

Chọn lọc các cá thể F_2 đồng hợp tử mang *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông lúa bằng chỉ thị phân tử CAPS

Phạm Thị Mai¹, Lê Thị Như¹, Stefan Jouannic², Không Ngân Giang^{1*}

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu phát triển Montpellier, Đại học Montpellier (Pháp)

Ngày nhận bài 28/9/2020; ngày chuyển phản biện 1/10/2020; ngày nhận phản biện 30/10/2020; ngày chấp nhận đăng 19/11/2020

Tóm tắt:

QTL9 là một tính trạng số lượng tiềm năng mới liên quan đến cấu trúc bông lúa, được xác định thông qua phân tích liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) quần thể lúa bản địa Việt Nam. Các quần thể lai tái tổ hợp đã được phát triển từ 2 giống lúa bố mẹ G6 và G189 thuộc 2 haplotype tương phản về số gié thứ cấp/bông và số hạt/bông, nhằm nghiên cứu chức năng của *QTL9*. Bên cạnh đó, sử dụng công nghệ gen capture kết hợp với giải trình tự thế hệ mới đã xác định được 1.002 biến thể di truyền trong vùng *QTL9* của 2 giống bố mẹ, trong đó 12 điểm đột biến đa hình đơn nucleotide (SNPs) được tìm thấy nằm trong vùng cắt của 5 enzyme giới hạn. Trong nghiên cứu này, 12 cặp mồi đã được thử nghiệm để nhân chỉ thị CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), được phát triển dựa vào 12 SNPs trên, nhằm ứng dụng để chọn lọc các dòng F_2 đồng hợp tử mang kiểu gen *QTL9* của bố và của mẹ. Phân tích sản phẩm PCR và cắt enzyme giới hạn chọn lọc được 4 chỉ thị CAPS cho sự đa hình giữa 2 giống bố mẹ và phân bố bao phủ vùng *QTL9*. Kết quả đánh giá quần thể F_2 gồm 275 cá thể bằng 3 chỉ thị CAPS thu được 74 dòng đồng hợp tử mang kiểu gen *QTL9* của mẹ, 66 dòng đồng hợp tử mang kiểu gen *QTL9* của bố và 135 dòng dị hợp tử. Các dòng đồng hợp tử sẽ được sử dụng để phát triển quần thể F_3 , đánh giá kiểu hình cấu trúc bông của quần thể F_3 để làm sáng tỏ vai trò của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông lúa.

Từ khóa: cấu trúc bông lúa, chỉ thị phân tử CAPS, đồng hợp tử, năng suất, QTL, quần thể F_2 .

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cấu trúc bông là một trong những tính trạng quan trọng hàng đầu quyết định năng suất lúa. Từ những năm 1960, các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu nhằm tối ưu hóa kích thước cấu trúc bông lúa, trong đó chiều dài bông, số lượng các gié/bông và số lượng hạt/bông là những đặc điểm thu hút sự quan tâm nhiều nhất. Rất nhiều gen liên quan đến chiều dài trục bông, sự phân nhánh và số hạt/bông đã được tìm ra bằng phương pháp lập bản đồ QTL (quantitative trait loci) và phân tích đột biến: *Ghd7*, *Ghd7.1*, *Ghd8/DTH8* [1-3], *LAX1* [4], *DEP1* [5]... Ngoài ra, một số lượng nhỏ gen được xác định liên quan đến sự phân nhánh bậc cao (số gié thứ cấp/bông, tam cấp/bông) và số hạt/bông: *Gn1a* [6], *LRK1*, *LAX2*, *TAW1* [7-9].

Những năm gần đây, phân tích GWAS trở thành một công cụ hữu ích để nghiên cứu sự đa dạng của quần thể và phát hiện thêm nhiều hơn các loci quan trọng, đặc biệt là các loci liên kết với các tính trạng nông học phức tạp như tính trạng năng suất. Nhiều QTL liên quan đến các tính trạng năng suất như: trọng lượng 1.000 hạt, số lượng bông/cây, số gié sơ cấp/bông, số gié thứ cấp/bông, chiều dài trục bông, số nhánh/bông, số hạt/bông

đã được công bố trong vài năm gần đây [10-14]. Những thành tựu này phản ánh sự phổ biến, mức độ đáng tin cậy cũng như tiềm năng to lớn của các nghiên cứu bằng GWAS trên các tính trạng nông học ở lúa. Tuy nhiên, kết quả phân tích GWAS dựa vào các thuật toán thống kê để khai thác được các QTL mới vào các chương trình chọn tạo giống nên chúng cần phải được kiểm chứng vai trò thông qua các quần thể lai và phân tích bằng chỉ thị phân tử kết hợp với đánh giá kiểu hình.

Trong số các quần thể được sử dụng để lập bản đồ QTL như quần thể F_2 , Doubled haploids (DHs) hoặc quần thể các dòng lai tái tổ hợp (Recombinant Inbred Lines - RILs) thì quần thể RILs là lựa chọn chính cho cây tự thụ phấn như lúa, *Arabidopsis* [15], nhờ những lợi thế thu được từ sự đồng hợp tử và tái tổ hợp có hiệu quả của chúng. RILs được phát triển từ một hạt F_2 duy nhất: từ mỗi cây F_2 một hạt giống duy nhất được trồng thành cây F_3 , từ đó một hạt giống duy nhất trồng thành cây F_4 ... Các quần thể RILs được sử dụng để lập bản đồ QTL rất hiệu quả bởi ảnh hưởng của môi trường đến đặc điểm định lượng có thể giảm đi nhiều bằng cách đánh giá một số cây có cùng kiểu gen thay vì chỉ một cây duy nhất. Hơn nữa, việc

* Tác giả liên hệ: Email: ngangiang.khong2010@gmail.com

Selection of F_2 homozygous plants over the *QTL9* related to rice panicle structure by using CAPS markers

Thi Mai Pham¹, Thi Nhu Le¹, Stefan Jouannic²,
Ngan Giang Khong^{1*}

¹National Key Laboratory of Plant Cell Biotechnology,
Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

²University of Montpellier, UMR DIADE, IRD, Montpellier, France

Received 28 September 2020; accepted 19 November 2020

Abstract:

QTL9 is a new potential quantitative trait locus related to rice panicle structure, identified through a GWAS analysis of Vietnamese local rice panel. To validate the *QTL9*, a biparental population was developed using the low branching (G6) and the high branching (G189) accessions from two haplotypes characterised by a contrasting phenotype for the secondary branch number and spikelet number traits. In parallel, using Gene capture technology combined with new generation sequencing identified 1,002 genetic variants in the *QTL9* region between two parents, of which 12 SNPs were found in the cleavage site of 5 restriction enzyme. In this study, 12 primer pairs were tested to amplify the CAPS markers, based on the 12 SNPs, in order to be applied to select homozygous F_2 lines over the *QTL9* region for both haplotypes. 4 CAPS markers were selected distributing over the *QTL9* region and displaying polymorphism between two parents. 275 F_2 plants were genotyped using 3 CAPS markers leading to the selection of 74 homozygotes plants over the *QTL9* region for haplotype 1, 66 homozygotes plants over the *QTL9* region for haplotype 2, and 153 heterozygous plants. Homozygous lines will be used to develop the F_3 population, phenotyping of two F_3 haplotypes will lead to discovering the role of *QTL9* related to rice panicle structure.

Keywords: CAPS maker, F_2 population, homozygote, QTL, rice panicle structure, yield.

Classification number: 4.6

ứng dụng các chỉ thị phân tử cho phép chọn lọc các dòng đồng hợp từ ngay ở thế hệ F_2 , rút ngắn thời gian thu được quần thể RILs đồng hợp từ xuống còn 3 thế hệ thay vì 8. Quần thể RILs có nguồn gốc từ cặp lai chéo giữa 2 giống *Indica* Minghui 63 và Zhenshan 97 đã được sử dụng rộng rãi để lập bản đồ QTL cấu trúc bông [16-18]. Các QTL liên quan đến hình dạng hạt (*GS3*), số hạt/bông, ngày ra hoa và chiều cao cây (*Ghd7*) đã được phân lập thành công [1, 19].

Các quần thể lập bản đồ có thể được đánh giá kiểu gen với bất kỳ chỉ thị phân tử nào, như SSR, CAPS, hoặc các chỉ thị được xây dựng từ các dữ liệu giải trình tự như: SNPs, INDELs (Inserts/Deletions) [15]. Cùng với sự phát triển của các thế hệ giải trình tự mới, hàng triệu SNPs đã được tìm thấy ở hàng trăm giống lúa khác nhau trên thế giới, tạo điều kiện cho việc phát triển chỉ thị phân tử CAPS, được ứng dụng rộng rãi không chỉ trong nghiên cứu lập bản đồ QTL mà còn hỗ trợ công tác chọn tạo giống [20-23]. Nguyên tắc của chỉ thị này là dựa vào sự đa hình của SNPs trong vùng trình tự cắt của enzyme giới hạn. Ở những cá thể xảy ra đột biến trong vị trí cắt của enzyme giới hạn (thường là SNPs) thì enzyme sẽ không nhận ra để cắt. Từ đó, mỗi được thiết kế để nhận đoạn DNA chứa vị trí cắt của enzyme giới hạn. Sản phẩm PCR sau đó được cắt bởi enzyme giới hạn sẽ cho các đoạn DNA có chiều dài khác nhau giữa giống có đột biến trong vị trí cắt của enzyme giới hạn (chỉ có 1 đoạn DNA dài vì enzyme không cắt sản phẩm PCR) và giống không có đột biến (sản phẩm PCR được cắt thành 2 mảnh DNA ngắn hơn). Đa hình của sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn dễ dàng quan sát được trên gel agarose. Tính di truyền đồng trội của CAPS là một trong những đặc tính quan trọng nhất của loại chỉ thị này dẫn đến cả cá thể đồng hợp tử và dị hợp tử có thể dễ dàng phân biệt được.

Trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi nhằm nghiên cứu chức năng của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông [24], các quần thể lai tái tổ hợp đã được phát triển bằng cách lai 2 giống bố mẹ G6 và G189 thuộc 2 haplotype đối lập về cấu trúc bông (bông to và nhỏ) [25]. Bên cạnh đó, 12 SNPs nằm trong vùng cắt của 5 enzyme giới hạn (*SacI*, *DraI*, *EcoRV*, *BamHI*, *Sall*) thuộc vùng *QTL9* đã được xác định thông qua ứng dụng công nghệ chụp gen kết hợp với giải trình tự thế hệ mới [26]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển, thử nghiệm chỉ thị phân tử CAPS nhằm phân tích sự phân ly kiểu gen của *QTL9* trong quần thể F_2 , góp phần tạo cơ sở để làm sáng tỏ vai trò của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông lúa.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

275 cây F_2 tự thụ được phát triển từ quần thể F_1 của cặp lai G6 x G189 [25], trong đó G6 (bông nhỏ, haplotype 1) là cây mẹ và G189 (bông to, haplotype 2) là cây bố.

12 chỉ thị CAPS được giới thiệu trong bảng 1 và 5 enzyme cắt giới hạn được giới thiệu trong bảng 2 [26].

Bảng 1. Danh sách 12 chỉ thị phân tử CAPS và trình tự mỗi.

Ký hiệu CAPS	Vị trí SNP	Tên Locus	Đặc điểm vị trí	Trình tự mỗi
CAPS #1	16748183	LOC_Os02g28334	UTR_3'	F- CTCCAGCATCTCACCTCTC R- CTCCACCATGAATAACCTGCA
CAPS #2	16805351	LOC_Os02g28410	Promoter	F- GTTACTCCATCCGTCACAAA R- GAATGCTCTCGTCGGATGAT
CAPS #3	16882053	LOC_Os02g28530	Intron	F- TGGTTTGGGTTACTCGGAAG R- TTACCTGGAGTGAAGGTCC
CAPS #4	16919772		Intragenic	F- TTGTTCTGTGATTCGACGG R- CGTGCAGAACACGAAG
CAPS #5	16961918	LOC_Os02g28670	Promoter	F- GGCAGCATCAGCAAGCATAC R- GGATTAGCTCCCTACACGC
CAPS #6	17035526	LOC_Os02g28810	Promoter	F- CTGAATCCGTCAGCAAGGT R- TCGGAGAGGAACGAACGAA
CAPS #7	17039753	LOC_Os02g28820	Promoter	F- TGGTGATTACGGCGTTTGGT R- TTCGCAATACGTCACACTA
CAPS #8	17124682	LOC_Os02g28910	Promoter	F- CACGCACTTTAGCATGACGG R- TTCCCGTACTCTCGTCACCT
CAPS #9	17161487	LOC_Os02g28980	UTR_3'	F- TGAGAAGCGAAACGACCTT R- GCTTCTCTGCTGCGGTAA
CAPS #10	17205540	LOC_Os02g29040	Intron	F- GTCTGCGCCACATTTTAGT R- GCCTTCTCTCACCTTGAC
CAPS #11	17254246	LOC_Os02g29130	Intron	F- TGGATTGCATGGTTTACTG R- ATGCATTGAGAGGACCTTG
CAPS #12	17271258	LOC_Os02g29150	UTR_3'	F- TGGTGGATTAATGCTGTGGA R- GCCACATTAGATGTGTA

Bảng 2. Danh sách 5 enzym giới hạn sử dụng để cắt chỉ thị phân tử CAPS.

Enzym	Chỉ thị phân tử CAPS	SNP (H1/H2)	Trình tự vị trí cắt của enzym giới hạn	Kích thước sản phẩm cắt bằng enzym giới hạn
			<i>G6 (H1)</i> <i>G189 (H2)</i>	<i>G6 (H1)</i> <i>G189 (H2)</i>
<i>SacI</i>	CAPS#1	G/A	GAGCTC AAGCTC	134 & 223 357
	CAPS#2	T/G	TTTAAA TTGAAA	346 & 531 877
	CAPS#3	A/T	TTA AAA TTTAAA	689 473 & 216
	CAPS#4	T/TA	TTTAAA TTA AAA	601 & 251 852
<i>DraI</i>	CAPS#8	TA/T	TTTAAA TTTTAA	273 & 779 1052
	CAPS#9	TA/T	TTTAAA TTTTAA	1027 & 683 1710
	CAPS#11	T/A	TTTAAA TTTAA T	226 & 333 & 339 559 & 339
			TTTAAA TTTAAA	
<i>EcoRV</i>	CAPS#5	A/T	GATATC GTTATC	643 & 394 1037
	CAPS#7	T/C	GATATC GATACC	1321 & 127 1358
<i>SalI</i>	CAPS#10	A/T	GTCGAC GTCGTC	886 & 1023 1909
	CAPS#6	G/A	G AATCC GGATCC	577 304 & 273
<i>BamHI</i>	CAPS#12	G/C	GGATGC GGATCC	1103 1041 & 62

Chữ gạch chân: điểm đột biến trong vị trí cắt của enzym giới hạn.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế mỗi: các mỗi thiết kế dựa trên trình tự của giống Nipponbarre trên trang MSU Rice Genome Annotation (Osa1) Release 7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu>), sử dụng phần mềm Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ lá lúa

20-25 ngày tuổi theo phương pháp CTAB của Doyle (1991) [27] có cải tiến.

Phản ứng PCR với cặp mỗi CAPS: phản ứng PCR được thực hiện trong 10 µl, gồm 20 ng DNA, 0,2 µl dNTPs 10X (#R0182, Fermentas), 0,5 µl mỗi CAPS xuôi và ngược, 0,8 µl MgCl₂, 2 µl GoTaq Buffer 10X (#R0971, Fermentas), 0,05 µl GoTaq DNA polymerase 5 u/µl (#EP0702, Fermentas) và 5,2 µl nước Milli Q khử trùng. Chu trình nhiệt: 95°C trong 2 phút, 35 chu kỳ, 95°C - 30 giây, 57°C - 30 giây (nhiệt độ gắn mỗi), 72°C - 1 phút và giữ 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2,5%, rồi được soi trong buồng UV (Uvltect, Cambridge), phần mềm Fire Reader. Các thí nghiệm điện di sử dụng thang chuẩn DNA Low Gene Ruler 100 bp (#SM1163, Fermentas).

Cắt sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn: các phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn được thực hiện với các kit của Hãng Thermo Fisher Scientific, mỗi phản ứng được thực hiện trong thể tích 20 µl bao gồm DNA, enzym giới hạn và dung môi. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C qua đêm, sau đó được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 2%.

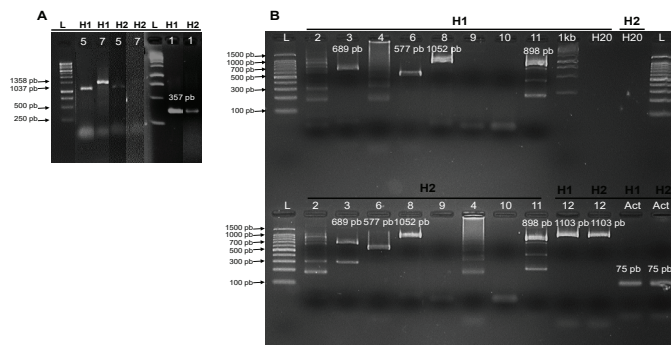
Kết quả và thảo luận

Khảo sát sự đa hình của chỉ thị CAPS ở hai giống bố mẹ

Trước khi sử dụng mỗi CAPS để chọn lọc các dòng đồng hợp tử mang *QTL9* trong quần thể F₂, các mỗi cần được kiểm tra độ đặc hiệu và sau đó là sự đa hình ở hai giống bố mẹ (2 haplotype) bằng phản ứng PCR và cắt enzym giới hạn.

Kiểm tra độ đặc hiệu của mỗi CAPS

Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR với 12 mỗi CAPS ở 2 giống mẹ và bố (H1 và H2) thu được 6 cặp mỗi CAPS cho kết quả đặc hiệu chỉ một băng DNA duy nhất, đúng với kích thước mong đợi ở cả 2 giống bố mẹ: CAPS#1 (357 bp), CAPS#5 (1.037 bp), CAPS#7 (1.358 bp), CAPS#8 (1.052 bp) (hình 1A), CAPS#6 (577 bp), CAPS#12 (1.103 bp) (hình 1B). Kết quả PCR với mỗi CAPS#2 không đặc hiệu, xuất hiện nhiều băng DNA với kích thước khác nhau nhưng không có băng nào đúng với kích thước mong đợi (877 bp) ở cả 2 giống bố mẹ (hình 1B). Mỗi CAPS#3 đặc hiệu ở giống mẹ (H1), thu được một băng duy nhất đúng kích thước mong đợi (689 bp), tuy nhiên ở giống bố (H2), ngoài băng đúng kích thước mong đợi còn xuất hiện một băng không đặc hiệu, có kích thước nhỏ hơn (khoảng gần 300 pb, hình 1B). Mỗi CAPS#4 cho hai băng có kích thước khoảng 200 và 300 bp, không đúng với kích thước mong đợi (852 bp). Phản ứng PCR với mỗi CAPS#9 và CAPS#10 không thu được băng nào ở cả 2 giống bố mẹ (hình 1B). Mỗi CAPS#11 không đặc hiệu, xuất hiện nhiều băng DNA với kích thước khác nhau nhưng trong đó có băng đúng với kích thước mong đợi (898 bp) đậm và rõ nét nhất, kết quả giống nhau ở cả hai giống bố mẹ (hình 1B).



Hình 1. Hình ảnh điện di phản ứng PCR với 12 mồi CAPS ở 2 giống mẹ G6 và bố G189. A: 1: CAPS#1; 5: CAPS#5; 7: CAPS#7; L: promega 1 kb ladder; B: 2: CAPS#2; 3: CAPS#3; 4: CAPS#4; 6: CAPS#6; 8: CAPS#8; 9: CAPS#9; 10: CAPS#10; 11: CAPS#11; 12: CAPS#12; L: promega 100 pb DNA ladder, Act: actin.

Như vậy, kết quả PCR với 12 mồi CAPS thu được 8 mồi CAPS có băng đúng với kích thước mong đợi ở cả 2 giống bố mẹ bao gồm: CAPS#1, CAPS#3, CAPS#5, CAPS#6, CAPS#7, CAPS#8, CAPS#11, CAPS#12. 4 cặp mồi CAPS#2, CAPS#4, CAPS#9, CAPS#10 không đặc hiệu hoặc không hoạt động.

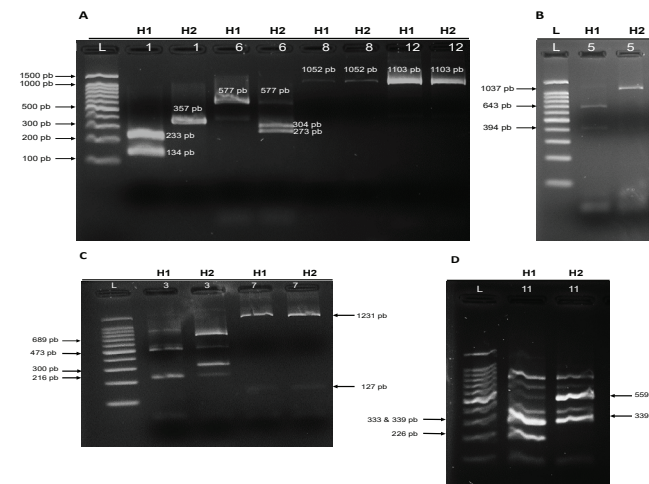
Khảo sát sự đa hình của mồi CAPS ở 2 giống bố mẹ bằng cắt enzym giới hạn

Sản phẩm phản ứng PCR của 8 cặp mồi CAPS#1, CAPS#3, CAPS#5, CAPS#6, CAPS#7, CAPS#8, CAPS#11, CAPS#12 tiếp tục được xử lý cắt bằng các enzym giới hạn tương ứng (bảng 1) để kiểm tra sự đa hình giữa hai giống bố mẹ. Phân tích hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzym giới hạn cho thấy, có 4 chỉ thị CAPS cho sự đa hình có thể phân biệt rõ ràng giữa 2 giống bố mẹ là CAPS#1, CAPS#5, CAPS#6 và CAPS#11. CAPS#1 được cắt bằng enzym giới hạn *SacI*, vị trí cắt của *SacI* trong giống mẹ không có đột biến nên sản phẩm PCR bị cắt thành 2 mảnh đúng với kích thước mong đợi (134 và 233 bp), ngược lại, đột biến xảy ra trong vị trí cắt của *SacI* trong giống bố nên sản phẩm PCR không bị cắt (357 bp) (hình 2A). CAPS#5 được cắt bằng enzym giới hạn *EcoRV*, ở giống mẹ quan sát thấy 2 băng DNA đúng với kích thước mong đợi (394 và 643 bp), trong khi ở giống bố xảy ra đột biến trong vị trí cắt của *EcoRV* nên sản phẩm PCR không bị cắt, do đó chỉ có 1 băng DNA duy nhất (1.037 bp) (hình 2B). Hình ảnh điện di sản phẩm cắt của CAPS#6 bằng enzym giới hạn *BamHI* thu được 2 băng DNA đúng với kích thước mong đợi (304 và 273 bp) ở giống bố, trong khi ở giống mẹ H1 (577 bp) không bị cắt (hình 2A). CAPS#11 chứa 2 vị trí cắt của enzym *DraI*, trong đó ở giống mẹ không có đột biến nào nên sản phẩm PCR của giống mẹ bị cắt thành 3 mảnh có kích thước là 226, 333 và 339 pb. Tuy nhiên, vì độ dài của 2 băng sau chỉ sai khác có 6 pb nên trên hình ảnh điện di chỉ quan sát thấy 2 băng DNA. Một vị trí cắt của *DraI* trong giống bố xảy ra đột biến nên sản phẩm PCR được cắt thành 2 băng có kích thước là 559 và 339 bp (hình 2D). Đối với CAPS#3 và CAPS#7, enzym cắt cả 2 giống mặc dù dự đoán có đột biến xảy ra ở giống bố (hình 2C). Ngược lại, CAPS#8 và CAPS#12 lại không bị cắt bởi enzym giới hạn, chỉ có 1 băng DNA duy nhất cùng kích thước 1.052 và 1.103 bp ở cả 2 giống bố mẹ (hình 2A).

Kết quả cắt bằng enzym giới hạn của 8 chỉ thị CAPS cho thấy,

có 4 chỉ thị CAPS cho sự đa hình giữa 2 giống bố mẹ và bao phủ vùng *QTL9* là CAPS#1 (cắt bằng *SacI*), CAPS#5 (cắt bằng *EcoRV*), CAPS#6 (cắt bằng *BamHI*) và CAPS#11 (cắt bằng *DraI*). Các chỉ thị này có thể được sử dụng để xác định các cây F_2 mang *QTL9* đồng hợp tử (hình 2).

Trong số 4 chỉ thị CAPS#1, CAPS#5, CAPS#6 và CAPS#11 cho sự đa hình giữa giống bố mẹ thì vị trí của chỉ thị CAPS#5, CAPS#6 gần nhau (16961918 và 17035526) và đều nằm ở giữa vùng *QTL9*, trong khi chỉ thị CAPS#1 (16748183) và CAPS#11 (17254246) nằm ở 2 đầu của *QTL9*.

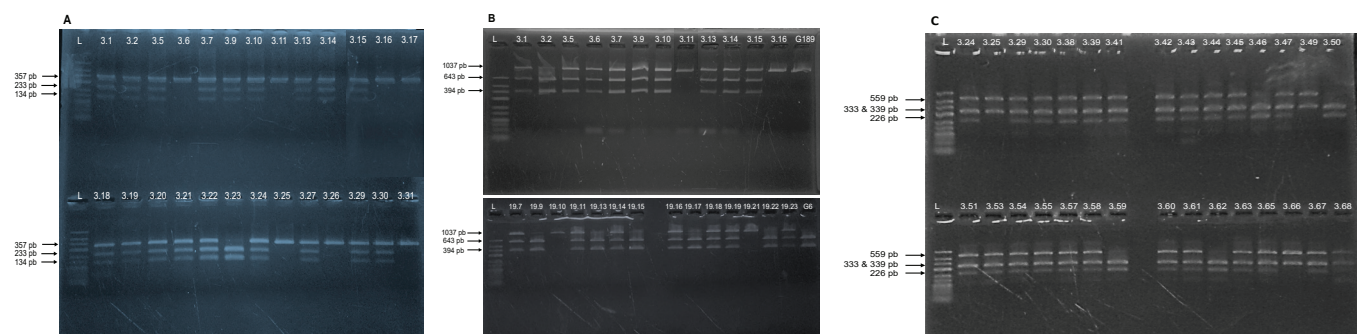


Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt bằng enzym giới hạn ở 2 giống mẹ G6 và bố G189. A: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#1, CAPS#6, CAPS#8 và CAPS#12; B: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#5; C: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#3, CAPS#7; D: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#11 (ghi chú các giống: 1-CAPS#1, 3-CAPS#3, 5-CAPS#5, 6-CAPS#6, 7-CAPS#7, 8-CAPS#8, 11-CAPS#11, 12-CAPS#12; L: thang chuẩn DNA promega 1 kb ladder).

Chọn lọc các dòng F_2 mang *QTL9* đồng hợp tử bằng chỉ thị phân tử CAPS

Trong 4 chỉ thị phân tử CAPS (CAPS#1, CAPS#5, CAPS#6, CAPS#11) cho sự đa hình giữa 2 giống bố mẹ và bao phủ vùng *QTL9*, CAPS#5 và CAPS#6 có vị trí gần nhau nên chỉ sử dụng 3 chỉ thị CAPS (CAPS#1, CAPS#5 và CAPS#11) để chọn lọc các cây F_2 đồng hợp tử.

DNA của 275 cây F_2 được tách chiết, chạy phản ứng PCR lần lượt với 3 cặp mồi của CAPS#1, CAPS#5 và CAPS#11, sau đó cắt bằng enzym giới hạn tương ứng (*SacI*, *EcoRV* và *DraI*). Kết quả hình ảnh điện di của CAPS#1 cho thấy, có 3 kiểu gen trong quần thể F_2 , các cá thể cho 2 băng DNA kích thước 134 và 233 bp là những cây đồng hợp tử mang *QTL9* của mẹ, những cây chỉ có băng DNA duy nhất với kích thước 357 bp là cây đồng hợp tử mang *QTL9* của bố, còn lại cây có cả 3 băng DNA là cây dị hợp tử (hình 3A). Kết quả trong tổng số 275 cây F_2 có 74 cây đồng hợp tử kiểu gen *QTL9* của mẹ (G6), 66 cây đồng hợp tử kiểu gen *QTL9* của bố (G189) và 135 cây dị hợp tử mang cả 2 kiểu gen *QTL9* của bố và mẹ. Tương tự, khi phân tích quần thể F_2 với CAPS#5 và CAPS#11 cũng thu được kết quả hoàn toàn trùng lặp với CAPS#1 (hình 3B, C).



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzyme giới hạn của một số cây F₂ với các chỉ thị phân tử CAPS. A: kết quả phân tích cây F₂ với chỉ thị CAPS#1; các cây đồng hợp từ: 3.11, 3.23, 3.25, 3.26, 3.31; B: kết quả phân tích cây F₂ với chỉ thị CAPS#5; các cây đồng hợp từ: 3.11, 3.16, 3.17, 19.10, 19.13, 19.15, 19.17, 19.21, 19.22; C: kết quả phân tích cây F₂ với chỉ thị CAPS#11; các cây đồng hợp từ: 3.25, 3.46, 3.50, 3.59, 3.62.

Kết luận

Sự phân ly kiểu gen của *QTL9* trong quần thể F₂ đã được đánh giá thành công nhờ sử dụng 3 chỉ thị phân tử CAPS.

Phân tích 275 cá thể F₂ với 3 chỉ thị phân tử CAPS#1 CAPS#5 và CAPS#11 thu được 74 cây F₂ đồng hợp từ mang kiểu gen *QTL9* của mẹ (G6), 66 cây F₂ đồng hợp từ mang kiểu gen *QTL9* của bố (G189), chiếm tỷ lệ 50,9%. Các cây F₂ đồng hợp từ sẽ được phát triển tạo quần thể F₃, phân tích kiểu hình cấu trúc bông của quần thể F₃ so sánh với 2 giống bố mẹ để làm sáng tỏ được vai trò của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông và năng suất lúa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W. Xue, et al. (2008), "Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice", *Nature Genetics*, **40**, pp.761-767.
- [2] W.H. Yan, et al. (2011), "A Major QTL, Ghd8, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice", *Molecular Plant*, **4**, pp.319-330.
- [3] W. Yan, et al. (2013), "Natural variation in Ghd7.1 plays an important role in grain yield and adaptation in rice", *Cell Research*, **23**, pp.969-971.
- [4] K. Komatsu, et al. (2003), "LAX and SPA: major regulators of shoot branching in rice", *PNAS*, **100**, pp.11765-11770.
- [5] X. Huang, et al. (2009), "Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice", *Nature Genetics*, **41**, pp.494-497.
- [6] M. Ashikari, et al. (2005), "Cytokinin oxidase regulates rice grain production", *Science*, **309**, pp.741-745.
- [7] X. Zha, et al. (2009), "Over-expression of the rice LRK1 gene improves quantitative yield components", *Plant Biotechnology Journal*, **7**, pp.611-620.
- [8] H. Tabuchi, et al. (2011), "LAX PANICLE2 of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems", *The Plant Cell*, **23**, pp.3276-3287.
- [9] A. Yoshida, et al. (2012), "TAWAWA1, a regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition", *PNAS*, **110**, pp.767-772.
- [10] J. Yonemaru, et al. (2014), "Genomic regions involved in yield potential detected by genome-wide association analysis in Japanese high-yielding rice cultivars", *BMC Genomics*, **346**, 12p.
- [11] W. Yang, et al. (2015), "Genome-wide association study of rice (*Oryza sativa* L.) leaf traits with a high-throughput leaf scorer", *Journal of Experimental Botany*, **66**, pp.5605-5615.
- [12] K. Zhao, et al. (2011), "Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*", *Nature Communications*, **2**, p.467.
- [13] S. Crowell, et al. (2016), "Genome-wide association and high-resolution

phenotyping link *Oryza sativa* panicle traits to numerous trait-specific QTL clusters", *Nature Communications*, **7**, DOI: 10.1038/ncomms10527.

[14] X. Bai, et al. (2016), "Genome-wide association analysis reveals different genetic control in panicle architecture between and rice", *The Plant Genome*, **9**, DOI: 10.3835/plantgenome2015.11.0115.

[15] C. Alonso Blanco, et al. (1998), "Analysis of natural allelic variation at flowering time loci in the landsberg erecta and cape verde islands ecotypes of *Arabidopsis thaliana*", *Genetics*, **149**, pp.749-764.

[16] S.B. Yu, et al. (1997), "Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid", *PNAS*, **94**, pp.9226-9231.

[17] Y.F. Tan, et al. (2000), "Genetic bases of appearance quality of rice grains in Shanyou 63, an elite rice hybrid", *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, pp.823-829.

[18] Y. Xing, et al. (2002), "Characterization of the main effects, epistatic effects and their environmental interactions of QTLs on the genetic basis of yield traits in rice", *Theoretical and Applied Genetics*, **105**, pp.248-257.

[19] C. Fan, et al. (2006), "GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein", *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, pp.1164-1171.

[20] A. Cheng, et al. (2012), "Simple and rapid molecular techniques for identification of amylose levels in rice varieties", *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, pp.6156-6166.

[21] R. Yang, et al. (2012), "A putative gene sbe3-rs for resistant starch mutated from SBE3 for starch branching enzyme in rice (*Oryza sativa* L.)", *PLOS ONE*, **7**, DOI: 10.1371/journal.pone.0043026.

[22] Y.Y. Tan, et al. (2013), "Functional molecular markers and high-resolution melting curve analysis of low phytic acid mutations for marker-assisted selection in rice", *Molecular Breeding*, **31**, pp.517-528.

[23] S.H. Lim, S.H. Ha (2013), "Marker development for the identification of rice seed color", *Plant Biotechnology Reports*, **7**, pp.391-398.

[24] Kim Nhung Ta, Ngan Giang Khong, Thi Loan Ha, Dieu Thu Nguyen, Duc Chung Mai, Thi Giang Hoang, Thi Phuong Nhung Phung, Isabelle Bourrie, Brigitte Courtois, Thi Thu Hoai Tran, Bach Yen Dinh, Tuan Nghia La, Nang Vinh Do, Michel Lebrun, Pascal Gantet, Stefan Jouanin (2018), "A genome-wide association study using a Vietnamese landrace panel of rice (*Oryza sativa*) reveals new QTLs controlling panicle morphological traits", *BMC Plant Biology*, **18**, p.282.

[25] Vũ Thị Nhiên, Tạ Kim Nhung, Stefan Jouanic, Lê Hùng Lĩnh, Phạm Xuân Hội, Trần Khánh Vân, Trần Vũ Hằng, Phạm Thị Mai, Lê Thị Như, Không Ngân Giang (2018), "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 bản địa Việt Nam", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp*, **11**, tr.15-21.

[26] Stefan Jouanic, Phạm Thị Mai, Lê Thị Như, Phạm Xuân Hội, Không Ngân Giang (2020), "Ứng dụng công nghệ gene capture để xác định SNP trong vùng QTL9 liên quan đến cấu trúc bông lúa", *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2020*, tr.162-167.

[27] J. Doyle (1991), *DNA Protocols for Plants (Molecular Techniques in Taxonomy)*, Springer.