

Zheng, K., N. Huang, J. Bennett and G.S. Khush, 1995. PCR-Based Marker-Assisted Selection in Rice Breeding. *IRRI Discussion Paper Series*, No. 12, International Rice Research Institute, Manila.

Zhu D., Kang H., Li Z., Liu M., Zhu X., Wang Y., *et al.* A genome-wide association study of field resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice. *Rice*. 2016; 9: 44. <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0116-3> PMID:27576685.

## Creating materials for rice blast resistance breeding

Pham Thien Thanh, Tang Thi Diep, Tong Thi Huyen, Do Thi Huong, Le Thi Thanh, Nguyen Tri Hoan, Duong Xuan Tu

### Abstract

The rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* is one of the most serious diseases in Vietnam. However, this disease can be managed by using resistant rice varieties. Research on breeding sustainable rice varieties with resistance genes has always been considered as effective, inexpensive and environmentally friendly. The diversity of genetic materials in combination with molecular markers closely linked to resistance genes is an effective tool in supporting the rice breeding of blast resistance. In this study, we used 12 popular blast fungus strains in the Northern provinces to assess resistance for near isogenic lines. The results identified genes *Pi1*, *Pi7(t)*, *Pi9*, *Pik*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pish*, *Pita*, *Pita-2* and *Piz-5* exhibiting effective resistance. A total of 16 markers used for polymorphic assessment between cultivars carrying these resistance genes and cultivated varieties, five SSR markers for differentiating polymorphisms could be used as a support tool for breeding (RM527, RM206, RM224, RM1337, RM7102). These resistance genes were transferred to BC15 rice variety to create five promising lines D2.1, D2.9, D3.2, D3.5, and D3.8 carrying the corresponding resistance genes *Pita*, *Pita2*, *Pik-h*, *Piz5* and *Pi1*. The elite lines have precious agronomic characteristics such as high yielding (6.69 - 7.16 tons/ha), good quality (amylose content from 16.8-17.8%) and resistance to blast disease through artificial infection (Scale 0-5). This is a valuable source of material for breeding of new rice varieties resistant to blast in the future.

**Keywords:** Rice (*Oryza sativa* L.), blast, resistance gene, DNA marker, MAS

Ngày nhận bài: 03/9/2020

Ngày phản biện: 20/9/2020

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

Ngày duyệt đăng: 02/10/2020

## ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG AMYLOSE, NHIỆT ĐỘ HÓA HỒ VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN *waxy1* CỦA MỘT SỐ NGUỒN GEN NGÔ ĐỊA PHƯƠNG ĐANG ĐƯỢC BẢO QUẢN TRONG NGÂN HÀNG GEN CÂY TRỒNG QUỐC GIA

Trần Thị Thu Hoài<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lan Hoa<sup>1</sup>, Bùi Thị Thu Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Thủy<sup>1</sup>, Đinh Bạch Yến<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Báo cáo này trình bày kết quả nghiên cứu xác định hàm lượng amylose và nhiệt độ hóa hồ của 200 mẫu nguồn gen được lựa chọn từ tập đoàn ngô địa phương. Kết quả cho thấy có sự đa dạng rất lớn về hàm lượng amylose cũng như là nhiệt độ hóa hồ 200 mẫu nguồn gen đánh giá. Hàm lượng amylose dao động từ 1,07 đến 27,99%, trong đó có 39,2% thuộc nhóm ngô nếp với hàm lượng amylose dưới 6,0%. Nhiệt độ bắt đầu hồ hóa của các mẫu nguồn gen biến động từ 63,5 - 71,9°C. Nhóm ngô nếp với hàm lượng amylose thấp có nhiệt độ hóa hồ cao hơn so với các nguồn gen thuộc nhóm ngô tẻ. Giải trình tự gen *waxy1* của 35 nguồn gen ngô đại diện cho thấy, có 4 dạng Haplotype, với tổng số 23 đột biến điểm (SNP) và 13 InDel. Trong số 35 mẫu giải trình tự gen *waxy1* có 10 mẫu thuộc Haplotype 1; 3 mẫu thuộc Haplotype 2; 21 mẫu thuộc Haplotype 3 và chỉ có 1 mẫu thuộc Haplotype 4. InDel mất đoạn 15 nucleotide (Haplotype 1) trên exon 10 làm thay đổi trật tự axit amin là xóa 4 axit amin và một stop codon thuộc nhóm giống ngô nếp có hàm lượng amylose thấp. Haplotype 1 có ý nghĩa trong phân tích tương quan kiểu gen *waxy1* và hàm lượng amylose thấp (1 - 5%) ở ngô nếp, cần tiếp tục được nghiên cứu sâu hơn nữa.

**Từ khóa:** Hàm lượng amylose, ngô địa phương, nhiệt độ hóa hồ, vùng sinh thái, *waxy1*

<sup>1</sup> Trung tâm Tài nguyên thực vật

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực đứng thứ hai sau cây lúa. Sản lượng ngô ở Việt Nam không đáp ứng do yêu cầu ngày càng tăng. Cây ngô có mặt ở hầu hết các tỉnh của Việt Nam nhưng tập trung chủ yếu ở miền Bắc, miền Trung và Tây Nguyên (Trương Văn Đích, 2005). Cây ngô là một trong những cây trồng có hiệu quả kinh tế cao do lợi thế là cây ngắn ngày, kỹ thuật trồng, chăm sóc đơn giản, đầu tư ít, thị trường tiêu thụ mạnh. Các sản phẩm từ cây ngô cũng đã và đang được đa dạng hóa nhằm đáp ứng nhu cầu của xã hội. Chính vì vậy công tác chọn tạo giống ngô cũng được tiến hành theo nhiều mục tiêu khác nhau, trong đó các yêu cầu về giống ngô chất lượng cao cũng ngày càng được quan tâm nghiên cứu.

Giá trị dinh dưỡng của ngô trong hạt ngô bao gồm 70 - 75% đường, tinh bột, 8 - 10% protein và 4 - 5% tinh dầu. Một trong những sản phẩm quan trọng từ cây ngô chính là tinh bột, tinh bột ngô có các ứng dụng trực tiếp và gián tiếp khác nhau như làm lương thực, làm nguyên liệu chế biến thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và một số ngành công nghiệp khác. Về mặt hóa học, tinh bột là polysaccharides bao gồm các đơn vị glucose lặp lại. Các phân tử tinh bột bao gồm cấu trúc mạch thẳng, được gọi là amylose và cấu trúc phân nhánh, được gọi là amylopectin. Tỷ lệ amylose và amylopectin quyết định đặc tính lý hóa của tinh bột. Hàm lượng amylose trong tinh bột là một chỉ tiêu rất quan trọng, ảnh hưởng đến các tính chất vật lý, hóa học của tinh bột. Bên cạnh đó, nhiệt độ hóa hồ của tinh bột cũng là chỉ tiêu quan trọng, đặc biệt trong công nghệ chế biến thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và một số ngành công nghiệp khác.

Các đặc tính liên quan tới tính trạng chất lượng của ngô này được thể hiện thông qua các alen biến dị di truyền tự nhiên sẵn có. Xác định và điều khiển được các gen quan trọng này sẽ mở ra hướng mới thiết kế các tổ hợp biến dị trọng yếu làm thay đổi giá trị dinh dưỡng của ngô, hướng đến mục tiêu chọn tạo giống ngô có hàm lượng dinh dưỡng cao, dễ tiêu hóa, đáp ứng được nhu cầu trong tương lai. Trong số gen có liên quan đến quá trình tổng hợp và tích lũy tinh bột ở nội nhũ ngô, gen *wx* (*waxy1*) được định vị trên vai ngắn của nhiễm sắc thể số 9. Enzyme Granule-bound-starch synthase (GBSSI), được mã hoá bởi gen *waxy1* (*wx1*) ở ngô chịu trách nhiệm về tổng hợp amylose (Nelson and Rines, 1962; Shure *et al.*, 1983).

Một số công trình nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử trong đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn dòng ngô thuần đã được nhiều tác giả nghiên cứu và thu được kết quả có giá trị trong chọn tạo giống. Tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền bằng phân

tích đặc điểm hình thái các giống ngô tẻ địa phương, Vũ Văn Liết và cộng tác viên (2009) đã nhận thấy, nguồn gen ngô địa phương ở các tiểu vùng sinh thái miền núi phía Bắc Việt Nam rất đa dạng về hình thái, chất lượng và đặc điểm nông học. Tuy nhiên chưa có đánh giá chi tiết về kiểu hình cũng như kiểu gen liên quan đến các tính trạng dinh dưỡng ở tập đoàn ngô địa phương Việt Nam.

Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đánh giá hàm lượng tinh bột, nhiệt độ hóa hồ, đồng thời khảo sát các trạng thái alen của gen *wx* (*waxy1*) của một số nguồn gen ngô địa phương đang được bảo quản trong Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia nhằm bổ sung thêm thông tin chi tiết về các nguồn gen này phục vụ công tác chọn tạo giống ngô chất lượng cao cho sản xuất.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Căn cứ vào số lượng mẫu giống hiện đang lưu giữ tại Ngân hàng gen cũng như tỷ lệ phân bố tại các vùng sinh thái và đặc điểm hạt, 200 mẫu nguồn gen ngô địa phương và 04 dòng, giống ngô cải tiến được sử dụng để đánh giá hàm lượng amylose và nhiệt độ hóa hồ của tinh bột.

**Bảng 1.** Số lượng mẫu giống ngô của từng vùng sinh thái nông nghiệp

Vùng sinh thái	Số lượng mẫu giống
Đông Bắc	89
Tây Bắc	38
Tây Nguyên	47
Nam Trung Bộ	21
Khác	5
Giống mới	04
Tổng số	204

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### a) Phương pháp phân tích hàm lượng Amylose

Xác định hàm lượng amylose theo TCVN 5716-2:2017, ISO 6647-2:2015. Hạt ngô được nghiền thành bột mịn để phá vỡ cấu trúc nội nhũ nhằm hỗ trợ sự phân tán và gelatin hoá hoàn toàn. Phần mẫu thử được hoà vào dung dịch natri hydroxit, sau đó lấy một phần của dung dịch chiết này và cho thêm dung dịch iot. Sử dụng máy đo quang phổ để đo hấp thụ của phức màu tạo thành ở bước sóng 720 nm. Kết quả hàm lượng amylose tính theo độ hấp phụ của dung dịch ở bước sóng 720 nm sau đó so sánh với đường chuẩn amylose đã xây dựng.

### b) Phương pháp xác định nhiệt độ hóa hồ

Xác định nhiệt độ hóa hồ theo phương pháp của Xu và cộng tác viên (2014). Sử dụng máy differential scanning calorimeter DSC 200F3 Maia (Netzsch, Germany). Hạt ngô sau khi tách bỏ phần mày và nội nhũ được nghiền mịn, sàng qua sàng với lỗ sàng 200 - 250  $\mu\text{m}$ . Lấy 5 mg bột cho vào pan thêm 10  $\mu\text{L}$  Distill water, đập nắp pan và để ổn định trong vòng 1 tiếng sau đó cho vào máy. Chạy máy với dải nhiệt độ 20 - 100°C, 5°C/phút. Dữ liệu được xử lý, tính toán bằng phần mềm NEZSCH Proteus Thermal Analysis.

### c) Phương pháp giải trình tự gen wx1 liên quan đến sinh tổng hợp tinh bột ở nội nhũ ngô địa phương

- Chọn mẫu và thiết kế môi: Dựa vào kết quả đánh giá và phân nhóm hàm lượng tinh bột, 35 nguồn gen được chọn cho giải trình tự gen *waxy*. Các cặp môi khuếch đại gene quan tâm được thiết kế bằng phần mềm Primer-3 dựa trên thông tin về trình tự nucleotide của gen *wx1* (gen ID: LOC541854).

- Tách chiết ADN tổng số của các nguồn gen ngô trong nghiên cứu theo phương pháp CTAB cải tiến của Mohammad Irfan và cộng tác viên (2013).

- Kiểm tra độ tinh sạch của mẫu ADN thu được trên hệ thống NanoDrop, điện di agarose 1%, soi dưới tia cực tím.

- Sản phẩm PCR của các mẫu được tinh sạch qua cột sephadex sử dụng bộ kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) và kiểm tra chất lượng và nồng độ bằng máy NanoDrop trước khi được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR-giải trình tự. Cho mỗi phản ứng PCR - giải trình tự, 50  $\mu\text{L}$  phản ứng được chuẩn bị bao gồm 100 ng sản phẩm PCR tinh sạch, 3,2 pmol mỗi xuôi hoặc mỗi ngược và 8  $\mu\text{L}$  hỗn hợp BigDye Terminator Ready Reaction. Phản ứng giải trình tự được tiến hành trên hệ thống PCR ABI Veriti. Mỗi mẫu đoạn gen sẽ được giải trình tự từ hai đầu bằng mỗi xuôi và mỗi ngược.

### d) Xử lý trình tự thô và phân tích trình tự bằng các phần mềm tin sinh học

Các trình tự tại mỗi vùng gen sau khi đã được hiệu chỉnh hoàn chỉnh được so sánh với trình tự tham khảo của giống B73 - là giống đã được giải trình tự toàn bộ hệ gen và được sử dụng làm khuôn để thiết kế các bộ môi khuếch đại các vùng gen quan tâm. Những đối chiếu này được thực hiện bởi công

cụ MUSCLE alignment (phần mềm Geneious) với loại so sánh: *Global alignment with free end gaps*; với tiêu chí *Cost Matrix* biến thiên từ 65 - 100% tương đồng. Những alen là SNP khác biệt với hệ gen B73 đều được so sánh với dữ liệu của 300 trình tự trên NCBI Blast với công cụ BLAST tích hợp trên phần mềm Geneious để xác định alen hiếm (có tỉ lệ xuất hiện < 5%) và alen đặc hữu (alen chỉ xuất hiện trên giống của Việt Nam).

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 11 năm 2018 đến tháng 12 năm 2019.

- Địa điểm nghiên cứu:

+ Các thí nghiệm được thực hiện tại Trung tâm Tài nguyên thực vật.

+ Xác định nhiệt độ hóa hồ được thực hiện tại phòng thí nghiệm Nghiên cứu sinh học nông nghiệp, Khoa Nông học, trường Đại học Kyushu, Nhật Bản.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

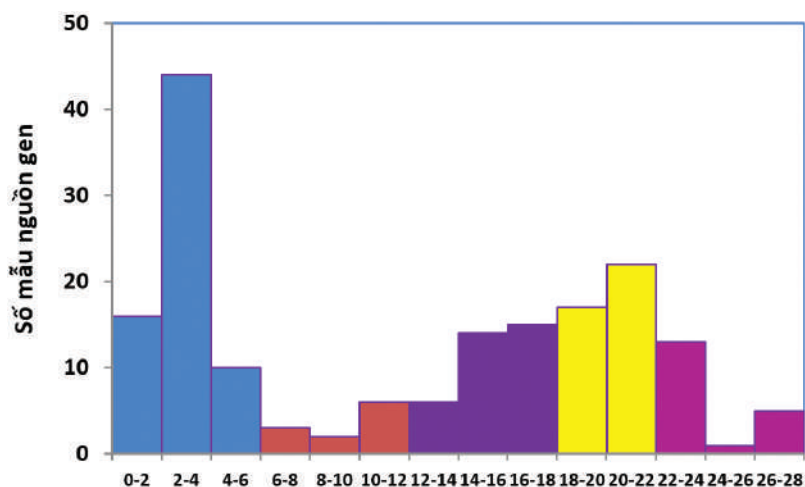
### 3.1. Kết quả xác định hàm lượng amylose trong nội nhũ của một số nguồn gen ngô đang được bảo quản trong Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia

Kết quả đánh giá của 200 mẫu giống ngô địa phương cho thấy hàm lượng amylose dao động từ 1,07 đến 27,99% (Hình 1). Trong khi đó 4 dòng, giống ngô nước có hàm lượng amylose dao động từ 2,34% đến 19,03%.

Hình 1 thể hiện sự biến động về hàm lượng amylose của các mẫu nguồn gen ngô địa phương. Trong đó số mẫu nguồn gen có hàm lượng amylose từ 2 - 4% là cao nhất, sau đó đến các nguồn gen có hàm lượng amylose từ 18 - 22%.

Tiếp tục phân nhóm các nguồn gen ta thu được kết quả ở bảng 2. Kết quả cho thấy trong số 204 nguồn gen: 80 nguồn gen có hàm lượng amylose từ 1 - 6%, 12 nguồn gen có hàm lượng amylose từ 8 - 12%, 39 nguồn gen có hàm lượng amylose từ 12 - 18%, 52 nguồn gen có hàm lượng amylose từ 18 - 22% và 21 nguồn gen có hàm lượng amylose lớn hơn 22%.

Như vậy các nguồn gen có hàm lượng amylose < 6% chiếm số lượng lớn hơn cả, đây là nhóm giống ngô nếp có thể khai thác sử dụng theo hướng sử dụng bắp non hoặc chế biến thành một số món ăn như bánh, chè.

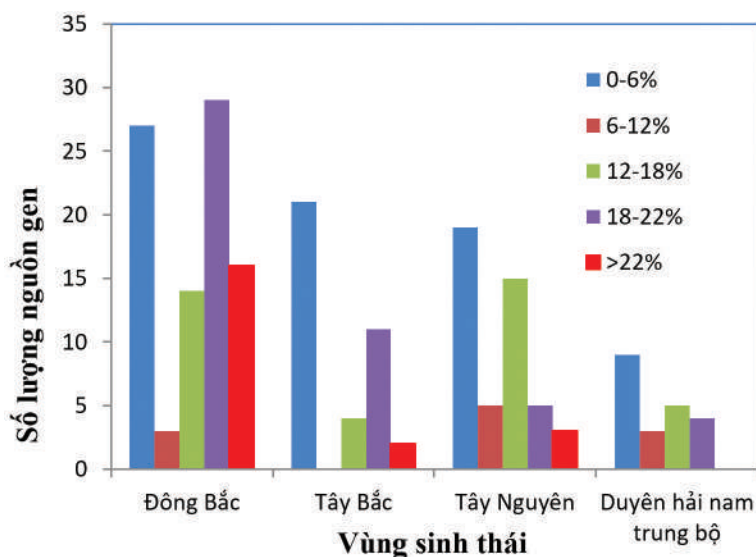


Hình 1. Đa dạng hàm lượng amylose trong một số mẫu nguồn gen ngô địa phương

Bảng 2. Phân nhóm 204 mẫu nguồn gen ngô theo hàm lượng amylose

Hàm lượng Amylose (%)	Số lượng mẫu giống	Tỷ lệ (%)
Nếp (1 - 6%)	80	39,2
Rất thấp (6 - 12%)	12	5,9
Thấp (12 - 18)	39	19,1
Trung bình (18 - 22)	52	25,5
Cao (> 22%)	21	10,3
Tổng	204	100

Đánh giá hàm lượng tinh bột heo vùng sinh thái của 195 nguồn gen có đầy đủ thông tin về địa điểm thu thập chúng tôi thu được kết quả ở hình 2. Kết quả bước đầu có thể nhận thấy khu vực Đông Bắc và khu vực Tây Nguyên có sự đa dạng lớn nhất về hàm lượng amylose. Ngược lại, khu vực Tây Bắc và khu vực Duyên hải Nam Trung bộ có sự đa dạng thấp hơn. Đây là một kết quả có ý nghĩa, bổ sung thêm thông tin hữu ích cho công tác chọn tạo giống ngô trên địa bàn các khu vực liên quan.



Hình 2. Phân bố hàm lượng amylose trong hạt ngô theo khu vực địa lý

### 3.2. Kết quả xác định nhiệt độ hóa hồ

Kết quả xác định nhiệt độ hóa hồ của 200 nguồn gen ngô địa phương cho thấy các nguồn gen ngô có nhiệt độ hóa hồ từ 63,5°C đến 71,9°C (điểm bắt đầu hồ hóa (Onset), trong đó nguồn gen có nhiệt độ hóa

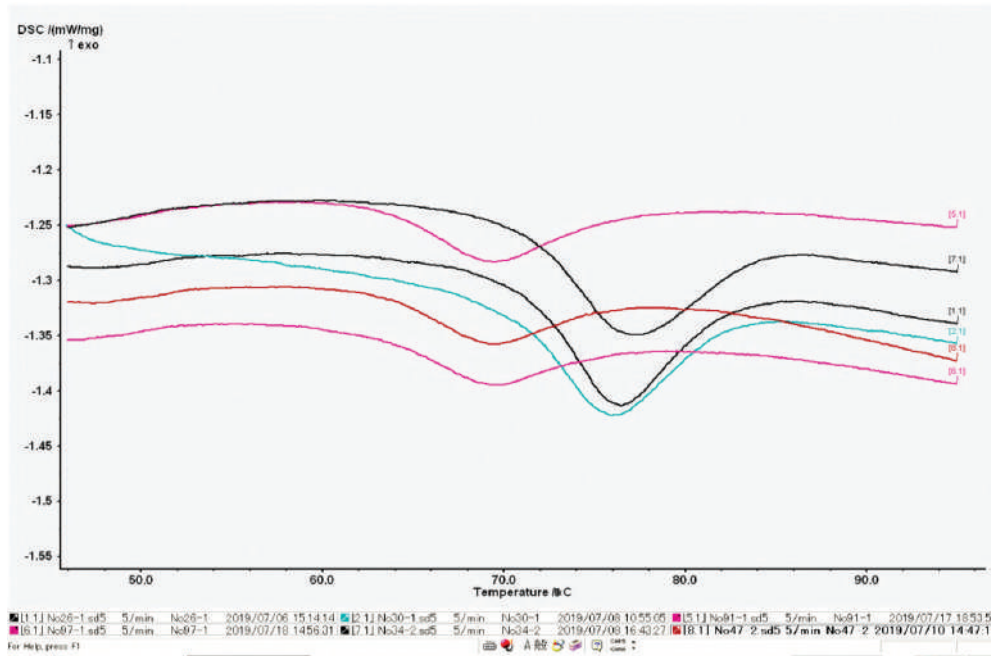
hồ thấp nhất là 63,5°C và nguồn gen có nhiệt độ hóa hồ cao nhất là 71,9°C. Phân nhóm 200 nguồn gen theo nhiệt độ hóa hồ cho thấy trên 70% số nguồn gen thuộc nhóm nhiệt độ hóa hồ ở mức trung bình (65,9 - 69,5°C) (Bảng 3).

**Bảng 3.** Phân nhóm 200 nguồn gen ngô địa phương theo nhiệt độ hóa hồ (Onset temperature)

Phân nhóm theo nhiệt độ bắt đầu hồ hóa	Số lượng nguồn gen	Tỷ lệ (%)	Một số nguồn gen đại diện
Thấp (63,5°C - 65,8°C)	31	15,5	23830, 23832, 23836, 24229, 24687, 24695
Trung bình (65,9°C - 69,5°C)	143	71,5	23646, 23719, 23722, 24000, 24081, 24099, 24221, 24224, 24232
Cao (≥ 69,6°C)	26	13,0	23690, 23692, 23696, 23709, 24155

Hình 3 thể hiện mối liên hệ giữa hàm lượng amylose và nhiệt độ hóa hồ. Kết quả cho thấy hàm lượng amylose có ảnh hưởng khá rõ đến nhiệt độ

hóa hồ của bột ngô theo xu hướng giảm nhiệt độ bắt đầu hóa hồ khi hàm lượng amylose tăng.



(No)	Mã số NHG
1.1	23690
2.1	23696
5.1	24683
6.1	24699
7.1	23709
8.1	23830

**Hình 3.** Đường biểu diễn nhiệt độ hóa hồ của một số nguồn gen ngô địa phương có hàm lượng amylose khác nhau

Ghi chú: Mã số ngân hàng gen 23690: hàm lượng amylose 2,65%; 2.1: 23696: 2,84%; 5.1: 24683: 26,07%; 6.1: 24699: 22,68%; 7.1: 23709: 3,13%; 8.1: 23830: 17,01%.

Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu về nhiệt độ hóa hồ của tinh bột nói chung và tinh bột ngô nói riêng. Một số nhà khoa học thuộc trường đại học Hacettepe, Thổ Nhĩ Kỳ cũng đã có nghiên cứu về nhiệt độ hóa hồ của ba nhóm giống ngô: ngô nếp (waxy corn); ngô thường (normal corn) và ngô có hàm lượng amylose cao (high amylose corn). Kết quả cũng đã chỉ ra sự liên hệ giữa hàm lượng amylose và quá trình hóa hồ của tinh bột. Nhóm ngô nếp có nhiệt độ hóa hồ cao hơn so với nhóm ngô thường. Tuy nhiên, đối với nhóm ngô có hàm lượng amylose cao do có sự hiện diện của phức hợp lipid đã ảnh hưởng đến quá trình hồ hóa nên nhiệt độ hóa hồ của nhóm này là cao nhất. Chính vì vậy các nhà khoa học đã kết luận rằng đối với quá trình hồ hóa

các amylose tự do có ảnh hưởng chính chứ không phải là tỷ lệ amylose trong tinh bột (Aytunga E. Arik Kibar *et al.*, 2009).

Wajira và David (2006) khi nghiên cứu sự hồ hóa và khả năng hòa tan của tinh bột ngô trong quá trình đun nóng cũng đã chỉ ra rằng một điều hiển nhiên là amyloza đóng vai trò quan trọng trong thời gian đầu giai đoạn hóa hồ của tinh bột ngô.

Thành phần amylose và amylopectin và tỷ lệ amylose và amylopectin ảnh hưởng đến tính chất hồ hóa và đặc tính lý hóa khác của tinh bột. Trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy hàm lượng amylose có tương quan nghịch với nhiệt độ bắt đầu hồ hóa ( $T_o$ ) của quá trình hồ hóa tinh bột. Như vậy có thể thấy rằng hàm lượng amylose có tác động khá

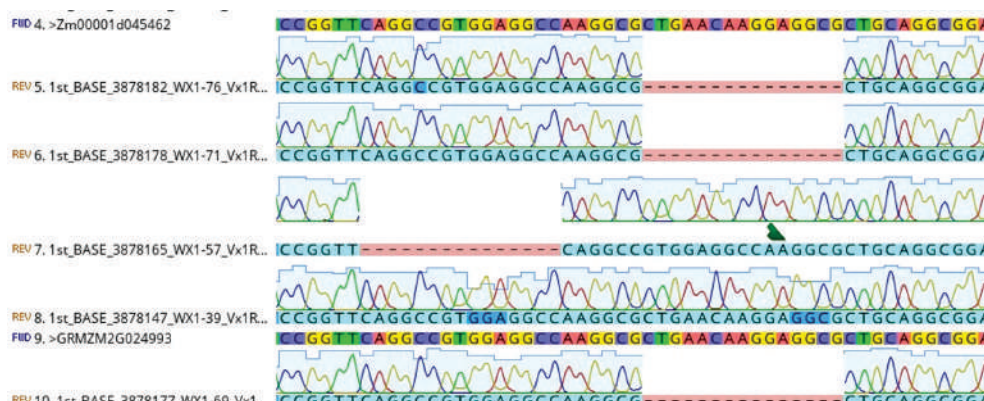
rõ đến quá trình hồ hóa của tinh bột và do đó sẽ có ảnh hưởng nhất định đến nhiệt độ hóa hồ. Tuy nhiên để có thể kết luận rõ ràng và chính xác hơn thì cần có những nghiên cứu chuyên sâu hơn về vấn đề này.

### 3.3. Mối quan hệ giữa đột biến điểm trên gen *wx1* với hàm lượng amylose của một số giống ngô địa phương

Gen *waxy1* là gen có chức năng mã hóa enzym tổng hợp tinh bột liên kết hạt (GBSS), là một trong những gen quan trọng ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp tinh bột trong nội nhũ hạt. Để đánh giá sự khác biệt về chức năng giữa các alen GBSS, chúng

tôi đã nhân bản và giải trình tự gen từ một loạt các mẫu nguồn gen có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng amylose.

Kết quả giải trình tự gen *waxy1* của 35 mẫu nguồn gen cho thấy có 23 SNP, 13 InDel và không có alen hiếm. InDel là sự chèn thêm nucleotide hoặc cắt của một nucleotide hoặc một đoạn trình tự trên gen. Số lượng nucleotide InDel có thể dao động từ 1 nu cho đến 15 nu. Trong 13 InDel xuất hiện trong 35 mẫu giải trình tự gen *waxy1* thì có 3 InDel thêm đoạn từ 4 đến 8 nucleotide và 9 InDel mất đoạn từ 1 đến 15 nucleotide. Sự xóa 15 nucleotide trên exon 10 gen *wx1* được thể hiện ở hình 4. 12 InDel còn lại đều được phát hiện ở intron 10, 11, 12 và intron 13.

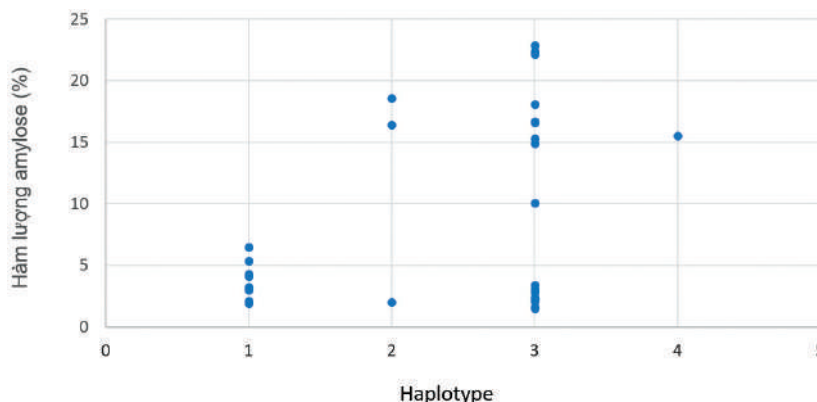


Hình 4. InDel trên gen *wx1* của một số giống ngô địa phương

Từ kết quả giải trình tự gen *wx1* và kết quả đánh giá hàm lượng amylose, chúng tôi đã tiến hành phân tích mối quan hệ giữa kiểu hình là hàm lượng amylose và các đột biến điểm và InDel trên exon 10. Kết quả thể hiện ở hình 10.

Haplotype 1 bao gồm 10 nguồn gen ngô có 15 nu (AGGCGCTGAACAAGG) bị xóa trên exon 10, vị trí từ 2535 - 2549 bp. Haplotype 1 không có SNP và

InDel trên intron 10, exon 11, intron 11 và intron 12. Haplotype 2 bao gồm 4 nguồn gen ngô có đột biến điểm (nucleotit A ở giống B73 bị thay thế bởi C) tại vị trí 2630 bp của exon 10. Intron 10, intron 11 và intron 12 có SNP và InDel. Haplotype 3 (17 nguồn gen): không có SNP và InDel ở exon 10 trong khi có 10 SNP và 8 InDel được ghi nhận ở intron 10, intron 11 và intron 12.

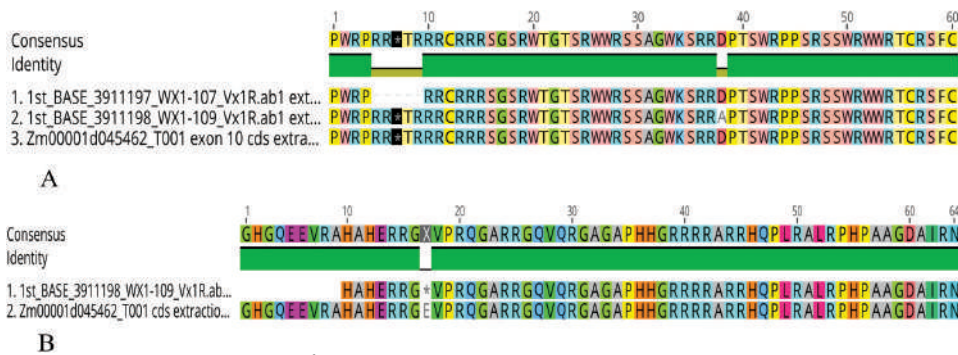


Hình 5. Mối quan hệ giữa haplotype gen *wx1* và hàm lượng amylose của một số giống ngô địa phương

Ghi chú: Haplotype 1: InDel xóa 15 nu trên exon 10 (vị trí 2535 - 2549 bp); Haplotype 2: SNP A > C tại vị trí 2630 bp; Haplotype 3: Không có SNP và InDel ở exon 10, có 10 SNP và 8 InDel trên intron 10, intron 11 và intron 12.

Kiểm tra sự thay đổi axit amin tại vị trí có SNP và InDel trên exon 10 (Hình 6) cho thấy: Haplotype 1 có 15 nucleotide bị xóa dẫn tới thay đổi trật tự axit amin (delete của 4 axit amin là 3 Arginine, 1 Threonine và 1 stop codon). Đối với nhóm haplotype 2 có SNP tại vị trí 2630bp của exon 10, axit amin thay đổi

từ Aspartic Acid (GAC) sang Alanine (GCC). Đặc biệt, nguồn gen Khẩu lý ón (số đăng ký 26992) có 1 SNP trên exon 11 vị trí 2844bp. SNP này làm thay đổi axit amin từ Glutamic Acid (GAA) thành Stop codon (TAA).



**Hình 6.** Đột biến điểm (SNP) và InDel trên exon 10 và exon 11 gen *wx1* của hai giống ngô địa phương làm thay đổi trình tự axit amin

**Ghi chú:** A: InDel tại vị trí 2535 - 2539 bp và SNP tại vị trí 2630 bp trên exon 10 làm thay đổi axit amin. 1: nguồn gen Khẩu táy nu, mã số Ngân hàng gen 24925; 2: nguồn gen Khẩu lý ón, mã số Ngân hàng gen 26992; 3: Trình tự gen *wx1* của giống B73.

B: SNP tại vị trí 2844 bp exon 11: 1. Nguồn gen Khẩu lý ón, mã số Ngân hàng gen 26992 thay đổi axit amin; 2: Trình tự gen *wx1* của giống B73.

Haplotype 1 với 10 nguồn gen ngô có InDel 15 nucleotide trên exon 10 đều là ngô nếp và có nguồn gốc tại một số tỉnh thuộc Đông Bắc bộ. Trong một số nghiên cứu của Fan và cộng tác viên (2008) đã ghi nhận InDel trên exon 7 và exon 10 được tìm thấy ở các giống ngô nếp địa phương có nguồn gốc từ Trung quốc. Các đột biến điểm và InDel trên exon 10 và exon 11 dẫn tới xóa bỏ và thay đổi một số axit amin có vai trò trong quá trình bất hoạt hoàn toàn hoặc một phần, kết quả làm giảm lượng amylose trong khi làm tăng hàm lượng amylopectin trong nội nhũ ngô.

Haplotype 3 được ghi nhận ở 21 nguồn gen ngô có nguồn gốc từ một số tỉnh Tây nguyên và Nam Trung bộ như Ninh Thuận, Quảng Nam, Gia Lai, Đắk Lắk. Các SNP và InDel trên ba intron 10, 11 và 12 cho thấy không có mối quan hệ với hàm lượng amylose. Hàm lượng amylose của 21 nguồn gen ngô có sự biến động lớn từ 1,08 - 22,84%. Trong số 16 nguồn gen ngô có tới 10 giống ngô nếp, 6 giống ngô tẻ thuộc ba nhóm có hàm lượng amylose thấp, trung bình và cao.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có sự đa dạng cao về kiểu gen của gen *wx1* ở các giống ngô địa phương của Việt Nam. Sự phân bố theo vùng địa lý, điều kiện về thổ nhưỡng, khí hậu cũng là một trong những nguyên nhân hình thành lên sự đa dạng của tập đoàn ngô địa phương.

#### IV. KẾT LUẬN

Hàm lượng amylose của 200 mẫu nguồn gen ngô địa phương dao động từ 1,07 - 27,99%. Trong đó có số mẫu nguồn gen nằm trong nhóm ngô nếp chiếm 39,2% và chủ yếu thuộc khu vực Tây Bắc.

Nhiệt độ bắt đầu hóa hồ của 200 nguồn gen ngô địa phương có sự biến động lớn từ 63,5°C đến 71,9°C và được phân ra ba nhóm bao gồm các nguồn gen có nhiệt độ hóa hồ thấp, trung bình và cao. Trên 70% nguồn gen ngô phân tích có nhiệt độ hóa hồ trung bình. Giải trình tự gen *waxy1* liên quan đến sinh tổng hợp tinh bột của 35 mẫu nguồn gen ngô địa phương đã phát hiện 23 đột biến điểm (SNP) và 13 InDel, trong đó có 4 InDel thêm đoạn và 9 InDel mất đoạn. Trong 35 mẫu giải trình tự có 10 mẫu thuộc Haplotype 1; 4 mẫu thuộc Haplotype 2; 21 mẫu thuộc Haplotype 3. InDel ở exon 10 làm thay đổi thành phần axit amin được ghi nhận ở 10 nguồn gen ngô nếp địa phương.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trương Văn Đích**, 2005. *Kĩ thuật trồng giống ngô năng suất cao*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 26.
- Vũ Văn Liệt, Vũ Thị Bích Hạnh, Nguyễn Văn Hà**, 2009. Đánh giá đa dạng di truyền nguồn giống ngô nếp tẻ địa phương dựa trên các đặc điểm hình thái. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7 (5): 604-611.

- TCVN 5716-2:2017, ISO 6647-2:2015. Tiêu chuẩn quốc gia về Gạo - Xác định hàm lượng amylose - Phần 2: Phương pháp thông dụng
- Aytunga E. Arik Kibar\*, İlknur Gönenç, Ferhunde Us, 2009. Gelatinization of waxy, normal and high amylose corn starches. *GIDA* (2010), 35 (4): 237-244.
- Fan LJ, Quan LY, Leng XD, Guo XY, Hu WM, 2008. Molecular evidence for post-domestication selection in the Waxy gene of Chinese waxy maize. *Mol Breed.*, 22: 329-338.
- Mohammad Irfan *et al.*, 2013. Modification of CTAB protocol for maize genomic DNA extraction. *Research journal of biotechnology*, 8 (1): 41-45.
- Shure M., S.Wessler, N.Fedoroff, 1983. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell Volume* 35, Issue 1, November 1983, Pages 225-233.
- Nelson, O.E., and Rines, H.W., 1962. The enzymatic deficiency in waxy mutant of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9: 297-300.
- Wajira S. Ratnayake and David S. Jackson, 2006. Gelatinization and Solubility of Corn Starch during Heating in Excess Water: New Insights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (10): 3712-3716; doi: 10.1021/jf0529114.
- Xu S, Yang Z, Zhang E, Jiang Y, Pan L, et al, 2014. Nucleotide Diversity of Maize ZmBT1 Gene and Association with Starch Physicochemical Properties. *PLoS ONE* 9(8): e103627. doi:10.1371/journal.pone.0103627.

## Determination of amylose content, gelatinization temperature and *waxy1* gene sequencing of local maize accessions in Vietnam Crop National Genebank

Tran Thi Thu Hoai, Nguyen Thi Lan Hoa, Bui Thi Thu Giang, Nguyen Thi Bich Thuy, Dinh Bach Yen

### Abstract

In this report, the amylose content and gelatinization temperature of 200 accessions selected from the local maize collection were determined. The results showed that there was a great diversity in amylose content and gelatinization temperature. The amylose content ranged from 1.07 - 27.99%, of which 39.2% belonging to waxy corn group had amylose content below 6.0%. The gelatinization temperature of these accessions varied from 63.5 - 71.9°C. It is noted that waxy corn accession have higher gelatinization temperature than those having higher amylose content. Survey of allele variation of *waxy1* gene among 35 local maize accessions showed that there were 3 Haplotypes identified with a total of 23 SNPs and 13 InDels. Among them, 10 accessions belonged to Haplotype 1; 21 accessions belonged to Haplotype 3 and 04 accession belonged to Haplotype 3. All of the accessions that belonged to Haplotype 1 have 01 InDel in exon 10 with deleting of 15 nucleotides and have low amylose content (waxy maize group). InDel of Haplotype 1 seems to be correspondent to low amylose content in Vietnamese local maize collection, which might need further research to understand this relationship to this trait in maize.

**Keywords:** Amylose content, ecological region, gelatinization temperature, local maize varieties, *waxy1*

Ngày nhận bài: 28/8/2020

Ngày phản biện: 08/9/2020

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

Ngày duyệt đăng: 02/10/2020

## ĐÁNH GIÁ TỐC ĐỘ PHÁT THẢI KHÍ NHÀ KÍNH TRONG CÁC MÔ HÌNH ÁP DỤNG GÓI KỸ THUẬT CANH TÁC LÚA TIÊN TIẾN TRÊN BỐN TIỂU VÙNG SINH THÁI TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Kim Thu<sup>1</sup>, Hồ Nguyễn Hoàng Phúc<sup>1</sup>, Dương Nguyễn Thanh Lịch<sup>1</sup>, Vũ Ngọc Minh Tâm<sup>1</sup>, Trần Ngọc Thạch<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Nghiên cứu tiến hành đánh giá tốc độ phát thải khí nhà kính trên các mô hình áp dụng gói kỹ thuật canh tác lúa tiên tiến ở các tiểu vùng sinh thái tại ĐBSCL từ năm 2017 - 2018. Nghiên cứu được thực hiện trên quy mô 15 ha/mô hình, mẫu khí thải được thu 3 điểm/mô hình ở ruộng mô hình và ruộng đối chứng vào các thời điểm: sau mỗi

<sup>1</sup> Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long