

PHÂN TÍCH HỆ GEN VỀ TÍNH TRẠNG NĂNG SUẤT CỦA 8 NHÓM ĐỒNG NGÔ THỂ HỆ F_{2,3} TRONG ĐIỀU KIỆN HẠN VÀ TUỚI ĐỦ

Đỗ Văn Dũng¹, Thayil Vinayan Madhumal², Gajanan Saykhedkar², Raman Babu², Đặng Ngọc Hạ¹, Lê Quý Kha³, Nguyễn Chí Thành¹, Zaidi Pervez Haider²

TÓM TẮT

Kết quả đánh giá năng suất của 8 nhóm đồng BP gồm 790 dòng thể hệ F_{2,3} trên đồng ruộng trong điều kiện hạn và tưới đủ cho thấy năng suất các nhóm đồng này đạt từ 0,74 - 1,37 tấn/ha/hạn và 1,21 - 2,51 tấn/ha/tưới đủ, giảm 22,0% - 48,6. Nhóm đồng BP2, BP6, BP7 và BP8 có phương sai kiểu gen ở điều kiện hạn từ 0,10 - 0,23 và có hệ số di truyền từ 0,55 - 0,69, cao hơn các nhóm đồng khác, chúng tỏ có nhiều cơ hội chọn lọc được các gia đình F_{2,3} tốt phù hợp với mục tiêu làm thuần dòng thể hệ mới tiếp theo và phục vụ chọn tạo giống ngô lai chịu hạn. Qua phân tích kiểu gen và sử dụng 39.846 SNP cho 8 nhóm đồng BP đã xác định được 15 vùng gen quan trọng quy định về năng suất hạt liên kết với 15 chỉ thị phân tử (SNP) trên các nhiễm sắc thể số 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 phù hợp ứng dụng chỉ thị phân tử trong chương trình chọn giống ngô chịu hạn.

Từ khóa: Cây ngô, tưới đủ, hạn, hệ gene, SNP

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cải tiến nguồn vật liệu luôn được ưu tiên hàng đầu của mỗi chương trình chọn tạo giống và qua mỗi chu kỳ chọn tạo thì khả năng chống chịu, năng suất được cải thiện (Arnel *et al.*, 2010). Công việc chọn lọc cường độ cao ở giai đoạn sớm (F₂, F_{2,3}) của mỗi chu kỳ cải tiến vật liệu có ý nghĩa quan trọng, nhằm chọn ra những vật liệu được cải tiến tốt hơn (Klaus Koehler, 2014). Trong nghiên cứu này, khi lai truyền 2 dòng ngô chịu hạn (cây cho Donor) sang 8 dòng ưu tú của CIMMYT để tạo được 8 nhóm đồng BP (theo cặp bố - mẹ, Bi-parental: BP) thể hệ F_{2,3}. Qua đánh giá kiểu hình, kiểu gen trong môi trường hạn - tưới đủ; đồng thời ứng dụng kỹ thuật dùng chỉ thị phân tử (SNP) có liên kết đa hình để phân tích hệ gen (GWAS: Genome wide association study) để xác định vùng gen quy định khả năng chịu hạn phục vụ nghiên cứu chọn tạo giống ngô chịu hạn. Kết quả là xác định SNP nào liên kết với gen quy định tính trạng quan tâm, qua tần số allele biến động so với phần lớn các nhóm khác (Arthur Kortecorresponding and Ashley Farlow, 2013).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lấy mẫu lá 8 nhóm đồng BP gồm 790 gia đình F_{2,3} được phát triển từ 2 dòng mẹ chịu hạn với 8 dòng ưu tú (chia làm 2 nhóm ưu thế lai gọi là nhóm A và nhóm B) của CIMMYT10. Có 871 SNP đa hình được xác định (Bảng 2).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá kiểu hình ở điều kiện đồng ruộng

Thí nghiệm ở điều kiện đồng ruộng thiết kế theo mô hình ô vuông latin (Alpha lattice) trong 2 điều kiện là hạn và tưới đủ chi tiết như bảng 1. Mật độ khoảng cách: dài hàng 4 m, hàng cách hàng 75 cm, cây cách cây 25 cm.

Bảng 1. Quản lý chế độ tưới nước ở từng giai đoạn sinh trưởng phát triển

Các giai đoạn ST-PT	Điều kiện tưới đủ*	Quản lý giai đoạn gây hạn*
Gieo	✓	✓
V2 - V3	✓	✓
V5 - V6	✓	Không tưới
V8 to V9	✓	Không tưới
VT (tung phấn)	✓	Không tưới
R1 (phun râu)	✓	Không tưới
R3 (Chín sữa)	✓	Không tưới
R4 (chín sáp)	✓	✓ ^s
R5 (Đá)	✓	✓
Chín sinh lý	Tưới nếu cần	Tưới nếu cần

Ghi chú: *, ✓: Tưới đủ, theo điều kiện độ ẩm đất thực tế; s: tiếp tục tưới; ST-PT: sinh trưởng - phát triển.

Trong khoảng thời gian gây hạn, độ ẩm đất được theo dõi hàng tuần bằng thiết bị ở từng khối (block) trên toàn cánh đồng, ở các độ sâu 0 - 20 cm, 40 cm, 60 cm và 100 cm. Khi độ ẩm ở độ sâu 40 - 60 cm (vùng rễ hoạt động) đạt 20% A⁰ tại điểm héo vĩnh

¹ Viện Nghiên cứu Ngô; ² Trung tâm cải tiến Ngô và Lúa mì quốc tế tại Ấn Độ (CIMMYT Int.)

³ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

viên, thì tiến hành tưới phục hồi. Ở điều kiện tưới đủ: Chu kỳ 8 - 11 ngày tiến hành tưới đủ ẩm. Những thử nghiệm này đã được mô tả bởi Zaidi (2000), Zaidi and Singh (2005) và Zaidi (2012).

2.2.2. Đánh giá kiểu gen

Các mẫu lá được tách triết DNA tại Ấn Độ, sau đó được gửi sang Phòng thí nghiệm (KBiosciences) của tập đoàn LGC tại Nước Anh để phân tích kiểu gen qua 1.250 chỉ thị phân tử (SNP). Tất cả 1.250 SNP

là một tập hợp con của 1.536 SNP đã được xác định từ (Yan *et al.*, 2010). DNA chiết xuất từ lá non của 10 cây/gia đình F_{2,3} của mỗi nhóm dòng tái tổ hợp (RIL) theo quy trình của CIMMYT (2005), Zeleke và cộng tác viên (2007). Sau khi kiểm tra định lượng DNA của 8 nhóm dòng (790 gia đình F_{2,3}) và từ báo cáo K Biosciences cho CIMMYT, kết quả đã xác định được 871 SNP đa hình phân bố đều trong hệ gen trên 8 nhóm dòng F_{2,3} (Bảng 2) của tổng số 1.186 SNP đa hình trên 10 dòng bố mẹ.

Bảng 2. Chi tiết các dòng, nhóm dòng F_{2,3} và phân phối marker

Dòng bố, mẹ	Nhóm dòng	*Cặp lai	Số gia đình F _{2,3} /nhóm dòng	Số marker đa hình	Khoảng cách liên kết (cm)	Khoảng cách TB giữa các marker (cm)
P1-nhóm A	BP1	P9 × P1	121	107	781,77	7,31
P2-nhóm A	BP2	P9 × P2	117	140	726,58	5,19
P3-nhóm A	BP3	P9 × P3	82	75	561,92	7,49
P4-nhóm A	BP4	P9 × P4	103	159	880,57	5,54
P5-nhóm B	BP5	P10 × P5	103	63	385,73	6,12
P6-nhóm B	BP6	P10 × P6	105	209	1.142,42	5,47
P7-nhóm B	BP7	P10 × P7	61	118	1.039,81	8,81
P8-nhóm B	BP8	P10 × P8	98	0	0,00	0,00
P9-dòng mẹ chịu hạn						
P10-dòng mẹ chịu hạn						
Cộng			790	871		

Ghi chú: BP1 - BP8: Nhóm dòng phát triển từ cặp lai (BP: Bi-parent); *P9 và P10: dòng mẹ chịu hạn; P1 đến P8: dòng ưu tú.

Phân tích trên toàn bộ hệ gen (GWAS) của 8 nhóm dòng BP dựa trên dữ liệu kiểu gen và kiểu hình về đặc điểm năng suất được sử dụng trên 2 mô hình 55 K (56.110 SNPs) và GBS v2.7 (954.179 SNPs) để tận dụng những ưu thế riêng của chúng. Đánh giá kiểu gen qua 55 K MaizeSNP50 từ Illumina (2014). Các vị trí marker của theo đánh giá trình tự kiểu gen (Genotyping bysequencing - GBS) sử dụng 55K SNPs lấy từ nguồn Panzea_2.7GBS (Ensembl, 2014). Dựa trên ước lượng tiêu chuẩn, yêu cầu > 0,85 cho 55 K và > 0,3 cho GBS và tần số allele tối thiểu (MAF) > 0,05 cho 55 K và > 0,02 cho GBS, kết quả chọn 39.846 SNP từ chip 55K và 435.975 SNP từ GBS.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

a) Phân tích kiểu hình

Phân tích phương sai (ANOVA) kiểu gen, kiểu hình (σ_g^2 và σ_p^2) và hệ số di truyền (h^2) được tính toán theo Lush J. L. và A. E. Molln (1942) và sử dụng phần mềm GenStat ver12, METAR 2.1. Sử dụng mô hình REML (Multivariate Restricted Maximum Likelihood) tính toán theo PROC MIXED bằng phần

mềm SAS ver9.2 bởi ASYCOV để tính toán phương sai di truyền và hiệp phương sai giữa các đặc điểm (Gonzalo *et al.*, 2006).

b) Lập bản đồ hệ gen (GWAS)

Sử dụng mô hình hỗn hợp cộng tính nhiều vị trí locus (Multi-locus mixed additive model - MLM) với cách tiếp cận phía trước và phía sau mỗi locus theo từng bước để chọn SNP như các hiệp phương sai cố định đã được sử dụng (Seguraf *et al.*, 2012). Ma trận giữa các mẫu của các cá thể/gia đình được tính dựa trên nhận biết khoảng cách bởi mỗi đơn vị (Irritable bowel syndrome - IBS) của SNP và bao hàm như là một hiệu ứng ngẫu nhiên trong mô hình hỗn hợp. Phân tích này được thực hiện với SNP và phần mềm Variation Suite ver8.3.4 (Golden Helix. Inc, 2015). Các thành phần dữ liệu chính (PC) được xử lý theo công thức:

$$y = X\beta + Zu + e$$

Trong đó: y là vector của PC1, PC2 hoặc PC3; β là vector của hiệu ứng cố định cho các allele chính của SNP để kiểm tra sự liên kết; u là vector của các hiệu

ứng đa hình ngẫu nhiên và e là vector của các số dư ngẫu nhiên; X là ma trận liên quan đến quan sát các ảnh hưởng SNP với các phần tử được mã hoá là 0, 1 hoặc 2 đối với các allele đồng hợp tử, các allele dị hợp tử và các allele đồng hợp tử thay thế và Z là ma trận liên quan những quan sát đến hiệu ứng ngẫu nhiên đa gen.

Hệ số quan hệ gen giữa các cá thể j và k được ước tính như sau:

$$\frac{1}{n_o} \sum_{i=1}^{n_o} \frac{(x_{ij} - 2p_i)(x_{ik} - 2p_i)}{2p_i(1 - 2p_i)}$$

Trong đó: n_o là số SNP (39.846 SNP); x_{ij} và x_{ik} các số (0, 1 hoặc 2) của allele liên quan cho từng SNP thứ i của cá thể thứ j và thứ k tương ứng, và p_i là tần số của allele liên quan (VanRaden, 2008).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm thực hiện tại Viện Nghiên cứu Cây trồng cho vùng bán khô hạn (ICRISAT), Hyderabad, Ấn Độ trong vụ hạn 2012/2013 - 2013/2014.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá kiểu hình

Năng suất (GY) của 8 nhóm dòng ở điều kiện hạn biến động từ 0,74 - 1,37 tấn/ha, trong đó nhóm A từ 1,29 - 1,37 tấn/ha, nhóm B từ 0,74 - 1,28 tấn/ha (Bảng 3). Nhìn chung năng suất điều kiện hạn so với điều kiện tưới đủ suy giảm đáng kể từ 20% - 48% trên 8 nhóm dòng, trong đó BP1, BP3 và BP5 giảm 20 - 23%, BP4, BP6, BP8 giảm 38% - 47%. Sự suy giảm cũng quan sát thấy ở các bố mẹ ở hai điều kiện hạn - tưới đủ biến động từ 10% - 51%. Đồng thời cũng nhận thấy sự biến động năng suất đáng kể của các gia đình $F_{2,3}$ (các gia đình $F_{2,3}$ / nhóm dòng, bảng 1) trong mỗi nhóm dòng cặp bố mẹ (BP) giữa 2 điều kiện hạn và tưới đủ, đồng thời có những gia đình $F_{2,3}$ có năng suất năng suất cao hơn và một số thấp hơn dòng bố mẹ, cho thấy sự phân ly của các alen quy định tính chịu hạn và không chịu hạn thừa hưởng di truyền từ các dòng bố mẹ. Trong điều kiện hạn, hệ số di truyền (h^2) đạt từ thấp đến trung bình, cụ thể h^2 từ 0,2 đến 0,6 và ở điều kiện tưới đủ h^2 đạt giá trị từ trung bình đến cao (h^2 từ 0,4 - 0,8), cho thấy mối quan hệ giữa giá trị kiểu hình và giá trị di truyền tích cực của các nhóm dòng nghiên cứu. Phương sai kiểu gen (σ_g^2) về GY ở điều kiện hạn biến động từ 0,02 - 0,23 và ở điều kiện tưới đủ từ 0,27 - 0,65, cho thấy sự sai khác kiểu gen về năng suất. Bên cạnh đó, phương sai kiểu gen \times với môi trường ($\sigma_{g \times l}^2$) có giá trị từ 0,01 - 0,12 chỉ ra rằng, sự biến động của tính trạng đặc trưng do tác động cộng của các gen, thể hiện

sự đóng góp của khả năng chịu hạn, di truyền từ dòng bố mẹ. Kết quả phân tích tương quan di truyền năng suất ở 8 nhóm dòng (BP1 đến BP8) cho thấy có tương quan thuận giữa điều kiện hạn hán và tưới đủ, từ 0,49 - 0,67 ($P < 0,01$). Điều này có thể là do thực tế là các nhóm dòng phát triển từ [dòng chịu hạn \times dòng ưu tú] thừa hưởng nên di truyền từ mỗi dòng bố - mẹ biểu hiện không có hoặc chỉ liên kết từng phần liên quan tính trạng năng suất trong mỗi điều kiện môi trường cụ thể (Bảng 3).

3.2. Kết quả phân tích hệ gen (GWAS)

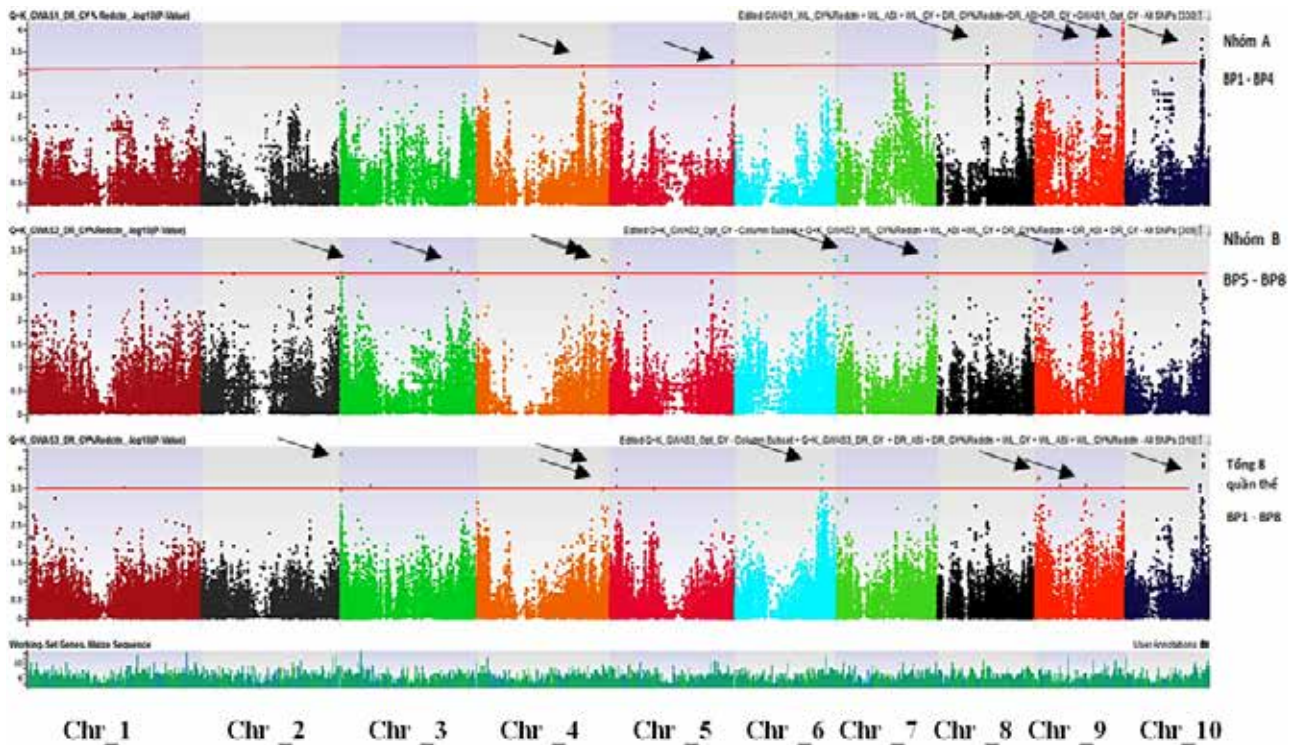
Các thể hệ gia đình $F_{2,3}$ được tạo bởi các dòng bố mẹ, chúng thừa hưởng vật chất di truyền và trong quá chọn tạo đã diễn ra sự phân ly độc lập - tái tổ hợp ngẫu nhiên. Kết quả là có thể dẫn đến sự tích hợp của các mối liên kết hay những hiệu ứng cộng, trội khác nhau, cuối cùng là thể hiện các tính trạng trong môi trường cụ thể. Kết quả Hình 1 cho thấy, các SNP đa hình có quan hệ tương quan với năng suất, thể hiện các điểm (plots) trên vạch ngang biểu thị mức độ có ý nghĩa của các nhiễm sắc thể 6, 8, 9, 10 (Nhóm A), trên nhiễm sắc thể 3, 4, 6, 7, 8 (Nhóm B). Như kết quả đã phân tích, sự biến động năng suất của các gia đình $F_{2,3}$ trong mỗi nhóm dòng BP có giá trị năng suất sự vượt quá so với dòng bố mẹ. Nghiên cứu đã thực hiện một phân tích tổng hợp toàn bộ gen kết hợp ba bộ dữ liệu nghiên cứu kết hợp trên toàn bộ gen (GWAS), bao gồm 790 gia đình $F_{2,3}$ và dòng bố mẹ qua 1.000 SNP, kết quả có 291 SNP có ý nghĩa ở điều kiện tưới đủ, 297 SNP có ý nghĩa ở điều kiện hạn (Hình 2). Tuy nhiên, ở Hình 2 thể hiện mối quan hệ SNP với các điều kiện môi trường trên 8 nhóm dòng BP, trong đó nhóm A có 19 SNP được chọn, nhóm B có 23 SNP được chọn là hữu ích liên quan nhiều đến năng suất, và kết hợp qua các điều kiện môi trường cho kết quả 0,1% (3 SNP). Điều đáng lưu ý, tổ hợp của 8 nhóm dòng BP đã xác định được 15 SNP tin cậy như bảng 4, chúng bao gồm các gen liên quan đến năng suất ở điều kiện hạn. Các vị trí tương đồng về chức năng giữa các gen trên các nhóm (nhóm A, nhóm B) khác nhau đã được xác định và gen được ghi dựa trên tần số allele phụ với hiệu ứng trực tiếp (+) các liên kết allele chính. Như vậy, kết quả này chỉ ra rằng năng suất được kiểm soát bởi nhiều vị trí locus (loci) có ảnh hưởng đến năng suất ở điều kiện hạn và các chỉ thị phân tử SNP được xác định thông qua GWAS là những SNP hữu ích phục vụ chọn tạo giống ngô chịu hạn. Từ kết quả đánh giá năng suất ở điều kiện hạn và tưới đủ của 790 gia đình $F_{2,3}$ của 8 nhóm dòng phát triển từ cặp bố mẹ khác nhau (nhóm dòng Bi-parental) kết hợp với phân tích GWAS cho thấy 15 vùng gen trùng khớp với của 8 nhóm dòng BP ($F_{2,3}$) cho điều kiện hạn (Bảng 4),

liên kết với các chỉ thị phân tử (marker hay SNP) sau S3_151334181, S4_224910359, S5_208101878, S6_67260174, S7_40327099, S8_144372859, S9_88734345, S9_82359236, S9_154651413, S9_151662859, S9_100305550, S9_96774495, S9_11501850, S10_137460286, S10_147354987 (từ Panzea_2.7 GBS) trên các nhiễm sắc thể số 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 và 10 có ý nghĩa quan trọng với mô hình gen liên quan đến đặc điểm năng suất và khả năng chống chịu hạn.

Bảng 3. Kết quả đánh giá năng suất của 8 nhóm dòng F_{2,3}

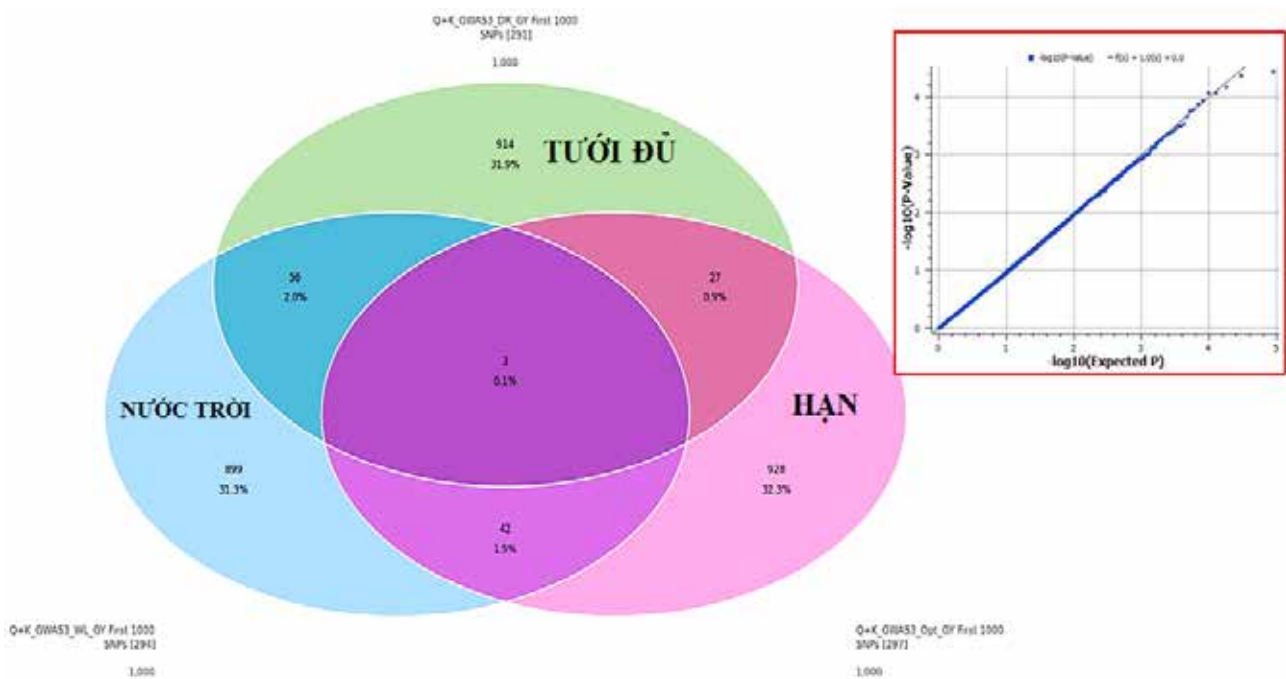
Đại lượng thống kê	Năng suất (tấn/ha)					
	Nhóm ưu thế lai A			Nhóm ưu thế lai B		
	Nhóm dòng BP	Hạn	Tươi đủ	Nhóm dòng BP	Hạn	Tươi đủ
F _{2,3} ±Std	BP1	1,37±0,15	1,87±0,20	BP5	1,28±0,15	1,64±0,20
Biến động		0,34÷2,28	0,85÷3,77		0,53÷2,31	0,48÷2,97
¥		0,09	0,37		0,09	0,59
h ²		0,12			0,12	
ŷ _p		0,47	0,76		0,55	0,84
ŷ _g		0,57***			0,81***	
F _{2,3} ±Std	BP2	1,13±0,13	1,81±0,20	BP6	0,91±0,14	1,56±0,20
Biến động		0,35÷1,97	0,85÷3,18		0,17÷1,75	0,09÷2,88
¥		0,10	0,40		0,15	0,46
h ²		0,07			0,04	
ŷ _p		0,55	0,80		0,69	0,85
ŷ _g		0,6***			0,64***	
F _{2,3} ±Std	BP3	1,12±0,16	1,63±0,20	BP7	0,89±0,18	1,31±0,30
Biến động		0,41÷2,09	0,43÷3,01		0,34÷2,17	0,24÷2,7
¥		0,02	0,61		0,23	0,27
h ²		0,01			0,04	
ŷ _p		0,22	0,85		0,66	0,51
ŷ _g		0,31***			0,72***	
F _{2,3} ±Std	BP4	1,29±0,20	2,51±0,20	BP8	0,74±0,13	1,21±0,20
Biến động		0,55÷2,03	1,00÷3,94		0,11÷1,71	0,07-2,67
¥		0,03	0,39		0,14	0,65
h ²		0,12			0,10	
ŷ _p		0,21	0,75		0,58	0,89
ŷ _g		0,66***			0,75***	
		0,62***			0,69***	
	P_1	0,53±0,17	0,97±0,30	P_5	1,14±0,45	2,38±0,50
	P_2	0,22±0,22	0,76±1,20	P_6	0,23±0,21	1,28±0,20
	P_3	0,94±0,22	1,40±0,60	P_7	0,40±0,17	0,83±0,30
	P_4	0,67±0,21	1,37±0,50	P_8	0,17±0,09	0,56±0,10
	P_9	1,31±0,25	1,43±0,20	P_10	0,91±0,22	1,55±0,20

Ghi chú: BP: nhóm dòng Biparent; Std: độ lệch chuẩn; GY: năng suất (tấn/ha); BP: nhóm dòng Bi-parent; P: dòng bố mẹ; σ_g²: phương sai kiểu gen; σ_{gxl}²: phương sai kiểu gen với thời vụ/các điểm; ¥: qua 2 vụ hạn; h²: hệ số di truyền; ŷ: tương quan kiểu gen; F_{2,3}: thế hệ F_{2,3}; *, **, ***: mức độ tin cậy P < 0,05; 0,01; 0,001.



Hình 1. Bản đồ phân tích bộ gen GWAS (Genome Wide Association study)

Ghi chú: Chr: nhiễm sắc thể; BP: nhóm dòng quần thể BP cặp bố mẹ thế hệ $F_{2,3}$.



Hình 2. Biểu đồ tổng hợp bộ gen GWAS ở các điều kiện môi trường khác nhau

Qua đó cho thấy 8 nhóm dòng thế hệ $F_{2,3}$ đã được thừa hưởng di truyền về khả năng chịu hạn của thành phần mẹ (dòng P9, P10). Như vậy, GWAS đã được thực hiện trên kiểu gen bằng cách sử dụng nền tảng GBS và kiểu hình về năng suất ở điều kiện

hạn và tưới đủ. Xác định được 15 SNP đặc trưng có ý nghĩa, từ đó có thể hỗ trợ cho việc chọn tạo giống ngô chịu hạn nhờ sử dụng chỉ thị phân tử (SNP) đối với các vùng gen chính liên quan đến khả năng chịu hạn.

Bảng 4. Danh sách 15 vùng gen quan trọng xác định cho nhóm dòng BP thế hệ F_{2,3} thông qua phân tích GWAS cho mỗi nhiệm sắc thể về năng suất

TT	Chỉ thị phân tử (marker_SNP)	NST	GWAS DD-dd	Vị trí marker	Loci										Allele phụ	Tần số nhỏ allele	Allele chính		
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	BP/P9	BP/P10					
1	S3_151334181	3	0,59	151.334.181	C/C	C/C	G/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G	0,11	C
2	S4_224910359	4	8,50	224.910.359	C/C	T/T	T/T	T/T	C/T	T/T	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T	0,30	C
3	S5_208101878	5	7,32	208.101.878	T/T	T/T	T/T	T/G	T/T	T/T	T/T	T/G	T/T	T/T	G/G	G/G	G	0,26	T
4	S6_67260174	6	0,53	67.260.174	C/C	C/C	C/C	C/A	C/A	C/A	C/A	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	A	0,25	C
5	S7_40327099	7	7,99	40.327.099	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	A	0,08	G
6	S8_144372859	8	1,99	144.372.859	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	C/T	T	0,31	C	
7	S9_88734345	9	8,70	88.734.345	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	G/G	G	0,20	A	
8	S9_82359236	9	7,84	82.359.236	C/C	C/C	C/C	C/A	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	A	0,19	C	
9	S9_154651413	9	4,30	154.651.413	A/A	C/C	C/C	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	C	0,43	A	
10	S9_151662859	9	-2,64	151.662.859	T/T	T/T	A/A	T/T	T/A	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	A	0,06	T	
11	S9_100305550	9	-5,50	100.305.550	G/G	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	G/G	G/G	T/T	T/T	T/T	T	0,18	T	
12	S9_96774495	9	-5,54	96.774.495	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A	0,18	A	
13	S9_11501850	9	-5,85	11.501.850	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C	G	0,10	C	
14	S10_137460286	10	0,02	137.460.286	G/G	C/C	G/G	C/G	G/G	C/G	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G	0,26	C	
15	S10_147354987	10	-1,87	147.354.987	T/C	T/T	C/C	T/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/C	T/T	C/C	C	0,46	T	

Ghi chú: P: Dòng ngô bố mẹ; BP/P: nhóm dòng BP phát triển từ cặp bố mẹ; DD-dd: đồng hợp tử.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Kết quả đánh giá năng suất ở đồng ruộng trong điều kiện hạn và tưới đủ trên 8 nhóm dòng BP gồm 790 dòng thế hệ $F_{2,3}$ cho thấy năng suất các nhóm dòng này đạt từ 0,74 - 1,37 tấn/ha/hạn và 1,21 - 2,51 tấn/ha/tưới đủ, giảm 22,0% - 48,6%, ít hơn so với các dòng bố mẹ (8,4% - 78,0%). Nhóm dòng BP2, BP6, BP7 và BP8 có phương sai kiểu gen ở điều kiện hạn từ 0,10 - 0,23 và có hệ số di truyền từ 0,55 - 0,69, cao hơn các nhóm dòng khác, chứng tỏ có nhiều cơ hội chọn lọc được các gia đình $F_{2,3}$ tốt phù hợp với mục tiêu làm thuần dòng thế hệ mới tiếp theo và phục vụ chọn tạo giống ngô lai chịu hạn.

- Đã xác định được 15 vùng gen quan trọng quy định về năng suất hạt liên kết với 15 chỉ thị phân tử (SNP) là S3_151334181, S4_224910359, S5_208101878, S6_67260174, S7_40327099, S8_144372859, S9_88734345, S9_82359236, S9_154651413, S9_151662859, S9_100305550, S9_96774495, S9_11501850, S10_137460286, S10_147354987 trên các nhiễm sắc thể số 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 và là những chỉ thị phân tử hữu ích phù hợp ứng dụng chỉ thị phân tử trong chương trình chọn giống ngô chịu hạn.

4.2. Đề nghị

Kết quả mới chỉ bước đầu phát hiện được những vùng gen quy định khả năng chịu hạn ở 8 nhóm dòng thế hệ $F_{2,3}$ nên đề nghị tiếp tục nghiên cứu ở những thế hệ sau và khả năng ứng dụng cho chọn tạo giống ngô chịu hạn.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ Hợp tác và Phát triển Kinh tế Liên bang Đức (BMZ - Bundes Managierium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) đã tài trợ cho dự án nghiên cứu này. Cảm ơn sự hợp tác của CIMMYT-Asia và nhân viên của ICRISAT đã giúp thu thập và phân tích dữ liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arnel R. Hallauer, Marcelo J. Carena and J.B. Miranda Filho, 2010. Quantitative Genetics in Maize Breeding. In: *Handbook of Plant Breeding*. Springer Science + Business Media, LLC.

Arthur Kortecorresponding and Ashley Farlow, 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9: 29.

CIMMYT, 2005. *Laboratory Protocols*. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico, D.F.: CIMMYT. Third Edition: 4-17.

Ensembl, 2014. *Zea mays (B73_RefGen_v4)*, accessed on Nov17th2014. Available from: https://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index.

Golden Helix. Inc, 2015. *SNP & Variation Suite Manual*. *SNP & Variation Suite v8.8.3*.

Gonzalo M., T.J. Vyn, J.B. Holland and L.M. McIntyre, 2006. Mapping density response in maize: a direct approach for testing genotype and treatment interactions. *Genetics*, 173(1): 331-348.

Illumina Inc, 2014. Maize SNP50 DNA Analysis Kit. Array and sequencing technologies for genome-wide genotyping, accessed on Nov17th2014. Available from: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/maize-snp50.html>.

Klaus Koehler, 2014. Application of Genomic Selection in commercial corn breeding and crop improvement. In: *Solutions for the Growing World*. Dow AgroSciences.

Lush J.L. and A. E. Molln, 1942. Litter size and weight as permanent characteristics of sows. *Tech. Bull. U. S. Dept. Agric.* No. 836.

Seguraf V, Vilhjálmssonf BJ, PlattfA, KortefA, SerenfU and LongfQ, 2012. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. *Nat Gene*, 44: 825-830.

VanRaden P. M., 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci.*, 91: 4414-4123.

Yan J, Yang X, Shah T, Sanchez-Villeda H, W.M. Li J, Zhou Y, Crouch JH and Xu Y., 2010. High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. *Mol Breed.*, 25: 441-451.

Zaidi P.H., 2000. *Drought Tolerance in Maize: Theoretical considerations & Practical implications*. CIMMYT, D.F., Mexico.

Zaidi P.H. and N.N. Singh, 2005. *Drought Tolerance in Tropical Maize Problems and Prospects*. New Delhi, Directorate of Maize Research.

Zaidi P.H., 2012. *CIMMYT Precision Phenotyping*. Aug 2012.

Zeleke H., Dagne Wegary, Labuscagne M.T., Hussien T. and Singh H., 2007. Heterosis and combining ability for grain yield and its component in selected maize inbred line. *S Afr J Plant Soil*, 24: 133-137.

Genome-wide association analysis for grain yield of 8 progenic populations F_{2,3} under drought and well-water conditions

Do Van Dung, Thayil Vinayan Madhumal, Gajanan Saykhedkar, Raman Babu, Dang Ngoc Ha, Le Quy Kha, Nguyen Chi Thanh, Zaidi Pervez Haider

Abstract

The evaluation of grain yield of 8 BP groups including 790 F_{2,3} generation lines on farm under drought and well watering conditions showed that the yield of these groups in drought was from 0.74 to 1.37 tons.ha⁻¹, reduced by 22.0% - 48.6 against under well-watering by 1.21 - 2.51 tons.ha⁻¹. The genotypic variance of BP2, BP6, BP7 and BP8 groups under drought ranged from 0.10 to 0.23 and the genetic coefficient varied from 0.55 to 0.69, higher than other groups, which proved that it is able to select F_{2,3} families for developing new generation pure lines and for further breeding of drought tolerance hybrid maize varieties. By genotyping analysis and the use of 39,846 SNP for 8 BP populations, 15 key gene regions controlling the trait of grain yield, linked with 15 molecular markers (SNP) on chromosomes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 were identified as suitable molecular markers for breeding programs of drought tolerance maize varieties.

Keywords: Maize, F_{2,3}, drought, optimal condition, SNP marker, GWAS

Ngày nhận bài: 28/1/2019

Ngày phản biện: 6/2/2019

Người phản biện: TS. Vương Huy Minh

Ngày duyệt đăng: 11/3/2019

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY LỚP MỎNG TRONG NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY RIÊNG BẢN ĐỊA BẮC KẠN

Vũ Xuân Dương¹, Đặng Trọng Lương², Đỗ Tuấn Khiêm³, Phạm Thanh Loan¹, Trịnh Thị Thanh Hương²

TÓM TẮT

Riêng bản địa Bắc Kạn (*Alpinia coriandriodora* D. Fang), là cây quý hiếm, có giá trị kinh tế cao được sử dụng làm gia vị và dược liệu. Nghiên cứu này xây dựng quy trình nhân giống cây riêng bản địa Bắc Kạn thông qua tạo callus từ lát cắt chồi nhằm tăng hiệu suất nhân chồi *in vitro*. Môi trường Murashige & Skoog (MS) bổ sung 0,5 mg/l TDZ và 3 mg/l 2,4D được sử dụng để tạo callus từ lát cắt chồi, tỉ lệ tạo callus đạt 75,56%, callus có bề mặt khô, chắc, màu trắng sáng. Môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l Vitamin B1 và 3,0 mg/l BAP có tỷ lệ tái sinh tạo chồi đạt cao nhất là 78,89%, số chồi đạt 9,71 chồi/callus. Môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BAP, 1,0 mg/l Ki, 0,2 mg/l α -NAA và 100 ml/l nước dừa là phù hợp để nhân chồi *in vitro*, hệ số nhân chồi sau 4 tuần đạt 6,32 lần, chồi mập, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt. Môi trường MS có bổ sung 0,6 mg/l α -NAA có hiệu quả tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất với thời gian ra rễ từ 19 - 21 ngày, trung bình chiều cao cây đạt 9,63 cm, số lá/cây đạt 5,33 lá, số rễ đạt 5,51 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 4,43 cm. Trên giá thể 100% cát mịn, sau 30 ngày ra ngôi tỉ lệ cây sống cao nhất đạt 95,56%, cây sinh trưởng phát triển tốt.

Từ khóa: Nhân giống, callus, riêng bản địa Bắc Kạn (*Alpinia coriandriodora* D. Fang), gừng đá

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây riêng bản địa ở tỉnh Bắc Kạn (tên thường gọi là gừng núi đá, gừng đá, gừng núi) có tên khoa học là *Alpinia coriandriodora* D. Fang (Duong *et al.*, 2019) được trồng từ lâu đời trên các nương rẫy, rừng núi đất đá xen kẽ, là loài cây quý hiếm. Hiện nay, cây riêng bản địa được trồng chủ yếu theo kinh nghiệm, diện tích manh mún, nhỏ lẻ ở các huyện nên sản phẩm

chưa mang tính hàng hóa, chưa có lượng giống đủ lớn để phát triển thành vùng trồng tập trung. Việc nhân và giữ giống vẫn theo kinh nghiệm của người dân, do vậy củ giống không đảm bảo về chất lượng, nhiễm bệnh nhiều và dần thoái hóa.

Trên thế giới, cây họ gừng đã được nghiên cứu nhân giống *in vitro* khá phổ biến ở các nước như Ấn Độ, Sri Lanka, Malaysia, Trung Quốc,...

¹ Viện Nghiên cứu Ứng dụng và phát triển, Trường Đại học Hùng Vương - Phú Thọ

² Viện Di truyền Nông nghiệp; ³ Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bắc Kạn