

TẠO DÒNG VÀ ĐÁNH GIÁ NỀN DI TRUYỀN CÁC DÒNG BỐ MẸ MANG ĐỘT BIẾN *fea2-1328* NHẪM TĂNG SỐ HÀNG HẠT VÀ CẢI TIẾN NĂNG SUẤT GIỐNG NGÔ LVN10

Vi Lạng Sơn^{1,3}, Trần Thị Thúy¹, Phí Công Nguyên¹,
Nguyễn Thị Liễu¹, Nguyễn Thúy Diệp¹, Trần Đăng Khánh¹,
Phương Hữu Pha¹, Phạm Thùy Chi⁴, Trần Mạnh Bảo²,
Đặng Cao Cường², Khuất Hữu Trung^{1*}

TÓM TẮT

Các dòng bố mẹ của tổ hợp lai LVN10 (DF2 và DF1) đã được phát triển đến thế hệ BC₅F₁. Trong tổng số 300 mỗi SSR trên 10 nhiễm sắc thể, việc xác định đa hình giữa dòng cho và dòng nhận gen *fea2-1328* W22 cho thấy 31 chỉ thị đa hình giữa dòng nhận DF2 và dòng cho gen *fea2-1328* W22; 26 chỉ thị đa hình giữa dòng nhận DF1 và dòng cho gen W22 mang đột biến *fea2-1328*. Nền di truyền của các dòng bố mẹ ở thế hệ kế trên đã được đánh giá sử dụng các chỉ thị SSR đa hình. Dựa vào tính toán DF2 trên các chỉ thị đa hình rải đều trên toàn bộ hệ genome, các cá thể BC₅F₁ có nền di truyền tương đồng cao so với dòng gốc DF2, DF1 đạt tỷ lệ từ 93,5% đến 100%. Đã xác định được 23 cá thể BC₅F₁ đạt tỷ lệ 100% số chỉ thị tương đồng với dòng mẹ DF2 và 21 cá thể BC₅F₁ đạt tỷ lệ 100% tương đồng với dòng bố DF1. Những kết quả thu được sẽ là những thông tin có giá trị trong chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và đánh giá mức độ biểu hiện kiểu hình của đột biến *fea2-1328* trong các dòng bố mẹ của giống ngô lai LVN10.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, *FEA2*, hồi giao, LVN10, SSR

1. BẶT VẤN ĐỀ

Ngô (*Zea mays* L.) là cây ngũ cốc quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu, đáp ứng nhu cầu lương thực của một phần ba dân số thế giới, đứng thứ 3 sau lúa mì và lúa. Ở Việt Nam, ngô có diện tích canh tác lớn thứ hai sau lúa gạo. Tuy nhiên, ngô lại chỉ được trồng ở những khu vực không có lợi cho việc trồng cây công nghiệp. Theo số liệu của Tổng cục Thống kê (<http://www.gso.gov.vn>) năm 2019, sản lượng ngô đạt 4,76 triệu tấn trên diện tích gieo trồng khoảng 1 triệu ha. Tuy nhiên, điều hạn chế này đang ngày càng được cải thiện nhờ sự xuất hiện của các giống ngô mới được chọn tạo, đáp ứng được mục tiêu của sản xuất, nâng cao thu nhập và cải thiện đời sống của người nông dân. Hiện nay, với sự phát triển vượt bậc của công nghệ giải mã genome, việc chọn tạo giống ngô đã có nhiều bước ngoặt lớn. Nhiều tính trạng số lượng (QTLs – quantitative traits loci) được tìm ra, các chỉ thị phân tử trong chọn giống được ứng dụng để đưa các QTL này vào dòng bố mẹ tốt nhờ

phương pháp hồi giao. Tính trạng năng suất ở ngô là một trong những tính trạng quan trọng và phức tạp nhất trong chương trình lai tạo giống ngô. Những năm gần đây, rất nhiều QTL liên quan đến số hàng hạt và năng suất ở ngô đã được phát hiện và lập bản đồ (Yang *et al.*, 2015, Mendes-Moreira *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2016, Huo *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2016). Trong đó, gene *FEA2* (*FASCIATED EAR 2*) được phân lập (cloned) đầu tiên từ dòng ngô đột biến toè đỉnh bắp vào năm 2001 bởi nhóm nghiên cứu của GS. Dave Jackson và cộng sự (Taguchi-Shiobara *et al.*, 2001). Đến năm 2013, vai trò trong việc qui định số hàng hạt trên bắp ngô mới được làm rõ bằng QTL mapping (Bommert *et al.*, 2013). Gene *FEA2* qui định một protein thụ quan kinase lập giàu trình tự lặp leucine trên màng tế bào (Leucine rich repeat receptor like kinase) (Taguchi-Shiobara *et al.*, 2001). *FEA2* là gene tương đồng với *CLAVATA2* ở *Arabidopsis*. Nhờ phương pháp đột biến sử dụng hoá chất EMS và phương pháp câu đột biến có định hướng TILLING (Targeting Induced Local Lesions), Bommert và cộng sự (2013) đã tìm ra được 4 allele yếu (hypermorphic alleles) trên gene *FEA2* ở trong dòng ngô W22. Nhóm tác giả đã đưa ra kết quả cho thấy alen *fea2-1328* (đột biến C>T gây thay đổi amino acid Proline ở vị trí 477 thành Leucine trên protein) gây ra tăng hàng hạt rõ nhất trên bắp.

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Công ty Cổ phần Tập đoàn Thai Binh Seed

³ Đại học PHENIKAA

⁴ Học viện Khoa học và Công nghệ
Email: khuathuutrong@yahoo.com

MABC (marker assisted backcrossing) là phương pháp ưu việt hơn phương pháp lai trở lại truyền thống về độ chính xác và hiệu quả chọn lọc. Ở ngô, phương pháp MABC đã được ứng dụng thành công để cải tiến những tính trạng phức tạp như tính trạng năng suất hạt (Gupta *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Trong MABC, người chọn giống muốn tạo ra cá thể lai hồi giao mang đoạn mang gene đích (trong trường hợp nghiên cứu này là *fea2-1328*) và đảm bảo toàn bộ nền di truyền sẽ giống với dòng nhận nhất có thể. Như vậy dòng hồi giao tạo ra sẽ mang đặc tính như dòng gốc và có thêm một tính trạng thay đổi theo mong muốn. Các nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu đã lai tạo theo phương pháp hồi giao MABC dùng dòng nhận là DF2 và DF1, là bố mẹ của giống ngô lai LVN10, đã dùng chỉ thị phân tử kiểm tra và chọn các con lai mang đột biến *fea2-1328* và đã tạo ra các dòng hồi giao đến thế hệ BC₅F₁. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là kiểm tra nền di truyền của các dòng lai hồi giao này, so sánh với dòng nhận và tạo các dòng bố mẹ cải tiến trong sản xuất giống ngô lai LVN10.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dòng bố DF1 và dòng mẹ DF2 của giống lai đơn LVN10 không mang alen đột biến *fea2-1328*. Dòng cho gen dòng thuần W22, mang alen đột biến *fea2-1328* (ki hiệu là *fea2-1328*(W22)) được cung cấp bởi phòng thí nghiệm của Giáo sư Dave Jackson (Cold Spring Harbor Laboratory-Mỹ). Các dòng hồi giao được tạo ra do lai giữa nguồn cho *fea2-1328* (W22) và dòng nhận DF2 và DF1 và được chọn dòng mang gen đột biến *fea2-1328* nhờ chỉ thị phân tử.

2.2. Phương pháp lai hồi giao dựa vào chỉ thị phân tử

Thí nghiệm cải tiến tổ hợp lai dòng bố DF1 và mẹ DF2 tạo giống LVN10 mang gene *fea2-1328* bằng phương pháp lai trở lại có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử. Dòng nhận gene DF2, DF1 lai với dòng cho gen W22 mang đột biến *fea2-1328* tạo thế hệ F₁. Cá thể F₁ được lai trở lại với giống nền DF2, DF1. Tiếp tục lai trở lại đến thế hệ BC₅F₁. Ở mỗi thế hệ BC_xF₁, sử dụng các chỉ thị OVS1-OVS2 kiểm tra sự có mặt của đột biến gene *fea2-1328*.

2.3. Phương pháp PCR

300 mỗi SSR nằm trên 10 nhiễm sắc thể được tìm trên website <http://www.maizegdb.org>.

Cặp mỗi dCAPs (OVS1-OVS2: 5'-GCAACCTCCCCATGCCCCCAAGC CCCGCA-3'; 5'-GTTTGTGTCAGCTTCTGTGGAC-3') được thiết kế dựa trên trình tự của gen *FEA2* (Bommert *et al.*, 2013).

Phản ứng PCR với tổng thể tích phản ứng là 10 µl, bao gồm: PCR buffer 10x: 1 µl, dNTPs 10mM: 0,25 µl, Taq: 1 unit, mỗi xuôi và mỗi ngược 10 µM: mỗi 0,4 µl, DMSO: 1 µl, bổ sung DNA khuôn và nước cho đủ tổng thể tích phản ứng 10 µl. Chu trình nhiệt: 94°C với 3 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ (94°C: 20 giây, nhiệt độ ủ: 30 giây (62°C với mỗi OSV1-OSV2 55°C với các mỗi SSR), 72°C: 30 giây), kết thúc với 72°C trong 5 min).

Sản phẩm PCR với mỗi OSV1-OSV2 được cắt bởi enzyme cắt giới hạn PstI-HF (New England Biolab) ở 37°C trong 2 giờ, sau đó điện di trên gel agarose 3%. Sản phẩm PCR với mỗi SSR được điện di trên gel polyacrylamide 6%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xác định chỉ thị phân tử đa hình ngoài vùng gen *FEA2* giữa dòng bố mẹ DF2 và DF1 với dòng W22

3.1.1. Đa hình giữa dòng DF2 và W22

Từ 300 chỉ thị SSR được sử dụng để xác định mức tính đa hình giữa DF2 và W22, kết quả đã xác định được tổng số 31 chỉ thị cho đa hình rải rác trên 10 nhiễm sắc thể (NST). Trên nhiễm sắc thể số 1 (NST1), đã xác định được 4 chỉ thị đa hình không liên kết locus gen *FEA2* là umc1754, umc1160, umc1166, umc1630. Bốn chỉ thị cho kết quả đa hình: bnlg381, umc1506, umc1947, umc1633 trên NST2; 4 chỉ thị đa hình: umc2101, umc1030, phi053, bnlg1035 trên NST3. Trên NST4, NST5, đều xác định số lượng chỉ thị đa hình bằng nhau. Tại NST4 có 3 chỉ thị phi072, umc1847, phi021. Tương tự trên NST5, các chỉ thị umc1097, umc1591, umc1349. Trên NST6 có 2 chỉ thị (umc1143, phi070) cho đa hình trên tổng số chỉ thị được khảo sát. Tại NST7 xác định các chỉ thị đa hình là: umc2177, umc1407. Các chỉ thị đa hình trên NST8: umc1974, umc1904, phi233376. Trên NST9, các chỉ thị đa hình là: umc1137, phi027, phi061, bnlg1129. Trên NST10 xác định được 2 chỉ thị (umc1380, umc1239) đa hình trên tổng số chỉ thị đã khảo sát giữa hai dòng DF2 và W22 (bảng 1a, hình 1). Các chỉ thị cho đa hình giữa DF2 và W22 trên 10 nhiễm sắc thể được sử dụng để đánh giá nền

di truyền của các dòng bố mẹ cải tiến mang gen *fea2-1328*.

3.1.2. Đa hình giữa dòng DF1 và W22

Trong 300 chỉ thị SSR được sử dụng xác định được 26 chỉ thị cho kết quả đa hình giữa DF1 và W22, chiếm 12,3% số cặp mỗi tham gia phản ứng (Bảng 1a). Trên nhiễm sắc thể 1, 2 và 6 có nhiều chỉ thị đa hình với 4 chỉ thị trên NST1 (bnlg439, umc1160, umc1976, umc1819), trên NST2 gồm phi083, umc1875, umc1635, umc1506 và NST6 gồm umc0241, phi299852, umc1143, phi070. Nhóm nhiễm sắc thể có số lượng chỉ thị cho kết quả đa hình tương đương nhau là NST3, NST5 và NST9; NST4 và NST10. Cụ

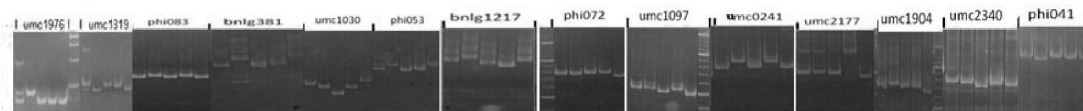
thể, trên NST3 xác định được các chỉ thị đa hình gồm: umc2101, umc1030, trên NST5 gồm umc1097, umc1349 và trên NST9 chỉ thị đa hình là umc2340, phi022. Tương tự, chỉ thị đa hình trên NST4 là 3 chỉ thị: phi072, bnlg1217, bnlg2162 và trên NST10 với 3 chỉ thị gồm: phi041, umc1380, umc1239. Nhóm nhiễm sắc thể có ít chỉ thị đa hình là NST7 (umc2177) và NST8 (umc1904) (Bảng 1b, Hình 1). Các chỉ thị cho đa hình giữa DF1 và W22 trên 10 nhiễm sắc thể được sử dụng để đánh giá nền di truyền của các dòng bố mẹ cải tiến mang gen *fea2-1328*.

Bảng 1. Các thông tin chi tiết chỉ thị cho đa hình trên 10 nhiễm sắc thể

(a/giữa dòng DF2 và W22; b/giữa dòng DF1 và W22)

Bảng 1a				Bảng 1b			
TT	Tên mỗi SSR	Trình tự	Vị trí NST	TT	Tên mỗi SSR	Trình tự	Vị trí NST
1	umc1160	CGTTTGATATGATGTGGAGATTTCG AAGCTTGTAATGTTCTGGAGTGTC	1.01	1	bnlg439	TTGACATCGCCATCTTGTTGACCA TCTTAATGCGATCGTACGAAGTTGTGAA	1.03
2	umc1166	CGATCAGATCATACACAACCTTGC GAGGATCGATTCTTGCCGAGT	1.02	2	umc1160	CGTTTGATATGATGTGGAGATTTCG AAGCTTGTAATGTTCTGGATGTC	1.01
3	umc1754	ATAGGGATCGACCCGTTTCGT AATATCTCCGATCCACCAACAAAA	1.06	3	umc1976	TGCCGAGGCTTCTAGTAGACAA CGTATATCTATCCCGCAGCAAC	1.02
4	umc1630	CAGACCTTCGAGGGCAAGAACT AGTTTGGCTTCTTCTCCCAAGTC	1.11	4	umc1819	GCTGCTCTAAAATCATGCTGATAAAA TATTCAGCAATGTATTTCCCTCTGT	1.12
5	bnlg381	TCCCTCTTGAGTGTATTATCAGAAA GTTTCCATGGGCGAGGTGTAT	2.02	5	phi083	CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	2.04
6	umc1506	AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG ATAAAGGTTGGCAAAACGTAGCCT	2.07	6	umc1635	GCTGAGCAGATCTTTCCTTGTTC AAGGAGCAGAACTCGGAGACG	2.05
7	umc1947	GGATCTCACCCCTGCTGTC ATCAGCGCTCACTCTCCTCT	2.08	7	umc1875	AAGCGACAGTTGGTTTCAGTTTTC AGTTGCATGACCTTGCAACCTTT	2.06
8	umc1633	GTCTTCTCTCTCTTCGTGCATA CAGAGGCTGTTGTCCCCAC	2.08	8	umc1506	AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG ATAAAGGTTGGCAAAACGTAGCCT	2.07
9	umc1030	TCCAGAGAATGAGATGACAAGACG CAGAATAACAGGAGATGAGACGCA	3.04	9	umc1030	TCCAGAGAATGAGATGACAAGACG CAGAATAACAGGAGATGAGACGCA	3.04
10	phi053	CTGCCTCTCAGATTTCAGAGTTGAC AACCCAACGTACTCCGGCAG	3.05	10	umc2101	CCCGGCTAGAGCTATAAAGCAAGT CTAGCTAGTTTGGTGCCTGGTGAT	3.00
11	umc2101	CCCGGCTAGAGCTATAAAGCAAGT CTAGCTAGTTTGGTGCCTGGTGAT	3.00	11	bnlg1217	AGCTGATCTGCACGTTGTTG GCAGATCCACGCCATTAAA	4.05
12	bnlg1035	TGCTTGCACTGTCAAGGAATC CAGCTCTGACACACACACA	3.05	12	phi072	ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT GACAGCGCGCAAATGGATTGAAC	4.00
13	phi072	ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT GACAGCGCGCAAATGGATTGAAC	4.00	13	bnlg2162	GTCTGCTGCTAGTGGTGGTG CACCGGCATTGATATCTTT	4.08
14	phi021	TTCCATTCTCGTGTCTTGAGTGGTCCA CTTGATCACCTTTCTGTGCTGCGCA	4.03	14	umc1097	CTCGTCAACGTCAACCAAGTAAG CTGTTAGATGTGCGACAACAGAGC	5.00
15	umc1847	GCCCAAGGTAGATTTTACTCTCCA AAGTCGTAGAGCTCGTCGTGATG	4.07	15	umc1349	ACGACCAGTGCTTCGCTCAC AGTTTCCATCGTATGATGTCGAGG	5.04
16	umc1097	CTCGTCAACGTCAACCAAGTAAG CTGTTAGATGTGCGACAACAGAGC	5.00	16	umc1143	GACACTAGCAATGTTCAAAACCCC CGTGGTGGGATGCTATCCTTT	6.00
17	umc1591	GAGGTCTCTCTCGGTGACATC CAACCAACTGGCAACTACTCGAC	5.04	17	umc0241	TATATCCGTGCATTACGTTT CATCGCTTGTCTGTGCA	6.05
18	umc1349	ACGACCAGTGCTTCGCTCAC AGTTTCCATCGTATGATGTCGAGG	5.04	18	phi299852	GATGTGGGTGCTACGAGCC AGATCTCGGAGCTCGGCTA	6.07
19	umc1143	GACACTAGCAATGTTCAAAACCCC CGTGGTGGGATGCTATCCTTT	6.00	19	phi070	GCTGAGCGATCAGTTTCATCCAG CCATGGCAGGGTCTCTCAAG	6.07
20	phi070	GCTGAGCGATCAGTTTCATCCAG CCATGGCAGGGTCTCTCAAG	6.07	20	umc2177	ACCATGCATGTCTCAGTCACT GGGTACGTGCTGTGGAGGAC	7.03
21	umc2177	ACCATGCATGTCTCAGTCACT	7.00			GTAAGCTGTGGCCATACTACCACC	

		GGGTACGTGCTGTGGAGGAC		21	umc1904	CAGCCACTCGTTTATGGAGGTTTA	8.03
22	umc1407	AGGCTTACCTCCTGAGAAGCAGTT	7.05			TGTTACTAGTCGATCTGATGCCCA	
		AGGCTTAGCATCGGTGGAGAG		22	umc2340	GCTAGCTCACCTACTCTGTGGCTG	9.03
23	umc1974	ACAAGGAGACCCTCCTCAGCTAGT	8.02			ACAGGGAGTAGAGGACGAGCG	
		GTAAGCTGTGGCCATACTACCACC		23	phi022	TGCGCACCAGCGACTGACC	9.03
24	umc1904	CAGCCACTCGTTTATGGAGGTTTA	8.03			GCGGGCGACGCTTCCAAAC	
		TGTTACTAGTCGATCTGATGCCCA		24	umc1380	CTGCTGATGTCTGGAAGAACCCT	10.1
25	phi233376	CCGGCAGTCGATTACTCC	8.09			AGCATCATGCCAGCAGGTTTT	
		CGAGACCAAGAGAACCCTCA		25	phi041	TTGGCTCCCAGCGCCGAAA	10.00
26	umc1137	ATCAGTCACTCTTCTGCCTCCACT	9.00			GATCCAGAGCGATTGACGGCA	
		GGCTGGATAATGTTGTAGCTGGTC		26	umc1239	ATCAACACACCTTTTCGATTCTGG	10.03
27	phi027	CGGGATCAGTCGTTTACAACATAG	9.03			CGGTGATTAGTCGATGAAGAGTGA	
		GCGTACGTACGACGAAGACAC					
28	phi061	GACGTAAGCCTAGCTCTGCCAT	9.03				
		AAACAAGAACGGCGGTGCTGATTC					
29	bnlg1129	GAGAGTATGCTACTCGCCGC	9.08				
		GACGAGTTTGAGTGCCATT					
30	umc1380	CTGCTGATGTCTGGAAGAACCCT	10.1				
		AGCATCATGCCAGCAGGTTTT					
31	umc1239	ATCAACACACCTTTTCGATTCTGG	10.03				
		CGGTGATTAGTCGATGAAGAGTGA					



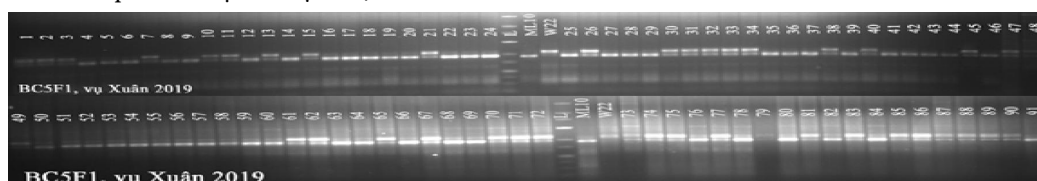
Hình 1. Kết quả kiểm tra đa hình giữa các dòng DF2, DF1 và W22 với một số chỉ thị phân tử

(Thứ tự từ trái qua phải ở mỗi chỉ thị: giếng 1 - DF2; giếng 2 - DF1; giếng 5 - W22)

3.2. Kết quả xác định cá thể mang đột biến *fea2-1328* ở thế hệ BC_5F_1

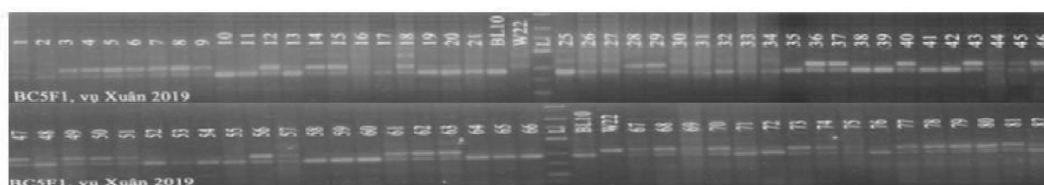
Với mục tiêu chọn lọc cá thể mang đột biến *fea2-1328* từ dòng cho lai tạo với dòng bố DF1 và mẹ DF2 của giống ngô lai LVN10. Trong thí nghiệm này, 91 cá thể BC_5F_1 ở tổ hợp lai DF2/W22 và 82 cá thể BC_5F_1 ở tổ hợp lai DF1/W22 được lựa chọn để xác định cá thể mang đột biến *fea2-1328* bằng chỉ thị OVS1-OVS2. Kết quả xác định được 40/91 cá thể

BC_5F_1 mang đột biến *fea2-1328* ở trạng thái dị hợp ở tổ hợp lai DF2/W22 và 41/82 cá thể BC_5F_1 mang đột biến *fea2-1328* ở trạng thái dị hợp ở tổ hợp lai dòng bố DF1/W22 (Hình 2, Hình 3). Các con lai mang kiểu gen dị hợp nghĩa là mang cả alen của dòng cho và alen của dòng nhận. Các cá thể BC_5F_1 mang kiểu gen dị hợp có kiểu hình tương đồng với giống nền và sạch bệnh được lựa chọn để kiểm tra nền di truyền.



Hình 2. Ảnh sản phẩm PCR các cá thể BC_5F_1 của tổ hợp lai DF2/W22 sử dụng cặp mồi OVS1-OVS2

(Thứ tự các cá thể BC_5F_1 : 1-82; DF2: ML10)



Hình 3. Ảnh sản phẩm PCR các cá thể BC_5F_1 của tổ hợp lai DF1/W22 sử dụng cặp mồi OVS1-OVS2

(Thứ tự các cá thể BC_5F_1 : 1-82; DF1: BL10)

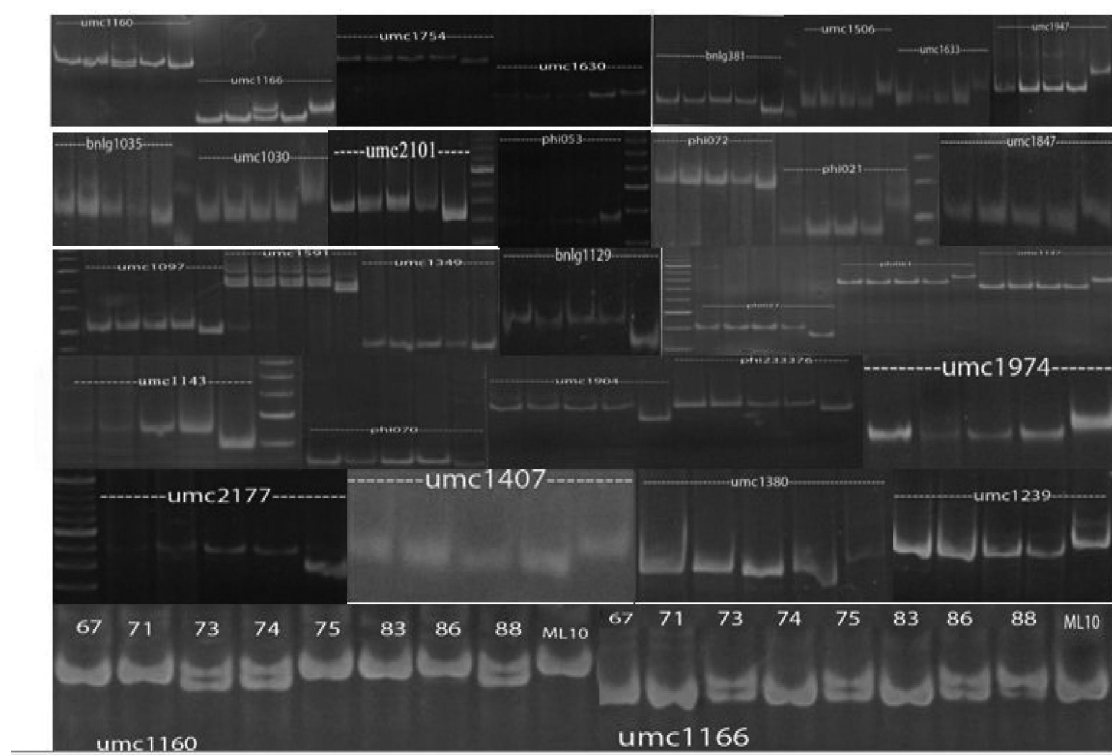
3.3. Đánh giá nền di truyền các dòng hồi giao với DF2 và DF1

3.3.1. Kết quả đánh giá nền di truyền các cá thể mang đột biến *fea2-1328* trong quần thể BC_5F_1 so với dòng DF2

Sau khi kiểm tra xác định được 40 cá thể BC_5F_1 mang kiểu gen *fea2-1328* dị hợp, lựa chọn 28 cá thể kiểm tra nền di truyền so với dòng nhận gen DF2 bằng chỉ thị phân tử. Sử dụng 31 chỉ thị đa hình giữa dòng cho gen W22 và dòng nhận gen DF2 rải trên 10 NST để xác định nền di truyền DF2 của 28 cá thể mang gen *fea2-1328* trong quần thể BC_5F_1 (Bảng 1a).

Để tiết kiệm thời gian thực hiện thí nghiệm, 28 cá thể được chia thành 3 nhóm sau đó hỗn ADN của các cá thể theo 3 nhóm để tiến hành thực hiện phản ứng PCR. Danh sách chia nhóm như sau:

Nhóm ADN	Các cá thể BC_5F_1 trong nhóm
Nhóm 1	DF2-5.1, 5.2, 5.10, 5.11, 5.13, 5.15, 5.21, 5.26, 5.30, 5.31
Nhóm 2	DF2-5.32, 5.38, 5.40, 5.45, 5.47, 5.48, 5.49, 5.61, 5.62, 5.65
Nhóm 3	DF2-5.67, 5.71, 5.73, 5.74, 5.75, 5.83, 5.86, 5.88



Hình 4. Kết quả kiểm tra nền di truyền của các cá thể BC_5F_1 DF2 trên 31 chỉ thị đa hình

(Thứ tự các mẫu trên mỗi chỉ thị từ trái qua phải: Nhóm 1-Nhóm 2-Nhóm 3- DF2- W22;

Thứ tự trên chỉ thị *umc1160* và *umc1166*: tên cá thể BC_5F_1 thuộc nhóm 3)

Trong số 31 chỉ thị xác định được 29 chỉ thị xuất hiện băng đồng hợp của cả nhóm 1, nhóm 2 và nhóm 3. Hai chỉ thị *umc1160* và *umc1066* xuất hiện băng dị hợp ở các cá thể thuộc nhóm 3. Các cá thể nhóm 3 tiếp tục được PCR từng cá thể trong nhóm với hai chỉ thị trên. Dựa vào tính toán trên 31 chỉ thị rải đều trên toàn bộ hệ genome, kết quả đã xác định được cá thể có nền di truyền tương đương dòng mẹ DF2 nhất, đạt 31/31 số chỉ thị (tỷ lệ 100%) xuất hiện băng ADN

tương tự với dòng DF2 là các cá thể thuộc nhóm 1 (DF2-5.1, 2, 10, 11, 13, 15, 21, 26, 30, 31), nhóm 2 (DF2-5.32, 38, 40, 45, 47, 48, 49, 61, 62, 65) và nhóm 3 gồm các cá thể: DF2-5.67, 71, 83. Các cá thể DF2-5.74, 75, 86 đạt 30/31 (tỷ lệ 96,7%) số chỉ thị xuất hiện băng ADN giống với dòng DF2. Cá thể DF2-5.73 và DF2-5.88 đạt 29/31 (tỷ lệ 93,5%) số chỉ thị xuất hiện băng ADN giống với dòng DF2 (Bảng 2, Hình 4).

Bảng 2. Kết quả kiểm tra nền di truyền của các cá thể BC₅F₁ DF

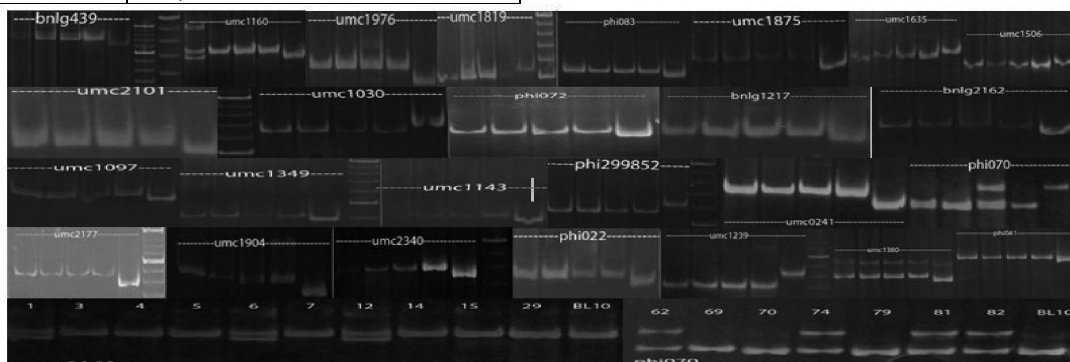
TT	Tên cá thể	Đồng hợp/tổng số	Tên cá thể	Đồng hợp/tổng số	Tên cá thể	Đồng hợp/tổng số
	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3	
1	DF2-5.1	31/31	DF2-5.32	31/31	DF2-5.67	31/31
2	DF2-5.2	31/31	DF2-5.38	31/31	DF2-5.71	31/31
3	DF2-5.10	31/31	DF2-5.40	31/31	DF2-5.73	29/31
4	DF2-5.11	31/31	DF2-5.45	31/31	DF2-5.74	30/31
5	DF2-5.13	31/31	DF2-5.57	31/31	DF2-5.75	30/31
6	DF2-5.15	31/31	DF2-5.47	31/31	DF2-5.83	31/31
7	DF2-5.21	31/31	DF2-5.48	31/31	DF2-5.86	30/31
8	DF2-5.26	31/31	DF2-5.49	31/31	DF2-5.88	29/31
9	DF2-5.30	31/31	DF2-5.61	31/31		
10			DF2-5.62	31/31		
11			DF2-5.65	31/31		

3.3.2. Kết quả đánh giá nền di truyền các cá thể mang đột biến *fea2-1328* trong quần thể BC₅F₁ của các dòng backcross DF1

Đối với tổ hợp lai DF1/W22 ở thế hệ BC₅F₁ xác định được 41 cá thể mang kiểu gen dị hợp *fea2-1328*. Lựa chọn 27 cá thể có kiểu hình đẹp để xác định nền di truyền so với dòng nhận gen DF1 bằng 26 chỉ thị đa hình giữa dòng cho gen W22 và dòng nhận gen DF1 (Bảng 1b). Để tiết kiệm thời gian thực hiện thí nghiệm, 27 cá thể được chia thành 3 nhóm sau đó hỗn ADN của các cá thể theo 3 nhóm để tiến hành thực hiện phản ứng. Ba nhóm ADN hỗn như sau:

Nhóm ADN	Các cá thể trong nhóm
Nhóm 1	DF1-5.1, 5. 3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.12, 5.14, 5.15, 5.29
Nhóm 2	DF1-5.36, 5.37, 5.40, 5.43, 5.45, 5.46, 5.47, 5.49, 5.50, 5.51
Nhóm 3	DF1-5.62, 5.69, 5.70, 5.74, 5.79, 5.81, 5.82.

Trong 26 chỉ thị, xác định được 24 chỉ thị xuất hiện bằng đồng hợp ở cả 3 nhóm cá thể. Còn lại 2 chỉ thị umc1160 trên nhiễm sắc thể số 1 xuất hiện bằng dị hợp ở cá thể nhóm 1 và chỉ thị phi070 trên nhiễm sắc thể 6 xuất hiện ở cá thể nhóm 3. Các cá thể thuộc nhóm 1 và nhóm 3 tiếp tục được kiểm tra từng cá thể trong nhóm với hai chỉ thị umc1160 và phi070. Dựa vào tính toán trên 26 chỉ thị đa hình rải đều trên toàn bộ hệ genome, kết quả xác định 21 cá thể có nền di truyền gần nhất với dòng DF1, 26/26 số chỉ thị (đạt tỷ lệ 100%) xuất hiện bằng đồng hợp tương tự dòng bố DF1, cụ thể là 7 cá thể thuộc nhóm 1 (DF1-5.3, 4, 5, 7, 12, 15, 29), 10 cá thể thuộc nhóm 2 (DF1-5.36, 37, 40, 43, 45, 46, 47, 49, 50, 51) và 4 cá thể thuộc nhóm 3 (DF1-5.62, 69, 70, 79). Còn lại các cá thể DF1-5.1, DF1-5.6, DF1-5.12, DF1-5.62, DF1-5.74, DF1-5.81, DF1-5.82 đạt 25/26 (đạt tỷ lệ 96,7%) số chỉ thị tương đồng với dòng bố DF1 (Bảng 3, Hình 5).



Hình 5. Kết quả kiểm tra nền di truyền các cá thể BC₅F₁ DF1 trên 26 chỉ thị đa hình
(Thứ tự trên các chỉ thị từ trái qua phải: Nhóm 1-Nhóm 2- Nhóm 3- DF1- W22;
Thứ tự trên chỉ thị umc1160 và umc1166: tên cá thể dòng BC₅F₁ thuộc nhóm 1 và nhóm 3)

Bảng 3. Kết quả kiểm tra nền di truyền của các cá thể BC₅F₁ DF1

TT	Tên cá thể	Đồng hợp/tổng số	Tên cá thể	Đồng hợp/tổng số	Tên cá thể	Đồng hợp/tổng số
Nhóm 1			Nhóm 2		Nhóm 3	
1	DF1-5.1	25/26	DF1-5.36	26/26	DF1-5.62	25/26
2	DF1-5.3	26/26	DF1-5.37	26/26	DF1-5.69	26/26
3	DF1-5.4	26/26	DF1-5.40	26/26	DF1-5.70	26/26
4	DF1-5.5	26/26	DF1-5.43	26/26	DF1-5.74	25/26
5	DF1-5.6	25/26	DF1-5.45	26/26	DF1-5.79	26/26
6	DF1-5.7	26/26	DF1-5.46	26/26	DF1-5.81	25/26
7	DF1-5.12	25/26	DF1-5.47	26/26	DF1-5.82	25/26
8	DF1-5.14	26/26	DF1-5.49	26/26		
9	DF1-5.15	26/26	DF1-5.50	26/26		
10	DF1-5.29	26/26	DF1-5.51	26/26		

4. THẢO LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên ứng dụng chỉ thị phân tử *fea2-1328* để làm tăng năng suất và cải tiến giống ngô. Đột biến gen *fea2-1328* đã được đưa thành công vào các dòng bố mẹ của giống ngô lai LVN10 (DF1 và DF2) qua nhiều thế hệ hồi giao (BC₅F₁). Vì thế, khi có những thông tin về nền di truyền của các dòng hồi giao sau nhiều thế hệ lai trở lại, sẽ có ích khi đánh giá hoặc dự đoán những tác động hoặc sự tương tác với gen *fea2-1328* về mức độ biểu hiện của gen *fea2-1328* trong các dòng bố mẹ cải tiến và trong con lai thương phẩm. Những thông tin này có thể giúp lựa chọn các dòng phù hợp để duy trì và phát triển các dòng bố mẹ sau này và hạt lai. Mật độ số chỉ thị trên một nhiễm sắc thể tuy còn thấp, nhưng các chỉ thị cũng được trải đều trên các nhiễm sắc thể. Các chỉ thị đa hình được xác định sẽ được sử dụng nhiều trong chọn giống nhờ chỉ thị phân tử. Kiểu hình của các dòng mang gen sẽ được đánh giá trong các nghiên cứu sau này.

Phương pháp MABC dùng thành công để cải tiến một số giống lúa ở Việt Nam như Bắc Thơm kháng bạc lá (Nguyễn Thị Lệ et al., 2014), BC15 kháng đạo ôn (Trần Thị Thúy et al., 2017), lúa chịu ngập AS996 (Doãn Thị Hương Giang et al., 2017)

Ở ngô MABC và chọn lọc nền di truyền cũng được sử dụng cho cải tiến nhiều tính trạng như hàm lượng beta-carotenoid và chất lượng protein cao (Sagare et al., 2019), lượng dầu (Hao et al., 2014).

Việc dùng các đột biến trên gen liên quan đến đỉnh sinh trưởng tương tự như *FEA2* để cải tiến giống cây trồng khác cũng đã được thực hiện thành công trên thế giới như tăng năng suất, tăng kích thước quả ở cà chua (Xu et al., 2015, Munos et al., 2011, Yuste-Lisbona et al., 2020), tiềm năng tăng kích thước quả và tăng số hạt và năng suất trên cải dầu (Fan et al., 2014)

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu, sử dụng 300 mỗi SSR ở các vị trí trên 10 nhiễm sắc thể xác định đa hình giữa dòng cho và nhận gen cho thấy 31 chỉ thị đa hình giữa dòng nhận DF2 và dòng cho gen *fea2-1328* (W22); 26 chỉ thị đa hình giữa dòng nhận DF1 và dòng cho gen *fea2-1328* W22. Các chỉ thị cho đa hình giữa dòng cho và nhận gen được sử dụng để đánh giá nền di truyền của các dòng bố mẹ cải tiến mang đột biến gen *fea2-1328*.

Đánh giá nền di truyền của các cá thể BC₅F₁ so với dòng gốc (DF2, DF1) cho thấy tất cả cá thể đều có nền di truyền tương đồng với dòng nền DF2, DF1 đạt tỷ lệ từ 93,5% đến 100%.

Xác định được 23 cá thể BC₅F₁ đạt tỷ lệ 100% số chỉ thị tương đồng với dòng mẹ DF2: DF2-5.1, DF2-5.2, DF2-5.10, DF2-5.11, DF2-5.13, DF2-5.15, DF2-5.21, DF2-5.26, DF2-5.30, DF2-5.31, DF2-5.32, DF2-5.38, DF2-5.40, DF2-5.45, DF2-5.47, DF2-5.48, DF2-5.49, DF2-5.61, DF2-5.62, DF2-5.65, DF2-5.67, DF2-5.71, DF2-5.83.

Xác định được 21 cá thể BC₅F₁ đạt tỷ lệ 100% tương đồng với dòng bố DF1: DF1-5.3, DF1-5.4, DF1-

5.5, DF1-5.7, DF1-5.12, DF1-5.15, DF1-5.29, DF1-5.36, DF1-5.37, DF1-5.40, DF1-5.43, DF1-5.45, DF1-5.46, DF1-5.47, DF1-5.49, DF1-5.50, DF1-5.51, DF1-5.62, DF1-5.69, DF1-5.70, DF1-5.79.

Các cá thể trên được tiếp tục chọn lọc và phát triển thành nguồn vật liệu tốt để phục vụ cho nghiên cứu phát triển giống ngô tăng năng suất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bommert P, Nagasawa NS, Jackson D, 2013. Quantitative variation in maize kernel row number is controlled by the FASCIATED EAR2 locus. *Nat Genet* 45: 334-337.
2. Chen L, Li YX, Li C, Wu X, Qin W, 2016. Fine-mapping of qGW4.05, a major QTL for kernel weight and size in maize. *BMC Plant Biol* 16: 81.
3. Doãn Thị Hương Giang, Lưu Minh Cúc, Lê Huy Hàm, 2017. Nghiên cứu ứng dụng phương pháp MABC trong chọn tạo giống lúa chịu ngập AS996. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, số 3 (76):3-8.
4. Fan, C., Wu, Y., Yang, Q., Yang, Y., Meng, Q., Zhang, K., Li, J., Wang, J., Zhou, Y. (2014). A novel single-nucleotide mutation in a CLAVATA3 gene homolog controls a multilocular silique trait in *Brassica rapa* L, 2014. *Mol. Plant*, 7: 1788–1792.
5. Gupta HS, Raman B, Agrawal PK, Mahajan V, Hossain F, 2013. Accelerated development of quality protein maize hybrid through marker-assisted introgression of opaque-2 allele. *Plant Breeding* 132: 77-82.
6. Hao, X., Li, X., Yang, X., Li, J. (2014). Transferring a major QTL for oil content using marker-assisted backcrossing into an elite hybrid to increase the oil content in maize, 2014. *Mol. Breed.*, 34: 739–748.
7. Huo D, Ning Q, Shen X, Liu L, Zhang Z, 2016. QTL Mapping of Kernel Number Related Traits and Validation of One Major QTL for Ear Length in Maize. *PLoS One* 11: e0155506.
8. Liu C, Zhou Q, Dong L, Wang H, Liu F, 2016. Genetic architecture of the maize kernel row number revealed by combining QTL mapping using a high-density genetic map and bulked segregant RNA sequencing. *BMC Genomics* 17: 915.
9. Mendes-Moreira P, Alves ML, Satovic Z, Dos Santos JP, Santos JN, 2015. Genetic Architecture of Ear Fasciation in Maize (*Zea mays*) under QTL Scrutiny. *PLoS One* 10: e0124543.
10. Muñoz, S, Ranc, N, Botton, E, Bérard, Rolland, S, Duffé, P, Carretero, Y, Le Paslier, M. C, Delalande, C, Bouzayen M, 2011. Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiol*, 156, 2244–2254.
11. Pukalenth B., Manickam D., Chandran S, Adhimoolam K., Sampathrajan V., Rajasekaran R., Arunachalam K., Ganapathyswamy H., Chocklingam V., Muthusamy V., Hossain F. and Natesan S, 2019. Incorporation of opaque-2 into ‘UMI 1200’, an elite maize inbred line, through marker-assisted backcross breeding. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-10.
12. Reif J, Melchinger, Xi X, Warburton M., Hoisington D, Vasal S, Beck D, Bohn M. and Frisch M, 2003. Use of SSRs for establishing heterotic groups in subtropical maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(5): 947-957.
13. Sagare D. B., Shett P, Surender M, Reddy S, 2019. Marker-assisted backcross breeding for enhancing β -carotene of QPM inbreds. *Mol. Breed.*, 39, 31, doi:10.1007/s11032-019-0939.
14. Taguchi-Shiobara F, Yuan Z, Hake S, Jackson D, 2001. The *fasciated ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes & Development*, 15(20):2755-2766.
15. Trần Thị Thúy, Nguyễn Thúy Diệp, Nguyễn Trường Khoa, Nguyễn Thị Phương Đoài, Kiều Thị Dung, Nguyễn Thị Ly, Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Thái Dương, Trần Đăng Khánh, Khuất Hữu Trung, 2017. Thiết kế môi nhận biết gen ứng viên (Candidate gene) kháng đạo ôn *Pik-p* ở một số giống lúa địa phương của Việt Nam và ứng dụng trong lai tạo giống. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 4(77): 3-8..
16. Vũ Hồng Quảng, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Huế, Nguyễn Văn Hoan, Nguyễn Chí Dũng, 2014. Kết quả chọn tạo giống lúa Bắc Thơm 7 kháng bạc lá. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 12, số 2: 131-138

17. Xu C, Liberatore K. L, MacAlister C. A., Huang Z, Chu Y.-H, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M, 2015. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nat. Genet.* 47: 784–792.
18. Yang C, Tang D, Zhang L, Liu J, Rong T, 2015. Identification of QTL for ear row number and two-ranked versus many-ranked ear in maize across four environments. *Euphytica* 206: 33–47.
19. Yuste-Lisbona F. J, Fernández-Lozano A, Pineda B, Bretones S., Ortiz-Atienza A, García-Sogo B, Müller N. A, Angosto T, Capel J, Moreno V, 2020. ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117: 8187–8195.
20. Zhang X, Yang Q, Rucker E, Thomason W, Balint-Kurti P, 2017. Fine mapping of a quantitative resistance gene for gray leaf spot of maize (*Zea mays* L.) derived from teosinte (*Z. mays* ssp. *parviglumis*). *Theor Appl Genet* 130: 1285–1295.
21. <http://www.gso.gov.vn>
22. <http://www.maizegdb.org>.

ADVANCED BACKCROSSING AND INVESTIGATION OF GENETIC BACKGROUND OF IMPROVED PARENTAL LINES CARRYING *fea2-1328* MUTATION IN THE LVN10 MAIZE HYBRID

**Vi Lang Son, Tran Thi Thuy, Phi Cong Nguyen, Nguyen Thi Lieu
Nguyen Thuy Diep, Tran Dang Khanh, Phuong Huu Pha, Pham Thuy Chi,
Tran Manh Bao, Dang Cao Cuong, Khuat Huu Trung**

Summary

Parental lines (DF2 and DF1) from the hybrid maize LVN10 have been backcrossed to the donor line W22 carrying the *fea2-1328* mutation allele to BC₅F₁ generation. Thirty one polymorphic markers between DF2 and W22 and 26 polymorphic markers between DF1 and W22 among 300 SSR tested markers were selected to investigate the genetic backgrounds of selected BC₅F₁ individuals carrying *fea2-1328*. Genetic backgrounds of these advanced parental lines were revealed, which showed high similarity (93.5% - 100%) to those of original DF2 and DF1. Twenty-three improved DF2 BC₅F₁ and 21 improved DF1 BC₅F₁ individuals showed 100% genetic background similar to those of original parents. The results of this study could be useful for marker-assisted breeding in maize and for the understanding of the expression levels of *fea2-1328* in parental lines and hybrid F₁.

Keywords: Backcross, *FEA2*, *LVN10*, marker, SSR.

Người phản biện: TS. Nguyễn Xuân Thắng

Ngày nhận bài: 4/11/2020

Ngày thông qua phản biện: 4/12/2020

Ngày duyệt đăng: 11/12/2020