

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.120

HIỆU QUẢ DẤU PHÂN TỬ GENE CHỨC NĂNG TRONG ĐÁNH GIÁ TÍNH TRẠNG CHẤT LƯỢNG GIỐNG LÚA

Huỳnh Kỳ^{1*}, Nguyễn Văn Thép², Văn Quốc Giang¹, Nguyễn Văn Mạnh³, Trần In Đô², Huỳnh Như Điển¹, Lê Thị Hồng Thanh¹, Chung Trương Quốc Khang², Nguyễn Châu Thanh Tùng¹, Nguyễn Lộc Hiền¹ và Phạm Thị Bé Tư¹

¹Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành Công nghệ giống cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

³Học viên cao học ngành Di truyền và Chọn giống cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Kỳ (email: hky@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 10/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 15/04/2021

Ngày duyệt đăng: 20/08/2021

Title:

The effectiveness of functional markers for evaluation of rice quality traits

Từ khóa:

Amylose, BADH2, chỉ thị phân tử gene chức năng, DRR-GL, gene Wx

Keywords:

Amylose, BADH2, DRR-GL, Functional marker, Gene Wx

ABSTRACT

Nowadays, the economy is better, consumers' demand for rice has also changed, they prefer rice with high quality such as soft and aroma cooked rice. To meet the demand of consumers about rice, the application of functional markers for selection high quality of rice was carried out to assess quality traits in imported rice varieties from rice GeneBank, Can Tho University for selection high quality rice varieties that cope with the above objectives. DRR-GL marker was used to identify the gene controlling GS3 grain length; while the Wx-in1 marker was used the Wx gene that controls the amylose trait, and the BADH2 gene control the aroma in rice. The results showed that 1 line (IR 86385-172-1-1-B) was with good quality such as elongated rice grain, 7.12mm grain length, amylose content is low 17.51%, very soft gelconsistency (level 1) 86.67mm, medium gelatinization temperature (level 5). This report was the preliminary step to select imported rice lines that may be used as starting materials for the quality breeding program in the future.

TÓM TẮT

Ngày nay khi nền kinh tế đang ngày càng phát triển, nhu cầu của người tiêu dùng về lúa gạo cũng thay đổi theo, người tiêu dùng hiện nay có xu hướng thích sản phẩm gạo có hình thức đẹp và chất lượng cao như cơm nấu ra phải mềm dẻo và có mùi thơm. Để đáp ứng nhu cầu thị hiếu của người tiêu dùng về chất lượng gạo, nghiên cứu được thực hiện nhằm chọn ra những giống lúa có chất lượng cao đáp ứng mục tiêu trên. Dấu chỉ thị phân tử DRR-GL được sử dụng để xác định gene kiểm soát chiều dài hạt GS3; chỉ thị phân tử Wx-in1 xác định gene Wx kiểm soát tính trạng amylose và gene chỉ thị phân tử BADH2 xác định gene kiểm soát tính trạng mùi thơm. Qua kết quả nghiên cứu, các tính trạng chất lượng của 50 dòng lúa IRRI đã tuyển chọn được 1 dòng (IR 86385-172-1-1-B) có chất lượng tốt như hạt gạo thon dài, chiều dài hạt 7,12mm, hàm lượng amylose thấp 17,51%, độ bền thể gel rất mềm (cấp 1) 86,67mm, nhiệt trở hồ trung bình (cấp 5). Kết quả này đã chọn ra được dòng lúa nhập nội có thể làm vật liệu khởi đầu cho chương trình chọn giống chất lượng trong tương lai.

1. GIỚI THIỆU

Cây lúa là một trong những cây trồng quan trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Trồng lúa không chỉ là nguồn cung cấp lương thực chính, mà còn là sinh kế của người dân. Khu vực ĐBSCL chiếm hơn 50% sản lượng và hơn 90% lượng gạo xuất khẩu của cả nước. Tuy nhiên, gạo của Việt Nam còn gặp nhiều hạn chế về chất lượng, mặc dù nước ta có rất nhiều giống lúa khác nhau nhưng trong số đó chỉ mới có một vài giống đã khẳng định được vị trí trên thị trường thế giới còn lại hầu hết các giống chưa có thương hiệu và chưa được xuất hiện trên thị trường quốc tế. Trước thực trạng trên, để nâng cao thương hiệu gạo Việt Nam, Chính phủ đã ban hành Quyết định 706/QĐ-TTg ngày 21 tháng 5 năm 2015 nhằm xây dựng lại thương hiệu gạo Việt. Chính vì lý do trên công tác nghiên cứu và chọn giống ngày càng được chú trọng với mục tiêu tìm ra một số giống lúa có chất lượng thương phẩm cao đưa vào sản xuất để đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng trong và ngoài nước.

Chất lượng hạt gạo theo nghĩa hẹp thường đề cập đến chất lượng ăn uống hoặc cảm giác ngon miệng, trong khi chất lượng hạt gạo ở nghĩa rộng bao gồm nhiều khía cạnh. Nói chung, chất lượng hạt gạo bao gồm chất lượng xay chà, hình dạng hạt gạo, chất lượng gạo nấu và cảm quan, cũng như chất lượng dinh dưỡng và vệ sinh (Zhou et al., 2019). Theo nghiên cứu của Calingacion et al. (2014), các quốc gia các vùng khác nhau sẽ có tiêu chuẩn đánh giá gạo chất lượng khác nhau, ví dụ các quốc gia Đông Nam Á thích dạng hạt thon dài, trong khi các quốc gia ở Bắc Á thích dạng hạt tròn ngắn. Riêng Ấn Độ và Pakistan lại thích dạng hạt rất dài. Bên cạnh dạng hạt, hàm lượng amylose cũng là một trong những đặc tính dùng để đánh giá chất lượng hạt và thang đánh giá cũng khác nhau ở mỗi quốc gia. Ở Lào và một số tỉnh của Thái Lan, người dân thích gạo nếp (hàm lượng amylose thấp), trong khi người dân ở vùng Bắc Trung Quốc, Nhật Bản và Thái Lan lại thích gạo có hàm lượng amylose trung bình (Calingacion et al. 2014). Người dân ở vùng Nam Trung Quốc, Iran, Pakistan, Malaysia, Philippines, Việt Nam, Indonesia và Uruguay thích loại gạo có

hàm lượng amylose trung bình. Riêng đối với Myanmar, Sri Lanka, Colombia, nhiều tỉnh của Ấn Độ, Ghana, Senegal, Suriname lại chuộng gạo có thành phần amylose cao (Calingacion et al. 2014). Qua đó cho thấy sở thích hay chất lượng gạo của mỗi quốc gia khác nhau nhưng nhìn chung nhu cầu đều là hình dạng hạt gạo phải đẹp, hàm lượng amylose thấp và có mùi thơm thì họ sẽ ưa chuộng giống đó.

Với sự phát triển nhanh chóng của việc nghiên cứu chức năng gene, hơn 2.000 gene đã được tìm thấy có chức năng kiểm soát các đặc tính nông học quan trọng và đã đánh giá được các cơ chế phân tử của chúng. Zhou et al. (2017) đã tìm thấy chiều dài hạt gạo được quyết định bởi gene *GS3* và nghiên cứu cũng cho thấy ở exon 2 của gene *GS3* từ C > T đã quyết định nên chiều dài hạt gạo. Bên cạnh đặc tính chiều dài hạt, hàm lượng amylose là một trong những đặc tính quyết định đến chất lượng gạo (Cai et al., 1998). Kết quả khảo sát cho thấy có ít nhất 7 vị trí biến đổi ở gene *GBSSI* đã dẫn đến ảnh hưởng hàm lượng amylose trong hạt gạo (Zhang et al., 2019). Ngoài 2 đặc tính trên, mùi thơm của gạo cũng được xem là một trong những tiêu chí chọn giống chất lượng. Hợp chất 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) tích lũy trong hạt gạo sẽ cho ra mùi như bắp rang và mùi này được điều khiển bởi gene *OsBADH2*, khi gene này bị mất chức năng khi có đột biến xảy ở các vùng mã hóa sẽ giúp tổng hợp 2-AP (Bradbury et al., 2005). Dựa trên nhu cầu thực tế kết hợp với sự phát triển của khoa học, trong nghiên cứu này gene chức năng *GS3*, *Waxy*, *OsBADH2* là ba gene liên quan đến đặc tính chất lượng được dùng để tìm ra các dòng lúa nhập nội chất lượng nhằm phục vụ cho công tác chọn tạo giống chất lượng trong tương lai.

2. PHƯƠNG TIỆN PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Nhằm tăng cường vật liệu di truyền 50 dòng lúa nhập nội có nguồn gốc từ Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế (IRRI), hiện đang lưu trữ trong Ngân hàng Gene Trường Đại học Cần Thơ (Bảng 1). Đề tài được thực hiện tại Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Bảng 1. Danh sách 50 dòng lúa IRRI dùng trong thí nghiệm

Stt	Tên dòng	Stt	Tên dòng
1	IR29	26	IR 77674-3B-8-2-2-8-3-4
2	IR 87989-8-1-B	27	IR 77674-3B-8-2-2-12-5-2
3	IR 85175-4-1-7-1-AJY1-B	28	IR 77660-B-9-1-3-2-1-17-4-1
4	IR 85252-6-3-1-1-AJY1-B	29	IR 85178-5-3-1-1
5	IR 83484-3-B-7-1-1-1	30	IR 85197-5-1-2-1
6	IR 87869-2-AJY1-B	31	IR 83412-6-B-3-1-1-1
7	IR 86385-48-2-1-B	32	IR 83414-5-B-5-3-1-1
8	IR 86385-62-1-1-B	33	IR 83435-6-B-6-2-1-1
9	IR 86385-64-1-1-B	34	IR 83460-4-B-4-2-1-1
10	IR 86385-67-1-1-B	35	IR 83465-6-B-1-1-1-1
11	IR 86385-80-3-1-B	36	IR 83484-3-B-7-1-1-1
12	IR 86385-84-2-1-B	37	IR 83996-B-B-3-1
13	IR 86385-97-2-1-B	38	IR 78767-B-SDO1-3-AJY2
14	IR 86385-110-1-1-B	39	IR 83407-B-SDO4-3-AJY1
15	IR 86385-114-1-1-B	40	IR 84095-AJY1-2-SDO6-B
16	IR 86385-122-1-1-B	41	IR 83422-B-AJY5-6-SDO2
17	IR 86385-170-1-1-B	42	IR 84086-11-B-AJY2-B
18	IR 86385-172-1-1-B	43	IR 25997-B-B-B
19	IR 83465-6-B-1-1-1-1	44	IR 83412-6-B-3-1-1-1
20	IR 84649-308-7-1-B-AJY1-B	45	IR 83420-B-AJY3-7-SDO1
21	PSB Rc 88	46	IR 84649-130-5-1-1-1
22	IR 72046-B-R-3	47	IR 84089-7-3-AJY1-B
23	IR 77674-3B-8-1-3-10-3-AJY2	48	IR 85212-21-2-1-1
24	IR 77674-3B-8-2-2-13-4-AJY2	49	IR 85212-186-1-1-1
25	IR 77674-3B-8-2-2-6-3-5	50	IR 85212-73-1-1-1

2.2. Phương pháp phân tích

2.2.1. Đặc tính chiều dài và hình dạng hạt gạo

Kích thước (dài, rộng) và tỷ lệ dài/rộng của 10

hạt gạo lức (bóc vỏ trấu) được đo và tính giá trị trung bình. Phân loại hạt gạo theo thang điểm của IRRI (2013) (Bảng 2).

Bảng 2. Phân loại kích thước, hình dạng hạt gạo lức theo tiêu chuẩn IRRI (2013)

Cấp độ	Nhóm hạt	Chiều dài hạt gạo (mm)	Dạng hạt	Tỷ lệ Dài/Rộng
1	Rất dài	>7,50	Thon dài	>3,0
3	Dài	6,61-7,50	Trung bình	2,1-3,0
5	Trung bình	5,50-6,60	Bầu	1,1-2,0
9	Ngắn	<5,50	Tròn	<1,1

2.2.2. Phương pháp phân tích hàm lượng amylose

Định lượng amylose theo phương pháp Juliano (1971) có cải tiến theo Khoomtong and Noohorm (2015). Đầu tiên hạt gạo được bóc vỏ trấu, tiếp theo nghiền thật mịn và sau đó đo độ ẩm rồi về quy về độ ẩm chuẩn 12%, tiến hành cân mẫu.

Cân 25 mg bột đã nghiền mịn (ẩm độ 12%), cho vào ống nghiệm 15 mL (100 x 13 mm). Thêm 0,25 mL ethanol 95%, lắc đều. Thêm 2,25 mL NaOH 1M rồi trộn đều hỗn hợp. Đun hỗn hợp dung dịch trong nước sôi 10 phút, sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng.

Cho tất cả dung dịch trong ống nghiệm vào bình định mức 25 mL. Chuẩn đến vạch định mức, để qua đêm. Rút 1,25 mL dung dịch tinh bột sang bình định mức 25 mL. Thêm 0,25 ml acid acetic 1M và 0,5 ml dd Iod, lắc đều. Chuẩn nước cất lên vạch định mức, lắc đều, giữ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút.

Đo mẫu: độ hấp thụ được đo trên máy đo quang phổ ở bước sóng 620 nm. Giá trị độ hấp thụ được chuyển đổi thành hàm lượng amylose dựa trên đường cong chuẩn đã được thiết lập. Mẫu blank được chuẩn bị và kiểm tra tương tự như các mẫu (không có tinh bột). Cuối cùng ghi nhận và phân tích

kết quả. Đánh giá hàm lượng amylose theo thang đánh giá của Juliano and Villareal (1993) (Bảng 3).

Bảng 3. Thang đánh giá hàm lượng amylose của Juliano and Villareal (1993)

Phân loại	Tỷ lệ (%) amylose
Nếp	0-5%
Rất thấp	5,1-12%
Thấp	12,1-20%
Trung bình	20,1-25%
Cao	>25%

Bảng 4. Thang điểm đánh giá chỉ tiêu nhiệt trở hồ (IRRI, 2013)

Cấp	Độ lan rộng	Độ phân hủy kiềm	Nhiệt trở hồ
1	Hạt không bị ảnh hưởng	Thấp	Cao
2	Hạt phồng lên	Thấp	Cao
3	Hạt phồng lên rìa hẹp không rõ	Thấp/Trung bình	Cao/Trung bình
4	Hạt phồng lên rìa rộng và rõ	Trung bình	Trung bình
5	Hạt bị tách rời, rìa rộng và rõ	Trung bình	Trung bình
6	Hạt tan và kết với rìa	Cao	Thấp
7	Hạt tan hoàn toàn và hòa lẫn vào nhau	Cao	Thấp

2.2.4. Phương pháp phân tích độ bền thể gel (Cagampang et al., 1973)

Các mẫu gạo được tách vỏ trấu, sau đó nghiền mịn và đo ẩm độ hạt gạo. Cân mẫu (100 mg với ẩm độ 12%) cho vào ống nghiệm (100 x 13 mm), tiếp đến thêm 0,2 mL ethanol 95% có chứa 0,025% thymol blue. Thêm 2 mL KOH 0,2N, sau đó khuấy đều bằng máy Vortex. Đặt ống nghiệm và đem đun cách thủy (nhiệt độ 100°C trong 8 phút, lấy ra để yên 5 phút, sau đó làm lạnh bằng nước đá trong 20 phút. Cuối cùng đọc và ghi nhận kết quả bằng cách để ống nghiệm nằm ngang trên bề mặt phẳng của giấy kẻ ô ly và sau 60 phút thì tiến hành đo chiều dài thể gel (từ đáy đến mí trên của thể gel), đơn vị mm. Đánh giá độ bền thể gel theo thang điểm của IRRI (2013) (Bảng 5).

Bảng 5. Thang điểm đánh giá độ bền thể gel của IRRI (2013)

Chiều dài thể gel (mm)	Loại độ bền thể gel	Cấp
81-100	Rất mềm	1
61-80	Mềm	3
41-60	Trung bình	5
35-40	Cứng	7
<35	Rất cứng	9

2.2.3. Phương pháp phân tích nhiệt trở hồ

Thực hiện theo phương pháp của Little et al. (1958), và dựa trên thang điểm của IRRI (2013) (Bảng 4). Cấp trung bình được tính theo công thức sau:

$$\text{Cấp trở hồ} = \frac{\sum x_i \times n}{N}$$

Trong đó:

x_i là cấp trở hồ

n là số hạt có cấp nhiệt trở hồ x_i

N là số hạt thử nghiệm

2.2.5. Phương pháp phân tích cảm quan mùi thơm

Mùi thơm của gạo được đánh giá theo phương pháp cảm quan, qui trình được thực hiện theo các bước sau. Trước tiên lấy khoảng 10 hạt gạo của mỗi giống đã được bóc vỏ trấu, làm trắng và nghiền. Sau đó bột gạo nghiền được đặt trong ống nghiệm 100 ml chứa 500 µl KOH 1,7%, tiếp đến đặt nắp lại và để 10 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng đánh giá mùi thơm bằng phương pháp cảm quan với 10 người và được đánh giá theo IRRI (2013) (Bảng 6). Sử dụng gạo của giống lúa Jasmine làm đối chứng (cấp 2) rất thơm, gạo Đài Thơm 8 làm đối chứng (cấp 1) thơm nhẹ và IR50404 làm đối chứng (cấp 0) không thơm.

Bảng 6. Đánh giá mùi thơm cảm quan (IRRI, 2013)

Cấp	Mùi thơm
0	Không thơm
1	Thơm nhẹ
2	Rất thơm

2.2.6. Phương pháp phân tích kiểu gene liên quan đến chất lượng

Mẫu lá non của 50 dòng lúa thí nghiệm được ly trích theo quy trình của Doyle and Doyle (1990). DNA thu được tiếp tục đánh giá kiểu gene dựa vào các mồi đã được tổng hợp có trình tự được liệt kê trong Bảng 7 bằng phương pháp PCR.

Bảng 7. Trình tự các đoạn môi dùng cho nhận diện kiểu gene quy định tính trạng chất lượng

Tên môi	Trình tự môi (5' đến 3')	Sự bắt cặp các môi	Kích thước bp
Kiểu gene <i>Wx</i> (Cai et al., 2015)			
GF	TACAAATAGCCACCACA	GF-TR (band chung)	387
TR	GATCAGCCTAACCAAACA		
GR	GGGAAACAAAGAATTATAAACATATAT GTACAC	GF-GR (band G)	207
TF	CATCAGGAAGAACATCTGCAAGT	TF-TR (band T)	235
Kiểu gene <i>BADH2</i> (Bradbury et al., 2005)			
ESP	TTGTTTGGAGCTTGCTGATG	ESP-EAP (band chung)	577
EAP	AGTGCTTTACAAAGTCCCGC		
INSP	CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA	INSP-EAP (band không thom)	355
IFAP	CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC	IFAP-ESP (band thom)	257
Kiểu gene <i>GS3</i> (Ramkumar et al., 2010)			
EFP	AGGCTAAACACATGCCCATCTC	EFP-ERP (band chung)	365
ERP	CCCAACGTTTCAGAAATTAATGTGCTG		
IRSP	AACAGCAGGCTGGCTTACTCTCTG	ERP-IFLP (band hạt dài)	262
IFLP	ACGCTGCCTCCAGATGCTGA	EFP-IRSP (band hạt ngắn)	147

Sản phẩm PCR được điện di với gel agarose 2% (w/v) đối với sản phẩm PCR gene *Waxy* và *BADH2*, riêng sản phẩm PCR gene *GS3* thì được điện di bằng gel polyacrylamide 8%, thang chuẩn 1 kb plus được sử dụng để ước lượng kích thước band.

2.2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Tất cả các số liệu được xử lý trên Microsoft Excel 2010. Số liệu được phân tích phần mềm statgraphics 18 (Statgraphics, 1988) để phân tích thống kê mô tả (số trung bình, độ lệch chuẩn), so sánh các trung bình nghiệm thức bằng phương sai (oneway ANOVA) và kết hợp so sánh các cặp trung bình nghiệm thức bằng kiểm định Tukey HSD, giá trị F và hệ số biến động CV (%) được tính thông qua bảng phân tích phương sai và thống kê mô tả, và sử dụng phần mềm Origin phiên bản 2017 để vẽ biểu đồ.

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Đặc tính chiều dài và hình dạng hạt gạo

Kích thước hạt là yếu tố quyết định chính đến năng suất cây trồng (Harlan et al., 1972), cụ thể được biểu thị bằng chiều dài, chiều rộng và tỷ lệ dài/rộng của hạt, là yếu tố quyết định chính đến chất lượng bề ngoài hạt. Đây là một đặc điểm nông học quan trọng đối với chọn lọc nhân tạo trong chọn giống lúa (McKenzie & Rutger, 1983).

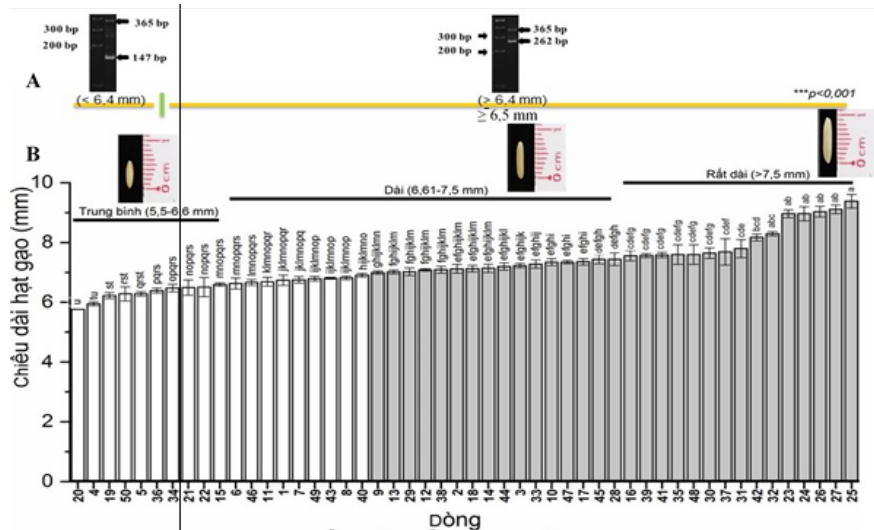
3.1.1. Chiều dài hạt gạo

Chiều dài hạt gạo là một trong những thông số để phân loại gạo xuất khẩu và còn phụ thuộc rất lớn vào thị hiếu người tiêu dùng của từng quốc gia trên thế giới (Jenning et al., 1979). Hình 1B cho thấy chiều dài hạt gạo có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Trong 50 dòng nghiên cứu, có 15 dòng thuộc cấp 1 (hạt rất dài) với số thứ tự dòng (16, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 35, 37, 39, 41, 42, 48) biến thiên từ 7,56-9,38 mm, có 25 dòng thuộc cấp 3 (hạt dài) với số thứ tự dòng (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 38, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 49) biến thiên từ 6,63-7,44 mm, các dòng còn lại thuộc cấp 5 (hạt trung bình) biến thiên từ 5,76-6,6 mm. Qua khảo sát đã tuyển chọn được 31 dòng lúa có chiều dài hạt ≥ 7 mm (dao động trong khoảng 7,00-9,38 mm), những dòng này có khả năng đáp ứng nhu cầu thị hiếu của người tiêu dùng trên thế giới (Bùi Chí Bửu & Nguyễn Thị Lang, 2000). Tuy nhiên theo phân loại của IRRRI (2013) thì giống chiều dài hạt gạo $\geq 6,5$ mm là giống có kiểu hình hạt dài.

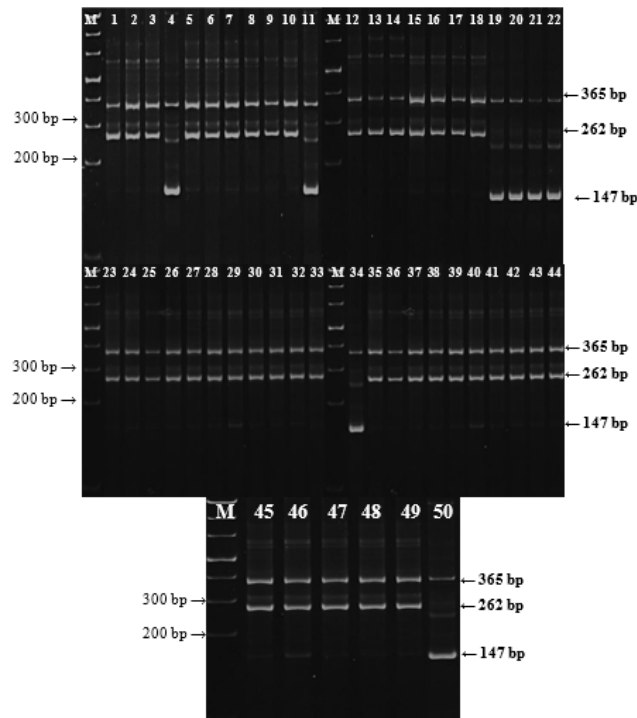
Theo Ramkumar et al. (2010), gene *GS3* thuộc nhiễm sắc thể số 3 là gene quan trọng nhất chịu ảnh hưởng từ 80-90% so với các gene kiểm soát chiều dài hạt gạo khác. Một đột biến ở exon thứ 2 của gene này đã làm thay đổi chiều dài hạt gạo. Dựa trên đặc điểm này, Ramkumar et al. (2010) đã sử dụng hệ thống môi DRR-GL trong nghiên cứu nhằm xác định gene *GS3* kiểm soát chiều dài hạt. Hai đoạn môi EFP/ERP khuếch đại một vùng 365 bp gồm cả alen trội và lặn. Các cặp môi đặc hiệu cho từng alen

EFP/IRSP khuếch đại vùng 147 bp cho các giống/dòng có chiều dài hạt ngắn dưới 6,4 mm và cặp môi ERP/IFLP khuếch đại vùng 262 bp nhận diện cho giống có chiều dài hạt gạo dài lớn hơn 6,4 mm. Qua kết quả phổ điện di sản phẩm PCR bằng môi DRR-GL (Hình 2), 50 dòng lúa IRR1 có 8 dòng

kích thước band là 147 bp chiều dài hạt gạo là ngắn (dưới 6,4 mm) và 42 dòng có kích thước band là 262 bp chiều dài hạt gạo là dài (lớn hơn 6,4 mm). So sánh giữa hai phương pháp truyền thống và ứng dụng dấu chỉ thị phân tử cho thấy dấu chỉ thị phân tử giải thích đúng 74,2 % sự biểu hiện kiểu hình.



Hình 1. Chiều dài hạt gạo



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR với môi GS3 trên gel polyacrylamide 8%

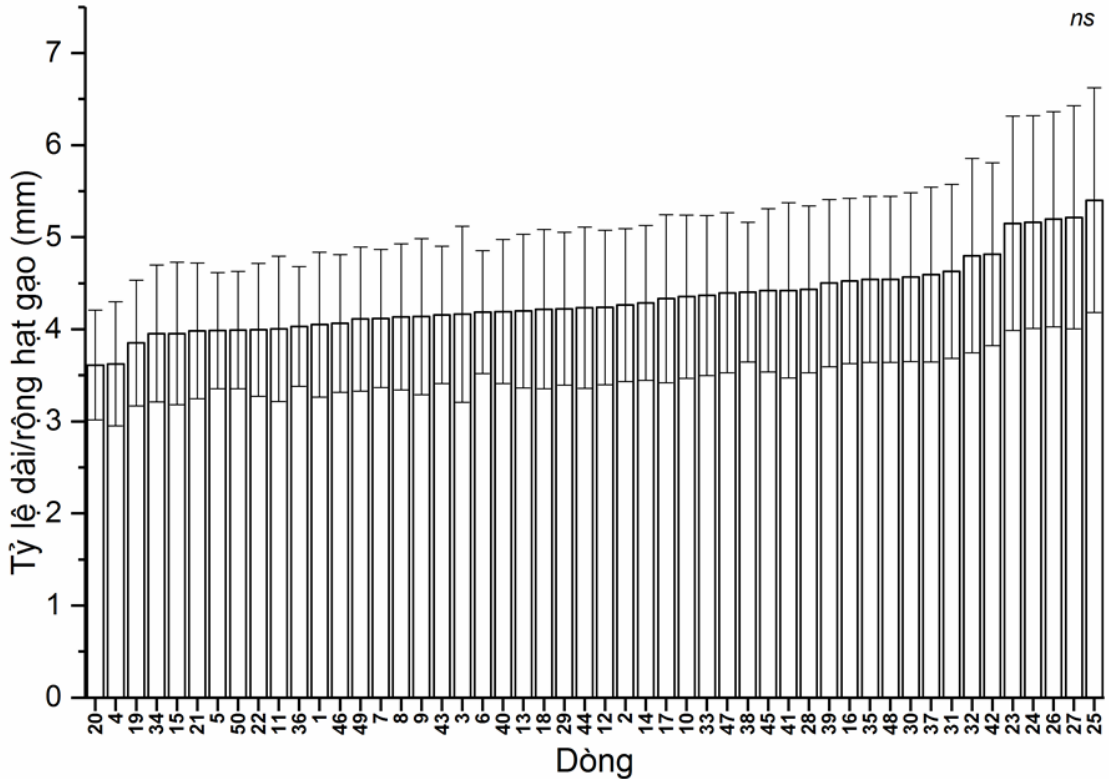
(M: thang chuẩn 1kb plus, 1-50: tương ứng số thứ tự các dòng lúa IRR1 được trình bày trong Bảng 1)

A. Dấu phân tử DRR-GL nhận diện chiều dài hạt gạo; B. Biểu đồ chiều dài hạt gạo đo được, thanh màu xám biểu thị chiều dài hạt gạo $\geq 7,0$ mm, thanh màu đen biểu thị giống có chiều dài hạt gạo $\geq 6,5$ mm.

3.1.2. Hình dạng hạt gạo

Tỷ lệ dài/rộng của các dòng lúa được thể hiện qua Hình 3 cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. Hầu hết các dòng đều thuộc cấp 1 (hạt thon dài) và dao động trong khoảng 3,61-5,4. Dòng có tỷ

lệ dài/rộng cao nhất là dòng số thứ tự 25 (5,4) và dòng thấp nhất là dòng số thứ tự 20 (3,61). Theo Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004), tỷ lệ dài/rộng hạt là một trong những tính trạng quan trọng nhằm đánh giá đa dạng di truyền của các loài cây có hạt.



Hình 3. Tỷ lệ dài/rộng của hạt gạo

3.2. Hàm lượng amylose

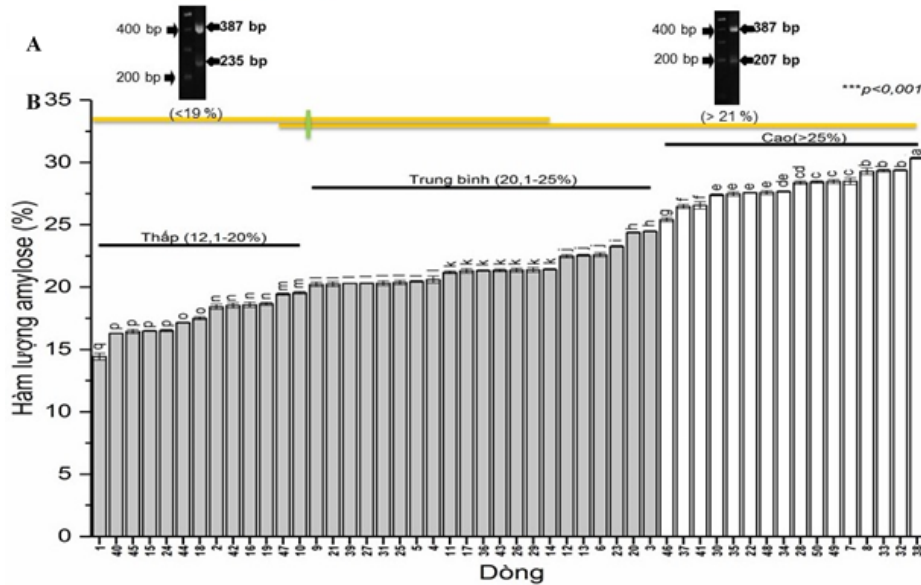
Hình 4B cho thấy hàm lượng amylose của 50 dòng lúa có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%, biến thiên từ 14,43-30,35%. Có 13 dòng có số thứ tự là (1, 2, 10, 15, 16, 18, 19, 24, 40, 42, 44, 45, 47) có hàm lượng amylose ở mức thấp (dao động từ 14,33-19,55%) và 21 dòng có số thứ tự là (3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 29, 31, 36, 39, 43) có hàm lượng amylose ở mức trung bình (dao động từ 20,23-24,48%). Còn lại 16 dòng trong tổng 50 dòng lúa IRRI có hàm lượng amylose ở mức cao (dao động từ 25,42-30,35%).

Kết quả đã phân tích cho thấy 34 dòng lúa có số thứ tự là (3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 29, 31, 36, 39, 43) có hàm lượng amylose ở mức thấp-trung bình trong số 50 dòng lúa. Gạo có hàm lượng amylose ở mức cao sẽ có độ trương nở lớn và độ phân rã cao khi được nấu. Ngược lại, gạo có hàm lượng amylose ở mức thấp, khi nấu dễ bị

nhão và cơm sẽ dính hơn. Ở các quốc gia trồng lúa trên thế giới, người tiêu dùng thường hay chọn các giống lúa có hàm lượng amylose ở mức trung bình (Nguyễn Ngọc Đệ, 2008). Một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng của gạo là hàm lượng amylose. Gene *Wx* điều khiển hàm lượng amylose trong lúa gây đột biến thay thế G → T ở +1 loci tại vị trí cắt giữa exon và intron thứ nhất, dựa vào kết quả đó làm cho hàm lượng amylose bị giảm. Cai et al. (2015) đã thiết kế 4 môi GF, TR và GR, TF. Bốn môi tạo ra ba cặp sản phẩm khuếch đại, GF-TR khuếch đại một đoạn DNA có độ dài 387 bp nhận diện vùng gene quy định hàm lượng amylose, GF-GR khuếch đại một đoạn DNA có độ dài 207 bp (G) nhận diện vùng gene thể hiện hàm lượng amylose cao và TF-TR khuếch đại một đoạn DNA có độ dài 235 bp (T) nhận diện vùng gene thể hiện hàm lượng amylose thấp.

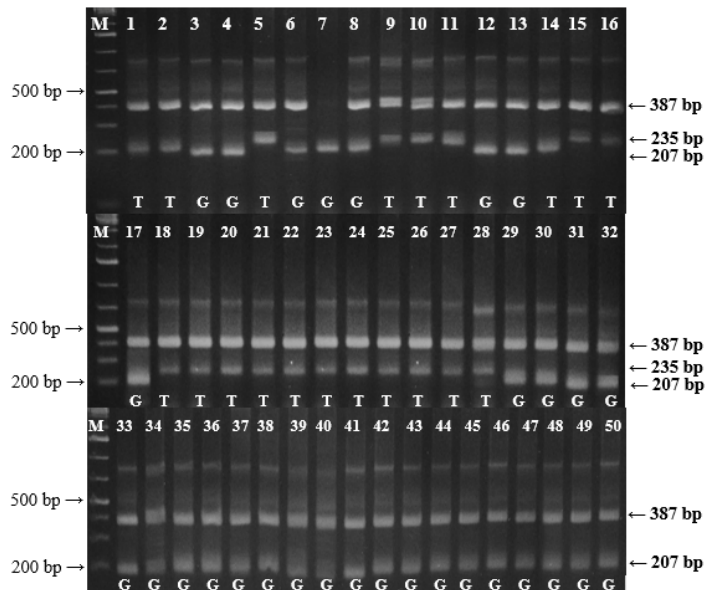
Qua kết quả phổ điện di sản phẩm PCR trong thí nghiệm của 50 dòng lúa IRRI (Hình 5), có 15 dòng có kích thước band ở vị trí 235 bp là dòng có số thứ tự (6, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28) thể hiện hàm lượng amylose thấp. Còn lại 35 dòng có kích thước band ở vị trí 207 bp thể hiện hàm lượng amylose cao. Từ kết quả phân tích kiểu gene

nhờ dấu chỉ thị phân (Hình 3), phân tích kiểu gene *Waxy* bằng 4 môi trên cho kết quả chính xác trên 82% về hàm lượng amylose, điều này góp phần vào trong công tác chọn giống lúa chất lượng nhanh hơn và giảm chi phí. Kết quả đã chọn được 15 giống có hàm lượng amylose thấp dưới 20% mang kiểu gene T phù hợp với nhu cầu chọn giống hiện nay.



Hình 4. Hàm lượng amylose của 50 dòng lúa IRRI

(A: Chỉ thị phân tử *Wx* nhận diện hàm lượng amylose trong gạo; B: Thanh màu xám có hàm lượng amylose < 25%)



Hình 5. Phổ điện di sản phẩm PCR với môi *Waxy* trên gel agarose 2% nhận diện các giống có mang gene đột biến *G* → *T*

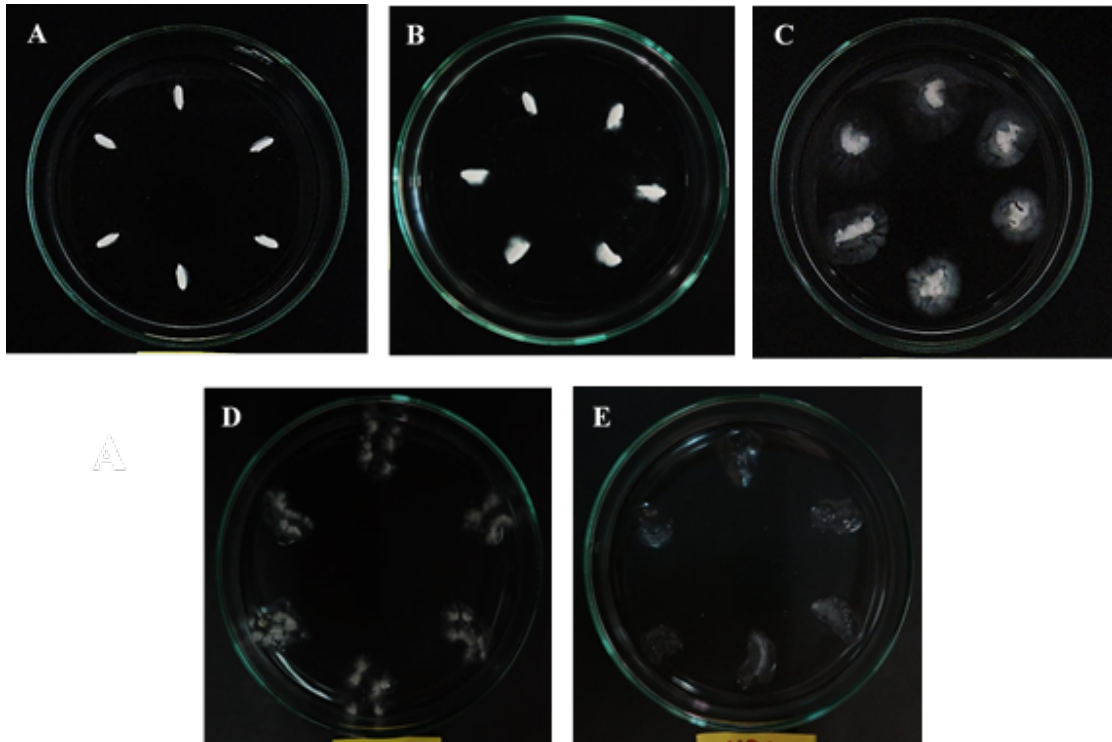
(M: thang chuẩn 1kb plus, 1-50: tương ứng số thứ tự các dòng lúa IRRI được trình bày trong Bảng 1)

3.3. Nhiệt trở hồ

Kết quả đánh giá nhiệt trở hồ (Hình 6) cho thấy có 11 dòng lúa trong tổng 50 dòng có nhiệt trở hồ thấp (cấp 6) đó là dòng có số thứ tự (7, 13, 14, 17, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 38) và 2 dòng có nhiệt trở hồ thấp (cấp 7) là dòng 32 và 35. Những dòng có nhiệt trở hồ trung bình cấp 5 chỉ có 3 dòng số thứ tự (5, 18 và 43). Trong đó 25 dòng có nhiệt trở hồ cao cấp 2 số thứ tự đó là (1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 12, 15, 16, 20, 21, 29, 30, 31, 33, 34, 39, 40, 42, 44, 46, 47, 49, 50).

Các dòng có số thứ tự còn lại có nhiệt trở hồ cao (cấp 3).

Theo Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang (2000), nhiệt trở hồ có liên quan đến thời gian nấu cơm, gạo có nhiệt trở hồ cao thì dẫn đến cần nhiều nước và nhiều thời gian để nấu hơn là gạo có nhiệt trở hồ thấp hay trung bình. Các dòng lúa có nhiệt trở hồ trung bình (cấp 5) là các dòng tối ưu cho việc chọn phẩm chất gạo. Vì thế, 3 dòng lúa có số thứ tự (5, 18 và 43) là 3 dòng có phẩm chất tốt để phục vụ cho việc chọn tạo giống lúa.

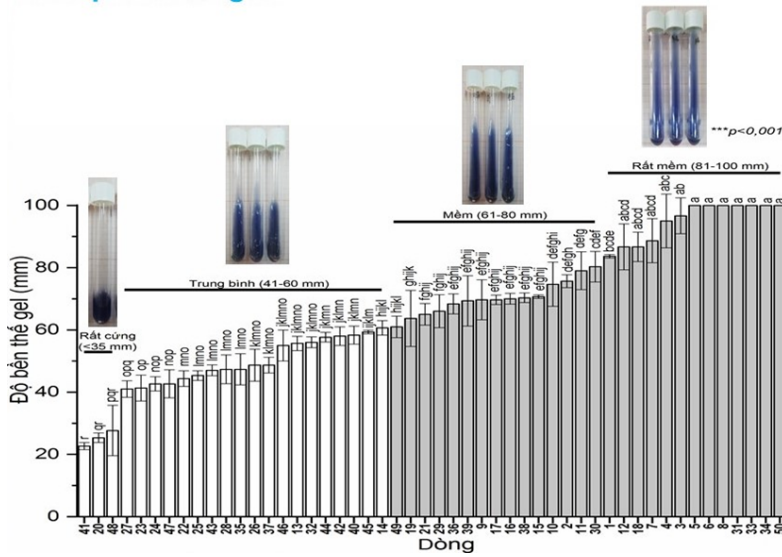


Hình 6. Cấp độ của nhiệt trở hồ các mẫu thí nghiệm: A, cấp 2; B, cấp 3; C, cấp 5; D, cấp 6; E, cấp 7

3.4. Độ bền thể gel

Kết quả phân tích độ bền thể gel trên 50 dòng lúa IRRI được thực hiện theo phương pháp của Graham (2002) dựa trên sự khác biệt về tính liên kết tinh bột (Cruz & Khush, 2000) và được đánh giá dựa trên thang điểm của IRRI (2013). Qua Hình 7, trong 50 dòng lúa IRRI có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%, các dòng dao động trong khoảng từ (22,67-100 mm). Có 13 dòng chiều dài thể gel thuộc cấp 1 (rất mềm) biến thiên từ (83,67-100 mm) đó là số thứ tự (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 18, 31, 33, 34, 50). 15 dòng có chiều dài thể gel đạt cấp 3 (mềm) biến thiên (61-80,33 mm) là số thứ tự (2, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 21, 29, 30, 36, 38, 39, 49). Và 19 dòng có chiều dài thể gel đạt cấp 5 (trung bình) đó là số

thứ tự (13, 14, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 32, 35, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47). Cuối cùng là 3 dòng có chiều dài thể gel đạt cấp 9 (rất cứng) biến thiên từ (22,67-27,67 mm). Độ bền thể gel còn là một trong những chỉ tiêu quan trọng liên quan đến phẩm chất gạo, quyết định đến độ mềm dẻo của cơm để người sau khi nấu (Nguyễn Thị Lang, 2005). Giữa các giống trong cùng một nhóm hàm lượng amylose của giống có độ bền thể gel mềm hơn sẽ được ưa chuộng hơn và gạo khi được nấu chín sẽ mềm hơn (Khush et al., 1979; Nguyễn Ngọc Đệ, 2008). Vì vậy, ở chỉ tiêu này đã loại trừ 22 dòng có độ bền thể gel thuộc nhóm trung bình và rất cứng vì không được thị trường ưa chuộng, các dòng còn lại đều thuộc nhóm gel từ mềm-rất mềm phù hợp với nhu cầu của người tiêu dùng.

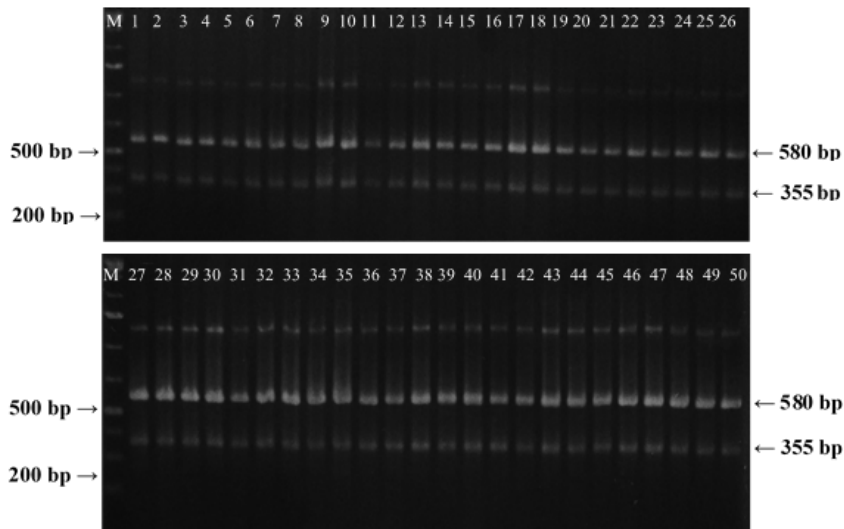


Hình 7. Độ bền thể gel của 50 dòng lúa thí nghiệm, thanh màu xám tương ứng thể hiện gạo mềm có chiều dài thể gel > 60 mm

3.5. Phân tích mùi thơm

Mùi thơm các dòng lúa được phân tích theo phương pháp phân tích cảm quan mùi thơm của Yoshihashi et al. (2004) và dựa vào thang đánh giá mùi thơm của IRRI (1996). Sử dụng 3 giống làm đối chứng gạo IR50404 không thơm (cấp 0), gạo thơm thái có thơm (cấp 1) và Jasmine 85 có thơm (cấp 2). Qua kết quả, 50 dòng lúa IRRI đều không có mùi thơm (cấp 0). Bradbury et al. (2005) đã thiết kế 4 đoạn mỗi ESP, EAP, INSP và IFAP, trong khi đó các cặp mỗi ESP-EAP sẽ khuếch đại một đoạn DNA

khoảng 580 bp cho cả 50 dòng lúa thơm và dòng lúa không thơm. Cặp mỗi ESP-IFAP sẽ giúp nhận diện được gene thơm nếu sản phẩm PCR có kích thước band 257 bp và cặp mỗi INSP-EAP sẽ giúp nhận diện được gene không thơm khi sản phẩm PCR có kích thước band 355 bp. Nếu sản phẩm PCR có cùng lúc hai kích thước band 257 bp và 355 bp thì dòng lúa đó sẽ mang kiểu gene thơm dị hợp. Trên lúa thơm tại vùng gene betain aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2) nằm trên nhiễm sắc thể số 8 có 8 cặp nucleotid ở exon thứ 7 bị loại bỏ, tuy nhiên ở lúa không thơm thì không bị mất đi vùng này.



Hình 8. Phổ điện di sản phẩm PCR với mỗi BADH2 trên gel agarose 2% nhận diện các giống có mang gene đột biến OsBADH2

(M: thang chuẩn 1kb plus, 1-50: tương ứng số thứ tự các dòng lúa IRRI được trình bày trong Bảng 1)

Qua kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 2% (Hình 8), 50 dòng lúa IRRI đều mang gene không thơm, không có dòng nào mang gene thơm, như vậy dấu phân tử này có mức độ phù hợp giữa kiểu gene và kiểu hình là 100%.

Như vậy qua đánh giá kiểu gene chất lượng kết hợp phân tích với các chỉ số sinh hóa của hạt gạo, dòng IR 86385-172-1-1-B (số thứ tự 18) mang kiểu gene waxy thấp, có hình dạng hạt gạo thon dài. Vì vậy đây là dòng lúa tiềm năng cần được tiếp tục nghiên cứu và phát triển.

4. KẾT LUẬN

Tóm lại, qua việc ứng dụng 3 chỉ thị phân tử DRR-GL, Wx-in1 và BADH2 đã giải thích được sự phù hợp giữa kiểu gene và kiểu hình trên 82%.

Đã tuyển chọn được dòng lúa IR 86385-172-1-1-B có mang đặc tính như hạt gạo thon dài (chiều dài hạt 7,12 mm), hàm lượng amylose thấp (17,51%), độ bền thể gel rất mềm (86,67mm), nhiệt trở hồ trung bình (cấp 5).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 (vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bradbury, L. M., Henry, R. J., Jin, Q., Reinke, R. F., & Waters, D. L. (2005). A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Molecular Breeding*, 16(4), 279-283.

Bùi Chí Bửu & Nguyễn Thị Lang. (2000). *Một số vấn đề cần biết về gạo xuất khẩu*. NXB Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

Cagampang, C. B., Perez, C. M., & Juliano, B. O. (1973). A gel consistency for eating quality of rice. *Sci. Food. Agric*, 24, 89-94.

Cai, H., Xu, D., Zhou, L., Cheng, J., Zhang, Z., Wu, J., & You, A. (2015). Development of PCR-based CNP marker of rice Waxy gene with confronting two-pair primers. *Russian Journal of Genetics* 51, 673-676.

Cai, X. L., Wang, Z. Y., Xing, Y. Y., Zhang, J. L., & Hong, M. M. (1998). Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *The Plant Journal*, 14, 459-465.

Calingacion, M., Laborte, A., Nelson, A., Resurreccion, A., Concepcion, J. C., Daygon, V. D., ... & Fitzgerald, M. (2014). Diversity of global rice markets and the science required for

consumer-targeted rice breeding. *PloS one*, 9(1), e85106.

Cruz, N. D., & Khush, G. S. (2000). Rice grain quality evaluation procedures. In R.K. Singh, U. S. Singh, & G. S. Khush (Eds.), *Aromatic rices* (pp.15-28).

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 13-15.

Graham, R. (2002). A Proposal for IRRI to Establish a Grain Quality and Nutrition Research Center. IRRI Discussion Paper, No. 44. Los Banos (Philippines): International Rice Research Institute. 15p.

Harlan, J. R., De Wet, J. M. J., & Price, E. G. (1973). Comparative evolution of cereals. *Evolution*, 27(2), 311-325.

IRRI. (2013). Standard Evaluation System for Rice (SES). Rice Science for a Better World. 31 pp.

Jenning, P. R., & Coffman, K. H. E. (1979). Rice improvement. IRRI.

Juliano, B. O. (1971a). Rice chemistry and technology. The American Association of cereal chemists, Ine Mumesita, USA.

Juliano, B. O. (1971b). A simplified assay for milled rice amylose. *Cereal Sci. Today*, 16, 334-360.

Juliano, B. O., & Villareal, C. P. (1993). *Grain quality evaluation of world rices*. International Rice Research Institution.

Khoomtong, A., & Noomhorm, A. (2015). Development of a Simple Portable Amylose Content Meter for Rapid Determination of Amylose Content in Milled Rice. *Food Bioprocess Technology*, 8(9), 1938-1946.

Little, R. R., Hilder, G. B., & Dawson, E. H. (1958). Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. *Cereal Chem.*, 35:111-126.

McKenzie, K. S., & Rutger, J. N. (1983). Genetic analysis of amylose content, alkali spreading score, and grain dimensions in rice. *Crop Sci.*, 23, 306 - 313.

Nguyễn Ngọc Đệ. (2008). *Giáo trình cây lúa*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyễn Thị Lang & Bùi Chí Bửu. (2004). Xác định gene fgr điều khiển tính trạng mùi thơm bằng phương pháp Fine Mapping với microsatellites. Hội nghị quốc gia về chọn tạo giống lúa.

Nguyễn Thị Lang. (2005). Nghiên cứu biến động di truyền trên hàm lượng amylose của gạo (*Oryza Sativa L.*). *Tạp chí Khoa học công nghệ Nông nghiệp*, 12, 24-20.

Ramkumar, G., Sivaranjani, A. K. P., Pandey, M. K., Sakthivel, K., Shobha Rani, N., Sudarshan, I., Prasad, G. S. V., Neeraja, C. N., Sundaram, R. M., Viraktamath, B. C., & Madhav, M. S. (2010). Development of a PCR-based SNP

- marker system for effective selection of kernel length and kernel elongation in rice. *Molecular Breeding*, 26, 735-740.
- Statgraphics, 1988. A statistical graphics software system. *Disasters*, 12, 304.
- Yoshihashi, T., Nguyen, H. T. T., & Kabaki, N. (2004). Area dependency of 2-acetyl-1-pyrroline content in an aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 38, 105-109.
- Xie, L. Y., Lin, E. D., Zhao, H. L., & Feng, Y. X. (2016). Changes in the activities of starch metabolism enzymes in rice grains in response to elevated CO₂ concentration. *International journal of biometeorology*, 60(5), 727-736.
- Zhang, C., Zhu, J., Chen, S., Fan, X., Li, Q., Lu, Y., Wang, M., Yu, H., Yi, C., Tang, S., Gu, M., & Liu, Q. (2019). Wxlv, the Ancestral Allele of Rice Waxy Gene. *Molecular Plant*, 12, 1157-1166.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., & Blanchard, C. (2017a). Effect of storage temperature on rice thermal properties. *Food Research International*, 43(3), 709-715.
- Zhou, H., Li, P., Xie, W., Hussain, S., Li, Y., Xia, D., ... & He, Y. (2017). Genome-wide association analyses reveal the genetic basis of stigma exertion in rice. *Molecular plant*, 10(4), 634-644.
- Zhou, H., Xia, D., & He, Y. (2019). Rice grain quality—traditional traits for high quality rice and health-plus substances. *Molecular Breeding*, 40, 1.