



## HIỆU QUẢ CỦA CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRỢ GIÚP CHỌN LỌC TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA

Trần Thị Xuân Mai<sup>1</sup>, Nguyễn Thành Tâm, Nguyễn Thị Liên và Trương Trọng Ngôn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 25/03/2014

Ngày chấp nhận: 28/08/2014

### Title:

Efficiency of molecular marker-assisted selection in rice breeding

### Từ khóa:

Chỉ thị phân tử, đa hình từng nucleotid, độ trở hồ (ĐTH), rầy nâu, tính trạng mùi thơm

### Keywords:

Brown planthopper (BPH), fragrance trait, gelatinization temperature (GT), molecular marker, Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

### ABSTRACT

Using a perfect marker with four specific primers in a single PCR tube was very useful for rapid detection between homozygous fragrant, homozygous non-fragrant and heterozygous non-fragrant individuals in a population segregating for fragrance. Primers ESP and IFAP generated a 257-bp DNA fragment from a fragrant allele. Primers INSP and EAP generated a 355-bp DNA fragment from a non-fragrant allele. The relationship between this marker and fragrance trait holds in 100%. Two contiguous SNPs (GC/TT) of SSIIa gene closely linked with starch gelatinization temperature (GT). Based on these SNPs, four primers NF1, NR1, F22 and R21 were used in a PCR reaction. Analysis of PCR results showed that PCR product with 350 bp from TT genotype had low GT and PCR product with 550 bp from GC genotype was high or intermediate GT. The relationship between SSIIa marker and GT was 92%. SSR marker S00310 located on the short arm of chromosome 6 linked to Bph25 was used in this study to identify brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal.) resistance in rice. The result of PCR products indicated that marker S00310 linked to BPH resistance gene and having about 92% for the correlation between their genotype and phenotype.

### TÓM TẮT

Sử dụng chỉ thị hoàn hảo với bốn môi chuyên biệt trong một phản ứng PCR là rất hữu hiệu để phát hiện nhanh những cá thể thơm đồng hợp, không thơm đồng hợp và không thơm dị hợp trong một quần thể còn đang phân ly về tính trạng mùi thơm ở lúa. Môi ESP và IFAP khuếch đại một đoạn DNA 257-bp từ một alen thơm. Môi INSP và EAP khuếch đại một đoạn DNA 355-bp từ một alen không thơm. Tương quan giữa chỉ thị này và tính trạng mùi thơm là 100%. Hai SNP kề cận nhau (GC/TT) của gen SSIIa liên kết gần với độ trở hồ (ĐTH), dựa trên các SNP này, bốn môi NF1, NR1, F22 và R21 đã được sử dụng trong một phản ứng PCR. Phân tích sản phẩm PCR cho thấy với 350 bp từ kiểu gen TT có ĐTH thấp, với 550 bp từ kiểu gen GC có ĐTH cao hoặc trung bình. Tương quan giữa chỉ thị này và ĐTH là 92%. Chỉ thị S00310 nằm trên tay ngắn nhiễm sắc thể thứ 6 của lúa có liên kết với gen Bph25 đã được sử dụng trong nghiên cứu này để nhận diện tính kháng rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal.) ở lúa. Kết quả của các sản phẩm PCR đã cho thấy chỉ thị S00310 liên kết với gen kháng rầy và có tỷ lệ khoảng 92% về sự tương quan giữa chỉ thị này và kiểu hình kháng rầy.

## 1 MỞ ĐẦU

Lúa (*Oryza sativa* L.) được xem là loại cây lương thực quan trọng đang nuôi sống gần một nửa dân số trên thế giới. Việt Nam, Thái Lan, Ấn Độ và Pakistan là những nước có vị trí hàng đầu trong những nước xuất khẩu gạo trên thế giới. Tuy nhiên, giá trị xuất khẩu của Việt Nam cho đến nay hầu như đứng sau cùng trong nhóm 4 nước này do chất lượng hạt gạo của Việt Nam còn kém. Vì vậy, chất lượng hạt gạo đang được chú trọng trong những năm gần đây.

Cải thiện chất lượng hạt gạo bằng phương pháp lai tạo truyền thống phải mất rất nhiều thời gian và tiêu tốn nhiều chi phí. Trong khi đó chọn giống nhờ chỉ thị phân tử liên kết với tính trạng mục tiêu gọi tắt là MAS (marker-assisted selection) là một quy trình sử dụng chỉ thị phân tử để chọn lọc gián tiếp của một hoặc nhiều yếu tố quyết định di truyền một tính trạng quan trọng, đây là phương pháp được thế giới ủng hộ mạnh mẽ bởi vì kỹ thuật này đã rút ngắn được thời gian lai tạo giống và có thể cho kết quả sau ba thế hệ chọn lọc ( Tanksley and Nelson, 1996). MAS cho phép lựa chọn kiểu gen không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường. MAS cũng làm tăng hiệu quả của các lựa chọn vì nó có thể được sử dụng trong giai đoạn cây giống, nó cũng phân biệt các đồng hợp tử với dị hợp tử, lựa chọn cho một số đặc tính cùng lúc. Hiện nay, ở cây lúa có rất nhiều chỉ thị phân tử đã được nhận diện, các chỉ thị này có thể liên quan đến các gen đang được chú ý.

Chỉ thị phân tử của các trình tự lặp đơn giản (Simple Sequence Repeat-SSR), cũng được gọi là các vi vệ tinh (microsatellite) là những đoạn ngắn của DNA có chứa từ 2 đến 6 nucleotid có trình tự lặp lại liên tiếp và số các trình tự lặp lại dao động từ 2 đến 40. Chỉ thị SSR rất phổ biến ở bộ gen thực vật, chúng được phân bố rải rác khắp nơi trong bộ gen và có tính đặc trưng cho từng loài. Chỉ thị này cũng đã được chứng minh là đa hình trong quần thể lúa (Olufowote *et al.*, 1997). Việc trình tự bộ gen cây lúa được giải mã càng cho phép chỉ thị SSR có nhiều lựa chọn hơn. Trên lúa có khoảng 5.700 – 10.000 SSR có trình tự khác nhau, với số lượng lớn SSR như vậy sẽ rất thuận lợi cho việc ứng dụng lập bản đồ gen (Chen *et al.*, 1997; McCouch *et al.*, 2002).

Chỉ thị phân tử của các trình tự đa hình từng nucleotid (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) là sự khác biệt trong trình tự DNA chỉ ở một nucleotid trong bộ gen. SNP có tính đa hình cao

nhên đã được ứng dụng rộng rãi trong chọn lọc và chẩn đoán các tính trạng di truyền.

Côn trùng gây hại là một hạn chế sinh học chủ yếu đến sản xuất lúa. Trong đó, Rầy nâu (*Nilaparavata lugens* Stal) là côn trùng gây hại lớn nhất đến sản xuất lúa gạo ở nước ta và các nước trong khu vực. Việc sử dụng thuốc trừ sâu để phòng trị dịch bệnh do rầy nâu không chỉ tốn kém mà còn gây ảnh hưởng xấu đến môi trường. Ứng dụng các chỉ thị SSR liên kết với các gen kháng rầy để chọn lọc các dòng lúa kháng rầy đang là một xu hướng nghiên cứu rất được quan tâm trong công tác chọn giống. Hiện nay, có hơn 25 gen kháng rầy nâu đã được lập bản đồ trên các nhiễm sắc thể, nhận diện các chỉ thị SSR nào có liên kết chặt với gen kháng rầy có ý nghĩa rất quan trọng đối với các nhà chọn giống.

Độ trở hồ (ĐTH) là một đặc tính quan trọng giúp xác định chất lượng nẫu của hạt gạo. ĐTH do gen starch synthase IIa (*SSIIa*) điều khiển, gen này nằm trên nhiễm sắc thể số 6 của lúa, đặc biệt hai SNP (GC/TT) nằm kề nhau được tìm thấy trong *SSIIa* có liên kết gần với ĐTH và cấu trúc amylopectin (Bao *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2003; Umemoto and Aoki, 2005; Waters *et al.*, 2006).

Mùi thơm của gạo cũng là một trong những đặc điểm thu hút người tiêu dùng. Gạo thơm có giá cao ở các thị trường Nam Á, Thái Lan và Trung Đông. Một vài phương pháp đánh giá cảm quan đã được phát triển nhằm giúp các nhà tạo giống lựa chọn lúa thơm nhưng họ gặp phải nhiều hạn chế khi thực hiện với số lượng mẫu lớn, tiêu tốn nhiều nhân lực, khó khăn và độ tin cậy không cao. Phương pháp sắc ký khí để xác định hợp chất tạo mùi thơm ở lúa 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) một cách khách quan đã được phát triển nhưng cần một lượng lớn mẫu và tiêu tốn nhiều thời gian. Các chỉ thị phân tử mới hiện nay như là SNP và SSR có liên kết di truyền với tính trạng mùi thơm đã được phát triển nhằm chọn lọc lúa thơm. Mặc dù, các chỉ thị phân tử này có ưu điểm rõ ràng, đơn giản, nhanh chóng và chỉ cần một lượng nhỏ mô mẫu, nhưng chúng chỉ liên kết với gen mùi thơm (*fgr*), do đó chúng không thể dự đoán tính trạng mùi thơm với độ chính xác 100%. Một chỉ thị phân tử hoàn hảo là chỉ thị phân tử nằm trong gen mã hóa cho tính trạng. Các kỹ thuật viên ở trường Đại học Southern Cross đã phát hiện ra đột biến mất một đoạn 8 cặp nucleotid và 3 SNP trong một gen được cho là mã hóa enzyme betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2) là tác nhân tạo ra mùi thơm ở gạo Jasmine và Basmati. Các giống lúa không thơm sở hữu một phiên bản

chức năng đầy đủ của gen mã hóa BADH2, trong khi đó, các giống thơm sở hữu một phiên bản chứa đột biến mất đoạn và SNP của gen mã hóa BADH2. Sự đa hình này đem đến cơ hội để xây dựng một chỉ thị phân tử hoàn hảo cho việc nghiên cứu gen thơm trên lúa. Bradbury *et al.*, (2005a) đã sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại chuyên biệt alen này với 4 cặp môi: ESP, EAP, IFAP và INSP giúp phân biệt kiểu gen của các giống lúa thơm đồng hợp tử và dị hợp tử.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả của việc sử dụng các chỉ thị phân tử thông qua việc đánh giá mối tương quan giữa chỉ thị phân tử với tính trạng mà nó có thể liên kết nhằm giúp cho công tác chọn tạo các đặc tính quan trọng của lúa được thuận tiện và chính xác hơn.

**2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1 Vật liệu**

Tổng cộng có 25 giống/dòng lúa được sử dụng trong nghiên cứu này, trong đó giống lúa OM6073 được cung cấp từ Viện lúa Ô Môn, các dòng Jasmine85-45, Jasmine85-46, Jasmine85-68 được thu thập từ ruộng lúa lần tạp của nông dân tỉnh Đồng Tháp và các giống lúa còn lại được cung cấp từ Viện Nghiên cứu và Phát triển Đồng bằng Sông Cửu Long, Trường Đại học Cần Thơ.

**2.2 Phương pháp**

**2.2.1 Xác định mùi thơm bằng dung dịch KOH**

Áp dụng phương pháp phân tích mùi thơm của hạt gạo bằng dung dịch KOH 1,7% (Sood and Siddiq, 1978). Mẫu lúa lúc mới thu hoạch được xay

chà thành gạo trắng. Cho 50 hạt gạo trắng vào ống nghiệm, thêm 5 ml KOH 1,7% vào và đậy kín ống nghiệm, để ở nhiệt độ phòng 15 phút. Sau đó lấy ra ngửi xác định mùi thơm. Sử dụng giống đối chứng thơm (Jasmine85) và giống đối chứng không thơm (VND95-20). Mùi thơm của hạt gạo được đánh giá theo ba cấp độ: 0- gạo không thơm, 1- gạo thơm nhẹ và 2- gạo thơm.

**2.2.2 Đo độ trở hồ**

Độ trở hồ (ĐTH) được đánh giá qua độ lan rộng của hạt gạo khi xử lý bằng dung dịch kiềm. Mỗi giống lúa lấy 6 hạt gạo đã chà trắng không bị nứt bể, cho vào đĩa petri. Thêm 10 ml dung dịch KOH 1,7% vào. Đậy nắp đĩa lại, để yên trong 23 giờ ở 30°C. ĐTH được đánh giá theo tiêu chuẩn IRRI (1996).

**2.2.3 Đánh giá mức độ nhiễm rầy nâu theo phương pháp khai mạ cải tiến của IRRI (1980)**

Thí nghiệm được tiến hành trong nhà lưới, thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố 3 lần lặp lại với giống chuẩn kháng là Ptb33 và chuẩn nhiễm là TN1. Mỗi giống được gieo thành 3 ô, mỗi ô 30 hộ, sau khi lúa mọc tía khoảng 25 cây/ô, mạ 7 ngày tuổi tiến hành thả rầy vào mật độ 5-7 con/cây, tiến hành đánh giá ngay khi giống chuẩn nhiễm TN1 bị chết 90%. Đánh giá phản ứng theo thang 9 cấp của IRRI (1996).

**2.2.4 Ly trích DNA**

Hạt lúa được cho nảy mầm, sau 7-10 ngày lá lúa non được ly trích DNA theo quy trình CTAB (Rogers and Bendich, 1994).

**Bảng 1: Trình tự các cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR:**

Tên môi	Trình tự môi	Trên nhiễm sắc thể	Tác giả
SSIIa	NF1 For. 5' CGAGGCGCAGCACAAACAG 3'	6	(Jin <i>et al.</i> , 2010)
	NR1 Rev. 5' GGCCGTGCAGATCTTAACCAT 3'		
	F22 For. 5' CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC 3'		
	R21 Rev. 5' ACATGCCGCGCACCTGGAAA 3'		
BADH2	ESP For. 5' TTGTTTGGAGCTTGCTGATG 3'	8	(Bradbury <i>et al.</i> , 2005b)
	INSP For. 5' CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA 3'		
	EAP Rev. 5' AGTGCTTTACAAAGTCCCGC 3'		
	IFAP Rev. 5' CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC 3'		
S00310	For. 5' CAACAAGATGGACGGCAAGG 3'	6	(Myint <i>et al.</i> , 2012)
	Rev. 5' TTGGAAGAAAAGGCAGGCAC 3'		

**2.2.5 Phản ứng PCR**

Phản ứng PCR được thực hiện với các thành phần như sau: 75 mM Tris HCl (pH 8,8), 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1% Triton X-100; 0,5% DMSO, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mỗi loại, 200 nM mỗi loại môi (đối với phản ứng PCR sử dụng 2 cặp môi

thì nồng độ mỗi loại môi là 400 nM), 1,25 unit Taq polymerase và 50-100 ng DNA. Thêm nước cất vô trùng cho đủ thể tích 25 µl. Phản ứng khuếch đại được tiến hành ở 95°C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp môi vào khuôn ở 59°C (đối với môi S00310 là 55°C) trong 30 giây, kéo dài ở

72°C trong 50 giây. Cuối cùng phản ứng được duy trì ở 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được phân tích bằng điện di trên gel 1,5% agarose (sản phẩm PCR của chỉ thị S00310 được phân tích trên gel 3% agarose) trong dung dịch đệm TBE 1X và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000. Thang chuẩn 100bp của công ty Fermentas đã được sử dụng để ước lượng kích thước đoạn sản phẩm PCR.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Đánh giá mùi thơm của lúa bằng phương pháp cảm quan và bằng chỉ thị phân tử:

*Đánh giá mùi thơm bằng phương pháp cảm quan:*

Kết quả đánh giá từ Bảng 2 cho thấy có 1 giống có cấp độ 0 (VND95-20).

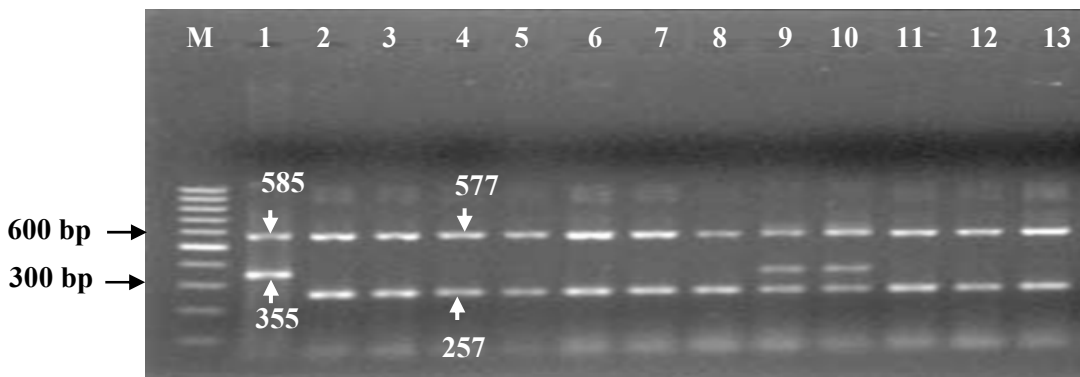
2 dòng có cấp độ 1 (Jasmine85-45, Jasmine85-

46) và 10 giống lúa còn lại được đánh giá có mùi thơm cấp độ 2.

**Bảng 2: Đánh giá mùi thơm hạt gạo bằng phương pháp cảm quan**

STT	Giống/Dòng lúa	Cấp độ	Kiểu hình
1	VND95-20	0	Không thơm
2	Jasmine85-45	1	Thơm nhẹ
3	Jasmine85-46	1	Thơm nhẹ
4	MTL480	2	Thơm
5	MTL495	2	Thơm
6	MTL513	2	Thơm
7	MTL514	2	Thơm
8	MTL540	2	Thơm
9	MTL549	2	Thơm
10	MTL555	2	Thơm
11	MTL559	2	Thơm
12	MTL579	2	Thơm
13	Jasmine85	2	Thơm

*Đánh giá mùi thơm bằng chỉ thị phân tử:*



**Hình 1: Sản phẩm PCR với các môi ESP và IFAP, INSP và EAP**

M: thang chuẩn 100 bp, 1: Đối chứng không thơm đồng hợp VND95-20, 2: MTL480; 3: MTL495; 4: MTL513; 5: MTL514; 6: MTL540; 7: MTL549; 8: MTL555; 9: Jasmine85-45; 10: Jasmine85-46; 11: MTL559; 12: MTL579; 13: Đối chứng thơm đồng hợp Jasmine85

Ở lúa thơm tại vùng gen betain aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2) trên nhiễm sắc thể 8 có 8 cặp nucleotid nằm trên exon thứ 7 bị loại bỏ, trong khi lúa không thơm thì không bị mất đi vùng này. Dựa trên đặc điểm này Bradbury *et al.* (2005a) đã thiết kế bốn đoạn môi ESP, EAP, INSP và IFAP, trong đó cặp môi ESP-EAP sẽ khuếch đại một đoạn DNA khoảng 580bp cho cả hai giống lúa thơm và không thơm. Đặc biệt nhất là cặp môi ESP-IFAP sẽ giúp nhận diện được gen thơm nếu sản phẩm PCR có kích thước 257bp và cặp môi INSP-EAP sẽ giúp nhận diện lúa không thơm khi sản phẩm PCR có kích thước 355bp. Ngoài ra, nếu trong sản phẩm PCR có cùng lúc hai sản phẩm 257bp và 355bp thì giống lúa đó sẽ mang kiểu gen

thơm dị hợp. Trong nghiên cứu này, tổng cộng có 13 giống/dòng lúa được kiểm tra. Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose (Hình 1) có 1 giống lúa không thơm đồng hợp (VND95-20), 2 dòng lúa thơm dị hợp (Jasmine85-45 và Jasmine85-46) và 10 giống còn lại đều mang gen thơm đồng hợp.

*Sự tương quan của phương pháp đánh giá cảm quan và chỉ thị phân tử trong xác định mùi thơm của lúa*

So sánh phương pháp đánh giá mùi thơm bằng cảm quan và bằng chỉ thị phân tử đã cho thấy có rất nhiều điểm rất tương đồng với nhau như sau: giống lúa VND95-20 đều cho kết quả xác nhận là lúa không thơm bằng hai phương pháp trên, tương tự

như vậy 9 giống lúa thuộc bộ giống MTL được đánh giá là thơm cấp độ 2 và cùng có gen thơm đồng hợp giống như giống đối chứng Jasmine85. Ngoài ra, cả hai dòng Jasmine85-45 và Jasmine85-46 được đánh giá cảm quan là có mùi thơm nhẹ thì có kết quả là mang gen dị hợp khi được đánh giá bằng chỉ thị phân tử, kết quả này cũng đã nói lên được rằng cả hai dòng này còn đang phân ly chứ chưa phải là dòng thuần. Từ những kết quả so sánh này đã cho thấy sự tương quan giữa chỉ thị của gen thơm BADH2 và mùi thơm của hạt gạo là 100%. Do đó, nếu sử dụng chỉ thị phân tử để chọn lọc giống lúa có mùi thơm là rất hiệu quả vì vừa đơn giản (do thực hiện được tại phòng thí nghiệm), rút ngắn thời gian tuyển chọn (do có thể phân tích khi cây còn ở giai đoạn mạ) mà còn nhận diện được những cá thể nào thuần hay còn đang phân ly trong khi đánh giá cảm quan thì không thể nhận diện được đặc tính này. Điều này cũng rất hữu dụng giúp duy trì những hạt giống thuần.

**3.2 Đánh giá ĐTH bằng dung dịch KOH 1,7% và bằng chỉ thị phân tử**

*Đánh giá ĐTH bằng dung dịch KOH 1,7%*

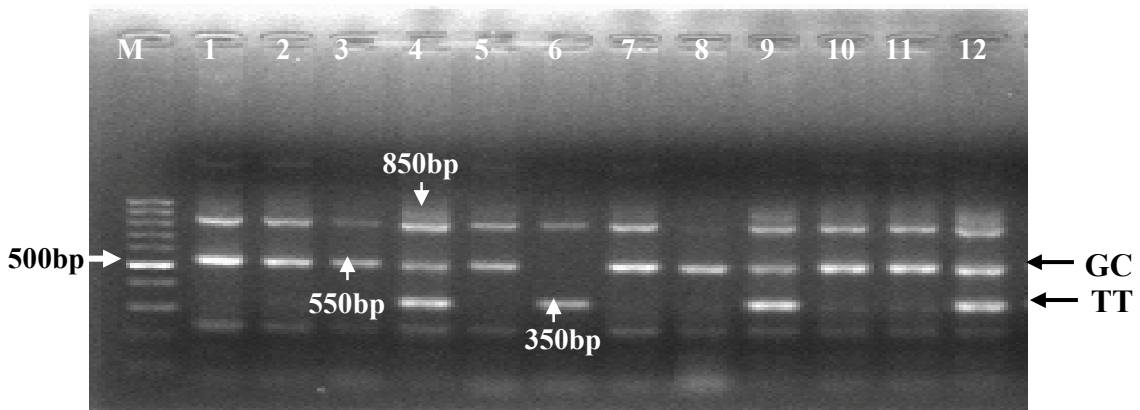
ĐTH được xác định thông qua phản ứng với dung dịch KOH 1,7%. Kết quả đánh giá (Bảng 3) cho thấy có sáu giống được xếp loại có ĐTH cao (1-3,5) bao gồm giống MTL 495, MTL513, MTL514, MTL559, MTL250 và VND95-20. Ba giống/dòng có ĐTH trung bình (4-5,5): MTL549, MTL579 và Jasmine85-45. Ba giống có ĐTH thấp (6-7): MTL480, MTL540 và MTL555.

**Bảng 3: Đánh giá cấp ĐTH bằng dung dịch KOH 1,7% và bằng chỉ thị phân tử SSIIa (dựa trên sản phẩm PCR) của các giống lúa**

STT	Giống/Dòng lúa	Cấp độ trở hồ	Sản phẩm PCR
1	MTL495	2,0	550bp
2	MTL513	1,5	550bp
3	MTL514	1,5	550bp
4	MTL540	7,0	350-550bp
5	MTL549	5,0	550bp
6	MTL555	7,0	350bp
7	MTL559	1,0	550bp
8	MTL579	5,0	550bp
9	MTL480	7,0	350-550bp
10	VND95-20	3,5	550bp
11	MTL250	3,5	550bp
12	Jasmine85-45	5,0	350-550bp

*Đánh giá độ trở hồ bằng chỉ thị phân tử SSIIa:*

Để đánh giá khả năng liên kết của chỉ thị SSIIa với gen qui định tính trạng về ĐTH, nghiên cứu này đã sử dụng bốn môi: NF1, NR1, F22 và R21. Kết hợp giữa kết quả phân tích sản phẩm PCR (Hình 2) với kết quả đánh giá độ trở hồ bằng dung dịch kiềm (Bảng 3) đã cho thấy phương pháp đánh giá bằng chỉ thị SSIIa có thể nhận diện các giống lúa có ĐTH từ cao đến trung bình (1,0-5,0) khi sản phẩm PCR có kính thước 550bp (bao gồm các giống lúa MTL495, MTL513, MTL514, MTL549, MTL559, MTL 579, MTL250 và VND 95-20) trong khi giống MTL555 có ĐTH thấp (7,0) thì có sản phẩm PCR tương đương với 350bp.



**Hình 2: Điện di sản phẩm PCR với chỉ thị SSIIa**

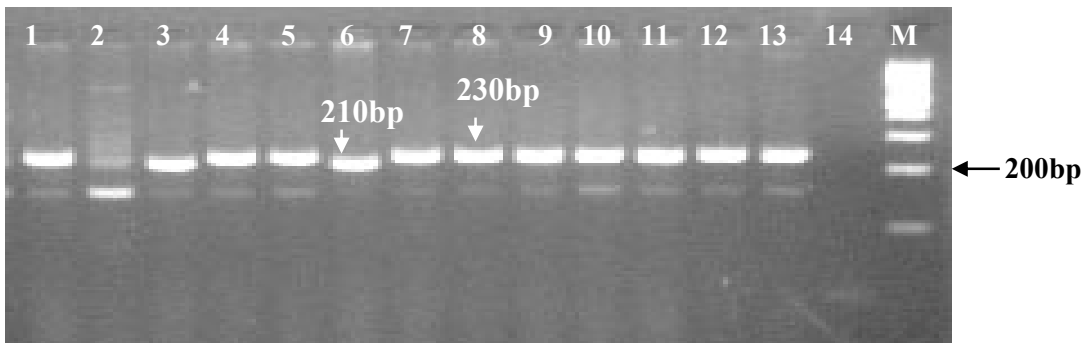
M: thang chuẩn 100 bp, 1: MTL495; 2: MTL513; 3: MTL514; 4: MTL540; 5: MTL549; 6: MTL555; 7: MTL559; 8: MTL 579; 9: MTL480 ; 10: VND 95-20; 11: MTL250; 12: Jasmine85-45

Chức năng của các SNP trong *SSIIa* liên kết chặt với ĐTH và cấu trúc amylopectin. Đặc biệt hai SNP nằm kề nhau (GC/TT) trong *SSIIa* có sự liên kết rất chặt với ĐTH. Nghiên cứu nhiệt độ trở hồ của các giống lúa bằng phương pháp đánh giá kiểu hình và sự liên kết của kiểu hình này với các chỉ thị phân tử *SSIIa*, Jin *et al.* (2010) đã cho thấy kiểu gen *SSIIa*-TT đồng hợp có ĐTH thấp tương ứng với sản phẩm PCR có kích thước 350 bp. Trong khi đó, kiểu gen *SSIIa*-GC đồng hợp thể hiện ĐTH cao hoặc trung bình tương ứng với sản phẩm PCR có kích thước 550 bp. Trong nghiên cứu cũng có những kết quả tương tự như vậy, ngoài ra những giống bị lẫn tạp hay những dòng còn đang phân ly có sản phẩm PCR xuất hiện cùng lúc hai band 350 và 550bp (trong nghiên cứu này hai giống MTL480, MTL540 có thể đã bị lẫn tạp và dòng Jasmine85-45 còn đang phân ly).

Theo báo cáo của Bao *et al.* (2006) đã cho thấy có sự tương quan 90-94% giữa ĐTH và chỉ thị *SSIIa*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hiệu quả đạt tới 100% đồng thời còn có thể nhận diện những cá thể dị hợp. Do đó, chỉ thị *SSIIa* có thể được sử dụng trong các phân tích chẩn đoán để dự đoán sớm ĐTH của các giống lúa.

**3.3 Đánh giá tính kháng rầy bằng phương pháp thanh lọc trong nhà lưới và bằng chỉ thị phân tử**

Gen *Bph25* nằm trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 6 và đồng phân ly với chỉ thị S00310, gen này cũng nằm rất gần so với 2 gen kháng rầy khác là *Bph3* và *bph4* (Myint *et al.* 2012). Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng chỉ thị trên để kiểm tra tính liên kết với gen *Bph25* trên một số giống lúa.



**Hình 3: Điện di sản phẩm PCR của chỉ thị S00310**

1: TN1; 2: HD1; 3: MTL856; 4: MTL110; 5:OM6073; 6: MTL861; 7: MTL547 ; 8: MTL567; 9: MTL662; 10: Jasmine85-45; 11: Jasmine85-46; 12: Jasmine85-68; 13: VD20 TG; 14: (đối chứng âm); M: thang chuẩn 100 bp

**Bảng 4: Đánh giá tính kháng rầy trong nhà lưới và bằng chỉ thị S00310**

STT Giống/dòng lúa	Cấp kháng rầy	Tính kháng rầy với chỉ thị S00310
1 HD1 (ĐC kháng)	2,0	Kháng
2 MTL110	5,0	Nhiễm
3 OM6073	5,0	Nhiễm
4 MTL856	6,0	Kháng
5 MTL861	3,0	Kháng
6 MTL547	5,0	Nhiễm
7 MTL567	5,0	Nhiễm
8 MTL662	6,0	Nhiễm
9 Jasmine85-45	6,0	Nhiễm
10 Jasmine85-46	6,0	Nhiễm
11 Jasmine85-68	7,0	Nhiễm
12 VD20TG	8,0	Nhiễm
13 TN1 (ĐC nhiễm)	9,0	Nhiễm

Phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 3% (Hình 3) cho thấy DNA được khuếch đại hai band chính khoảng 210 bp ở giống lúa HD1 (lúa kháng rầy) và 230 bp ở giống lúa TN1 (lúa nhiễm rầy).

Để đánh giá hiệu quả của chỉ thị S00310, kết quả phân tích sản phẩm PCR được so sánh với kết quả đánh giá tính kháng rầy trong nhà lưới (Bảng 4) đã cho thấy những giống lúa có cấp kháng rầy từ 2,0-3,0 (có kiểu hình kháng rầy) thì tương ứng với sản phẩm PCR là 210bp (có kiểu gen kháng), những giống lúa có cấp kháng rầy từ 5,0-9,0 (có kiểu hình nhiễm vừa đến nhiễm nặng) thì tương ứng với sản phẩm PCR là 230bp (có kiểu gen nhiễm), ngoại trừ giống MTL856 có cấp kháng rầy 6,0 nhưng lại có sản phẩm PCR 210bp (tương ứng kiểu gen kháng). Tóm lại, trong 13 giống/dòng được sử dụng trong nghiên cứu này đã cho thấy đánh giá bằng chỉ thị S00310 cho kết quả 12/13

giống/dòng tương đồng với đánh giá kiểu hình kháng rầy trong nhà lưới, hiệu quả đạt 92%.

#### 4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã cho thấy rằng mối tương quan giữa việc sử dụng các chỉ thị phân tử với các phương pháp đánh giá truyền thống về mùi thơm, ĐTH và tính kháng rầy ở lúa là rất cao. Vì vậy, các chỉ thị phân tử chức năng này có thể được sử dụng trong các phân tích chẩn đoán để dự đoán tình trạng mùi thơm là đồng hợp hay dị hợp, ĐTH cao hay thấp hoặc lúa có khả năng kháng rầy hay không. Các chỉ thị phân tử này có thể được sử dụng rộng rãi trong các chương trình chọn tạo giống lúa nếu như bố mẹ có kiểu alen khác nhau hoặc trong một quần thể còn đang phân ly.

#### LỜI CẢM ƠN

Tập thể các tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đồng Tháp đã cấp kinh phí cho công trình nghiên cứu này. Các thí nghiệm được tiến hành có sự dụng trang thiết bị của phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bao, J.S., H. Corke and M. Sun. 2006. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 113, 1171–1183.
- Bradbury L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q.S. Jin and D.L.E. Waters. 2005a. The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnol J* 3:363–370.
- Bradbury L.M.T., R.J. Henry, Q.S. Jin, R.F. Reinke and D.L.E. Waters. 2005b. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol Breed* 16:279–283.
- Chen X, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho and S.R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 95:553–567.
- Gao, Z.Y., D.L. Zeng, X. Cui, Y.H. Zhou, M. Yan, D. Huang, J.Y. Li and Q. Qian. 2003. Map-based cloning of the ALK gene, which controls the GT of rice. *Science in China C-Life Science* 46, 661–668.
- Jin, L., Y. Lu, Y.F. Shao, G. Zhang, P. Xiao, S.Q. Shen, H. Corke and J.S. Bao. 2010. Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 51:159-164.
- McCouch SR, L. Teytelman, Y.B. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B.Y. Fu, R. Maghirang, Z.K. Li, Y.Z. Xing, Q.F. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2,240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res* 9:199– 207.
- Myint, K. K. M., D. Fujita, M. Matsumura, T. Sonoda, A. Yoshimura and H. Yasui. 2012. Mapping and pyramiding of two major genes for resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal.) in the rice cultivar ADR52. *Theor Appl Genet* 124: 495 – 504.
- Olufowote JO, Y. Xu, X. Chen, W.D. Park, H.M. Beachell, R.H. Dilday, M. Goto and S.R. McCouch. 1997. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome* 38:1170–1176.
- Rogers SO and A.J. Bendich. 1994. Extraction of DNA from plant, fungal and algal tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, D 1: 1-8.
- Sood, B.G., and E.A. Siddiq. 1978. A rapid technique for scent determination in rice, *Indian J. Genet. Plant Breed.* 38: 268-271
- Tanksley, S.D., and J.C. Nelson. 1996. Advanced backcross QTL analysis: A method for simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 92:191–203.
- Umemoto, T. and N. Aoki. 2005. Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinization and starch association of the enzyme. *Functional Plant Biology* 32, 763–768.
- Waters, D.L.E., R.J. Henry, R.F. Reinke and M.A. Fitzgerald. 2006. Gelatinization temperature of rice explained by polymorphisms in starch synthase. *Plant Biotechnological Journal* 4, 115–122.