

ỨNG DỤNG CỦA CÁC CẶP MÒI CHUYÊN BIỆT DỰA TRÊN VÙNG GEN BAD2 ĐỂ PHÁT HIỆN NHANH CÁC DÒNG LÚA THƠM

Trần Thị Xuân Mai¹, Nguyễn Thành Tâm², Trần Thị Giang¹,
Lê Việt Dũng³ và Hà Thanh Toàn¹

ABSTRACT

For detection of fragrant genotyping in rice, we used primers based on a specific region of an eight base pair deletion and three SNP's in a gene of chromosome 8 which encodes a putative betain aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2). Using four primers within a single PCR reaction allows identification between homozygous fragrant, homozygous non-fragrant and heterozygous non-fragrant individuals in a population segregating for fragrance.

Primers ESP and IFAP amplify a 257 bp fragment DNA from a fragrant allele. Primers INSP and EAP amplify a 355 bp fragment DNA from a non-fragrant allele. Therefore, these specific primers are very useful for rapid detection of fragrance genotyping in rice varieties.

Keywords: *Specific primer, BAD2 gene, Fragrant rice, PCR reaction*

Title: *Application of specific primers based on the BAD2 gene region for rapid detection of fragrant rice varieties*

TÓM TẮT

Để phát hiện kiểu gen lúa thơm, chúng tôi đã sử dụng các đoạn mồi được thiết kế dựa trên một vùng chuyên biệt có sự loại bỏ tám cặp bp và ba trình tự chứa sự đa hình thái các nucleotid đơn (SNP) gen mã hoá cho enzyme betain aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2) nằm trên nhiễm sắc thể thứ 8. Việc sử dụng chung bốn đoạn mồi trong cùng một phản ứng PCR cho phép nhận diện giữa các cá thể thơm đồng hợp tử, không thơm đồng hợp tử và không thơm dị hợp tử trong một quần thể còn phân ly của lúa thơm.

Các đoạn mồi ESP và IFAP sản xuất được một đoạn 257 bp từ một alen thơm. Các đoạn mồi INSP và EAP đã khuếch đại được một đoạn 355 bp từ một alen không thơm. Do đó, các đoạn mồi chuyên biệt này rất hữu dụng trong việc phát hiện nhanh kiểu gen thơm ở các giống lúa.

Từ khóa: *Các mồi chuyên biệt, gen BAD2, lúa thơm, phản ứng PCR*

1 MỞ ĐẦU

Lúa là cây lương thực được trồng rộng rãi và là nguồn thực phẩm chính cho hơn một nửa dân số trên thế giới. Tuy nhiên, chỉ một phần rất nhỏ của các loại gạo chất lượng cao được đưa vào thị trường quốc tế.

Đồng bằng sông Cửu Long cung ứng hơn 90% lượng gạo xuất khẩu của cả nước. Từ năm 2001 đến nay sản lượng gạo xuất khẩu Việt Nam luôn luôn tăng trưởng và giữ vững vị trí thứ hai trên thế giới, năm 2005 lượng gạo xuất khẩu đạt mức cao nhất từ trước đến nay với 5,204 triệu tấn thu về 1,399 tỷ USD. Tuy nhiên trong

¹ Viện NCPT Công nghệ Sinh học

² Viện NCPT Đồng bằng sông Cửu Long

³ Phòng Hợp tác Quốc Tế

cùng chủng loại gạo xuất khẩu, mặc dù giá gạo Việt Nam cao hơn Pakistan nhưng vẫn luôn luôn thấp hơn Thái Lan.

Nhu cầu xuất khẩu của gạo có phẩm chất tốt luôn luôn cao hơn gạo loại thường. Bên cạnh đó, việc gia nhập vào WTO đã buộc chúng ta phải tìm cách nâng cao chất lượng sản phẩm để có thể cạnh tranh được với các nước khác trong khu vực và trên toàn thế giới. Nhưng các giống lúa chất lượng cao, đặc biệt là lúa thơm đều rất khó sản xuất vì dễ nhiễm sâu bệnh, năng suất thấp hoặc không ổn định so với các giống lúa loại thường, lý do này đã làm cho các nông dân không mặn mà trong việc sản xuất các giống lúa thơm và dẫn đến diện tích trồng lúa thơm ngày càng bị thu hẹp, ngoài ra một số giống lúa thơm do trồng ở điều kiện không thích hợp cũng bị mất dần đi mùi thơm hoặc thậm chí không còn mùi thơm nữa. Để có thể đáp ứng được yêu cầu xuất khẩu gạo, việc chọn lọc lại các giống lúa thơm có chất lượng cao là nhu cầu cấp bách hiện nay ở nước ta.

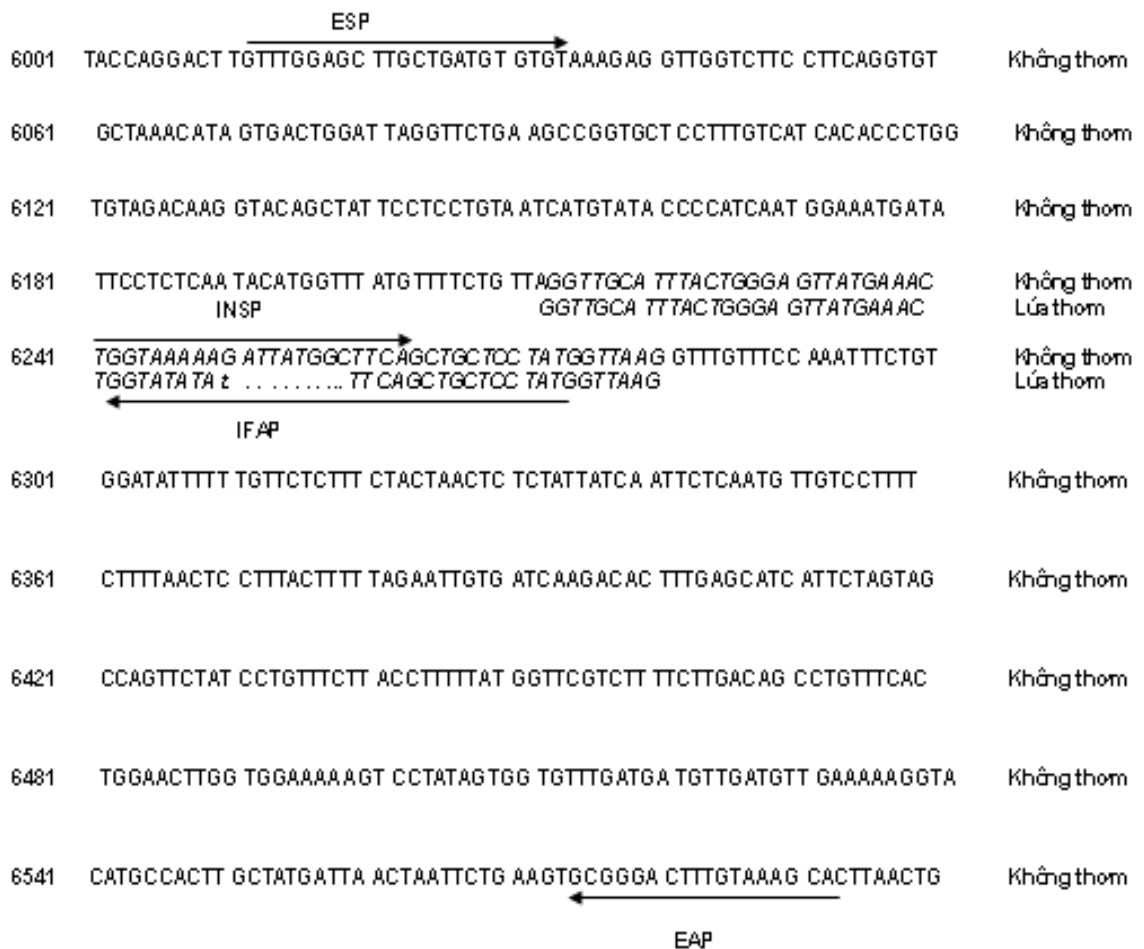
Một vài thành phần hoá học liên quan đến mùi thơm của lúa. Tuy nhiên 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) được xem là thành phần quan trọng nhất ảnh hưởng đến hương thơm của các loại lúa thơm phổ biến như Jasmine hay Basmati (Lorieux *et al.*, 1996), 2AP được tìm thấy trong tất cả các bộ phận của cây lúa, ngoại trừ rễ (Lorieux *et al.*, 1996), và nồng độ 2AP ở loại lúa thường thấp hơn 100 lần so với lúa thơm (Grosch và Schieberle, 1997).

Gen thể hiện tính trạng mùi thơm của lúa là một gen lặn, gen này bị mất đi 8 cặp baz và có ba trình tự của sự đa hình thái các nucleotid đơn (SNP) nằm trên exon thứ 7 của nhiễm sắc thể thứ 8 mã hoá cho một enzyme được cho là betain aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2) (Bradbury *et al.*, 2005). Hiện nay có rất nhiều phương pháp được sử dụng để đánh giá độ thơm của lúa như phương pháp cảm quan đã và đang được sử dụng để trợ giúp cho các nhà chọn giống trong việc chọn lọc lúa thơm, nhưng có rất nhiều hạn chế khi phải thử mùi với một số lượng lớn các loại mẫu (Bradbury *et al.*, 2005). Các phương pháp hóa học phổ biến liên quan đến việc ngửi mùi của mô lá hay hạt lúa sau khi đun nóng trong nước hoặc cho phản ứng với dung dịch KOH hay I₂-KI (Sood, 1978), không có tính chính xác cao. Phương pháp nhận diện 2AP bằng sắc ký khí cũng rất phổ biến nhưng các thí nghiệm đòi hỏi phải sử dụng một số lượng lớn mẫu và mất nhiều thời gian (Lorieux *et al.*, 1996; Widjaja *et al.*, 1996).

Nhiều marker phân tử như SNPs, SSR liên kết di truyền tính trạng mùi thơm và được xem như là những marker có nhiều ưu điểm, sử dụng marker này sẽ giúp phát hiện nhanh các giống lúa thơm, tiết kiệm thời gian, không tiêu tốn nhiều mẫu thí nghiệm và khá rẻ tiền (Cordeiro *et al.*, 2002). Tuy vậy, phương pháp này vẫn không thể dự đoán tính trạng mùi thơm ở mức chính xác 100%.

Gần đây, Bradbury *et al.*, 2005, đã thiết kế các đoạn mồi rất chuyên biệt (ESP, IFAP, INSP và EAP) dựa trên sự mất đi 8 cặp baz và ba trình tự của sự đa hình thái các nucleotid đơn (SNP) nằm trên exon thứ 7 của gen mã hoá cho enzyme betain aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2) (Hình 1), các cặp mồi này được sử dụng cùng một lúc trong một phản ứng PCR cho phép phân biệt chính xác giữa các cá thể thơm đồng hợp tử (với sản phẩm PCR gồm hai band trong đó có một band kích thước 257bp được khuếch đại từ allen thơm và một band 577bp), không thơm

đồng hợp tử (với sản phẩm PCR gồm hai band trong đó có một band kích thước 355bp được khuếch đại từ allen không thơm và một band 585bp) và không thơm dị hợp tử (với sản phẩm PCR gồm ba band, trong đó cùng hiện diện cả hai đoạn 257bp của allen thơm và 355bp của allen không thơm và một band 585bp). Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu sự ứng dụng của các cặp mồi ESP, IFAP, INSP và EAP phối hợp với phương pháp trích nhanh DNA đã giúp phát hiện nhanh các dòng lúa thơm đồng hợp tử.



Hình 1: Trình tự một đoạn gen BAD2 nằm trên nhiễm sắc thể thứ 8 của lúa

Vùng exon thứ 7 với các trình tự được in nghiêng. Tại exon 7 có chứa 3 SNP và một đoạn 8 cặp bp bị loại bỏ đối với lúa thơm, các mũi tên biểu thị cho các vùng bắt cặp với DNA khuôn của primer

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

22 mẫu lúa, bao gồm 20 giống lúa được cung cấp bởi Viện Nghiên Cứu Phát Triển Đồng Bằng Sông Cửu Long, 2 giống lúa được cung cấp bởi phòng Di truyền Thực vật, bộ môn Khoa học Sinh học Ứng dụng, Đại học Brussel. Các giống lúa này được cho nảy mầm và trồng ở nhà lưới cho đến khi lá lúa có chiều dài khoảng 10 cm thì được dùng để trích DNA.

2.2 Các đoạn môi đã sử dụng

ESP 5' TTGTTTGGAGCTTGCTGATG 3'

IFAP 5' CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC 3'

INSP 5' CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA 3'

EAP 5' AGTGCTTTACAAAGTCCCGC 3'

2.3 Phương pháp trích DNA

Bộ gen DNA đã được ly trích dựa theo phương pháp của Dellaporta *et al.*, (1983). Một phương pháp trích nhanh DNA với một lượng rất nhỏ mẫu lá (khoảng 10-20mg) của Edwards *et al.*, (1991) cũng đã được sử dụng nhưng có một vài thay đổi như sau: Mô được nghiền nhuyễn trong ống tube 1.5ml, cho vào 400 μ l dung dịch trích (200mM Tris HCl pH 7.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS), lắc đều, để ở nhiệt độ phòng khoảng 20 phút, ly tâm ở 13000rpm trong 2 phút, lấy phần dung dịch phía trên cho vào tube mới (khoảng 300 μ l). Thêm vào 300 μ l Isopropanol, lắc đều, để ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Ly tâm 13000rpm trong 5 phút. Phần tủa được làm khô và hòa tan trong 50 μ l TE 1X. Trữ mẫu DNA ở 4°C.

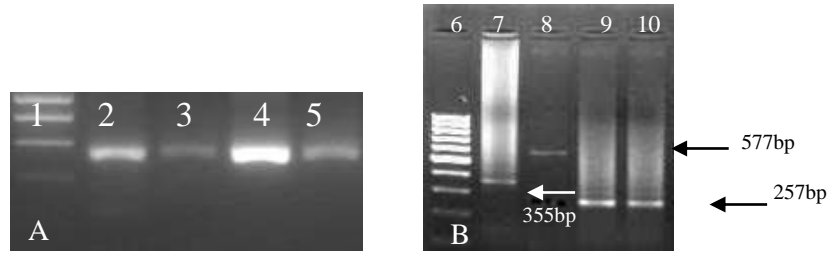
2.4 Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với các thành phần như sau: 50-100ng DNA lá lúa, 2,5 μ l dung dịch đệm PCR 10X (có chứa 3.0 mM MgCl₂), 1 μ l dNTP có 200 μ M mỗi loại, 1 μ l mỗi môi có nồng độ 2 μ M, 1unit của Taq DNA polymerase. Tổng thể tích trong một phản ứng là 25 μ l. Phản ứng khuếch đại được tiến hành ở 95°C trong 3 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: biến tính ở 95°C trong 10 giây, bắt cặp môi vào khuôn ở 59°C trong 10 giây, kéo dài ở 72°C trong 10 giây. Cuối cùng phản ứng được duy trì 72°C trong 5 phút. Sản phẩm sau khi khuếch đại được phân tích bằng điện di gel agarose 2% trong đệm TBE. PCR marker (Novagen) đã được sử dụng để ước lượng kích thước đoạn sản phẩm PCR.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự đặc hiệu của các cặp môi ESP, IFAP, INSP và EAP

Để kiểm tra sự đặc hiệu của các cặp môi, chúng tôi đã thực hiện phương pháp PCR với từng cặp môi riêng lẻ trong một phản ứng PCR. Qua phân tích các đoạn band được tách biệt trên gel agarose, kết quả cho thấy hai đoạn môi ESP và EAP bắt cặp tại các trình tự chung của cả hai giống lúa thơm và lúa không thơm, cặp môi này đã khuếch đại một đoạn 577 bp đối với lúa thơm và 585 bp đối với lúa không thơm. Hai đoạn môi ESP và IFAP sản xuất được một đoạn 257 bp đối với các dòng lúa thơm đồng hợp tử, trong khi hai đoạn môi INSP và EAP đã khuếch đại được một đoạn 355 bp đối với các dòng lúa không thơm đồng hợp tử (Hình 2).

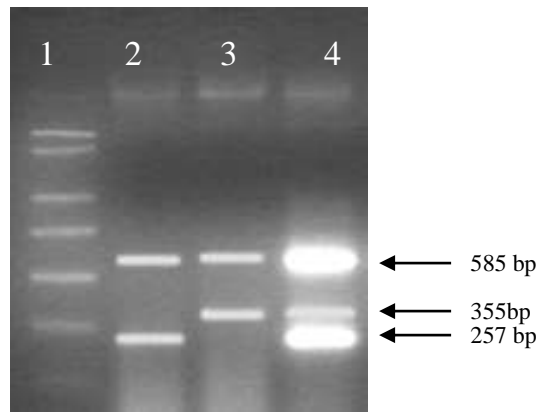


Hình 2: Sản phẩm PCR để kiểm tra sự đặc hiệu của các môi

Hình 2A sử dụng cặp môi ESP và EAP Giếng 1: thang chuẩn PCR (Novagen), giếng 2 và 4: band 577 bp của lúa thơm, giếng 3 và 5: band 585 bp từ lúa không thơm; Hình 2B, giếng 6: thang chuẩn PCR (Novagen), giếng 7: band 355 bp từ lúa không thơm sử dụng cặp môi: ESP + IFAP, giếng 8: 577bp từ lúa thơm với cặp môi ESP + EAP, giếng 9-10: 257 bp của lúa thơm với cặp môi INSP + EAP

3.2 Cải thiện qui trình PCR

Khi sử dụng bốn môi chuyên biệt nêu trên trong cùng một phản ứng PCR, áp dụng chương trình chạy PCR của Bradbury *et al.*, 2005, sản phẩm PCR được khuếch đại rất yếu, đặc biệt là mẫu lúa không thơm dị hợp tử không sản xuất được 03 band đặc trưng, để khắc phục điều này, chúng tôi đã có một số thay đổi trong các bước của chương trình chạy PCR (xem phần phương pháp), đồng thời bổ sung thêm BSA nồng độ 0.01 %, tăng lượng $MgCl_2$ lên 3.0 mM cho một phản ứng 25 μ l. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR đã có cải thiện tốt hơn (Hình 3).



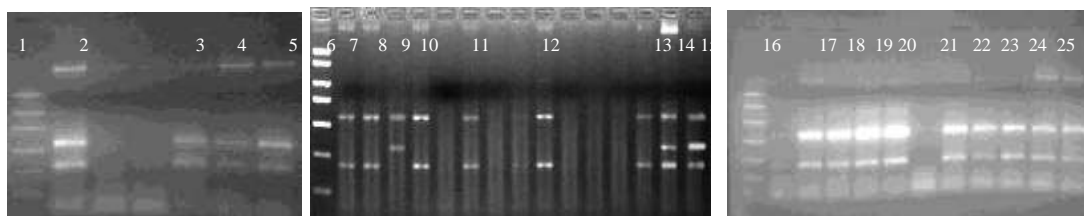
Hình 3: Sự kết hợp các đoạn môi trong một phản ứng PCR sản xuất các đoạn band kích thước khác nhau và được phân biệt rõ ràng qua điện di gel agarose 2%

Giếng 1: Thang chuẩn PCR (Novagen); giếng 2: Lúa thơm đồng hợp tử giống KDML, giếng 3: lúa không thơm đồng hợp tử Nipponbare, giếng 4: lúa không thơm dị hợp tử

Việc sử dụng phối hợp bốn môi trong cùng một phản ứng PCR đã giúp phân biệt rất rõ các cá thể lúa thơm đồng hợp tử (giếng 2, với một band 577 bp và một band 257 bp), lúa không thơm đồng hợp tử (giếng 3, với một band 585 bp và một band 355 bp), không thơm dị hợp tử, sản xuất ba band, với một band 585bp và đặc biệt cả hai đoạn 257 bp và 355 bp đều được sản xuất cùng một lúc (giếng 4).

3.3 Ứng dụng các cặp môi trong việc phát hiện kiểu gen thơm ở lúa

20 mẫu DNA lúa của Viện Nghiên Cứu Phát Triển Đồng Bằng Sông Cửu Long cung cấp được dùng trong thí nghiệm này. Kết quả được thể hiện trong Hình 4 và Bảng 1:



Hình 4: Độ nhạy của PCR trong phát hiện 20 dòng lúa

Band 585 bp và 577bp đại diện cho đối chứng dương của cả hai lúa thơm và không thơm, band 257 bp được khuếch đại từ alen thơm, band 355 bp đáp ứng cho lúa không thơm, nếu có cả hai đoạn 257 bp và 355 bp được sản xuất cùng một lúc chứng tỏ đó là lúa không thơm dị hợp tử. Giếng 1,6,và 16: Thang chuẩn PCR của Novagen, giếng 21: Đối chứng âm (nước), các giếng còn lại xem chú thích của bảng 1

Bảng 1: Kết quả xác định tính thơm của các dòng lúa qua khuếch đại PCR

Giống lúa	Thơm đồng hợp tử	Không thơm đồng hợp tử	Không thơm dị hợp tử
1/ IR 28 (giếng 2)	-	+	-
2/ IR 29 (giếng 3)	-	+	-
3/ Đốc Phụng (giếng 4)	-	+	-
4/ Pokhali (giếng 5)	-	+	-
5/ Jasmine (giếng 7-8)	+	-	-
6/ VND-95-20 (giếng 9)	-	+	-
7/ KDML (giếng 10)	+	-	-
8/ MTL 578 (giếng 11)	+	-	-
9/ MTL 426 (giếng 12)	+	-	-
10/ MTL 458 (giếng 13)	+	-	-
11/ MTL 579 (giếng 14)		+	
12/ MTL 584 (giếng 15, 26)			+
13/ MTL 495 (giếng 17)	+	-	-
14/ MTL 513 (giếng 18)	+	-	-
15/ MTL 514 (giếng 19)	+	-	-
16/ MTL 540 (giếng 20)	+	-	-
17/ MTL 548 (giếng 22)	+	-	-
18/ MTL 549 (giếng 23)	+	-	-
19/ MTL 555 (giếng 24)	+	-	-
20/ MTL 559 (giếng 25)	+	-	-

+ Sản phẩm PCR có khuếch đại

- Sản phẩm PCR không khuếch đại

Phương pháp trích nhanh DNA được miêu tả bởi Edwards *et al.*,1991, giúp tiết kiệm thời gian đồng thời chỉ sử dụng một lượng rất nhỏ DNA nhưng vẫn đủ để thực hiện thành công một phản ứng PCR, cơ bản dựa trên phương pháp này nhưng chúng tôi có thay đổi một vài bước để làm qui trình đơn giản hơn và rút ngắn thời gian ly trích DNA hơn (xem phần phương pháp) và lượng DNA vẫn đạt tiêu chuẩn cho sự khảo sát PCR và kết quả cũng cho phép phân biệt giữa các dòng lúa thơm và không thơm.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

- Gen qui định tính trạng mùi thơm của lúa là một gen lặn. Do đó ở cây lúa chỉ khi nào có gen thơm đồng hợp tử thì hạt lúa mới có mùi thơm. Các cặp mồi ESP, IFAP, INSP và EAP có tính chuyên biệt rất cao và rất hữu dụng để phát hiện nhanh các kiểu gen thơm của lúa.
- Việc bổ sung BSA đồng thời tăng lượng MgCl₂ đã cải thiện qui trình chạy PCR
- Sử dụng phương pháp trích nhanh DNA kết hợp sử dụng các cặp mồi trong cùng một phản ứng PCR giúp phát hiện nhanh kiểu gen thơm của lúa, giảm chi phí, rút ngắn được thời gian chọn tạo.

4.2 Đề nghị

Bằng phương pháp PCR cùng với việc sử dụng các cặp mồi chuyên biệt, chúng ta có thể xác định được dòng lúa thơm đồng hợp tử ngay từ thế hệ F₂. Do đó, chúng ta có thể loại bỏ các dòng không thơm đồng hợp tử, hoặc nhận diện rõ các dòng lúa có mang cả hai alen thơm và alen không thơm (hay còn gọi là lúa không thơm dị hợp tử). Việc hội nhập WTO sẽ có nhiều loại gạo thơm của Thái Lan, Ấn Độ tràn vào Việt Nam, nên mục tiêu lớn đặt ra cho Việt Nam là phải có thêm nhiều loại gạo thơm ngon. Rút ngắn thời gian chọn tạo giống lúa chất lượng cao là một trong những vấn đề cấp bách đối với các nhà chọn giống hiện nay, ứng dụng kỹ thuật PCR và sử dụng các cặp mồi chuyên biệt này cần được phát triển rộng rãi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q. Jin and D.L.E. Waters, 2005. The gene for fragrance in rice. *Plant Bio. J.* 3: 363-370.
- Bradbury, L.M.T., R.J. Henry, Q. Jin, R. F. Reinke and D.L.E. Waters, 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Molecular Breed. J.* 16: 279-283
- Cordeiro G.M., M.J. Christopher, R.J. Henry and R.F. Reinke, 2002. Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence. *Mol. Breed.* 9: 245–250.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks, 1983. Isolation of DNA from higher plants. *PMB Reporter* 4: 19-21.
- Edwards K., C. Johnstone, and C. Thompson, 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* March 25; 19(6): 1349
- Lorieux M., M. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni and A. Ghesquiere, 1996. Aroma in rice: Genetic analysis of a quantitative trait. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1145–1151.
- Grosch W., and P. Schieberle, 1997. Flavor of cereal products – a review. *Cereal Chem* 74:91–97
- Reinke R.F., L.A. Welsh, J.E. Reece, L.G. Lewin and A.B. Blakeney, 1991. Procedures for quality selection of aromatic rice varieties. *Int. Rice Res. Newslett.* 16: 10–11.
- Sood B.C. and E.A. Sidiq, 1978. A rapid technique for scent determination in rice. *Indian J. Genetic Plant Breed.* 38: 268–271.
- Widjaja R., J.D. Craske and M. Wootton, 1996. Comparative studies on volatile components of non-fragrant and fragrant rices. *J. Sci. Food Agric.* 70: 151–161.
- Yoshihashi, T. 2002. Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. *J. Food Sci.* 67: 619–622.