

SỬ DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ĐỂ XÁC ĐỊNH GEN KIỂM SOÁT MÙI THƠM (FGR) TRONG TẬP ĐOÀN CÁC GIỐNG LÚA ĐỊA PHƯƠNG

Nghiêm Thị Hương¹, Nguyễn Thị Vân²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này sử dụng chỉ thị phân tử DNA để phát hiện gen mùi thơm trong tập đoàn các giống lúa địa phương. Thí nghiệm thực hiện trên 81 giống lúa đã được thu thập ở nhiều địa phương khác nhau. Sử dụng hai cặp mồi ESP và IFAP nhằm xác định gen quy định mùi thơm - là gen lặn, ký hiệu FGR, định vị trên NST số 8 liên kết chặt chẽ với marker RG28. Kết quả nghiên cứu cho thấy đã phát hiện thấy 5 giống lúa chứa gen mùi thơm fgr là: 10102, 10059, 10089, 10096 và 10063-1. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc tạo ra nguồn vật liệu khởi đầu cho quá trình chọn tạo giống lúa có chất lượng cao.

Từ khóa: Cây lúa, gen FGR, mùi thơm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là một trong những cái nôi của cây lúa nước, do đó nguồn gen lúa rất phong phú, đóng vai trò quan trọng trong việc chọn tạo ra những giống lúa có chất lượng cao. Tuy nhiên hiện nay rất nhiều giống lúa địa phương đang bị thoái hoá có nguy cơ mất hẳn (do việc sản xuất các giống lúa này yêu cầu chi phí sản xuất cao, năng suất thấp và khó tiêu thụ). Trước thực trạng đó các nhà khoa học cho rằng đã đến lúc phải chú trọng công tác thu thập, bảo tồn và đánh giá nguồn gen để có hướng sử dụng hợp lí.

Mặc dù là một trong những nước xuất khẩu gạo hàng đầu thế giới nhưng giá gạo xuất khẩu của Việt Nam trên thị trường thế giới thường thấp hơn so với gạo xuất khẩu từ các nước như Mỹ, Thái Lan, Ấn Độ... Một trong những nguyên nhân cơ bản là chất lượng gạo của nước ta chưa tốt. Đặc tính mùi thơm ở lúa được người tiêu dùng đánh giá rất cao. Chính vì thế việc chọn tạo ra những giống lúa mới, có mùi thơm và kết hợp được một số tính trạng tốt như chất lượng gạo, khả năng chống chịu sâu bệnh... là một chiến lược trong nông nghiệp.

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về gen mùi thơm trên lúa. Tại Đại học Cornell, Ahn et al đã sử dụng marker để nghiên cứu gen điều khiển tính trạng mùi thơm, theo đó thì gen quy định mùi thơm là gen lặn, ký hiệu *fgr*, định vị trên NST số 8 liên kết chặt chẽ với marker RG28. Theo nghiên cứu của Brabury et al, 2005 đã phát hiện ở các giống lúa thơm có gen mã hóa cho Betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2) nằm trên NST số 8. Dựa trên những kết quả trên, Braury et al đã sử dụng phương pháp ASA (Allele Specific Amplification) với 4 cặp mồi ESP, EAP, IFAP và INSP. Giúp phân biệt kiểu gen của các giống lúa đồng hợp tử thơm (cho băng 257bp), dị hợp tử (cho băng dài 355bp và 257bp) và không thơm (cho băng dài 355bp). Để tạo nguồn vật liệu cho công tác chọn tạo giống lúa có chất lượng cao mang gen mùi thơm, ở nghiên cứu này đã sử dụng hai cặp mồi ESP và IFAP nhằm xác định gen quy định mùi thơm (*fgr*) trong tập đoàn các giống lúa địa phương.

^{1,2} Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thí nghiệm thực hiện trên 81 giống lúa thu thập ở nhiều địa phương khác nhau. Sử dụng đối chứng là giống lúa Bắc Thơm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết tách DNA

Chuẩn bị dịch chiết tách DNA: TrisHCl 50Mm PH=8, EDTA 0,25mM PH=8, NaCl 300 mM và H₂O.

Chuẩn bị dung dịch TE dùng để bảo quản DNA: Tris HCl 10Mm, EDTA 1mM, PH=8 và H₂O.

Quy trình tách chiết

Lá lúa non, khoẻ thu từ sáng sớm (khi đó cây chưa quang hợp, chiết tách DNA sẽ không bị lẫn tinh bột), cho vào các ống nghiệm và ghi tên giống trên ống nghiệm.

Cối, chày sứ được khử trùng, đặt trên đá lạnh.

Cắt 2 cm mẫu lá lúa thành các mẫu nhỏ bằng kéo vô trùng vào cối.

Cho 400µl dung dịch chiết xuất DNA, nghiền nhỏ cho tới khi dung dịch chuyển sang màu xanh, chứng tỏ tế bào lá đã vỡ và diệp lục được giải phóng ra.

Đổ thêm 400µl dung dịch chiết xuất DNA vào rồi trộn lẫn và chuyển 400µl dung dịch vào ống eppendort đã đánh dấu tên từng giống sau đó lại đặt vào đá lạnh.

Thêm 700µl dung dịch Phenol: Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1) vào ống eppendort này rồi ly tâm khoảng 5 phút, 13000 vòng ở nhiệt độ 15 - 21⁰C.

Chuyển phần dung dịch phía trên vào ống eppendort mới đã ghi tên giống, rồi thêm 600µl dung dịch Chloroform: Isoamylalcohol (24:1) ly tâm 5 phút, 13000 vòng ở nhiệt độ 15 - 21⁰C.

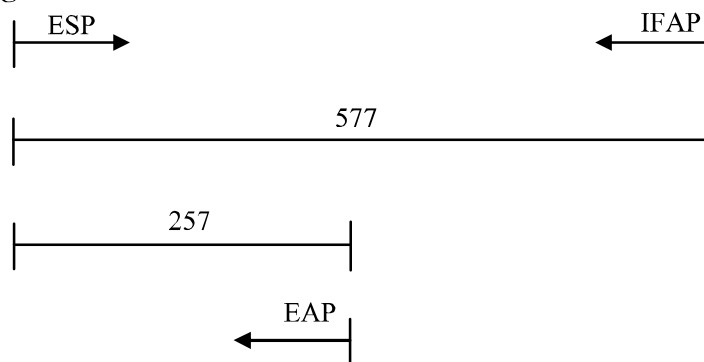
Chuyển phần dung dịch phía trên sang ống eppendort mới đã đánh dấu tên giống, rồi sau đó cho 800µl ethanol vào ly tâm 5 phút, 13000 vòng ở nhiệt độ 15 - 21⁰C, để kết tủa DNA.

Bỏ phần dung dịch phía trên, chỉ giữ lại phần kết tủa ở dưới, để khô tự nhiên bằng cách úp ngược ống nghiệm trên giấy thấm.

Hoà tan kết tủa DNA trong 50µl TE, bảo quản ở nhiệt độ -20⁰C.

2.2.2. Nhân PCR phát hiện gen mùi thơm

Vị trí nhân gen mùi thơm



Trình tự môi dùng trong PCR (Louis MT Bradbury et al 2005)

Tên môi	Trình tự
External Sense Primer (ESP)	TTG TTT GGA GTC TGC TGA TG
Internal Fragrant Antisense Primer (IFAP)	CAT AGG AGC AGCTGA AAT ATA TACC

Thành phần phản ứng PCR với thể tích mẫu 25 μ l gồm: 0,2 μ l Taq DNA Polymerase; 2,5 μ l Taq Buffer 10 X; 2 μ l $MgCl_2$ 25Mm; 0,5 μ l dNTP 10mM; 2,5 μ l ESP primer ; 2,5 μ l IFAP primer; 13,8 μ l nuclease free water và 1 μ l DNA tổng số.

Thiết lập chu kì hoạt động: 94⁰C trong 2 phút và 32 chu kỳ 94⁰C trong 30 giây; 56⁰C trong 30 giây; và 72⁰C trong 30 giây và 72⁰C trong 5 phút.

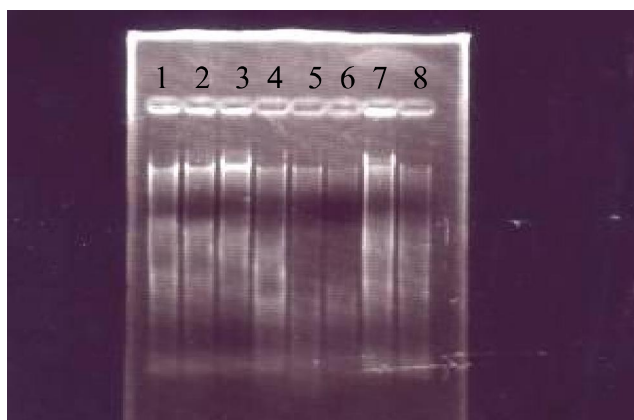
2.2.3. Điện di sản phẩm nhuộm màu phát hiện gen

Sản phẩm sau khi chạy PCR được điện di trên gel agarose 1%, 65V trong 45 phút. Nhuộm Ethymium bromide 10mg/ml trong 10 phút rồi chụp ảnh bằng máy chụp UV.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả kiểm tra độ tinh sạch của DNA tách chiết

Để kiểm tra độ tinh sạch của DNA, sau khi tách chiết chúng tôi tiến hành điện di DNA tách chiết được



- Giếng 1. Bắc thơm
- Giếng 2. IR64
- Giếng 3. Jasmine
- Giếng 4. 10136
- Giếng 5. 10143
- Giếng 6. 10261
- Giếng 7. 10062
- Giếng 8. 10707

Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số

Điện di sản phẩm chiết tách của các giống lúa thí nghiệm cho thấy các vệt băng DNA của tất cả các giống đều rõ, tập trung nhưng chưa gọn, điều này chứng tỏ DNA khá nguyên vẹn nhưng chưa tinh sạch. Nhưng do thực hiện phản ứng PCR với môi đặc hiệu nên DNA tách chiết của các giống đều có thể thực hiện cho phản ứng PCR.

3.2. Ứng dụng chỉ thị phân tử xác định gen quy định mùi thơm

3.2.1. Kết quả kiểm tra độ chính xác của môi

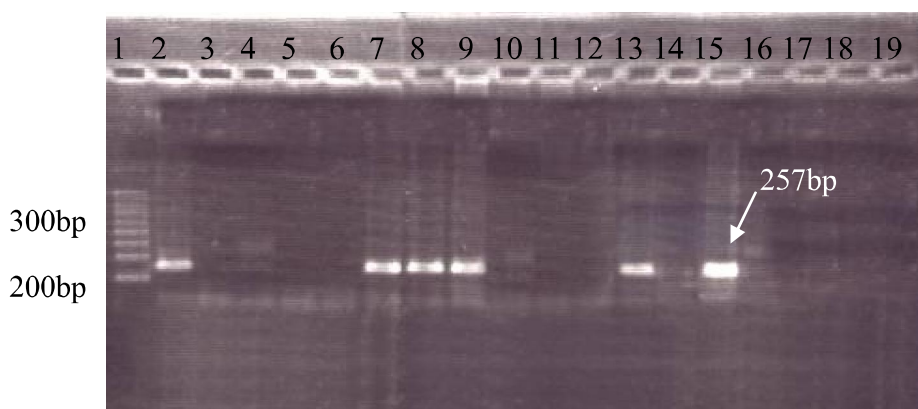
Trong nghiên cứu này đã sử dụng 2 môi đơn ESP và IFAP để nhân lên đoạn DNA nhận biết cho tính trạng mùi thơm. Khi chạy PCR với giống thơm có chứa đột biến mất

8bp và 3SNPs trong trình tự gen quy định sẽ cho vạch băng dài 257bp, còn với các giống không mang gen thơm sẽ không có băng DNA dài 257bp được nhân lên.

Tiến hành kiểm tra độ chính xác của 2 môi này. Phản ứng PCR được thực hiện trên các giống đối chứng thơm và không thơm, kết quả thu được sau khi điện di sản phẩm PCR cho thấy chỉ với các giống đối chứng có hương thơm: Bắc thơm và Jasmine thì xuất hiện vạch băng 257bp, với giống đối chứng không thơm IR64 thì không có vạch băng nào được nhân lên. Như vậy, khi sử dụng 2 môi ESP và IFAP cho kết quả phát hiện gen chính xác 100%.

3.2.2. Kết quả xác định gen mùi thơm của tập đoàn giống lúa địa phương

Sử dụng hai môi ESP và IFAP để xác định sự có mặt của gen mùi thơm trong tập đoàn giống lúa địa phương. Kết quả điện di thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di xác định gen mùi thơm

Giếng 1. Ladder	Giếng 6. 10081	Giếng 11. 10740	Giếng 16. 10120
Giếng 2. Bắc thơm	Giếng 7. 10102	Giếng 12. 10266	Giếng 17. 10700
Giếng 3. IR64	Giếng 8. 10059	Giếng 13. 10089	Giếng 18. 10160
Giếng 4. 10252	Giếng 9. 10063-1	Giếng 14. 10703	Giếng 19. 10294
Giếng 5. 10290	Giếng 10. 10130	Giếng 15. 10096	

Nhận xét: Phát hiện thấy 5 giống chứa gen fgr là : 10102, 10059, 10089, 10096, 10063-1

Bảng 1. Kết quả chạy PCR phát hiện gen mùi thơm

Các giống lúa địa phương	Gen fgr	Các giống lúa địa phương	Gen fgr	Các giống lúa địa phương	Gen fgr
1	10102	+	28	10250	-
2	10109	-	29	10251	-
3	10111	-	30	10252	-
4	10113	-	31	10254	-
5	10117	-	32	10255	-
6	10120	-	33	10256	-
7	10121	-	34	10259	-
8	10122	-	35	10260	-
9	10123	-	36	10261	-
			55	10703	-
			56	10706	-
			57	10707	-
			58	10708	-
			59	10709	-
			60	10710	-
			61	10711	-
			62	10715	-
			63	10718	-

10	10125	-	37	10266	-	64	10721	-
11	10130	-	38	10269	-	65	10722	-
12	10135	-	39	10272	-	66	10724	-
13	10136	-	40	10290	-	67	10729	-
14	10143	-	41	10294	-	68	10733	-
15	10154	-	42	10059	+	69	10737	-
16	10160	-	43	10062	-	70	10740	-
17	10162	-	44	10066	-	71	10741	-
18	10164	-	45	10067	-	72	10745	-
19	10166	-	46	10081	-	73	10746	-
20	10177	-	47	10085	-	74	10748	-
21	10180	-	48	10087	-	75	10126-1	-
22	10235	-	49	10088	-	76	10126-2	-
23	10240	-	50	10089	+	77	10138-2	-
24	10241	-	51	10091	-	78	10182-1	-
25	10243	-	52	10096	+	79	10185-1	-
26	10247	-	53	10097	-	80	10185-2	-
27	10249	-	54	10700	-	81	10063-1	+

4. KẾT LUẬN

Khi sử dụng 2 môi ESP và IFAP để xác định sự có mặt của gen mùi thơm trong tập đoàn giống lúa địa phương đã phát hiện 5 giống chứa gen mùi thơm fgr là: 10102, 10059, 10089, 10096 và 10063-1. Cần khảo sát đánh giá lại những giống đã phát hiện có gen mùi thơm và có hướng sử dụng các giống đã phát hiện ra gen thơm trong công tác chọn tạo giống nhằm tạo ra giống lúa thơm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang (2008), *Một số vấn đề cần biết về gạo xuất khẩu*, Nxb. Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh.
- [2] Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2004), *Ứng dụng marker phân tử đánh dấu gen mùi thơm trên lúa*, Tạp chí Di truyền và Ứng dụng, số 2.
- [3] Phạm Văn Phụng (2006), *Ứng dụng kỹ thuật điện di protein SDS - PAGE để nghiên cứu đặc điểm di truyền và chọn giống lúa*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.
- [4] Juliano B.O. (1990), *Rice grain quality: problems and challenges*, Cereal food world 35, page 245-253.
- [5] Louis M.T Bradburry, Robert J Henry, Qing Sheng Jin, Russell F. Reink, Daniel L. E, (2005), *Waters - A perfect marker for fragrance genotyping in rice* - Molecular Breeding 16: page 279 - 283.
- [6] Khush G.S. and N.Dela Cruz (2014), *Developing Basmati srices with high yiel potential*, Chaper 2 Speciality rice of the world.

USING MOLECULAR MARKER TO DETECT AROMATIC CONTROLLING GENES (*FGR*) OF LOCAL RICE VARIETIES

Nghiêm Thi Hương, Nguyễn Thị Vân

ABSTRACT

This study focused on the application of DNA molecular marker to detect genes for fragrance in local rice varieties. 81 rice varieties, which were collected in different locations were studied. Two pairs of primers, ESP and IFAP were used to identify genes for fragrance which were recessive genes, FGR symbol, located on chromosome 8 closely linked to the RG28 marker. The results indicated that genes for fragrance (FGR gene) presented in 5 rice varieties including 10102, 10059, 10089, 10096 and 10063-1. This information plays an important role in creating the initial material for high quality rice breeding.

Keywords: Rice, FGR genes, fragrance.

* Ngày nộp bài: 30/3/2018; Ngày gửi phản biện: 26/4/2018; Ngày duyệt đăng: 4/3/2020