

Chọn lọc cá thể mang QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông ở quần thể BC_2F_1 để cải tiến năng suất dòng NPT1 nhờ ứng dụng chỉ thị phân tử

Nguyễn Thị Thúy Anh^{1*}, Trần Trung¹, Khuất Hữu Trung²,
Lê Hùng Linh², Trần Đăng Khánh²

¹Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Hưng Yên

²Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 11/9/2017; ngày chuyển phản biện 14/9/2017; ngày nhận phản biện 12/10/2017; ngày chấp nhận đăng 20/10/2017

Tóm tắt:

Trong những năm gần đây, trước những diễn biến ngày càng phức tạp của biến đổi khí hậu toàn cầu ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây lúa, việc chọn tạo giống lúa vừa có năng suất cao, vừa có chất lượng tốt là ưu tiên hàng đầu của các nước sản xuất lúa gạo trên thế giới. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC) là phương pháp thiết thực, hiệu quả để lai chuyển QTL hoặc gen vào dòng/giống ưu tú. Trong nghiên cứu này, ứng dụng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử kết hợp lai trở lại, đã lai chuyển thành công QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông từ dòng cho gen KC25 vào dòng nhận gen (NPT1). Ở thế hệ BC_2F_1 đã chọn lọc được cá thể số 122 mang gen tăng số hạt trên bông và có nền di truyền cao nhất giống cây nhận gen đạt 96,2%.

Từ khóa: Chọn giống phân tử kết hợp lai trở lại (MABC), KC25, NPT1, QTL/gen.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực quan trọng nhất, đồng thời cũng là nguồn cung cấp thức ăn chính cho nhiều quốc gia trên thế giới. Nhu cầu cần thêm lúa gạo toàn cầu vào khoảng 676 triệu tấn vào năm 2010, dự báo sẽ lên tới 763 triệu tấn vào năm 2020 và tiếp tục tăng lên 852 triệu tấn vào năm 2035 [1]. Để đáp ứng mục tiêu này, sản lượng lúa gạo trên toàn thế giới phải gia tăng đáng kể. Thực tế cho thấy, sản lượng lúa phụ thuộc chủ yếu vào tiềm năng năng suất của các giống lúa. Do đó, việc cải thiện tiềm năng năng suất lúa là một trong những chiến lược quan trọng để tăng sản lượng lúa gạo thế giới và đảm bảo an ninh lương thực cũng như tăng thu nhập cho người trồng lúa.

Năng suất và yếu tố cấu thành năng suất lúa được tạo thành bởi các yếu tố chính: Số bông/đơn vị diện tích, số hạt/bông, tỷ lệ hạt chắc/bông và khối lượng nghìn hạt. Trong đó, ba tính trạng quan trọng quy định yếu tố cấu thành năng suất bao gồm: Số bông/khóm, số hạt/bông và khối lượng nghìn hạt. Tính trạng cấu thành năng suất là một tính trạng nông học phức hợp do nhiều gen quy định, và gọi là tính trạng di truyền số lượng (QTLs) [2].

Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC) là phương pháp tiên tiến, thiết thực và hiệu quả trong việc lai chuyển locus gen hay gen quy định tính trạng di truyền số lượng (QTL) vào giống mới. Ngày nay, với sự phát triển

vượt bậc của công nghệ sinh học hiện đại, rất nhiều QTL/gen quy định tính trạng cấu thành năng suất đã được xác định và định vị trên tất cả các nhiễm sắc thể của lúa. Từ đó, các nhà chọn giống đã sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết với những QTL/gen mục tiêu để cải tiến thành công năng suất lúa, tăng năng suất bình quân từ 5,7-36%. Điển hình như ở Trung Quốc, năm 2014, các nhà chọn giống đã lai chuyển thành công gen *GW6* quy định khối lượng nghìn hạt bằng phương pháp MABC vào giống lúa trồng đại trà và làm tăng 30% khối lượng nghìn hạt, tăng tương đương 7% năng suất lúa. Gần đây, tác giả Liu và nhóm nghiên cứu (2016) [3] đã xác định được một QTL quy định tính trạng chiều dài bông *LPI* có nguồn gốc từ dòng C-bao vào giống lúa đại trà Xiushui79. Kết quả cho thấy, chiều dài bông tăng 42,02% và năng suất tăng 13,73%.

Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là ứng dụng chỉ thị phân tử kết hợp phương pháp lai trở lại để lai chuyển và quy tụ QTL/gen quy định tăng số hạt trên bông vào dòng NPT1 nhằm tăng năng suất, đồng thời vẫn giữ nguyên đặc tính di truyền của giống nhận QTL/gen là việc làm cần thiết và có ý nghĩa.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Giống lúa KC25 và dòng NPT1, trong đó NPT1 là

*Tác giả liên hệ: thuyanh2110@gmail.com

Application of molecular breeding to select the individual plants carrying the QTL/gene (increasing the number of grains per panicle) from the BC₂F₁ population for improving the yield of NPT1 variety

Thi Thuy Anh Nguyen^{1*}, Trung Tran¹,
Huu Trung Khuat², Hung Linh Le², Dang Khanh Tran²

¹Hung Yen University of Technology and Education

²Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

Received 11 September 2017 ; accepted 20 October 2017

Abstract:

In recent years, the increasingly complicated climate change has caused adverse impacts on rice production, hence improving rice varieties with high yield and good quality is the main objective of worldwide scientists. Marker-assisted backcrossing (MABC) is one of the powerful methods to introgress the specific quantitative trait loci (QTL)/gene into the elite rice variety. In the study, we have successfully transferred QTL/gene which controls the trait of increasing number of grains per panicle from the donor KC25 into the recipient NPT1. The results have revealed that the selected individual plant numbered 122 in the BC₂F₁ population carried the target gene and attained the highest background of NPT1 up to 96.2%.

Keywords: KC25, Marker-assisted backcrossing (MABC), NPT1, QTL/gene.

Classification number: 4.6

giống lúa nhập nội triển vọng được trồng khá phổ biến ở các tỉnh Đồng bằng sông Hồng, giống KC25 có nguồn gốc nhập nội mang QTL/gen tăng số hạt trên bông.

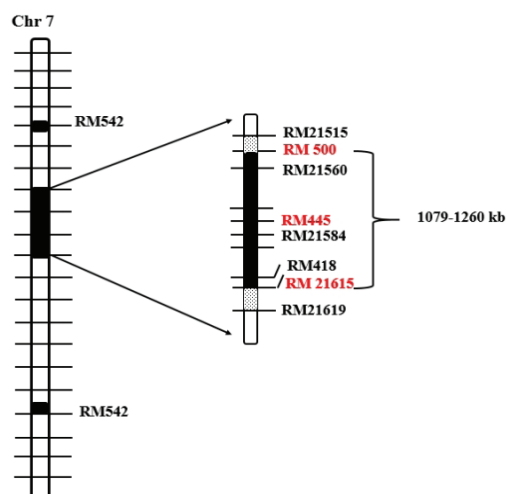
- Cá thể số 54 là cá thể từ thế hệ BC₁F₁ đã được xác định mang QTL/gen tăng số hạt trên bông và có nền di truyền cao nhất của cây nhận gen, được kế thừa từ những nghiên cứu trước đó [4].

- 03 chỉ thị phân tử đa hình tại vị trí QTL/gen quy định tăng số hạt trên bông gồm RM445, RM500, RM21615. Kết quả nghiên cứu của tác giả Linh và cs (2008) [5], đã xác định được chỉ thị RM445 nằm trên vùng gen và chỉ thị RM500, RM21615 là 2 chỉ thị cận biên lần lượt tại các vị trí 17,46Mb, 15,91Mb, 18,25Mb (bảng 1, hình 1).

- 63 chỉ thị phân tử đa hình trải đều trên 12 nhiễm sắc thể (NST) giữa hai giống NPT1 và giống KC25 (bảng 2).

Bảng 1. Các chỉ thị cho đa hình giữa giống NPT1 x KC25 tại vị trí QTL/gen.

Tên môi	Môi xuôi	Môi ngược	Kích thước (bp)
RM445	CGTAACATGCATATCACGCC	ATATGCCGATATGCGTAGCC	251
RM500	GAGCTTGCCAGAGTGGAAG	GTTACACCGAGAGCCAGCTC	259
RM21615	CTTCTCTCTCGGCCGTTGC	GAGGAGCCAGGCGAACATCACC	130



Hình 1. Vị trí của QTL/gen *yd7* quy định tăng số hạt trên bông định vị trên NST số 7 [5].

Bảng 2. Các chỉ thị cho đa hình giữa giống NPT1 x KC25 trải đều trên 12 NST.

NST	Chỉ thị phân tử cho đa hình	Số lượng
1	RM10115, RM10136, RM10694, RM10741, RM10800, RM10815, RM10916, RM11062, RM11438, RM11504, RM1287, RM3412b, RM5365, RM7075	14
2	RM1243, RM526, RM5356, RM6, RM7355	5
3	RM14795, RM14820, RM282, RM3654, RM5480, RM7389	6
4	RM16589, RM16820, RM280, RM3333, RM349, RM551	6
5	RM19199, RM31	2
6	RM19238, RM3, RM345, RM494, RM527, RM528, RM7434	7
7	RM11, RM21539, RM21769, RM248, RM7338	5
8	RM22825, RM331, RM447	3
9	RM1026, RM296, RM11874, RM1208	4
10	RM24865, RM25181, RM25271, RM3628	4
11	RM3137, RM7283, RM19840, RM341	4
12	RM1194, RM247, RM7102	3
Tổng		63

Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN: Theo phương pháp CTAB cải tiến dựa trên cơ sở phương pháp của Shagai - Maroof.

- Kỹ thuật PCR.

- Kỹ thuật điện di trên gel Agarose 0,8%; 3,5%.

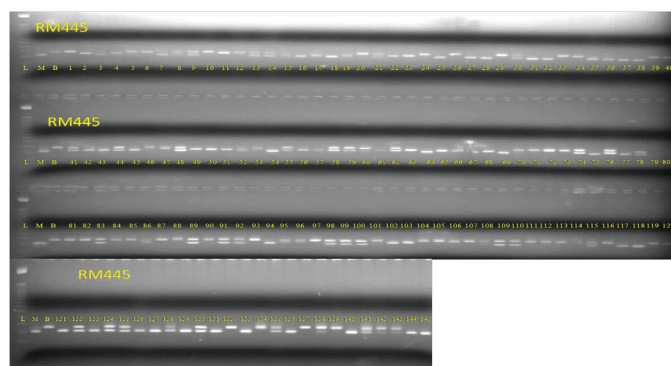
- Phương pháp phân tích số liệu thống kê: Số liệu được xử lý thống kê trên máy tính bằng chương trình Excel 2007, IRRISTART 5.0 và phần mềm GGT2.

Kết quả và thảo luận

Chọn lọc cá thể BC_2F_1 mang QTL/gen tăng số hạt trên bông

Cá thể mang QTL/gen tăng số hạt trên bông có nền di truyền gần nhất với cây nhận gen (cá thể số 54) được gieo trồng, chăm sóc và lai trở lại với NPT1, kết quả đã thu được 223 hạt lai BC_2F_1 . Toàn bộ hạt lai BC_2F_1 được tiếp tục gieo trồng, chăm sóc, thu mẫu lá (khi cây được 15-20 ngày tuổi), tách chiết và tinh sạch ADN. Mẫu ADN đủ tiêu chuẩn sẽ được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo nhằm xác định cá thể mang QTL/gen và xác định nền di truyền các cá thể mang QTL/gen.

Trong nghiên cứu này, 03 chỉ thị liên kết chặt với QTL/gen *yd7* gồm chỉ thị RM445, RM500 và RM21615 được sử dụng để sàng lọc các cá thể dị hợp tử. Kết quả được thể hiện trên các hình 2, 3 và 4.

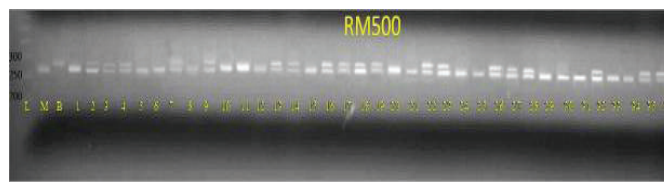


Hình 2. Hình ảnh điện di sàng lọc cá thể trong quần thể BC_2F_1 với chỉ thị RM445.

L: 50bp ladder, M: NPT1, B: KC25, 1-145: Các cá thể BC_2F_1 .

Qua hình 2 đã xác định 36/145 cá thể trong quần thể BC_2F_1 dị hợp tử gồm cá thể số 8, 9, 13, 14, 15, 21, 30, 41, 44, 48, 55, 58, 59, 62, 74, 76, 78, 83, 89, 91, 92, 98, 99, 100, 109, 110, 122, 124, 125, 128, 130, 135, 138, 141, 142 và cá thể số 143. Các cá thể này được đánh số thứ tự từ 1-36 tiếp tục được sàng lọc với 02 chỉ thị RM500, RM21615.

Kết quả kiểm tra cá thể lai BC_2F_1 (tổ hợp NPT1/KC25) đối với chỉ thị phân tử RM500 được trình bày ở hình 3.

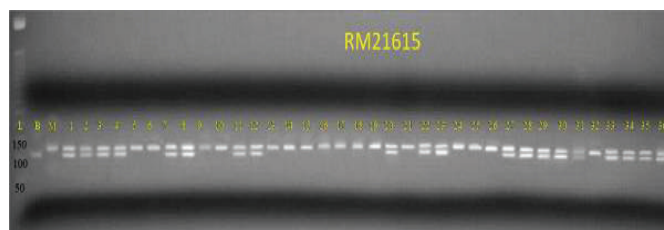


Hình 3. Hình ảnh điện di sàng lọc cá thể trong quần thể BC_2F_1 với chỉ thị RM500.

L: 50bp ladder, M: NPT1, B: KC25, 1-36: Cá thể trong quần thể BC_2F_1 .

Kiểm tra các cá thể BC_2F_1 với chỉ thị RM500 xác định được 19 cá thể dị hợp tử gồm số 2, 3, 4, 7, 9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 26, 27, 28, 32, 35 và cá thể số 36 tương ứng mẫu ADN của các cá thể đánh số 9, 13, 14, 30, 44, 59, 62, 76, 78, 83, 89, 98, 99, 110, 122, 124, 135, 142 và 143.

Tương tự, kiểm tra các cá thể lai BC_2F_1 với chỉ thị RM21615, kết quả được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Hình ảnh điện di sàng lọc cá thể BC_2F_1 với chỉ thị RM21615.

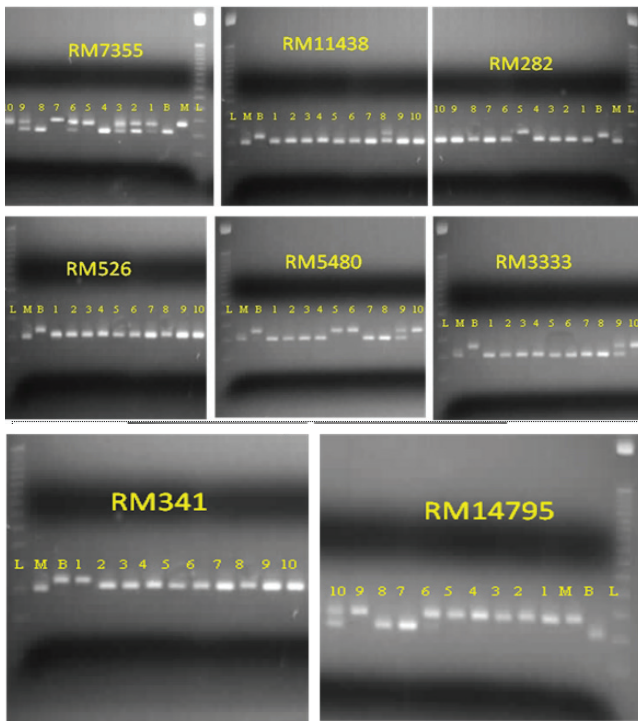
1-36: Các cá thể BC_2F_1 , M: NPT1, B: KC25, L: Ladder 50bp.

Quan sát và phân tích hình 4 cho thấy, các cá thể dị hợp tử bao gồm số 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 20, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35 và 36 tương ứng với mẫu ADN của cá thể số 8, 9, 13, 14, 30, 41, 55, 58, 91, 98, 99, 122, 124, 125, 128, 130, 138, 141, 142 và 143 cho kết quả dị hợp tử tại vị trí chỉ thị RM21615.

Như vậy, việc sử dụng 03 chỉ thị liên kết RM445, RM500 và RM21615 với QTL/gen *yd7* tăng số hạt trên bông đã xác định được 10 cá thể mang QTL/gen gồm số 9, 13, 14, 30, 98, 99, 122, 124, 142 và 143. Các cá thể này tiếp tục được sử dụng để kiểm tra nền di truyền trên 12 NST.

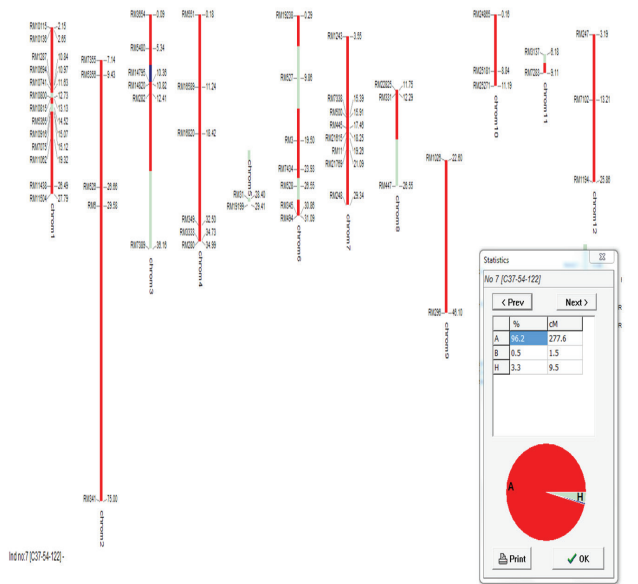
Xác định cá thể con lai BC_2F_1 mang QTL/gen có nền di truyền cao nhất giống cây nhận gen

Mười cá thể con lai BC_2F_1 mang QTL/gen tăng số hạt trên bông đủ điều kiện lựa chọn, sàng lọc, kiểm tra nền di truyền với 63/65 chỉ thị đa hình trải đều trên 12 NST (ngoại trừ những chỉ thị liên kết với gen mục tiêu QTL/gen *yd7*). Kết quả được thể hiện ở hình 5.



Hình 5. Kết quả kiểm tra điện di sản phẩm PCR trên gel Agarose 3,5%.

1-10: Các cá thể BC₂F₁, M: NPT1, B: KC25, L: Ladder 50bp.



Hình 6. Biểu đồ phân tích của cá thể số 122 trong quần thể BC₂F₁ giữa tổ hợp lai NPT1/KC25 (A: Đồng hợp tử với NPT1; B: Đồng hợp tử với KC25; H: Dị hợp tử; U: Mẫu không biểu hiện).

Ghi chú: Thứ tự các NST được biểu thị bằng số ở phía dưới và danh sách các chỉ thị sử dụng sàng lọc nền di truyền nằm ở phía bên trái, tương ứng với vị trí chỉ thị phân tử ghi bên phải NST. Vùng đỏ biểu thị nền di truyền tương đồng dòng NPT1, vùng xanh biểu thị nền di truyền của giống KC25. Vị trí và thứ tự chỉ thị phân tử được xây dựng dựa trên phần mềm GGT2.0.

Sau khi sàng lọc các cá thể BC₂F₁ với tất cả các chỉ thị cho đa hình trải đều trên 12 NST để sàng lọc nền di truyền của cây nhận gen. Số liệu của từng cá thể được chấm điểm đưa vào phân tích trên chương trình phần mềm Graphical Genotyper 2 (GGT2) với mục đích lựa chọn cá thể trong quần thể BC₂F₁ mang QTL/gen *yd7* tăng số hạt trên bông và có nền di truyền cao nhất của cây nhận gen. Kết quả được thể hiện ở hình 6.

Trong nghiên cứu này, qua phân tích đánh giá nền di truyền, cá thể số 122 mang QTL/gen tăng số hạt trên bông (*yd7*) được xác định có nền di truyền cao nhất giống cây nhận gen đạt 96,2%. Cá thể này có nguồn gốc từ cá thể số 54 của thể hệ BC₁F₁ nên chúng tôi ký hiệu là C37-54-122.

Như vậy, ứng dụng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử kết hợp lai trở lại có thể kết thúc ở ngay thể hệ sau, khi chọn ra được cá thể vừa mang QTL/gen tăng số hạt trên bông và mang xấp xỉ 100% nền di truyền hệ gen của cây nhận gen.

Kết luận

Ứng dụng chỉ thị phân tử kết hợp lai trở lại (MABC) bước đầu đã thành công trong quy tụ QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông vào giống lúa nhập nội tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này đã xác định được 10 cá thể trong quần thể BC₂F₁ mang mang QTL/gen tăng số hạt trên bông. Cá thể số 122 (thể hệ BC₂F₁) là cá thể mang QTL/gen tăng số hạt trên bông có nền di truyền cao nhất giống cây nhận gen ở mức 96,2%. Cá thể này sẽ tiếp tục được lựa chọn để sử dụng làm vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G.U.V.S. Khush (2013), "Review Strategies for increasing the yield potential of cereals: case of rice as an example", *Plant Breeding*, **436**, pp.433-436.
- [2] Lê Huy Hàm, Trần Đăng Khánh (2015), *Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [3] E. Liu, et al. (2016), "Identification of a Candidate Gene for Panicle Length in Rice (*Oryza sativa* L.) Via Association and Linkage Analysis", *Frontiers in Plant Science*, **7**, p.596.
- [4] Tạ Hồng Linh, Đỗ Mạnh Cường, Khuất Hữu Trung, Trần Đăng Khánh, Nguyễn Thị Loan, Hoàng Thị Hiền, Bùi Thị Thêu, Nguyễn Thị Thúy Anh (2014), "Ứng dụng chỉ thị phân tử xác định cá thể trong quần thể BC₁F₁ (KC25 x NPT1) mang QTL/gen quy định tính trạng tăng số hạt trên bông và có nền di truyền cao nhất giống cây nhận gen", *Tạp chí KH&CN nông nghiệp Việt Nam*, **6**, tr.3-8.
- [5] H.L. Linh (2008), *Fine mapping of quantitative trait loci for heading date and yield component traits in NILs from an interspecific cross between Oryza sativa and O. Minuta*, Doctoral Thesis, Chungnam National University, Daejeon, KOREA.