

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEATS) TRONG CHỌN TẠO CÁC DÒNG LÚA THƠM

Trần Vũ Hải, Vũ Minh Thuận, Nguyễn Lê Văn,
Nguyễn Thị Phương Thơ, Phạm Ngọc Tú

SUMMARY

Applications in SSR (Simple Sequence Repeats) method for aromatic gene rice breeding

Gene BAD2 with homology to the gene that encodes betaine aldehyde dehydrogenase (BAD) has significant polymorphisms in the coding region of fragrant genotypes relative to non-fragrant genotypes. Here, we show that the evaluation of the aroma of rice by analyzed SSR has great significance in determining the line/aromatic rice varieties for planting serves fragrant rice varieties, good quality later. Through molecular markers will soon aid selection in a rice breeding program. To determine the aroma, we were selected 40 crossed including backcross crossed (BC_1F_3 , BC_2F_3), *single-cross and double-cross* from aromatic rice varieties. Analysis based on four markers specific primer ESP, IFAP, INSP and EAP, the results show that: SSR analysis of 198 plants from 40 crossed showed 10 crossed in homozygous for aroma gene and 30 crossed combinations for the genotypes aromatic and non-aromatic. The rate in homozygous for aroma gene in the same crossed was ranged 40% -100%.

Keywords: Rice, aromatic gene, aromatic rice, SSR (simple sequence repeats)

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Để có thể đáp ứng được yêu cầu xuất khẩu gạo, việc chọn lọc các giống lúa thơm chất lượng cao là một trong những nhu cầu cấp bách hiện nay ở nước ta. Chiến lược tạo giống lúa thơm cần được quan tâm hơn trong phương hướng cải tiến giống lúa ở những vùng trồng lúa chất lượng cao. Vì vậy việc duy trì mùi thơm thông qua quá trình lai hồi giao, từ đó đánh giá mùi thơm bằng phương pháp dấu chuẩn phân tử là cần thiết.

Di truyền tính trạng thơm ở lúa đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Gen điều khiển tính trạng mùi thơm được ghi nhận ở nhiều tác giả khác nhau, với nhiều kết luận khác nhau. Theo Richharia và ctv (1965), mùi thơm do đa gen điều khiển. Bradbury và ctv (2005) đã nghiên cứu về cấu trúc, chức năng gen *fgr* tạo mùi thơm trên cây lúa, sử dụng kỹ thuật ASA (Allele specific amplification) với phản ứng PCR để phân biệt gen thơm đồng hợp tử và

dị hợp tử. Đỗ Thị Thu Hương và ctv (2008) dùng 2 cặp mồi ASA để phân tích 42 dòng giống lúa ở Việt Nam, trong đó có 16 dòng lúa thơm đồng hợp tử và 26 dòng lúa không thơm đồng hợp tử. Nguyễn Thị Lang (2004a) nghiên cứu mùi thơm trên quần thể F_2 của 4 tổ hợp lai cho kết quả hệ số di truyền rất thấp, chứng tỏ rằng tính trạng mùi thơm tương tác với môi trường rất cao.

Nghiên cứu này đã xác định được tính trạng mùi thơm của 40 tổ hợp lai hồi giao lúa thơm ở thế hệ BC_1F_3 , BC_2F_3 , tổ hợp lai đơn và lai đôi thông qua phương pháp phân tích dấu chuẩn phân tử nhờ kỹ thuật SSR.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

40 tổ hợp lai, trong đó có 12 tổ hợp lai hồi giao ở thế hệ BC_2F_3 , 14 tổ hợp lai hồi giao ở thế hệ BC_1F_3 , còn lại 14 tổ hợp lai đơn và lai đôi với ít nhất 1 giống lúa thơm ở

các thế hệ từ F₃ đến F₈, các tổ hợp được lai tạo tại Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), giống đối chứng thơm: Khaodawmali 105 (KDM105) và IR64.

Bảng 1. Danh sách tổ hợp lai sử dụng trong thí nghiệm

STT	Tên dòng	Ghi chú	STT	Tên dòng	Ghi chú
1	SH1169	BC ₂ F ₃	21	SH1764	F3
2	SH1170	BC ₂ F ₃	22	SH1765	BC ₂ F ₃
3	SH1172	BC ₂ F ₃	23	SH1766	BC ₁ F ₃
4	SH1173	BC ₂ F ₃	24	SH1767	BC ₁ F ₃
5	SH1174	BC ₂ F ₃	25	SH1768	BC ₁ F ₃
6	SH1175	BC ₂ F ₃	26	SH975	BC ₂ F ₃
7	SH1178	BC ₂ F ₃	27	SH1769	BC ₁ F ₃
8	SH1754	BC ₁ F ₃	28	SH1770	BC ₁ F ₃
9	SH1414	BC ₂ F ₃	29	SH1771	F3
10	SH1415	BC ₂ F ₃	30	SH1772	F3
11	SH1418	BC ₂ F ₃	31	SH1255	BC ₁ F ₃
12	SH1755	F3	32	SH450	F4
13	SH1756	F3	33	SH458	F4
14	SH1757	BC ₁ F ₃	34	SH376	F4
15	SH1758	BC ₁ F ₃	35	SH429	F4
16	SH1759	BC ₁ F ₃	36	SH425	F4
17	SH1760	BC ₁ F ₃	37	SH394	F4
18	SH1761	BC ₁ F ₃	38	SH522	F6
19	SH1762	BC ₁ F ₃	39	SH61	F6
20	SH1763	BC ₁ F ₃	40	SH616	F8

Ghi chú: Giống lúa OM có nguồn gốc từ Viện Lúa ĐBSCL; Jasmine85 là giống lúa nhập nội từ Viện Lúa Quốc tế (IRRI) được Viện Lúa ĐBSCL chọn thuần; IR64Saltol từ Viện Lúa Quốc tế (IRRI).

2. Phương pháp nghiên cứu

Phân tích mùi thơm bằng đánh giá kiểu gen thông qua phân tích SSR với 4 đoạn mỗi đặc hiệu (ESP; INSP; IFAP; EAP) ở bảng 2 để kiểm tra gen BAD2 nằm trên nhiễm sắc thể số 8, mã hóa cho betatain aldehyde dehydrogenase 2 quy định tính thơm của lúa do Bradbury và ctv. đã công bố năm 2005.

Ly trích DNA

Các giống/dòng lúa thơm phân tích và giống lúa đối chứng được trồng trong nhà lưới, khi đạt đủ độ lớn sẽ thu mẫu lá để tiến hành ly trích DNA bằng phương pháp Roges và Bendich (1988). Chạy điện di kiểm tra độ tinh sạch của DNA trên gel Agarose 1%. Sản phẩm được chụp hình gel bằng máy chụp hình và đọc gel Gel Logic 100. DNA sau kiểm tra sẽ chạy PCR với bốn đoạn mỗi đặc hiệu.

Xác định tình trạng mùi thơm bằng kỹ thuật PCR

Quy trình chạy PCR: Chu kỳ phản ứng PCR: 94°C khởi đầu trong 5 phút, 94°C 30 giây, 57°C 30 giây, 72°C 45 giây và kết thúc 72°C trong 7 phút, 35 chu kỳ phản ứng.

Các môi sử dụng

Sử dụng phần mềm primer premier 5.0 để thiết kế primer cho phản ứng PCR nhằm xác định trình tự của gen mục tiêu (BAD2), đồng thời kiểm tra tính xác thực của cặp môi dự kiến sử dụng để phát hiện gen mã hóa cho đặc tính thơm của lúa. Trình tự gen mục tiêu (BAD2) đã sẵn có từ GenBank (Mã số Accession number AP004463).

Bảng 2. Các môi sử dụng trong thí nghiệm

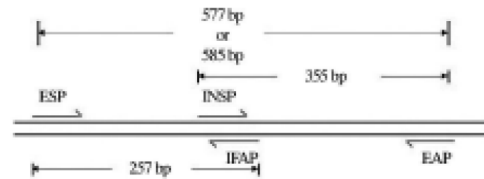
Primers	Sequences (5'-3')
ESP (up)	TTGTTTGGAGCTTGCTGATG
lúa thơm (IFAP) (down)	CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC
không thơm (INSP) (up)	CTGCTAAAAAGATTATGGCTTCA

EAP (down)	AGTGCTTTACAAAGTCCCGC
------------	----------------------

Sử dụng các cặp mồi đặc trưng cho phản ứng PCR để khuếch đại các đoạn gen quy định tính thơm và không thơm của các giống lúa phân tích và giống đối chứng. Kết quả chạy điện di phản ứng PCR sẽ được phân tích như sau: Giống lúa thơm được thể hiện band ở vị trí 577 bp và lúa không thơm đồng hợp tử được thể hiện band ở vị trí 585 bp, giống lúa thơm đồng hợp tử sẽ xuất hiện cả 2 band ở vị trí 577 và 257 bp, giống lúa không thơm dị hợp tử sẽ xuất hiện cùng lúc 3 band ở vị trí 577 hoặc 585, 355 và 257 bp, giống lúa không thơm đồng hợp tử xuất hiện 2 band ở vị trí 585 và 355 bp.

Mối quan hệ vị trí các cặp mồi phản ứng PCR cho sự phân tích lúa thơm và không thơm (trình tự mồi ở vị trí 6.010-6.594 của gen ESP và EAP có độ dài khoảng 580 bp, trình tự mồi ở vị trí 6.010-

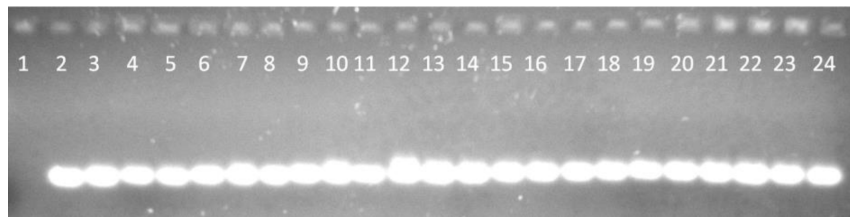
6.274 của gen ESP và IFAP có độ dài 257 bp và trình tự mồi ở vị trí 6.240-6.594 của gen INSP và EAP có độ dài 355 bp). Trình tự một đoạn gen BAD2 nằm trên nhiễm sắc thể số 8 của lúa *Oryza sativa* L. (vùng exon thứ 7 với các trình tự được in nghiêng. Tại exon thứ 7 có chứa 3 SNP và một đoạn 8 cặp bp bị loại bỏ đối với lúa thơm, các mồi tên biểu thị cho các vùng bắt cặp với DNA khuôn của primer).



Hình 1: Sơ đồ 4 primers (ESP; INSP; IFAP; EAP) trong phân tích gen thơm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả ly trích DNA



Hình 2: Kết quả kiểm tra DNA (1: nước, 2-24: DNA)

Sản phẩm DNA sau khi được kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy hầu hết các mẫu sau khi ly trích đều có vạch DNA sáng và rõ (hình 2), ít bị nhiễm tạp chất như chloroform hay protein thể hiện ở kết quả đo quang phổ, tỷ lệ OD260/OD280 từ 1.000 ng/μl đến 2000 ng/μl. DNA được pha loãng 50 ng/μl được lưu giữ ở -20°C và được sử dụng trong những bước nghiên cứu tiếp theo.

2. Xác định tình trạng mùi thơm bằng dấu chuẩn phân tử của bốn đoạn mồi ESP, IFAP, INSP, EAP thông qua kỹ thuật PCR

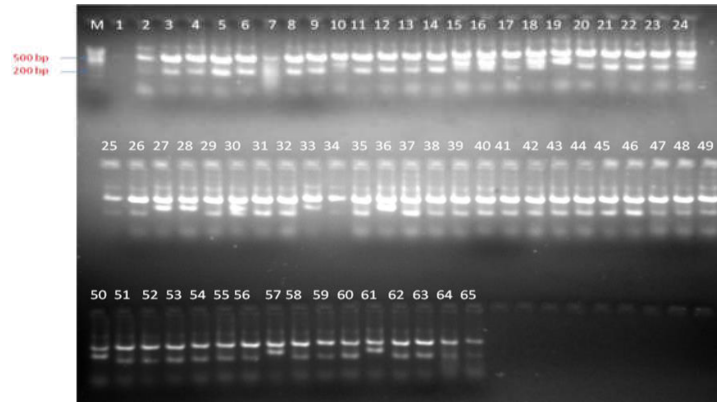
Qua phân tích kết quả điện di sản phẩm PCR trong hình 3 của 198 dòng/giống lúa từ 40 tổ hợp lai hồi giao với lúa thơm và giống đối chứng KDM105 (thơm), có 2 cá thể không cho sản phẩm PCR (band 7A và 59B) còn lại các giếng đều xuất hiện band chung với kích thước 577 bp hoặc 257 bp. Trong 198 cá thể từ 40 tổ hợp lai hồi giao, sản phẩm PCR cho thấy phần lớn các giếng đều có band 577 bp là band mang gen mùi thơm (148 cá thể); trong đó có 136 cá thể mang gen đồng hợp tử thơm (các giếng có band 257 bp và 577 bp) và 12 cá thể mang gen dị hợp tử thơm (các giếng có 1 band 577 bp). Có 50 cá thể không thơm, trong đó

có 22 cá thể mang gen đồng hợp tử không thơm (các giếng có band 585 bp và 355 bp) và 28 cá thể mang gen dị hợp tử không thơm (các giếng có 3 band: 257 bp, 355 bp và khoảng 580 bp).

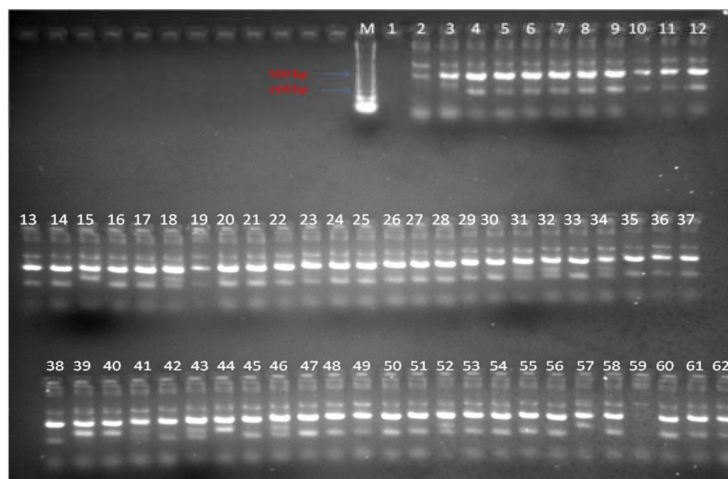
Phân tích kiểu gen của 5 cá thể ngẫu nhiên từ 40 tổ hợp lai hồi giao cho thấy 10 tổ hợp lai có 100% cá thể đều cho kiểu gen thơm là: SH1754, SH1414, SH1757, SH1758, SH1761, SH1762, SH1763, SH975, SH450

Không có tổ hợp lai hồi giao có 100% cá thể cho kiểu gen không thơm. Kết quả cũng cho thấy 30 tổ hợp lai hồi giao có các cá thể

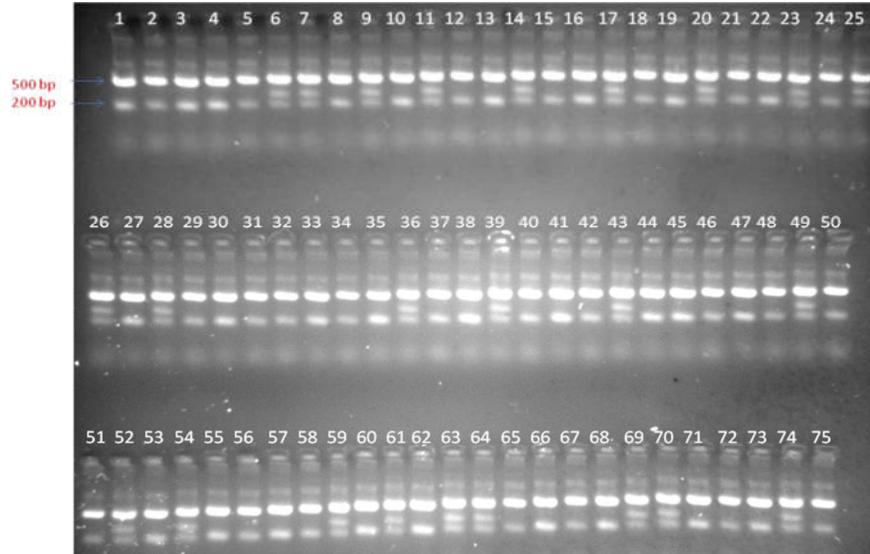
cho kiểu gen thơm và không thơm, trong các tổ hợp lai tỷ lệ cá thể cho kiểu gen thơm trong cùng một tổ hợp lai dao động 40 - 80%. Nếu trung bình tất cả các tổ hợp lai thì tỷ lệ cá thể cho kiểu gen thơm trong cùng một tổ hợp lai dao động 40 - 100%. Tỷ lệ phân ly 148 cá thể thơm: 50 cá thể không thơm ở BC₂F₃ cho thấy sự biểu hiện phân ly kiểu gen với tỷ lệ 3:1. Phân ly này giống với số liệu đã được chứng minh theo Nguyễn Thị Lang & Bùi Chí Bửu (2004b). Điều này cho thấy một sự tái tổ hợp rất tốt về tính trạng aroma trong quần thể này.



M: Maker, không có DNA, 2: KDM105, 3 - 7: Dòng số 1 (theo bảng 1), 8 - 12: Số 2, 13 - 17: Số 3, 18 - 22: Số 4, 23 - 27: Số 5, 28 - 32: Số 6, 33 - 37: Số 7, 38 - 42: Số 8, 43 - 47: Số 9, 48 - 52: 10, 53 - 57: Số 11, 58 - 62: Số 12, 63 - 65: Số 13.



M: Maker, không có DNA, 2: KDM105, 3 - 7: Dòng số 14 (theo bảng 1), 8 - 12: Số 15, 13 - 17: Số 16, 18 - 22: Số 17, 23 - 27: Số 18, 28 - 32: Số 19, 33 - 37: Số 20, 38 - 42: Số 21, 43 - 47: Số 22, 48 - 52: Số 23, 53 - 57: Số 24, 58 - 62: Số 25.



1 - 5: Dòng số 26 (theo bảng 1), 6 - 10: Số 27, 11 - 15: Số 28, 16 - 20: Số 29, 21 - 25: Số 30, 26 - 30: Số 31, 31 - 35: Số 32, 36 - 40: Số 33, 41 - 45: Số 34, 46 - 50: Số 35, 51 - 55: Số 36, 56 - 60: Số 37, 61 - 65: Số 38, 66 - 70: Số 39, 71 - 75: Số 40.

Hình 3: Sự đa hình tính trạng mùi thơm của các dòng lúa thơm thông qua việc sử dụng bốn môi ESP, EAP, INSP và IFAP trong cùng phản ứng PCR.

Bảng 3. Tính thơm của các dòng/giống lúa qua phân tích PCR.

TT	Tên dòng	Kết quả phân tích PCR		
		Đồng hợp tử gen lặn thơm (cá thể)	Dị hợp tử không thơm (cá thể)	Đồng hợp tử gen trội không có mùi thơm (cá thể)
1	SH1169	4		1
2	SH1170	4		1
3	SH1172	3	2	
4	SH1173	3	1	1
5	SH1174	3	1	1
6	SH1175	3	1	1
7	SH1178	3		2
8	SH1754	5		
9	SH1414	5		
10	SH1415	4		1
11	SH1418	4		1
12	SH1755	3		2
13	SH1756	3		
14	SH1757	5		
15	SH1758	5		
16	SH1759	4		1

TT	Tên dòng	Kết quả phân tích PCR		
		Đồng hợp tử gen lặn thơm (cá thể)	Dị hợp tử không thơm (cá thể)	Đồng hợp tử gen trội không có mùi thơm (cá thể)
17	SH1760	4		1
18	SH1761	5		
19	SH1762	5		
20	SH1763	5		
21	SH1764	3		2
22	SH1765	3	1	1
23	SH1766	3		2
24	SH1767	4		1
25	SH1768	4		1
26	SH975	5		
27	SH1769	2	3	
28	SH1770	3	2	
29	SH1771	3	1	1
30	SH1772	3	2	
31	SH1255	3	2	
32	SH450	5		
33	SH458	3	2	
34	SH376	4	1	
35	SH429	4	1	
36	SH425	3	2	
37	SH394	4	1	
38	SH522	2	3	
39	SH61	3	2	
40	SH616	4	1	

Ghi chú: Kết quả phân tích PCR: (+) đồng hợp tử gen lặn thơm, (-) đồng hợp tử gen trội không có mùi thơm, (+/-) kiểu gen dị hợp tử không thơm.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả PCR từ 198 cá thể của 40 tổ hợp lai hồi giao ở thế hệ BC₂F₃, BC₁F₃, tổ hợp lai đơn và lai đôi cho thấy: Có 10 tổ hợp cho kiểu gen đồng hợp tử thơm (5/5 cá thể), 30 tổ hợp lai có các cá thể cho kiểu gen thơm và không thơm. Tỷ lệ cá thể cho kiểu gen thơm trong cùng một tổ hợp lai dao động 40-100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin Q, Waters DLE (2005), *The gene for fragrance in rice*. Plant Biotechnology Journals 3: 363-370.
- Đỗ Thị Thu Hương, Nguyễn Văn Đông, Phạm Quang Duy, Lê Thị Thu Vê, Đỗ Năng Vịnh (2008), *Xác định nhanh chóng và chính xác gen kiểm soát tính trạng mùi thơm (fgr) ở lúa bằng tổ hợp môi đặc hiệu*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn 8: 3-6.
- Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004b), *Xác định gen fgr điều khiển tính trạng mùi thơm bằng phương pháp Fine Mapping với Microsatellites*. Hội nghị quốc gia về chọn tạo giống lúa, NXB Nông nghiệp TP.HCM: 192-199.
- Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004a), *Di truyền Phân Tử*. Thành phố Hồ Chí Minh: NXB Nông nghiệp.

5. Richharia RH. Minsro B, Kulkani VA (1965), *Studies in the world genetic stock of rice*. IV. Distribution of scent rice, *ORYZA* 2: 57-59.
- Ngày nhận bài: 27/4/2014
Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,
ngày 2/5/2014
Ngày duyệt đăng: 18/6/2014