thể của quần thể F₂ được xếp thành nhóm có giá trị diện tích phôi thấp nhất gồm 9 cá thể có diện tích phôi 1,5 - 1,6 mm² và nhóm các cá thể có giá trị diện tích phôi cao nhất gồm 8 cá thể có giá trị diện tích phôi là 2,7 - 3,7 mm² (Bảng 3). Các mẫu ADN của các cá thể thuộc hai nhóm này được trộn với cùng nồng độ để so sánh chỉ thị ADN. Các locus di truyền khác biệt rõ rệt giữa hai nhóm này sẽ tương ứng với các QTL quy định cho tính trạng diện tích phôi.

Bảng 3. Kết quả phân nhóm theo phương pháp BSA đối với diện tích phôi (DTP)

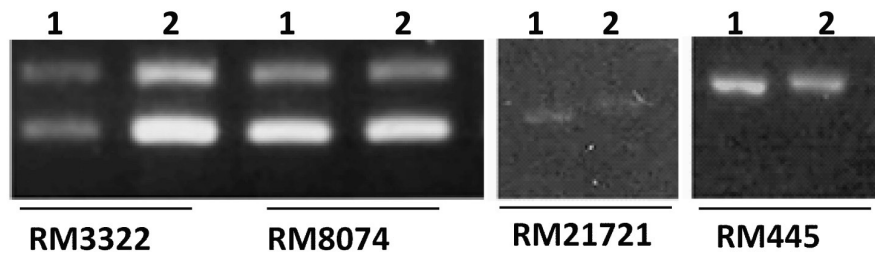
Nhóm	DTP (mm ²)	Số lượng cá thể F ₂	Cá thể F ₂
Nhóm DTP thấp nhất	1,5 - 1,6	9	35, 55, 66, 140, 154, 155, 173, 186, 194
Nhóm DTP cao nhất	2,7 - 3,7	8	43, 103, 107, 111, 121, 122, 148, 191
Taichung	1,8		
GME13	2,8		

So sánh kết quả PCR xác định kiểu gen của 56 locus bằng chỉ thị đa hình cho thấy có 2 chỉ thị RM445 và RM21721 cho sản phẩm PCR có kích thước khác biệt rõ ràng (Hình 6), 54/56 chỉ thị chỉ thị không có sự khác biệt về kích thước sản phẩm phản ứng PCR. Kết quả phân tích QTL bằng phương pháp BSA cho thấy có 1 QTL liên quan đến

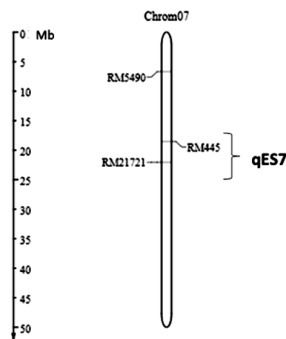
tính trạng diện tích phôi nằm ở vùng 2 chỉ thị phân tử RM445 và RM21721 trên nhiễm sắc thể số 7 ở vị trí vật lý 17.409.772 và 20.073.051 bp (Hình 7). Dựa trên nguyên tắc đặt tên QTL, QTL được xác định ở nghiên cứu này liên quan đến tính trạng khối lượng phôi khô là qES7.

Vị trí của qES7 khá trùng khớp với qEW7, cho thấy mối tương quan giữa diện tích và khối lượng phôi: diện tích/kích thước càng lớn thì trọng lượng

khô của phôi càng cao. Hai QTL qEW7 và qES7 đều nằm gần chỉ thị RM21721.



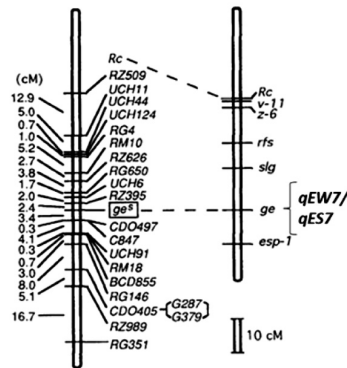
Hình 6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR một số chỉ thị DNA cho 2 nhóm diện tích phôi
Ghi chú: 1. Nhóm có kiểu hình diện tích phôi thấp nhất; 2. Nhóm có kiểu hình diện tích phôi cao nhất.



Hình 7. Bản đồ vị trí của QTL qES7 trên nhiễm sắc thể số 7

Năm 1981, Satoh và Iwata nghiên cứu trên các dòng lúa dị bội nhận thấy giống lúa mang 3 nhiễm sắc thể số 7 liên quan đến kích thước phôi to và xác định được gen đột biến *ge* liên quan đến tính trạng đó. Năm 1996, Koh và cộng tác viên đã áp dụng phương pháp BSA trên quần thể F₂ được tạo ra từ tổ hợp lai Hwacheongbyeoge và Milyang23 với 38 chỉ thị RFLP đã xác định được gen *ge* nằm giữa hai chỉ thị RZ395 và CDO497 trên nhiễm sắc thể số 7. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Sakata và cộng tác viên (2016), gen *Os07g0603700* được xác định trên nhiễm sắc thể số 7 trong các dòng đột biến EM40, MGE12 và MGE13 ở giống lúa Mizuhochikar được xử lý bằng hợp chất N-methyl-N-nitrosourea (MNU). Vị trí đột biến trong trình tự gen của 3 dòng EM40, MGE12 và MGE13 được xác định lần lượt ở các vị trí 1482, 994 và 1180 bp. Do đó, có thể kết luận sơ bộ rằng, các QTL được xác định ở nghiên cứu này liên quan đến diện tích phôi và khối lượng phôi khô, qES7 và qEW7 tương ứng với gen *ge/Os07g0603700* (Hình 8); chỉ thị RM21721

liên kết với qEW7 và chỉ thị RM445 và RM21721 liên quan đến qES7.



Hình 8. Bản đồ vị trí của gen *ge* (Koh *et al.*, 1996) và qEW7, qES7 trên nhiễm sắc thể số 7

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hiện tại đã xác định được 2 QTL trên nhiễm sắc thể số 7 là qEW7 liên quan đến tính trạng khối lượng phôi và qES7 liên quan đến tính trạng diện tích phôi hạt. Chỉ thị RM21721 liên kết với qEW7 và hai chỉ thị RM445 và RM21721 liên quan đến qES7 đã được xác định trong nghiên cứu này là các thông tin hữu ích và có thể được sử dụng cho việc phát hiện và lựa chọn cá thể mang QTL/gen quy định tính trạng phôi to trong việc chọn tạo các giống lúa.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Dự án SPĐP 08/19 của Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks**, 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4): 19-21.
- Han, S.J., S.W. Kwon, S.H. Chu and S.N. Ryu**, 2012. A new rice variety 'Keunnunjami,' with high concentrations of Cyanidin 3-glucoside and Giant embryo. *Korean Journal of Breed Science*, 44 (2): 185-189.
- Hong, H.C., Y.G. Kim, Y.H. Choi, S.J. Yang, K.S. Lee, J.H. Lee, O.Y. Jung, C. I. Yang, Y.C. Cho, I.S. Choi, M.K. Baek, M.K. Kim, J.D. Yea, H.G. Hwang, J.H. Roh, S.L. Kim, H.C. Choi, Y.T. Lee and S.H. Lee**, 2012. A Medium-Maturing, Giant-embryo, and Germination Brown Rice Cultivar 'Keunnun'. *Korean Journal of Breed Science*, 44 (2): 160-164.
- Khin, O.M., M. Sato, T. Li-Tao, Y. Matsue, A. Yoshimura and T. Mochizuki**, 2013. Close Association between Aleurone Traits and Lipid Contents of Rice Grains Observed in Widely Different Genetic Resources of *Oryza sativa*. *Plant Production Science*, 16 (1): 41-49.
- Koh, J.H., H.M. Heu and S.R. McCouch**, 1996. Molecular mapping of the *ge s* gene controlling the super-giant embryo character in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (1): 257-261.
- Kosambi, D.D.**, 1944. The Estimation of Map Distances from Recombination Values. *Annals of Eugenics*, 12: 172-175.
- Maeda, H., H. Nemoto, S. Iida, T. Ishii, N. Nakagawa, T. Hoshino, M. Sakai, M. Okamoto, H. Shinoda and T. Yoshida**, 2001. A New Rice Variety with Giant Embryos, "Haiminori & rdquo. *Breeding Science*, 51 (3): 211-213.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein**, 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 9 (6): 199-207.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli**, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked Segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 88 (21): 9828-9832.
- Nagasawa, N., K. Hibara, E.P. Heppard, K.A. Vander Velden, S. Luck, M. Beatty, Y. Nagato and H. Sakai**, 2013. GIANT EMBRYO encodes CYP78A13, required for proper size balance between embryo and endosperm in rice. *Plant Journal*, 75 (4): 592-605.
- Park, D.S., S.K. Park, B.C. Lee, S.Y. Song, N.S. Jun, N.L. Manigbas, J.H. Cho, M.H. Nam, J.S. Jeon, C.D. Han, K.J. Choi, D.H. Kim, Y. Woo, H.J. Koh, H.W. Kang and G. Yi**, 2009. Molecular characterization and physico-chemical analysis of a new giant embryo mutant allele (*ge¹*) in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes and Genomics*, 31: 277-282.
- Sakata, M., M. Seno, H. Matsusaka, K. Takahashi, Y. Nakamura, Y. Yamagata, E. R. Angeles, T. Mochizuki, T. Kumamaru, M. Sato, A. Enomoto, K. Tashiro, S. Kuhara, H. Satoh and A. Yoshimura**, 2016. Development and evaluation of rice giant embryo mutants for high oil content originated from a high-yielding cultivar 'Mizuhochikara'. *Breeding Science*, 66: 425-433. doi:10.1270/jsbbs.15135.
- Satoh, H. and T. Omura**, 1981. New endosperm mutation induced by chemical mutagen in rice, *Oryza sativa* L. *Japanese Journal of Breeding*, 31 (3): 316-326.
- Satoh, H. and N. Iwata**, 1990. Linkage analysis in rice on three mutant loci for endosperm properties, *ge* (giant embryo), *du-4* (dull endosperm-4) and *flo-1* (floury endosperm-1). *Japanese Journal of Breeding*, 40 (Suppl. 2): 268-269.
- Takahashi, S., T. Ohtani, S. Iida, Y. Sunohara, K. Matsushita, H. Maeda, Y. Tanetani, K. Kawai, M. Kawamukai and K. Kadowaki**, 2009. Development of CoQ10-enriched rice from giant embryo lines. *Breeding Science*, 59 (3): 321-326.
- Trinh, H.K., J.M. Oh, P. Yang, S.K. Hong and S.N. Ahn**, 2010. Analysis and mapping of the *re-1* gene for reduced embryo size in rice. *Korean Journal Breeding Science*, 42 (1): 23-27.
- Van, B.R and P. Stam**, 1999. Comparison between marker-assisted selection and phenotypical selection in a set of Arabidopsis thaliana recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 113-118.
- Yann, R. L, S.H. Chiang and Y.P. Wu**, 2009. Fine mapping of the giant embryo gene *GE2* in rice. In *International Symposium. Rice Research in the Era of Global Warning*: 17-30.
- Zhang, F., J. Kang, R. Long, L.X. Yu., Z. Wang., Z. Zhao., T. Zhang and Q. Yang**, 2019. High-density linkage map construction and mapping QTL for yield and yield components in autotetraploid alfalfa using RAD-seq. *BMC Plant Biology*, 19: 165 pp. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1770-6>

Quantitative trait locus (QTLs) mapping for the giant embryo in rice

Nguyen Thi Thuy Hanh, Nguyen Quoc Trung, Pham Van Cuong

Abstract

The giant-embryo trait is one of the important goals in improving rice varieties. The ratio of embryo weight/grain weight is related to the oil content of rice bran which is used for producing animal feed, biofuel and edible oil. The present study was carried out to determine QTL related to embryo weight and embryo area by using the F₂ population generated from crossing between the mutant rice line MGE13-Mizuhochikara (with giant embryo) and the Taichung65 cultivar (medium embryo). The Bulk Segregation Analysis (BSA) was used to identify QTLs related to embryo weight and area. The results showed that 2 QTLs were identified on chromosome 7: qEW7 related to embryo weight and qES7 related to embryo area, respectively. Taken together, the RM21721 marker associated with qEW7 and the two markers RM445 and RM21721 related to qES7. The obtained results from this study will be useful information and might be used for detection and selection of individuals carrying the QTL/gene for giant embryo in rice breeding.

Keywords: Rice, giant embryo, embryo weight, embryo area, QTL mapping

Ngày nhận bài: 21/10/2021

Người phản biện: TS. Vũ Đăng Toàn

Ngày phản biện: 03/11/2021

Ngày duyệt đăng: 30/11/2021

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY PHÔI TRONG LAI XA HAI LOÀI LÚA KHÁC NHAU

Nguyễn Hữu Minh^{1*}, Trần Thu Thảo¹, Phạm Công Trí¹,
Hà Minh Luân¹, Võ Thanh Toàn¹

TÓM TẮT

Cứu phôi là phương pháp thường được sử dụng để vượt qua những rào cản về mặt di truyền khi lai xa hai loài lúa khác nhau. Hai giống OM5451 và OM6162 thuộc loài *Oryza sativa*, hai loài lúa hoang *Oryza rufipogon* và *Oryza officinalis* được sử dụng để lai tạo và thực hiện cứu phôi trong lai xa. Thí nghiệm lai tạo và thí nghiệm xác định môi trường thích hợp cho nuôi cấy được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 11 môi trường, 3 lần lặp lại. Kết quả cho thấy môi trường cơ bản của Murashige and Skoog (1962) thêm 3% sucrose và 0,2 mg/L NAA cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất ở tất cả 4 tổ hợp lai, chiều dài thân lá, chiều dài rễ và số lượng rễ của cây con tốt nhất. Phôi hạt lai giữa loài *Oryza sativa* và *Oryza officinalis* có xu hướng suy thoái từ ngày thứ 10 sau khi thụ phấn và hạt lai đến chín sẽ không được tạo thành.

Từ khóa: Cứu phôi, lai xa, lúa hoang, nuôi cấy *in vitro*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lai xa giữa hai loài là một công cụ rất quan trọng trong quá trình chọn giống của nhiều loại cây trồng, đặc biệt trong nhóm cây lương thực như lúa gạo. Tuy nhiên lai xa gặp nhiều khó khăn trong việc lai giữa lúa trồng và lúa hoang dại, hạt lai được tạo ra từ hai loài khác nhau thường bất dục hoặc không nảy mầm được. Việc thuần hóa, nhập nội lúa trồng ở một số khu vực của châu Á bắt đầu từ các quần thể khác nhau của cùng một loài, *Oryza sativa* (Chang, 1976).

Nguồn gen quý từ các loài lúa hoang đóng góp rất lớn trong quá trình chọn tạo giống lúa, tuy nhiên sự dẫn nhập một gen từ lúa hoang vào lúa trồng là rất hiếm và hạn chế do hai loài có bộ gen khác nhau. Lúa trồng (*Oryza sativa*) có sự đa dạng về di truyền và thích nghi rộng với nhiều điều kiện sinh thái khác nhau. Theo Chang (1976), hai loài lúa *O. nivara* và *O. rufipogon* có cùng bộ gen với *O. sativa* (Bộ gen AA), khi tiến hành lai giữa các loài này thì hạt có khả năng sống sót nhưng tỷ lệ sống

¹ Bộ môn Di truyền và Chọn giống, Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

* Tác giả chính: E-mail: nguyenuhuuminhtt39b@gmail.com