

TẠO QUẦN THỂ LAI F1 LÀM VẬT LIỆU KHỞI ĐẦU ĐỂ ĐÁNH GIÁ VAI TRÒ CỦA QTL9 LIÊN QUAN ĐẾN CÁC TÍNH TRẠNG NĂNG SUẤT CỦA TẬP ĐOÀN LÚA VIỆT NAM

Vũ Thị Nhiên², Tạ Kim Nhung^{1,5}, Stefan Jouannic⁴
Lê Hùng Lĩnh¹, Phạm Xuân Hội¹, Trần Khánh Vân²,
Trần Vũ Hằng¹, Phạm Thị Mai¹, Lê Thị Nhu^{1,3}, Khổng Ngân Giang¹

TÓM TẮT

Năng suất hạt là một trong những chỉ số quan trọng nhất trong chọn tạo lúa, được điều khiển bởi các locus tính trạng định lượng (QTLs). Các quần thể lai tái tổ hợp RILs (Recombinant Inbred Lines) được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu QTL trong hệ gen lúa, với hàng trăm QTL liên quan đến năng suất đã được phát hiện. Nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) các tính trạng liên quan đến năng suất đã được tiến hành trên tập đoàn lúa địa phương Việt Nam và đã xác định được QTL9 mới tiềm năng, liên quan đến số gié thứ cấp/bông và số hạt/bông. Trong nghiên cứu này, các quần thể lai F1 đã được tạo ra từ các cặp lai giữa 2 nhóm lúa có kiểu hình bông trái ngược nhau (bông to và bông nhỏ) để làm vật liệu khởi đầu cho việc đánh giá vai trò của QTL9 thông qua các quần thể lai tái tổ hợp. Mười hai chỉ thị phân tử SSR được sử dụng để kiểm tra cây F1, trong đó 7 chỉ thị cho sự đa hình chiều dài ADN giữa các giống bố mẹ. Như vậy 51 dòng lai F1 đã được chọn lọc bằng 7 chỉ thị phân tử SSR, là nguồn vật liệu để tạo các quần thể lai tái tổ hợp F2, F3.

Từ khóa: QTL, quần thể tái tổ hợp, quần thể lai F1, ADN, SSR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây trồng quan trọng hàng đầu cung cấp lương thực cho hơn 50% dân số thế giới. Để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ ngày càng cao, dự đoán sản lượng lúa gạo đến năm 2025 cần tăng thêm 30%. Không những thế, trong bối cảnh bùng nổ dân số, mở rộng đô thị hóa và biến đổi khí hậu, cải tiến và ổn định năng suất lúa gạo trở thành một thách thức lớn đối với các nhà chọn tạo giống.

Các nghiên cứu từ những năm 1960 cho thấy sự đa dạng của các tính trạng nông học quy định năng suất lúa, đây là nguồn tài nguyên di truyền lớn phục vụ cho các chương trình chọn tạo giống lúa cao sản. Theo đó, nhiều công trình nghiên cứu nhằm cải thiện và tạo ra những giống mới có năng suất cao hơn đã được công bố (Xing and Zhang, 2010). Trong số đó, xác định các QTL ảnh hưởng tích cực đến tính trạng năng suất có ý nghĩa quan trọng (Bai *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2013; Xing and Zhang, 2010). Gần đây, phương pháp phân tích GWAS ra đời cùng với các công nghệ giải trình tự thế hệ mới đã trở thành một công cụ mạnh mẽ để nghiên cứu sự đa dạng của quần thể và phát hiện thêm nhiều loci quan trọng, đặc biệt là các loci liên kết với các tính trạng nông học phức tạp như tính trạng năng suất (Huang *et al.*, 2012).

Nghiên cứu GWAS các tính trạng liên quan đến năng suất đã được tiến hành trên tập đoàn lúa địa

phương Việt Nam và đã xác định được 29 QTLs tiềm năng. Trong số đó, đáng chú ý là QTL9 chứa 9 chỉ thị SNP (Single Nucleotide Polymorphism), liên kết chặt với 2 tính trạng số gié thứ cấp/bông và số hạt/bông. Tuy nhiên, kết quả của GWAS dựa trên các phân tích thống kê, do vậy các QTL mới tìm được cần được nghiên cứu và chứng minh trong quần thể con lai trước khi đưa vào sử dụng trong các chương trình chọn giống. Vì vậy, trong nghiên cứu này, các quần thể lai F1 đã được tạo ra bằng cách lai 2 nhóm giống lúa bản địa Việt Nam có kiểu hình bông trái ngược nhau (bông to và bông nhỏ), nhằm tạo vật liệu khởi đầu cho việc đánh giá vai trò của QTL9 trong các quần thể lai tái tổ hợp (F2, F3).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Bốn giống lúa địa phương chứa 9 SNPs nằm trong vùng QTL9 liên kết với số gié thứ cấp/bông và số hạt/bông, có kiểu hình cấu trúc bông trái ngược nhau (bông to và bông nhỏ) được sử dụng làm bố mẹ để tạo quần thể lai. Nhóm bông nhỏ gồm 2 giống: Sớm Giai Hưng Yên (G6), Ôn (G19), nhóm bông to: Khẩu Nam Rinh (G189), Blé Blâu Cho (G205). Thông tin chi tiết về các giống được trình bày trong bảng 1.

- 12 cặp mỗi SSR (Microsatellite Marker) đã được công bố cho sự đa hình giữa các giống lúa được sử dụng để chọn lọc các cây F1 (Bảng 2).

¹ Phòng thí nghiệm Việt - Pháp (LMI-RICE2), Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam; ² Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

³ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội; ⁴ Viện Nghiên cứu và Phát triển Pháp (IRD)

⁵ Plant Genetics Laboratory, National Institute of Genetics, Japan

Bảng 1. Một số chỉ số về cấu trúc bông và năng suất của các giống lúa sử dụng làm bố mẹ để tạo các quần thể lai F1

Tên giống	Địa điểm thu thập	Năm	Chiều dài bông (cm)	Số gié sơ cấp/ bông	Chiều dài gié sơ cấp (cm)	Khoảng cách giữa các gié sơ cấp	Số gié thứ cấp/ bông	Chiều dài gié thứ cấp	Khoảng cách giữa các gié thứ cấp	Số gié tam cấp/ bông	Số hạt/ bông	Thời gian ra hoa (ngày)
Sớm Giai Hưng Yên	Không xác định	2014	18,21	11,22	11,88	1,81	23,67	2,93	1,12	0,06	130,22	96,50
Ồn	Hà Nội	2014	19,61	11,39	12,10	1,90	24,22	2,58	1,16	0,00	133,94	95,50
Khẩu Nam Rinh	Điện Biên	2014	20,41	11,83	14,29	1,91	48,67	3,30	0,72	0,44	250,50	94,50
Blé Bláu Cho	Sơn La	2014	22,09	11,78	14,58	2,05	44,44	3,15	0,99	0,00	220,33	99,00
Sớm Giai Hưng Yên	Không xác định	2015	25,04	13,61	16,38	2,03	34,83	4,01	1,40	0,06	187,33	101,00
Ồn	Hà Nội	2015	27,58	13,83	17,02	2,18	31,11	3,53	1,69	0,44	176,83	100,50
Khẩu Nam Rinh	Điện Biên	2015	29,85	12,72	20,59	2,57	45,22	4,76	1,19	0,89	228,22	79,00
Blé Bláu Cho	Sơn La	2015	28,97	13,33	18,30	2,35	47,39	3,97	1,38	0,50	244,22	108,00

Ghi chú: Các giống lúa được trồng vào vụ Mùa tại ruộng thí nghiệm của Trung tâm Tài nguyên Di truyền thực vật (2014) và Trạm Nghiên cứu Nông nghiệp Văn Giang (2015).

Bảng 2. Các chỉ thị phân tử SSR sử dụng để chọn lọc cây F1

Tên chỉ thị	Số hiệu	NST	Trình tự lặp	Kích cỡ (bp)	Trình tự mỗi	Tác giả
RM151	L37528	1	(TA)23	205 - 317	F-ggctgctcatcagctgcatgcg R-tcggcagtggttagattgatctgc	Temnykh <i>et al.</i> , 2000; Akagi <i>et al.</i> , 1996
RM180	D63901	7	(ATT)10	107 - 204	F-ctacatcggccttaggttagcaacacg R-acttgctacttggtgagggactg	Temnykh <i>et al.</i> , 2000
RM204	AF344025	6	(CT)44	106 - 194	F-gtgactgacttggtcataggg R-gctagccatgctctctgacc	Chen <i>et al.</i> , 1997
RM289	AF344115	5	G11(GA)16	88 - 180	F-ttccatggcacacaagcc R-ctgtgcacgaactccaag	Temnykh <i>et al.</i> , 2000
RM320	AF344145	7	(AT)11G-TAT(GT)13	153 - 254	F-caactgtagcaggatagatc R-ggatttgctaccacagctc	Temnykh <i>et al.</i> , 2000
RM400	AQ051253	6	(ATA)63	195 - 321	F-acaccaggctaccaaaactc R-cggagagatctgacatgtgg	Temnykh <i>et al.</i> , 2001
RM410	AQ156440	9	(TA)13	173 - 269	F-gctcaactgttctctctg R-gaagatgctgaaagtgaacgg	Temnykh <i>et al.</i> , 2001
RM491	AQ510175	12	(AT)14	263 - 400	F-acatgatgctgtagcagattg R-ctctccctccaattctc	Temnykh <i>et al.</i> , 2001
RM532	AQ843286	3	(CA)9	166 - 180	F-tctataatgtagccccccc R-ttcaggggcttctaccaac	Temnykh <i>et al.</i> , 2001
RM535	AQ857127	2	(AG)11	138 - 410	F-actacatacagggccttgc R-ctactggacaccgtcacac	Temnykh <i>et al.</i> , 2001
RM577	AP000816	1	(TA)9(-CA)8	191 - 270	F-gcttcccttaaccctct R-ggatgtaccgctgacatgaa	Temnykh <i>et al.</i> , 2001 McCouch <i>et al.</i> , 2001
RM592	AC016779	5	(ATT)20	210 - 400	F-tctttggtgtaggaacacc R-agagatccggtttgtgtaa	Temnykh <i>et al.</i> , 2001

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định các giống lúa bố mẹ để tạo quần thể lai F1

Dựa vào sự phân tích đa hình của 9 SNP nằm trong vùng QTL9 và kiểu hình cấu trúc bông cũng như các tính trạng khác liên quan đến năng suất giữa các giống lúa trong tập đoàn nghiên cứu GWAS để xác định các giống lúa chứa đa hình của 9 SNPs nằm trong vùng QTL9 và có kiểu hình bông trái ngược nhau (bông to và bông nhỏ), dùng làm bố mẹ để tạo quần thể lai F1.

2.2.2. Tạo quần thể lai F1

Quần thể F1 được lai tạo bằng phương pháp lai truyền thống. Các giống lúa được chọn làm bố mẹ để lai được gieo trồng tại nhà lưới Viện Di truyền Nông nghiệp, mỗi giống 5 cây, trồng thành 3 đợt, mỗi đợt cách nhau 1 tuần. Cây được trồng trong xô nhựa có dung tích 5 L chứa 50% đất thịt + 50% giá thể chuyên dùng trồng lúa. Vì có sự chênh lệch về thời gian ra hoa nên các giống có thời gian ra hoa dài hơn được trồng trước (G6, G205) 1 - 2 tuần so với các giống có thời gian ra hoa sớm (G19, G189) nhằm đảm bảo các giống ra hoa cùng thời điểm để tiến hành lai. Việc xử lý thời gian chiếu sáng trong ngày nhằm mục đích điều khiển sự ra hoa đã được tiến hành. Các giống lúa bố mẹ được xử lý theo quang chu kỳ 9 giờ chiếu sáng/ngày (từ 8 h sáng đến 17 h chiều) và 15 h trong bóng tối sau 2 tháng gieo trồng cho đến khi cây lúa trở bông.

2.2.3. Chọn lọc cây F1 bằng chỉ thị phân tử SSR

a) Thu thập mẫu và tách chiết ADN

20 hạt F1 của mỗi cặp lai được gieo trồng trong nhà lưới để đánh giá bằng chỉ thị phân tử SSR. Cây lúa sau khi gieo trồng từ 20 ngày, lấy lá thứ 2 từ trên xuống làm mẫu phân tích ADN. ADN được tách chiết bằng phương pháp sử dụng CTAB của Doyle và Doyle có cải tiến (Doyle, 1991).

b) Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 20 µl, gồm 20 ng ADN, 0,1 mM dNTPs (#R0182, Fermentas), 0,1 µM mỗi xuôi và ngược, 2 µl 10X Dream Taq Buffer (#R0971, Fermentas), 0,2 µl Dream

Taq DNA polymerase 5u/µl (#EP0702, Fermentas) và nước Milli Q khử trùng. Chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút, và 30 chu kỳ: 95°C - 30 giây, Ta - 30 giây (nhiệt độ gắn mỗi), 72°C - 30 giây và giữ 5 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2,5% rồi được soi trong buồng UV (Uvltec, Cambridge), phần mềm Fire Reader. Các thí nghiệm điện di sử dụng thang chuẩn ADN Low Gene Ruler 100 bp (#SM1163, Fermentas).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

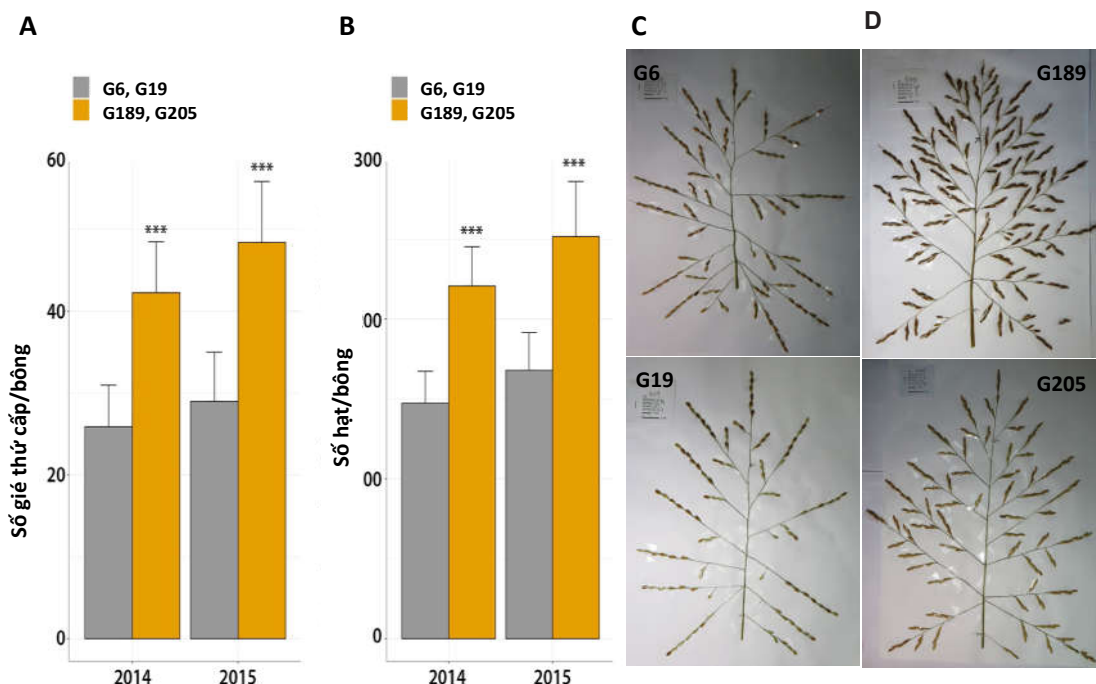
Các giống lúa bố mẹ được gieo trồng vào vụ Xuân năm 2017 và được lai với nhau tại nhà lưới Viện Di truyền Nông nghiệp. Các dòng F1 được trồng và đánh giá vào vụ Mùa năm 2017, cũng tại nhà lưới Viện Di truyền Nông nghiệp.

Các thí nghiệm sinh học phân tử nhằm chọn lọc cây F1 được tiến hành tại Phòng thí nghiệm LMI-RICE2, Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định các giống lúa bố mẹ để tiến hành lai tạo quần thể lai F1

Vùng QTL9 chứa 9 SNP (gagagcgaa/atataaatt) liên kết chặt với nhau và liên kết với 2 tính trạng số gié thứ cấp/bông và số hạt/bông. Các giống lúa bố mẹ được xác định dựa vào phân tích sự đa hình của 9 SNP và kiểu hình cấu trúc bông cũng như thời gian ra hoa của các giống lúa trong tập đoàn. Bốn giống lúa cho sự đa hình SNP và có kiểu hình cấu trúc bông khác biệt tương đối lớn đã được chọn ra. Hai giống G6 và G19 chứa 9 SNP (gagagcgaa) có kiểu hình bông nhỏ, số gié thứ cấp/bông dao động từ 23 - 34 gié đối với giống G6 và 24 - 31 gié đối với giống G19, số hạt/bông của giống G6 là từ 130 - 187 hạt trong khi giống G19 đạt 133 - 177 hạt. Hai giống có kiểu hình bông to G189 và G205 chứa 9 SNP (ata-taaatt) có số gié thứ cấp/bông khoảng 45 - 48 gié và số hạt/bông từ 220 - 250 hạt (Bảng 1, hình 1). Như vậy bốn giống lúa (G6, G19, G189, G205) được chọn để lai với nhau để tạo các quần thể lai F1, trong đó nhóm lúa bông nhỏ (G6, G19) được chọn làm cây mẹ, nhóm lúa bông to (G189, G205) được chọn làm cây bố.



Hình 1. Hình thái cấu trúc bông của 4 giống lúa sử dụng làm bố, mẹ để tạo quần thể lai F1

Ghi chú: A: số gié thứ cấp/bông của 2 nhóm lúa bông nhỏ G6, G19 (màu ghi) và bông to G189, G205 (màu vàng); B: số hạt/bông của 2 nhóm lúa bông nhỏ G6, G19 (màu ghi) và bông to G189, G205 (màu vàng); C: ảnh bông lúa của 4 giống G6, G19, G189 và G205.

3.2. Tạo quần thể lai F1

Các giống lúa bố mẹ (G6, G19 và G189, G205) được trồng trong chậu vại tại nhà lưới của Viện Di truyền Nông nghiệp vào vụ Xuân năm 2017. Đến thời kỳ ra hoa, các cặp lai được tiến hành lai với nhau theo phương pháp truyền thống. Năm ngày sau khi lai, hạt lai F1 đã xuất hiện trên bông ở tất cả các cây mẹ của 2 giống G6, G19.

3.3. Chọn lọc cây F1 bằng chỉ thị phân tử SSR

3.3.1. Khảo sát đa hình giữa hai giống bông bố mẹ để xác định những chỉ thị SSR cho đa hình

Mười hai chỉ thị phân tử SSR đã được công bố cho sự đa hình giữa các giống lúa (Bảng 2) đã được sử dụng để khảo sát đa hình giữa các cặp giống bông bố mẹ. Phân tích kết quả các phản ứng PCR với ADN khuôn là ADN của các giống bố mẹ với 12 cặp mỗi tương ứng với 12 chỉ thị phân tử cho thấy có 7 chỉ thị cho đa hình giữa các giống bố mẹ. Trong đó, 2 chỉ thị RM320 và RM180 chỉ cho duy nhất sự đa hình về chiều dài ADN giữa giống G6 và 3 giống còn lại (G19, G189, G205) (Hình 3B, 3C), do đó nó có thể được sử dụng để phân tích quần thể F1 của 2 cặp lai G6 × G189 và G6 × G205. Ngược lại, 2 chỉ thị phân tử RM204 và RM289 cho đa hình về chiều dài ADN giữa giống G19 và 3 giống còn lại (G6, G189, G205)

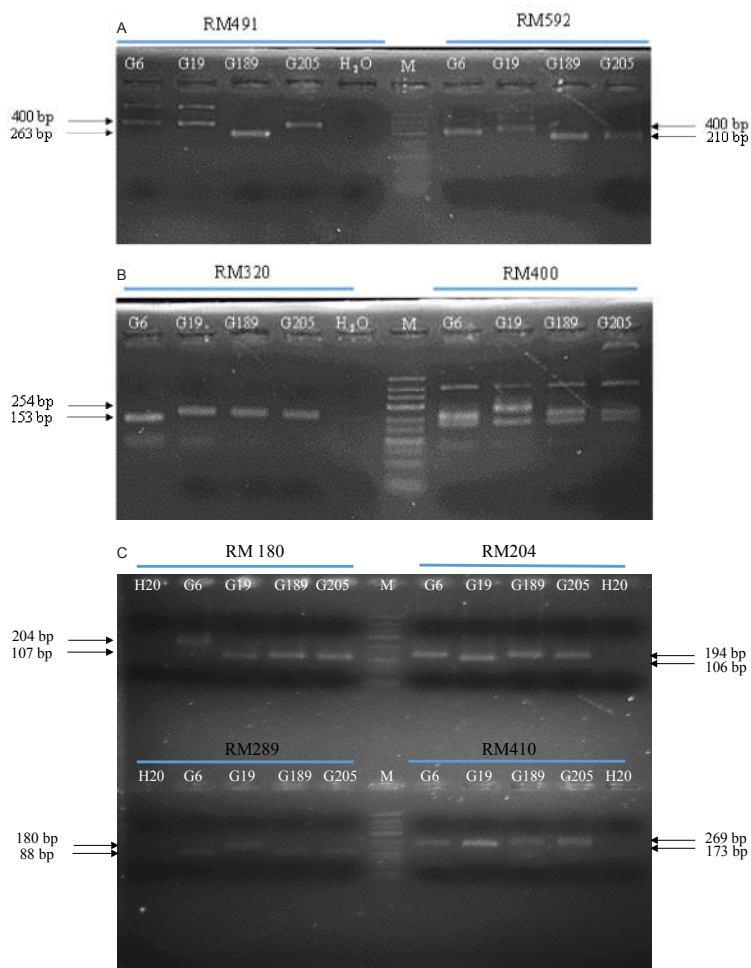
và có thể sử dụng để phân tích quần thể lai F1 của 2 cặp G19 × G189 cũng như G19 và G205 (Hình 3C). Chỉ thị phân tử RM491 mặc dù không đặc hiệu ở 2 giống G6 và G19 nhưng vẫn cho sự đa hình giữa 2 giống so với giống 189 (Hình 3A) nên có thể sử dụng để chọn lọc cây F1 của 2 cặp lai G6 × G189 và G19 × G189. Hai chỉ thị phân tử RM592 và RM410 cho sự đa hình giữa 2 nhóm giống bố, mẹ (Hình 3A và 3C) nên có thể sử dụng để xác định cây F1 của cả 4 cặp lai. Năm chỉ thị RM151, RM 400, RM532, RM535 và RM577 không cho đa hình giữa các giống bố mẹ.

3.3.2. Chọn lọc các dòng F1 bằng chỉ thị phân tử

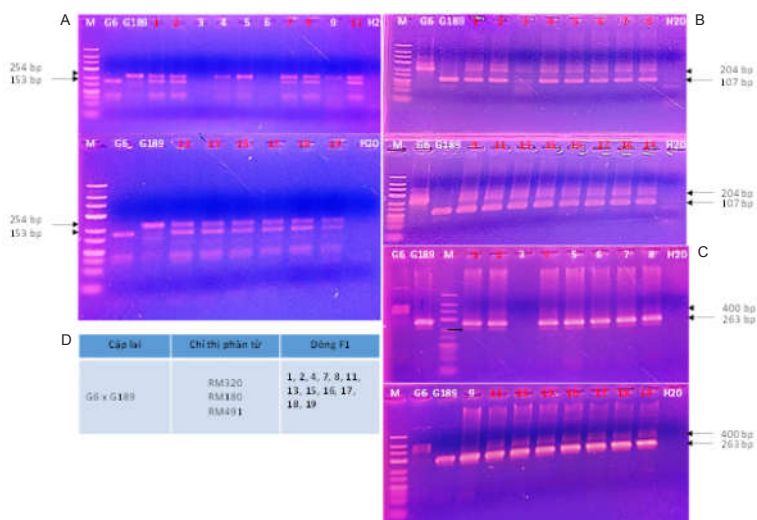
Từ kết quả thu được của phân khảo sát đa hình các chỉ thị phân tử ở các giống bố mẹ, các dòng lai F1 thu được từ 4 cặp lai khác nhau đã được đánh giá với 7 chỉ thị phân tử cho sự đa hình tương ứng với từng cặp lai như trong bảng 3.

a) Quần thể lai F1 của cặp lai G6 × G189

Quần thể lai F1 của cặp lai G6 × G189 được phân tích với 3 chỉ thị phân tử RM320, RM180, RM491. Chỉ thị RM320 cho phép xác định 11 dòng F1 mang cả 2 locus của bố và mẹ (Hình 4A), còn với chỉ thị RM180 và RM491 số dòng F1 được xác định lần lượt là 16 và 10 dòng (Hình 4B và 4C). Tổng hợp kết quả phân tích với 3 chỉ thị phân tử, 11 dòng F1 được xác định ít nhất với 2 chỉ thị phân tử (Hình 4D).



Hình 3. Khảo sát sự đa hình của các chỉ thị phân tử SSR ở các giống bố mẹ (G6, G19, G189, G205)
 Ghi chú: A: khảo sát sự đa hình của 2 chỉ thị phân tử RM491 và RM592; B: khảo sát sự đa hình của 2 chỉ thị phân tử RM320 và RM400; C: khảo sát sự đa hình của 4 chỉ thị phân tử RM180, RM204, RM289, RM410.

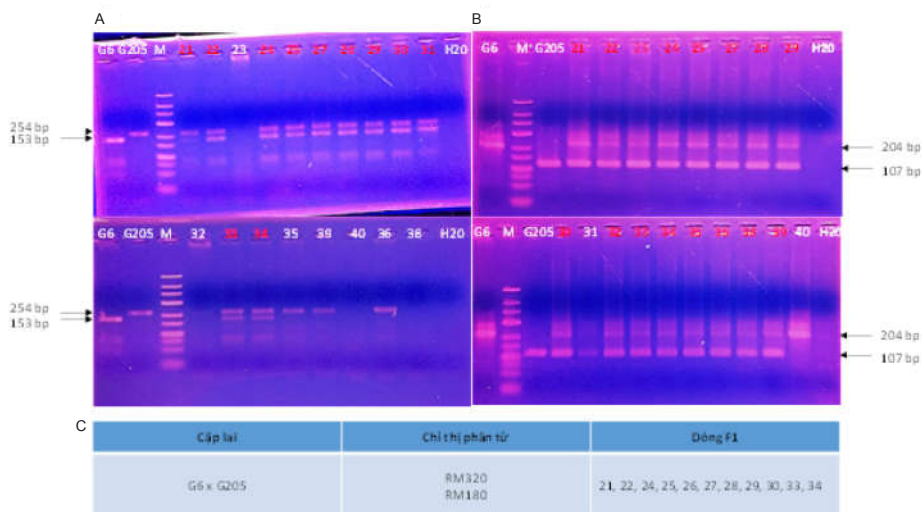


Hình 4. Kết quả chọn lọc dòng F1 của cặp lai G6 x G189 với 3 chỉ thị phân tử RM320 (A), RM180 (B) và RM491 (C). D, các dòng F1 được chọn bằng ít nhất 2 chỉ thị SSR
 Ghi chú: M: thang chuẩn ADN 100 bp (Promega).

b) Quần thể lai F1 của cặp lai G6 × G205

Các dòng lai F1 được phân tích bằng 2 chỉ thị phân tử RM320 và RM180. Cả 2 chỉ thị đều cho

phép xác định các cây F1 mang cả 2 locus của bố và mẹ (Hình 5A và 5B). Như vậy, 11 dòng F1 được khẳng định bởi cả 2 chỉ thị phân tử (Hình 5C).



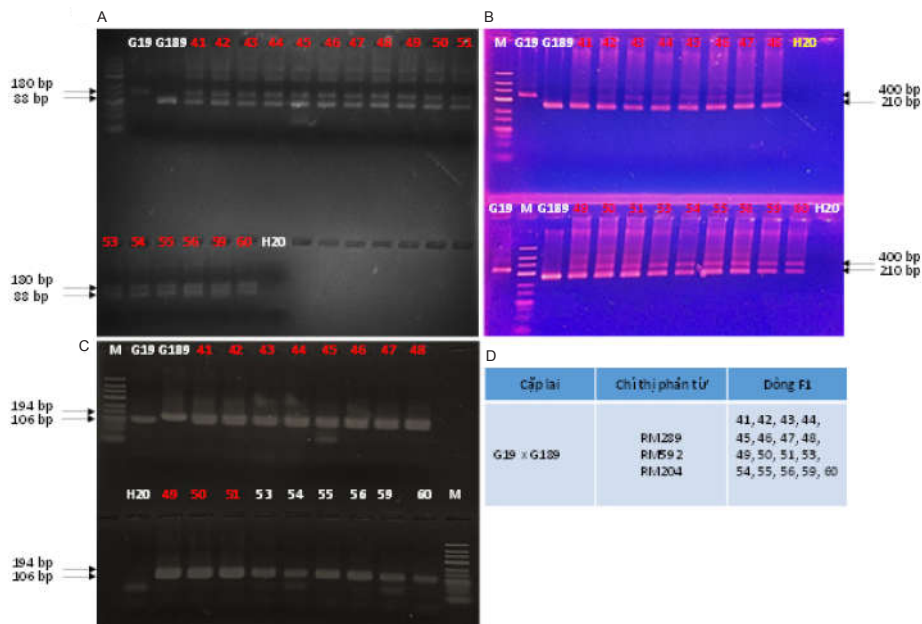
Hình 5. Kết quả chọn lọc dòng F1 của cặp lai G6 × G205 với 2 chỉ thị phân tử RM320 (A), RM180 (B). C: các dòng F1 được chọn bằng ít nhất 2 chỉ thị SSR

Ghi chú: M: thang chuẩn ADN 100 bp (Promega).

c) Quần thể lai F1 của cặp lai G19 × G189 và cặp lai G19 × G205

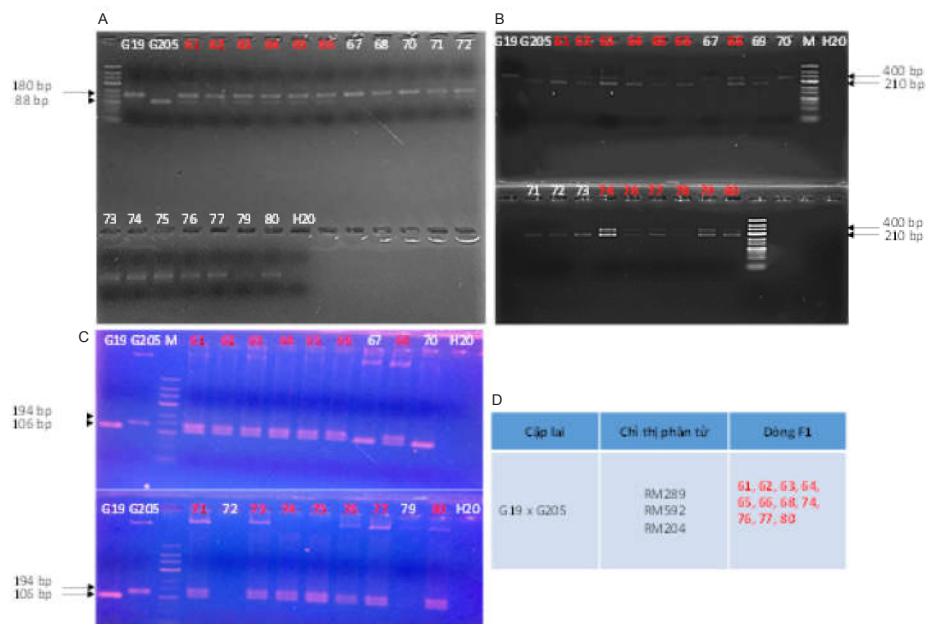
Các dòng lai F1 của 2 cặp lai G19 × G189 và cặp lai G19 × G205 được phân tích bằng 3 chỉ thị phân tử RM289 và RM592 và RM204. Cả 3 chỉ thị đều cho

phép xác định các cây F1 mang cả 2 locus của bố và mẹ (Hình 6A, 6B và 6C, 7A, 7B và 7C). Tổng hợp kết quả phân tích, 17 dòng lai F1 của cặp lai G19 × G189 và 11 dòng lai F1 của cặp lai G19 × G205 được khẳng định bởi ít nhất 2 chỉ thị phân tử (Hình 6D và 7D).



Hình 6. Kết quả chọn lọc dòng F1 của cặp lai G19 × G189 với 3 chỉ thị phân tử RM289 (A), RM592 (B) và RM204 (C). D: các dòng F1 được chọn bằng ít nhất 2 chỉ thị SSR

Ghi chú: M: thang chuẩn ADN 100 bp (Promega).



Hình 7. Kết quả chọn lọc dòng F1 của cặp lai G19 × G205 với 3 chỉ thị phân tử RM289 (A), RM592 (B) và RM204 (C). D, các dòng F1 được chọn bằng ít nhất 2 chỉ thị SSR

Ghi chú: M: thang chuẩn ADN 100 bp (Promega).

IV. KẾT LUẬN

Bốn quần thể lai F1 đã được tạo ra từ 4 giống lúa bố mẹ đại diện cho 2 nhóm lúa có cấu trúc bông to và nhóm có cấu trúc bông nhỏ, mang QTL9 liên quan đến các tính trạng năng suất. Đánh giá độ đa hình của mười hai chỉ thị phân tử SSR giữa các cây bố, mẹ đã thu được 7 chỉ thị có sự đa hình và 5 chỉ thị không cho sự đa hình hoặc không đặc hiệu. Phân tích 80 cây F1 bằng 7 chỉ thị cho sự đa hình đã chọn ra được 51 cây F1 mang cả 2 locus của bố và mẹ, là nguồn vật liệu khởi đầu để tạo các quần thể tái tổ hợp F2 và F3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akagi Y, Yokozeki A, Inagaki T, Fujimura, 1996. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (7): 1071-1077.
- Bai, Xufeng, Bi Wu, and Yongzhong Xing, 2012. Yield-Related QTLs and Their Applications in Rice Genetic Improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54 (5): 300-311.
- Chen S, Temnykh Y, Xu Y, G. Cho S. R. McCouch, 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 95 (4): 553-567.
- Doyle J., 1991. *DNA Protocols for Plants*. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Huang, Xuehui, Yan Zhao, Xinghua Wei, Canyang Li, Ahong Wang, Qiang Zhao, Wenjun, 2012. Genome-Wide Association Study of Flowering Time and Grain Yield Traits in a Worldwide Collection of Rice Germplasm. *Nature Genetics*, 44 (1): 32-39.
- Ikeda, Mayuko, Kotaro Miura, Koichiro Aya, Hidemi Kitano, and Makoto Matsuoka, 2013. Genes Offering the Potential for Designing Yield-Related Traits in Rice. *Current Opinion in Plant Biology*, March.
- McCouch, S, Temnykh, A, Lukashova, J, Coburn, G, DeClerck, S, Cartinhour, S, Harrington, M, Thomson, E, Septiningsih, M, Semon, P, Moncada and Jiming Li, 2001. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications. *Rice Genetics Collection Rice Genetics IV*: 117-135.
- Temnykh S., William D. Park, Nicola Ayres, Sam Cartinhour, N. Hauck, L.Lipovich, Y. G. Cho, T. Ishii, S. R. McCouch, 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 100 (5): 697-712.
- Temnykh Svetlana, Genevieve DeClerck, Angelika Lukashova, Leonard Lipovich, Samuel Cartinhour1, and Susan McCouch, 2001. Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential. *Genome Res.*, 11: 1441-1452.
- Xing, Yongzhong, and Qifa Zhang, 2010. Genetic and Molecular Bases of Rice Yield. *Annual Review of Plant Biology* 61 (1): 421-442.

Creation of F1 populations as prebreeding materials to characterize the role of QTL9 for yield-related traits in Vietnamese local rice collection

Vu Thi Nhien, Tạ Kim Nhung, Stefan Jouannic, Le Hung Linh, Pham Xuan Hoi, Tran Khanh Van, Tran Vu Hang, Pham Thi Mai, Le Thi Nhu, Khong Ngan Giang

Abstract

Grain yield is one of the most important indexes in rice breeding, which is controlled by quantitative trait loci (QTLs). Recombinant inbred line populations (RILs) have been widely used to discover QTLs in rice genome-wide, with hundreds of yield-related QTLs. In this research, F1 populations were created as prebreeding materials to develop RILs populations for validation of new QTL deriving from GWAS analysis for yield-related traits in Vietnamese local varieties. Four F1 populations were obtained from 4 crossings between 2 groups of rice displaying contrasted panicle structures, low branched versus high branched. Twelve SSR markers were tested for checking F1 lines, among them 7 SSR markers gave polymorphisms between parent lines. Therefore, 51 F1 lines selected by 7 SSR markers can be used as prebreeding materials to evaluate the role of the candidate QTL.

Keywords: QTL, F1 populations, RILs, DNA, SSR

Ngày nhận bài: 18/9/2018

Ngày phản biện: 22/9/2018

Người phản biện: TS. Trần Danh Sừ

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC GEN 35S::*GmNAC004* VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22 THÔNG QUA CHỦNG KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

Nguyễn Văn Đồng¹, Nguyễn Anh Vũ¹,
Lê Thị Mai Hương¹, Nguyễn Trung Anh¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, gen *GmNAC004* được sử dụng để biến nạp vào 3029 mẫu nửa lá mầm của giống đậu tương ĐT22 thông qua chủng khuẩn *A. tumefaciens* EHA101 mang vector *pZY101::35S::GmNAC004*. Kết quả biến nạp cho thấy, tỷ lệ mẫu tạo đa chồi đạt 69,56% và tỷ lệ mẫu sống sót sau chọn lọc đạt 3,84%. Phân tích cây đậu tương tái sinh sau quá trình chuyển gen đã thu được 18 dòng, vừa kháng thuốc trừ cỏ đồng thời cũng dương tính với phân tích PCR, đạt hiệu suất chuyển gen 0,59%, 18 dòng này đều có biểu hiện gen ở thế hệ T₁.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, chuyển gen, 35S::*GmNAC004*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các yếu tố phiên mã NAC (NAM, ATAF và CUC) đã được báo cáo là tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng đối với các điều kiện bất thuận như hạn, mặn và lạnh (Tran *et al.*, 2010). Các nghiên cứu sâu về yếu tố NAC trên một số cây trồng đã đưa ra giả thuyết là ít nhất có 105 yếu tố phiên mã NAC ở cây *Arabidopsis*, 140 ở cây lúa, 205 ở cây đậu tương và 152 ở cây thuốc lá (Fang *et al.*, 2008; Mochida *et al.*, 2009; Ooka *et al.*, 2003; Rushton *et al.*, 2008).

Trong nhóm gen *GmNAC*, gen *GmNAC004* là một trong những gen điều khiển liên quan đến khả năng chịu hạn, mặn và lạnh có khả năng biểu hiện mạnh (Tran *et al.*, 2009). Lần đầu tiên, nghiên cứu về siêu

biểu hiện của 2 cấu trúc *pGreen-P35SGmNAC003* và *pGreen-P35S-GmNAC004* trên cây *Arabidopsis* được công bố (Truyen *et al.*, 2014). Các cây *Arabidopsis* biểu hiện gen *GmNAC004* cho thấy sự gia tăng số lượng và chiều dài rễ trong điều kiện không hạn và duy trì số lượng và chiều dài rễ dưới điều kiện hạn nhẹ so với cây đối chứng, trong khi cây biến đổi gen *GmNAC003* không cho thấy bất kỳ phản ứng nào.

Cho tới nay, tất cả các công trình biến nạp gen vào đậu tương mới chỉ thành công trên giống mô hình như G. max 'Jack', Williams. Do có sự khác biệt về nguồn gốc nên hầu hết các giống mô hình khó ra hoa kết quả tại Việt Nam. Nguyễn Văn Đồng và cộng tác viên (2017) đã nghiên cứu chuyển gen

¹ Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp