

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ BIẾN ĐIỂM G/T TẠI ĐẦU 5' INTRON 1 GEN *Waxy* ĐẾN HÀM LƯỢNG AMYLOSE VÀ ĐỘ BỀN GEL Ở MỘT SỐ MẪU GIỐNG LÚA VIỆT NAM

Nguyễn Quốc Trung^{1*}, Lưu Thị Vân², Nguyễn Chính Việt³, Tống Văn Hải¹

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Đại học ở Düsseldorf, Đức

³Trung tâm Giống Nông lâm nghiệp, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Bình Phước

*Tác giả liên hệ: nqtrung@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.06.2020

Ngày chấp nhận đăng: 21.01.2021

TÓM TẮT

Chất lượng nấu nướng và ăn uống của gạo bao gồm hàm lượng amylose (AC) và độ gèn gel (GC) là các tiêu chí quan trọng quyết định giá thành gạo xuất khẩu của Việt Nam. Các đặc tính này chủ yếu phụ thuộc vào thành phần amylose trong nội nhũ hạt gạo và do gen *Waxy* quy định. Mục đích của nghiên cứu này là xác định ảnh hưởng của đột biến điểm G/T ở gen *Waxy* với AC và GT ở một số mẫu giống lúa của Việt Nam. Nghiên cứu tiến hành đánh giá trên 64 mẫu giống lúa thu; kết quả phân tích được 26 mẫu giống có AC cao, 5 mẫu giống có AC trung bình; 20 mẫu giống có AC thấp; 2 mẫu giống có AC rất thấp và 11 mẫu giống có AC xếp vào nhóm lúa nếp. Kết quả đánh giá GC cũng phân loại mẫu giống gồm 25 mẫu giống rất cứng; 1 mẫu giống cứng; 13 mẫu giống trung bình; 11 mẫu giống mềm và 14 mẫu giống rất mềm. Phân tích sử dụng chỉ thị CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) đã phát hiện 31 mẫu giống mang SNP loại G tương ứng với alen Wx^a và 33 mẫu giống mang SNP loại T tương ứng với alen Wx^b . So sánh kết quả xác định kiểu gen và kiểu hình cho thấy chỉ thị PCR-Accl xác định alen Wx^b của gen *Waxy* có độ chính xác cao cần ứng dụng trong công tác chọn tạo giống lúa có hàm lượng amylose trung bình chất lượng cao.

Từ khóa: Gen *Waxy*, hàm lượng amylose, độ bền gel, chỉ thị CAPS, đa hình nucleotide đơn.

Influence of Single Nucleotide Polymorphism G/T at 5'-Splice Site of Intron 1 of *Waxy* Gene on Amylose Content and Gel Consistency in Vietnamese Rice

ABSTRACT

The cooking and eating quality of rice, which are defined by amylose content (AC) and gel consistency (GC), are important criteria determining the export price of Vietnamese rice. These properties mainly depend on the amylose content in rice grain endosperm and are regulated by the *Waxy* gene. This study aimed to determine the effect of point mutation G/T in the first intron of *Waxy* gene with AC and GT traits in Vietnamese rice accessions. The AC evaluation in 64 accessions resulted from 26 accessions with high AC and 5 accessions with average AC; 20 accessions with low AC; 2 accessions had very low AC and 11 accessions of glutinous rice, respectively. The GC evaluation results classified the materials into 5 groups including: very hard (25 accessions); hard (1 accession); medium (13 accessions); soft (11 accessions) and very soft (14 accessions). Using CAPS markers, there were 31 samples possessed SNP G and Wx^a alleles and 33 samples possessed SNP T and Wx^b alleles. Comparison of genotypic and phenotypic results showed that the PCR-Accl has high accuracy for detection of *Waxy* genotype and needed to apply in breeding programs for quality rice.

Keywords: *Waxy* gene, amylose content, gel consistency, CAPS marker, single nucleotide polymorphism.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo là cây trồng chính cung cấp lương thực cho hơn một nửa dân số thế giới trong đó có

Việt Nam. Trong hơn 1 thập kỷ qua, Việt Nam đã trở thành một trong những nước xuất khẩu gạo lớn nhất thế giới với 4,58 triệu tấn năm 2007 đến 6,37 triệu tấn năm 2019. Tuy nhiên giá

Ảnh hưởng của đột biến điểm G/T tại đầu 5' intron 1 gen *Waxy* đến hàm lượng amylose và độ bền gel ở một số mẫu giống lúa Việt Nam

thành gạo xuất khẩu của nước ta luôn thấp hơn so với các nước khác như Mỹ, Thái Lan, nguyên nhân chính là do chất lượng gạo còn thấp. Việc duy trì và nâng cao hiệu quả xuất khẩu gạo luôn là bài toán cần được quan tâm giải quyết để nâng tầm thương hiệu gạo Việt Nam.

Chất lượng nấu nướng và ăn uống của gạo là một trong những tiêu chí quan trọng để xác định giá thành gạo xuất khẩu. Các đặc tính này chủ yếu phụ thuộc vào thành phần amylose trong nội nhũ hạt gạo. Theo phân loại IRRI, 1988, dựa vào hàm lượng amylose trong nội nhũ, các giống lúa được phân thành hai nhóm gạo nếp (0-2%) và gạo tẻ (> 2%). Nhóm gạo tẻ chia làm 3 phân nhóm: hàm lượng thấp (AC = 10-20%), hàm lượng trung bình (AC = 20-25%), hàm lượng cao (AC > 25%). Các mẫu giống lúa có hàm lượng amylose thấp cho cơm dẻo, các giống có hàm lượng amylose trung bình cho cơm mềm và các giống có hàm lượng amylose cao thì cho cơm cứng hoặc rất cứng. Trong cùng 1 nhóm có hàm lượng amylose cao (> 25%), mẫu giống nào có độ bền gel mềm thì giống lúa đó có cơm mềm hơn và được ưa chuộng nhiều hơn (Khush & cs., 2003). Độ bền gel theo các dạng rất mềm, mềm, trung bình, cứng và rất cứng.

Các nghiên cứu đã xác định GBSS là enzyme chính quyết định đến trình tổng hợp quyết định amylose trong nội nhũ hạt (Hirano & cs., 1998). GBSS được mã hoá bởi gene *Waxy* (*Wx*) nằm trên nhiễm sắc thể số 6. Wang & cs., 1990 đã xác định trình tự của gene *Waxy* trên giống lúa *O. sativa* (*Japonica* Heng-feng) cho thấy gen dài 5499bp gồm 14 exon và 13 intron, trong đó locus *Wx* có 2 alen là *Wx^a* và *Wx^b*.

So sánh trình tự giữa *Wx^a* với *Wx^b* cho thấy có xuất hiện đột biến thay thế 1 nucleotide G (ở *Wx^a* là AGGTATA) bằng T (ở *Wx^b* là AGTTATA) tại đầu 5' của intron 1, kết quả đã làm giảm hiệu quả cắt bỏ intron 1 của tiền mARN và làm xuất hiện stop codon (TGA) sớm tại exon 7 (Isshiki & cs., 2001) trong phân tử mARN trưởng thành và giảm hoạt tính GBSS dẫn đến hàm lượng amylose trong nội nhũ giảm. Dựa trên cơ sở này, Liu & cs. (2006) đã thiết kế chỉ thị phân tử CAPS dựa trên phương pháp PCR kết hợp với enzyme giới hạn *AccI* (PCR-*AccI*) để

phát hiện đột biến G/T để phân biệt alen *Wx^a* và *Wx^b* của gen *Waxy*.

Để thúc đẩy công tác chọn tạo các giống lúa chất lượng cao có hàm lượng amylose trung bình, nghiên cứu này tiến hành phân tích mối liên hệ giữa đa hình nucleotide đơn (SNP) G/T ở gen *Waxy* với hàm lượng amylose và độ bền gel ở các mẫu giống lúa của Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở để ứng dụng chỉ thị CAPS PCR-*AccI* đặc hiệu trong chương trình chọn tạo giống lúa chất lượng cao.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu gồm 64 mẫu giống lúa thu thập từ nhiều nguồn khác nhau được bảo tồn và lưu giữ tại Trung tâm Bảo tồn và Phát triển nguồn gen cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định hàm lượng amylose (Seko, 2003): hạt lúa đã được bóc vỏ, làm trắng, nghiền nhỏ sau đó cân 100 mg bột gạo đã nghiền mịn và bổ sung 1ml Ethanol 95%, 9ml NaOH 1N. Hỗn hợp đun cách thủy ở 100°C trong 10 phút và định mức đến 100ml. Dung dịch hồ hóa được hút 5ml ra ống nghiệm mới và cho thêm 1ml CH₃COOH 1M và 2ml dung dịch Iod và định mức đến 100ml. Mẫu được ủ ở 30°C trong 20 phút rồi đo độ hấp thụ quang bước sóng 620nm. Các mẫu giống được đo lặp lại 3 lần và tính hàm lượng amylose dựa trên bảng qui đổi. Các mẫu giống được phân nhóm dựa trên hàm lượng amylose theo Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế IRRI (1988): Nếp (0-2%), rất thấp (3-9), thấp (10-19%), trung bình (20-25%), cao (> 25%).

Phân tích độ bền gel (gel consistency): 100g bột gạo nghiền mịn trong ống nghiệm được trọng đều bằng cách lắc nhẹ với 0,2ml Ethanol 95% có chứa 0,025% thymol blue, 2ml KOH 0,2N. Ống nghiệm chứa hỗn hợp được đun cách thủy 100°C trong 8 phút, sau đó lấy ra và để yên 5 phút ở nhiệt độ phòng, tiến hành làm lạnh bằng cách ngâm trong nước đá 20 phút. Ống

nghiệm được đặt nằm ngang để gel chảy từ từ trong 1 giờ đến khi gel đặc lại và đo chiều dài gel. Dựa vào chiều dài gel, độ bền gel của mẫu giống được phân cấp theo thang điểm của IRRI (1998): rất mềm (81-100cm), mềm (61-80cm), trung bình (41-60cm), cứng (35-40cm) và rất cứng (< 35cm).

Tách chiết ADN theo phương pháp của Doyle & Doyle (1990): 2cm mẫu lá non thu vào buổi sáng được cắt nhỏ vào cối, nghiền với 400 μ l đệm chiết (50mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25mM EDTA, 300mM NaCl và 1% SDS). Bổ sung thêm 400 μ l dung dịch chiết vào cối rồi chuyển sang ống eppendorf mới. Bước tiếp theo thêm 700 μ l dung dịch Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (tỉ lệ thể tích 25:24:1) và ly tâm 5 phút ở 13.000 vòng/phút. Lớp dung dịch đồng nhất phía trên (600 μ l) được hút chuyển sang ống mới và bổ sung 600 μ l Chloroform: Isoalylalcohol (24:1) và ly tâm 5 phút ở 13.000 vòng/phút. Lớp dung dịch phía trên (300 μ l) được hút chuyển sang ống mới và bổ sung 600 μ l ethanol để kết tủa ADN. Hỗn hợp được ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Kết tủa ADN được thu bằng cách đổ bỏ dung dịch và để ethanol bay hơi ở nhiệt độ phòng. Kết quả hòa tan trong 50 μ l đệm TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0).

Xác định alen của gen *Waxy* bằng chỉ thị PCR-*AccI* - CAPS marker (Cai, 2002): đoạn gene *Waxy* có chứa đột biến G thành T tại điểm cắt nối giữa Exon1 và Intron1 được nhân lên bằng cặp môi: *Wx-F*: 5'-gcttcacttctctgttg-3' và *Wx-R*: 5'-atgatttaacgagttgaa-3'. Sản phẩm PCR dài 530 bp được ủ với enzyme giới hạn *AccI* để cắt tại điểm đột biến. Nếu giống mang gene *Wx^a* (G) sẽ bị cắt hoàn toàn tạo thành 2 vạch băng dài 405bp và 125bp. Nếu có gene *Wx^b* (T) thì không bị phân cắt chỉ cho 1 băng dài 480bp.

Thành phần phản ứng PCR với thể tích 25 μ l gồm: 0,2 μ l Taq ADN Polymerase, 2,5 μ l Taq buffer 10X, 2 μ l MgCl₂ 25 mM, 0,5 μ l dNTP 10 mM, 2,5 μ l *Wx-F* và *Wx-R* primer, 13,8 μ l H₂O và 1 μ l ADN tổng số. Chu kỳ nhiệt: 95°C trong 3' và 34 chu kỳ 94°-45", 62°C-45", 72°C-45" và 72" trong 10 phút.

Xử lý bằng enzyme giới hạn: sản phẩm PCR sau khi kiểm tra được ủ ở 37°C trong 2,5 giờ với enzyme giới hạn theo qui trình của nhà sản xuất, trong thể tích 15 μ l bao gồm: 1,5 μ l buffer B, 0,25 μ l enzyme *AccI* 10 unit/ μ l, 8 μ l nước cất vô trùng và 5 μ l sản phẩm PCR.

Phân tích tương quan giữa kiểu gen và hàm lượng amylose: kiểu gen tương ứng với đột biến điểm G/T được xác định được đánh giá tương quan với hàm lượng amylose trung bình của 64 mẫu giống bằng phần mềm Excel để phân tích sự ảnh hưởng của kiểu gen lên kiểu hình.

Giải trình tự gen: đoạn gen chứa vị trí đột biến G/T được nhân dòng bằng cặp môi *WxF*&*WxR*, sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại Công ty IDT, Singapore. Vị trí cắt của enzyme giới hạn xác định bằng ứng dụng NEBcutter 2.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá hàm lượng amylose trong gạo của các mẫu giống

Dựa trên giá trị độ hấp thụ quang (OD) ở bước sóng 620nm, tỉ lệ amylose trong bột gạo được xác định dựa trên bảng qui đổi. Kết thu được 26 mẫu giống có hàm lượng amylose cao, mẫu giống có hàm lượng amylose cao nhất 36,85% là SS; 5 mẫu giống có hàm lượng trung bình; 20 mẫu giống có hàm lượng thấp; 2 mẫu giống có hàm lượng rất thấp và 11 mẫu giống nhóm nếp có hàm lượng amylose 0%. Như vậy, 64 mẫu giống nghiên cứu có hàm lượng amylose thuộc cả 5 phân nhóm, đây là nguồn vật liệu đa dạng và thích hợp để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo về thành phần tinh bột trong gạo.

3.2. Kết quả đánh giá độ bền gel của gạo ở các mẫu giống

Độ bền gel là chỉ tiêu quan trọng ảnh hưởng tới thời gian nấu cơm. Độ bền gel được quyết định bởi hàm lượng amylopectin, đây là thành phần có tỉ lệ nghịch với hàm lượng amylose (Juliano, 2007). Do đó, các mẫu giống có hàm lượng amylose cao thì độ dài gel ngắn và độ bền gel thuộc loại cứng. Kết quả khảo sát độ bền gel

Ảnh hưởng của đột biến điểm G/T tại đầu 5' intron 1 gen *Waxy* đến hàm lượng amylose và độ bền gel ở một số mẫu giống lúa Việt Nam

thu được mẫu giống có chiều dài gel ngắn nhất 22mm là 21-13-1A và dài nhất 90mm gồm 9 giống 10585, 10678, 10681, 10693, 10696, 10471cc, BM9603, N56 và Nếp Lào.

Dựa theo tiêu chuẩn phân nhóm độ bền gel của IRRI, 64 mẫu giống chia thành 5 nhóm trong đó: 25 mẫu giống thuộc nhóm rất cứng (22-34mm); 1 mẫu giống thuộc nhóm cứng; 13 mẫu giống thuộc nhóm trung bình (43-60mm); 11 mẫu giống thuộc nhóm mềm (61-75mm) và 14 mẫu giống thuộc nhóm rất mềm (81-90mm).

3.3. Kết quả xác định alen Wx^a và Wx^b của các mẫu giống

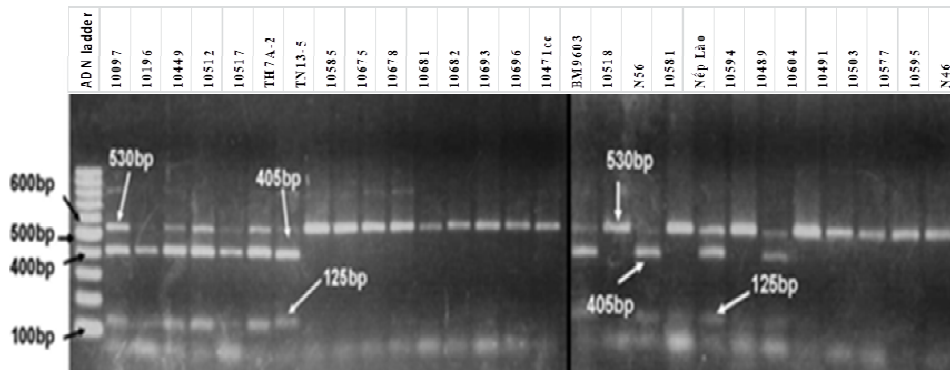
Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi WxF & WxR có kích thước 530bp được kiểm tra trên gel agarose 2% so sánh với ADN ladder 100bp, sau đó được cắt với enzyme giới hạn *AccI* để xác định alen Wx^a và Wx^b dựa trên số lượng và kích thước các băng trên ảnh điện di. Kết quả xác định được 31 mẫu giống mang SNP G tương

ứng với alen Wx^a và 33 mẫu giống mang SNP T tương ứng với alen Wx^b (Bảng 1).

Để kiểm tra lại vị trí đột biến G/T, chúng tôi lựa chọn mẫu giống BM9603 để nhân đoạn ADN mang vị trí cắt của enzyme *AccI* giữa 2 cặp mồi WxF & WxR . Kết quả giải trình tự sau khi loại nhiễu thu được trình tự 460 nucleotide như hình 3, trong đó mẫu giống BM9603 mang SNP loại T tương ứng với Wx^b .

3.4. Đánh giá ảnh hưởng của đột biến điểm G/T đến hàm lượng amylose và độ bền gel

Kết quả đánh giá chất lượng nấu nướng bao gồm hàm lượng amylose và độ bền gel cho thấy sự tương quan rõ rệt giữa 2 tính trạng này. Các mẫu giống của hàm lượng amylose thuộc nhóm cao có độ bền gel từ cứng đến rất cứng, các giống trung bình và thấp có độ bền gel từ trung bình đến rất mềm, 100% các giống nếp có hàm lượng amylose 0% và độ bền gel rất mềm (Bảng 1).



Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose 2% đoạn ADN sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi WxF & WxR sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *AccI*

```

1   TTCTGATGTTTCATCAGGAAAGAACATCTGCAAGGATACATATATGTTATA
53  TAATTCCTTTGTTCCCTCTTATTAGATACGATCACATGCATCTTACATTG
107 CTCGTTCTTTCTTACAAAGTCATCATACTGCTAATTGACTGTATAGTGT
161 GTTAGGGCTGGAAATTAATTAATTAATTAATTGACTTGCCAAGATCCATATA
214 TATGTCCTGATATTAATATCTTCAAGTTCGTTATGTATTGGTTAGGCTGATCAT
268 GTTTATTCTAGAGTCTAGAGAACACACCCAGGGTTATTCCATGCTAGCTCC
321 ATCATAGTATGGTGGGCTATGCTGACCTAGATTTAGAAGTCTCACTCTTCT
374 AACTTATTTGATATTAGATCATATACTAATATATTAGCGTCTTTTTTATTCT
428 AGAGTCTAATCTGTGTTCAACTCTCGTTATATTATAGC

```

Hình 2. Trình tự đoạn ADN trong gen *Waxy* của mẫu giống BM9603

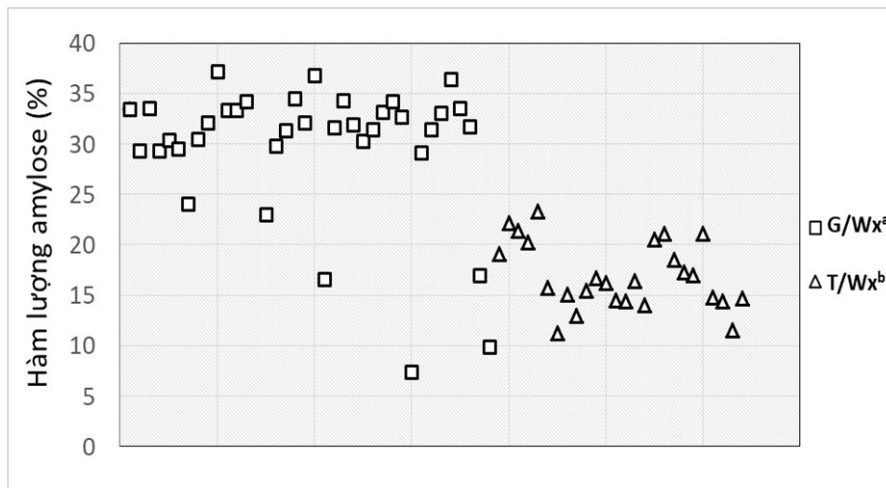
Bảng 1. Kết quả đánh giá độ bền gel, hàm lượng amylose và kiểu gen Wx^a/Wx^b của 64 mẫu giống

Số thứ tự	Mẫu giống	Chiều dài gel (mm)	Độ bền gel	AC (%)	Nhóm	$Alen$	Số thứ tự	Mẫu giống	Chiều dài gel (mm)	Độ bền gel	AC (%)	Nhóm	$Alen$
1	10097	29	Rất cứng	33,1	Cao	G/Wx^a	29	10675	82	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
2	10196	29	Rất cứng	31,4	Cao	G/Wx^a	30	10678	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
6	10449	28	Rất cứng	29,2	Cao	G/Wx^a	31	10681	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
11	10512	26	Rất cứng	32,7	Cao	G/Wx^a	32	10682	84	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
12	10517	29	Rất cứng	34,2	Cao	G/Wx^a	34	10693	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
13	10518	30	Rất cứng	33,2	Cao	G/Wx^a	36	10696	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
16	10581	28	Rất cứng	31,5	Cao	G/Wx^a	39	10471cc	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
18	10594	32	Rất cứng	30,3	Cao	G/Wx^a	54	BM9603	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
22	10604	29	Rất cứng	31,9	Cao	G/Wx^a	59	N56	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
23	10605	30	Rất cứng	34,3	Cao	G/Wx^a	60	Nếp Lào	90	Rất mềm	0,0	Nếp	T/Wx^b
38	10122-1	28	Rất cứng	34,2	Cao	G/Wx^a	7	10489	81	Rất mềm	11,6	Thấp	T/Wx^b
41	128T-2B-2	34	Rất cứng	33,4	Cao	G/Wx^a	8	10491	48	TB	14,4	Thấp	T/Wx^b
42	21-1-1	40	Cứng	33,4	Cao	G/Wx^a	9	10503	61	Mềm	14,8	Thấp	T/Wx^b
45	21-12-3-1	30	Rất cứng	37,2	Cao	G/Wx^a	15	10577	51	TB	17,0	Thấp	T/Wx^b
46	21-12-3-2	31	Rất cứng	32,1	Cao	G/Wx^a	19	10595	52	TB	17,3	Thấp	T/Wx^b
47	21-13-1A	22	Rất cứng	30,5	Cao	G/Wx^a	20	10596	49	TB	18,5	Thấp	T/Wx^b
55	N18	34	Rất cứng	31,8	Cao	G/Wx^a	24	10606	65	Mềm	14,1	Thấp	T/Wx^b
56	N19	29	Rất cứng	33,6	Cao	G/Wx^a	25	10619	48	TB	16,4	Thấp	T/Wx^b
58	N50	34	Rất cứng	36,4	Cao	G/Wx^a	27	10672	78	Mềm	14,7	Thấp	T/Wx^b
61	SC1(1)	30	Rất cứng	31,6	Cao	G/Wx^a	40	10495-1	60	TB	14,4	Thấp	T/Wx^b
63	SS	27	Rất cứng	36,9	Cao	G/Wx^a	43	21-1-1-3	82	Rất mềm	14,5	Thấp	T/Wx^b
64	SS-1	28	Rất cứng	32,1	Cao	G/Wx^a	44	21-1-2	51	TB	16,3	Thấp	T/Wx^b
65	SS-2	34	Rất cứng	34,6	Cao	G/Wx^a	48	21-8-16-2	71	Mềm	16,7	Thấp	T/Wx^b
66	SS-2'	30	Rất cứng	31,4	Cao	G/Wx^a	49	21-8-1A	52	TB	15,5	Thấp	T/Wx^b

Ảnh hưởng của đột biến điểm G/T tại đầu 5' intron 1 gen *Waxy* đến hàm lượng amylose và độ bền gel ở một số mẫu giống lúa Việt Nam

Số thứ tự	Mẫu giống	Chiều dài gel (mm)	Độ bền gel	AC (%)	Nhóm	<i>Alen</i>	Số thứ tự	Mẫu giống	Chiều dài gel (mm)	Độ bền gel	AC (%)	Nhóm	<i>Alen</i>
67	TH7A-2	29	Rất cứng	29,8	Cao	<i>G/Wx^a</i>	50	21-8-1B	58	TB	13,0	Thấp	<i>T/Wx^b</i>
68	TN13-5	33	Rất cứng	33,5	Cao	<i>G/Wx^a</i>	51	21-8-1B-1	51	TB	15,1	Thấp	<i>T/Wx^b</i>
10	10504	66	Mềm	7,4	Rất thấp	<i>G/Wx^a</i>	52	21-8-2A	59	TB	11,3	Thấp	<i>T/Wx^b</i>
26	10666	82	Rất mềm	9,9	Rất thấp	<i>G/Wx^a</i>	53	21-8-2B-2	63	Mềm	15,8	Thấp	<i>T/Wx^b</i>
28	10674	62	Mềm	17,0	Thấp	<i>G/Wx^a</i>	14	10574	72	Mềm	21,1	TB	<i>T/Wx^b</i>
62	SC2	43	TB	16,6	Thấp	<i>G/Wx^a</i>	21	10600	62	Mềm	21,1	TB	<i>T/Wx^b</i>
35	10694	75	Mềm	23,0	TB	<i>G/Wx^a</i>	33	10689	64	Mềm	20,5	TB	<i>T/Wx^b</i>
17	10585	90	Rất mềm	0,0	Nếp	<i>T/Wx^b</i>	57	N46	45	TB	22,2	TB	<i>T/Wx^b</i>

Ghi chú: *TB*_trung bình, *AC*_hàm lượng amylose.



Hình 3. Tương quan giữa kiểu gen Wx^a/Wx^b và hàm lượng amylose ở 64 mẫu giống

Kết hợp kết quả đánh giá kiểu gen và hàm lượng amylose trên hình 3, 100% mẫu giống mang alen Wx^b có hàm lượng amylose từ trung bình (4 mẫu giống) đến thấp (18 mẫu giống) và nhóm nếp (11 mẫu giống). Như vậy, có thể xác định đột biến G→T đã làm giảm đáng kể hàm lượng amylose ở các mẫu giống lúa Việt Nam. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây về SNP tại vị trí cắt giữa exon 1 và intron1 (Cai & cs. 1998), đột biến G→T dẫn đến sự cắt không đầy đủ intron 1 làm xuất hiện mã kết thúc ở exon 2 và exon7 (Isshiki & cs., 2001). Enzyme GBSS được hình thành không có đầy đủ chức năng tổng hợp amylose ban đầu dẫn tới hàm lượng trong nội nhũ thấp. Các mẫu giống nhóm nếp có hàm lượng amylose ở mức 0% có thể giải thích trong trường hợp này, enzyme GBSS mất hoàn toàn chức năng tổng hợp amylose, trong khi các mẫu giống trong nhóm Wx^b khác có hàm lượng amylose ở mức trung bình. Sự khác nhau giữa 2 nhóm mang alen Wx^b này có thể cần được nghiên cứu kỹ hơn về những trình tự nucleotide khác cũng liên quan đến hoạt tính của GBSS.

Trong 31 mẫu giống mang alen Wx^a có 26 mẫu giống có hàm lượng amylose cao (từ 29,2-36,9%). Các mẫu giống có trình tự AAGGTATAC ở đầu 5' của intron 1 giúp quá trình điều hòa sau phiên mã, cắt bỏ intron được bình thường (Isshiki & cs., 2001), enzyme GBSS hoạt động tổng hợp làm tăng hàm lượng

amylose trong nội nhũ hạt gạo. Tuy nhiên, có 5 mẫu giống (chiếm 16,1%) mang alen Wx^a nhưng hàm lượng amylose thuộc nhóm trung bình (10694 - 23%), thấp (10674 - 17%; SC2 - 16,6%) và rất thấp (10504 - 7,4%; 10666 - 9,9%), tương ứng độ bền gel của nhóm này từ trung bình đến rất mềm. Mặc dù không xảy ra đột biến tại intron 1 nhưng enzyme GBSS của các mẫu giống này có thể không hoạt động với chức năng bình thường. Một số công bố đã chỉ ra những đột biến tại vị trí khác cũng ảnh hưởng tới chức năng của enzyme này như tại exon 4 (Mikami & cs., 2008), exon 6 (Chen & cs. 2008) và exon 10 (Mikami & cs., 2008). Đặc biệt, đột biến tại exon 10 được một số nghiên cứu liên quan trực tiếp đến độ bền gel (Tran & cs., 2011).

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả đánh giá 64 mẫu giống cho thấy ảnh hưởng rõ ràng của đột biến G→T tại đầu 5' của Intron1 gen *Waxy*, những giống các mẫu giống mang alen Wx^a (SNP loại T) có hàm lượng amylose trung bình từ 11,6 đến 22,2%.

Kết quả nghiên cứu cũng xác định khả năng ứng dụng của chỉ thị PCR-*AccI* trong xác định alen Wx^a và Wx^b trong công tác chọn giống lúa.

Một số mẫu giống mang Wx^b (SNP loại G) nhưng có hàm lượng amylose trung bình đến rất thấp cần có những nghiên cứu đầy đủ hơn về trình tự gen *Waxy* cũng như hoạt tính của

Ảnh hưởng của đột biến điểm G/T tại đầu 5' intron 1 gen *Waxy* đến hàm lượng amylose và độ bền gel ở một số mẫu giống lúa Việt Nam

enzyme GBSS để làm rõ các cơ chế liên quan đến hàm lượng amylose cuối cùng trong nội nhũ gạo.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Trung tâm Bảo tồn và Phát triển nguồn gen cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã cung cấp mẫu lá và mẫu thóc của 64 mẫu giống trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cai X.L., Liu Q.Q., Tang S.Z., Gu M.H. & Wang Z.Y. (2002). Development of a molecular marker for screening the rice cultivars with intermediate amylose content in *Oryza sativa* subsp. *indica*. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* 28: 137-144
- 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 50 UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant Journal* 14: 459-465
- Chen M.H., Bergman C.J., Pinson S.R.M. & Fjellstrom R. (2008). WaxyWaxy gene haplotypes: associations with pasting properties in an international rice germplasm collection. *J Cereal Sci.* 48:781-788
- Doyle J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12: 13-15.
- Hirano H.Y., Eiguchi M. & Sano Y. (1998). A single base change altered the regulation of the waxy gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice. *Mol. Biol. Evol.* 15(8): 978-987.
- International Rice Research Institute (1988). International Rice Testing Program: Standard Evaluation System for Rice, 3rd ed., P.O. Box 933, Manila, Philippines.
- Issihiki M., Morino K., Nakajima M., Okagaki R.J., Wessler S.R., Izawa T. & Shimamoto K. (1998). A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 50 splice site of the first intron. *Plant Journal* 15: 133-138
- Juliano B. (2007). *Rice Chemistry and Quality*. Muñoz, Nueva Ecija, Philippines: Philippine Rice Research Institute.
- Khush G.S., Brar D.S. & Hardy B. (2003). *Advances in Rice Genetic*. IRRI.
- Liu Q.Q., Li Q.F., Cai X.L., Wang H.M., Tang S.Z., Yu H.X., Wang Z.Y. & Gu M.H. (2006). Molecular marker-assisted selection for improved cooking and eating quality of two elite parents of hybrid rice. *Crop Sci.* 46: 2354-2360
- Mikami I., Uwatoko N., Ikeda Y., Yamaguchi J., Hirano H., Suzuki Y., Sano Y. (2008). Allelic diversification at the wx locus in landraces of Asian rice. *Theoretical and Applied Genetics Theor Appl Genet.* 116: 979-989
- Seko H. (2003). An introduction manual for determination of apparent amylose content of rice grain in the rice breeding program, Faculty of Agronomy, Hanoi University of Agriculture in cooperation with HAU-JICA ERCB Project Office. pp. 6-10.
- Tran N.A., Daygon V.D., Resurreccion A.P., Cuevas R.P., Corpuz H.M. & Fitzgerald M.A. (2011). A single nucleotide polymorphism in the WaxyWaxy gene explains a significant component of gel consistency. *Theoretical and Applied Genetics Theor Appl Genet.* 123: 519-525
- Wang Z.Y., Wu Z.L., Xing Y.Y., Zheng F.G., Guo X.L., Zhang W.G. & Hong M.M. (1990). Nucleotide sequence of rice waxy gene. *Nucleic Acids Res.* 18(19): 5898.