

## SỬ DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ADN XÁC ĐỊNH GEN MÙI THƠM TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA THƠM

Dương Xuân Tú<sup>1,2\*</sup>, Nguyễn Văn Khởi<sup>2</sup>, Lê Thị Thanh<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hương<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thế Dương<sup>2</sup>, Trần Thị Diệu<sup>3</sup>, Phan Hữu Tôn<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Nghiên cứu sinh, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*  
<sup>2</sup>*Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*  
<sup>3</sup>*Trung tâm Khuyến nông Quốc gia*  
<sup>4</sup>*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email\*: [duongtu390@gmail.com](mailto:duongtu390@gmail.com)

Ngày gửi bài: 29.04.2014

Ngày chấp nhận: 18.07.2014

### TÓM TẮT

Mùi thơm là một chỉ tiêu chất lượng quan trọng ở lúa gạo. Các kết quả nghiên cứu được công bố gần đây đã khẳng định, có hàng trăm chất được tìm ra có liên quan đến mùi thơm ở lúa gạo, trong đó chất 2AP là chất chính tạo mùi thơm ở hầu hết các giống lúa thơm. Chất 2AP do gen đơn lặn *fgr* nằm trên nhiễm sắc thể số 8 kiểm soát tổng hợp. Gen *fgr* được xác định có liên kết với một số chỉ thị RG28, RM223, RM342, L06 và 4 mồi ESP, EAP, IFAP và INSP (BADH2) nhưng ở mức độ khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các chỉ thị trên để kiểm tra gen thơm *fgr* trong 33 giống lúa thơm. Kết quả cho thấy, chỉ thị RG28 phát hiện được 18 giống mang gen *fgr*, RM223 phát hiện được 11 giống mang gen *fgr*, RM342 phát hiện được 15 giống mang gen *fgr*, L06 phát hiện được 21 giống mang gen *fgr* và BADH2 phát hiện được 33 mẫu giống mang gen *fgr* đồng hợp tử. Phân tích gen thơm *fgr* kết hợp với đánh giá mùi thơm trên quần thể phân ly F2 của tổ hợp lai giữa giống lúa thơm và không thơm, kết quả cho thấy chỉ thị L06 và BADH2 đưa ra được tỷ lệ phân ly kiểu gen *fgr* gần đúng với tỷ lệ 1 : 2 : 1 ở cả 2 tổ hợp BT7 x Q5 và HT1 x KD18. Chỉ thị BADH2 có độ chính xác cao và ổn định với 92 - 95% cá thể có mùi thơm được phát hiện mang gen thơm *fgr* đồng hợp tử. Chỉ thị BADH2 được sử dụng phổ biến trong chương trình chọn tạo giống lúa thơm với kỹ thuật đơn giản, dễ sử dụng, chỉ cần điện di sản phẩm PCR trên gel agarose.

Từ khóa: ADN, chỉ thị phân tử, gen, lúa, mùi thơm.

### Molecular Marker for Using to Detect Fragrant Gene in Aromatic Rice Breeding

#### ABSTRACT

DNA markers RG28, RM223, RM342, L06 and BADH2 comprising 4 primers EAP, ESP, IFAP, INSP have been reported closely linked to *fgr* gene located on chromosome 8 controlling 2AP synthesis, major materials producing aroma in rice. In our report, marker BADH2 (4 primers EAP, ESP, IFAP, INSP) yielded in high polymorphism and could accurately differentiate between fragrant and non-fragrant rice material. Analysis of F2 population derived from cross between aromatic and non-aromatic rice varieties using this marker showed approximate ratio of segregation of 1: 2 : 1. Using this marker, from 92% to 95% of F2 individuals expressing aroma in grains were identified as homozygotes for *fgr* gene. These results confirmed the accuracy of BADH2 marker with 4 primers EAP, ESP, IFAP, INSP to detect fragrant gene in aromatic rice breeding materials.

Keywords: Aroma, DNA, gene, molecular marker, rice

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mùi thơm là một trong những chỉ tiêu về chất lượng quan trọng ở lúa gạo (*Oryza sativa* Linn.), được các nhà nghiên cứu quan tâm nhiều trong chọn tạo giống lúa chất lượng. Những kết quả nghiên cứu về chất tạo mùi thơm, di truyền tính trạng mùi thơm và chỉ thị liên kết với gen kiểm soát tổng hợp chất thơm trong cây lúa đã được công bố là cơ sở cho việc ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm.

Đến nay, đã tìm thấy hàng trăm chất tạo mùi thơm trong cây lúa, đó là những hợp chất dễ bay hơi như hydrocarbons, alcohol, aldehydes, ketones, esters... (Yajima et al., 1978; Widjaja et al., 1996; Mã Thái Hòa và Lê Ngọc Thạch, 2011). Trong số đó, chất 2-acetyl-1-pyrroline (2Aps) là chất quan trọng nhất tạo nên mùi thơm ở tất cả các giống lúa thơm (Buttery et al., 1982; 1983; Paule et al., 1989; Laksanalamai et al., 1993). Hàm lượng 2APs ở những giống lúa thơm đạt tới 0,09 mg/kg, cao gấp hơn 10 lần so với các giống lúa không thơm (0,006 - 0,008 mg/kg) (Buttery et al., 1983).

Nhiều kết quả nghiên cứu về di truyền tính trạng thơm ở lúa cho thấy, gen đơn lặn *fgr* nằm trên nhiễm sắc thể (NST) số 8 kiểm soát tổng hợp hợp chất tạo mùi thơm 2Aps trong cây lúa (Sood and Siddiq, 1978; Huang et al., 1994; Jin et al., 2003). Theo kết quả nghiên cứu của Bradbury et al. (2005a), sau khi phân tích trình tự của vùng gen *fgr* trên NST số 8, nhóm tác giả đã đưa ra kết luận: đột biến mất 8bp và 3 nucleotide ở exone thứ 7 của gen qui định tổng hợp betaine aldehyde dehydrogenase (BAD) là nguyên nhân tạo nên mùi thơm ở giống lúa Jasmine và Basmati. Các kết quả tương tự cũng được đưa ra trong nghiên cứu của các tác giả Kuo et al. (2006), Chen et al. (2006), Pachauri Vinita et al. (2010), Ahmadikhah et al. (2010).

Kết quả nghiên cứu định vị gen thơm *fgr* và chỉ thị phân tử liên kết với gen này trong cây lúa đã cho thấy, gen *fgr* đã được xác định vị trí trên NST số 8, chỉ thị gần nhất là RG28 với khoảng cách di truyền là 4,5 cM (Ahn et al., 1992; Lorieux et al., 1996). Gen *fgr* cũng được xác định có liên kết chặt với các chỉ thị RM223, RM342 (Stephen and Robert, 2001). Bằng việc sử dụng

một số chỉ thị SSR liên kết như L02, L06, gen *fgr* được xác định nằm trên NST số 8, có độ dài khoảng 69kb (Chen et al., 2006). Dựa trên thông tin về trình tự của đoạn gen *fgr* đã được đưa ra, Bradbury et al. (2005b) đã thiết kế 4 môi ESP, EAP, IFAP và INSP trong phản ứng PCR để khuếch đại trực tiếp vùng gen này. Theo kỹ thuật chỉ thị này, mỗi IFAP khuếch đại vùng gen thơm *fgr* với với dải băng 257bp, mỗi INSP khuếch đại vùng gen không thơm với dải băng là 355bp, 2 môi ESP và EAP khuếch đại cả vùng gen thơm và không thơm với dải băng khoảng 580bp.

Tại Việt Nam, những ứng dụng về chỉ thị phân tử liên kết với gen *fgr* qui định mùi thơm phục vụ công tác chọn tạo giống lúa thơm cũng đã được tiến hành trong thời gian gần đây. Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004) đã sử dụng chỉ thị phân tử RG28 và RM223 để phát hiện gen quy định tính trạng mùi thơm *fgr* trong chọn tạo giống lúa thơm, bước đầu đã tạo ra một số dòng lúa tẻ thơm triển vọng tại vùng Đồng bằng sông Cửu Long như OM4900, OM6074, OM5999 và OM6035. Phan Hữu Tôn và Tống Văn Hải, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (2010) đã sử dụng chỉ thị phân tử BADH2 trong giới hạn 2 môi ESP và IFAP để sàng lọc các giống lúa chứa gen mùi thơm *fgr*, kết hợp với chọn lọc kiểu hình, nhóm tác giả đã giới thiệu được 2 giống lúa tẻ thơm T33 và T12 cho phát triển sản xuất. Trần Tấn Phương và cs. (2010) cũng đã sử dụng 4 môi ESP, EAP, IFAP và INSP của chỉ thị BADH2 để kiểm tra gen thơm *fgr* trên 19 mẫu giống lúa địa phương và giống lúa nhập nội. Kết quả cho thấy, các giống lúa được đánh giá có mùi thơm đều được phát hiện có gen thơm *fgr* đồng hợp tử.

Độ chính xác của chỉ thị liên kết với gen *fgr* phụ thuộc vào khoảng cách di truyền giữa chúng và nguồn vật liệu sử dụng. Các chỉ thị ADN liên kết với gen mùi thơm *fgr* đã được công bố trên nguồn vật liệu nghiên cứu khác nhau, mức độ liên kết cũng rất khác nhau. Dựa trên những chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen thơm *fgr* đã được công bố, chúng tôi tiến hành nghiên cứu để lựa chọn chỉ thị có độ chính xác cao ứng dụng trong chọn tạo giống lúa thơm trên nguồn vật liệu của chúng tôi.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các dòng giống lúa vật liệu được đưa ra trong bảng 1 và các chỉ thị sử dụng được đưa ra trong bảng 2.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phát triển hệ F2 của các tổ hợp lai

Hai tổ hợp lai giữa mẹ là giống lúa thơm và bố là giống lúa không thơm: BT7 x Q5 và HT1 x KD18 được tiến hành từ vụ mùa 2010. Con lai F1 của các tổ hợp lai được gieo trong nhà lưới, đánh giá và loại bỏ những cây tự thụ. Thế hệ F2 được gieo hỗn hợp theo từng tổ hợp, mỗi tổ hợp lấy mẫu 160 cá thể cho phân tích gen thơm *fgr* trên lá và phân tích mùi thơm trong hạt.

#### 2.2.2. Phương pháp PCR

##### Tách chiết AND:

ADN được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle và Doyle có cải tiến (Doyle and Doyle, 1990). Nghiền 0,5g lá với 800µl CTAB

buffer bằng chày cối sứ đến khi dung dịch có màu xanh xuất hiện. Chuyển dung dịch sang ống eppendorf, bổ sung thêm 56µl SDS 10%, lắc đều. Ủ mẫu ở 65°C trong bể ổn nhiệt 60 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 800µl hỗn hợp chloroform : isoamylalcohol (24:1), lắc nhẹ tới khi thành dạng nhũ sữa, ly tâm ở 13.000 vòng/phút, 5 phút, 4°C. Hút dịch nổi chuyển sang ống eppendorf mới, bổ sung 800µl hỗn hợp chloroform : isoamylalcohol (24:1), ly tâm ở 13.000 vòng/phút, trong 5 phút, 4°C. Thu dịch nổi sang ống eppendorf, kết tủa ADN bằng isopropanol với tỉ lệ 1:1(v/v). Để trong tủ lạnh sâu trong 1h. Ly tâm 13.000 vòng/phút, 5 phút, 4°C. Rửa kết tủa ADN bằng ethanol 70%. Làm khô ADN ở nhiệt độ phòng. Hòa tan ADN bằng nước cất cất 2 lần (khoảng 200µl). ADN đã tách chiết được kiểm tra độ nguyên vẹn trên gel agarose 1%.

##### Phản ứng PCR:

Mỗi phản ứng PCR 25µl bao gồm: 8,2µl nước cất hai lần khử ion; 1,5µl đệm PCR 10X + MgCl<sub>2</sub> 25mM; 0,5µl dNTPs 10mM; 0,8µl Taq DNA polymerase 1U/µl; 3µl mỗi xuôi 5µM + Mỗi

**Bảng 1. Nguồn gốc các mẫu giống lúa vật liệu nghiên cứu**

TT	Tên mẫu giống	Nguồn gốc	TT	Tên mẫu giống	Nguồn gốc
1	AC5	Viện CLT - CTP	19	D123-10	F9 (Hương cốm/LT2)
2	AC15	Viện CLT - CTP	20	D127-10	F8 (P6/AC5)
3	HDT8	Viện CLT - CTP	21	D257-10	F8 (N46/ĐB6)
4	HDT2	Viện CLT - CTP	22	D306-10	F8 (BT7/N19)
5	HT1	Trung Quốc	23	D324-10	F8 (AC5/N19//AC5)
6	BT7	Trung Quốc	24	D227-10	F8 (LT2/BB1-10)
7	D16-09	IR1561 đột biến-M9	25	D395-10	F8 (HT1/AC5//HT1)
8	D17-10	F9 (N46/ĐB6)	26	D414-10	F10 (AC5/Q5//AC5)
9	D19-10	F9 (BT7/LT2/BT7)	27	D416-10	F10 (HT6/ĐB5)
10	D20-10	F9 (AC5/BB1-4)	28	D264-10	F10 (HT1/N19)
11	D21-10	F9 (AC5/CH133)	29	D267-10	F10 (BT7/CH133)
12	D36-10	F9 (Jasmin/AC5)	30	D270-10	F10 (AC5/Q5//C70)
13	D44-10	F9 (CL8/AC5)	31	SH8	Viện CLT - CTP
14	D25-10	F9 (CL8/LT2)	32	D129-10	F9 (N46/Nghi H)
15	D68-10	F9 (P6/Sóc trắng)	33	D18-10	F9 (Q5/AC15)
16	D26-10	F9 (AC5/CH133)	34	IR24	IRRI
17	D11-10	F9 (CL9/Sóc trắng)	35	Q5	Trung Quốc
18	D40-10	F9 (Jasmin/Sóc trắng)	36	KD18	Trung Quốc

**Bảng 2. Các chỉ thị phân tử ADN liên kết với gen mùi thơm *fgr* đã được công bố**

Tên chỉ thị	Trình tự môi	Tác giả	Khoảng cách (cM)	Kích cỡ (pb)
RM342	F 5'- ATCCTACCGCTGACCATGAG-3' R 5'-TTTGGTCTACGTGGCGTACA-3'	Stephen and Robert, 2001	< 10	160
RM223	F 5'-GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC-3' R 5'-GAAGGCAAGTCTTGCCACTG-3'		< 10	150
RG28	F 5'-GATCTCACTCCAAGTAACTCTGAC-3' R 5'-ACTGCCATTGCTTCTGTTCTC-3'	Ahn et al., 1992	4,5	130
L06	F 5'- GCAAGTGACGGAGT ACGCCT-3' R 5'- GCTAACTTCCGCTCACGCAA-3'	Chen et al., 2006	-	300
BADH2	ESP: 5'-TTGTTTGGAGCTTGCTGATG-3'	Bradbury et al., 2005b	Khuếch đại vùng gen thơm	580
	IFAP: 5'CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC-3'			257
	INSP: 5'-CTGGTAAAGTTTATGGCTTCA-3'			355
	EAP : 5'-AGTGCTTTACAGCCCGC-3'			580

ngược 5µM; 1,0µl DNA 10 ng/µl. Chương trình PCR trên máy Bio-rad 9800: 95°C - 5 phút; 35 chu kỳ (95°C - 30 giây; 58°C - 1 phút; 72°C - 1,5 phút); 72°C - 5 phút; giữ mẫu ở 4°C.

#### Điện di sản phẩm PCR:

Sản phẩm PCR được điện di bằng máy điện di mao quản và điện di trên gel agarose 2%, thang chuẩn (ladder) 100bp với hiệu điện thế 100V, thời gian 40 phút, bản gel được nhuộm bằng Ethidium bromide 0,5 µg/ml trong 30 phút, hình ảnh được phân tích trên máy chụp hình gel (gel DOC).

#### 2.2.3. Phân tích mùi thơm

Mùi thơm được đánh giá theo phương pháp của Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004). Mỗi cá thể lấy 15 hạt được bóc vỏ trấu và nghiền nhỏ, sau đó đặt trong đĩa petri. Mỗi hộp được cho vào 0,5ml dung dịch KOH pha loãng (1,7%) sau đó đậy lại, đặt trong điều kiện 30°C, 30 phút. Sau đó các hộp được mở ra lần lượt để đánh giá mùi thơm theo cảm quan với 3 mức: không thơm, thơm nhẹ và thơm.

#### 2.2.4. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu

Sử dụng phân phối khi bình phương ( $\chi^2$ ) để kiểm định kiểu gen thơm phân ly trong quần thể F2 theo tỷ lệ phân ly mong đợi:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{số quan sát} - \text{số mong đợi})^2}{\text{Số mong đợi}}$$

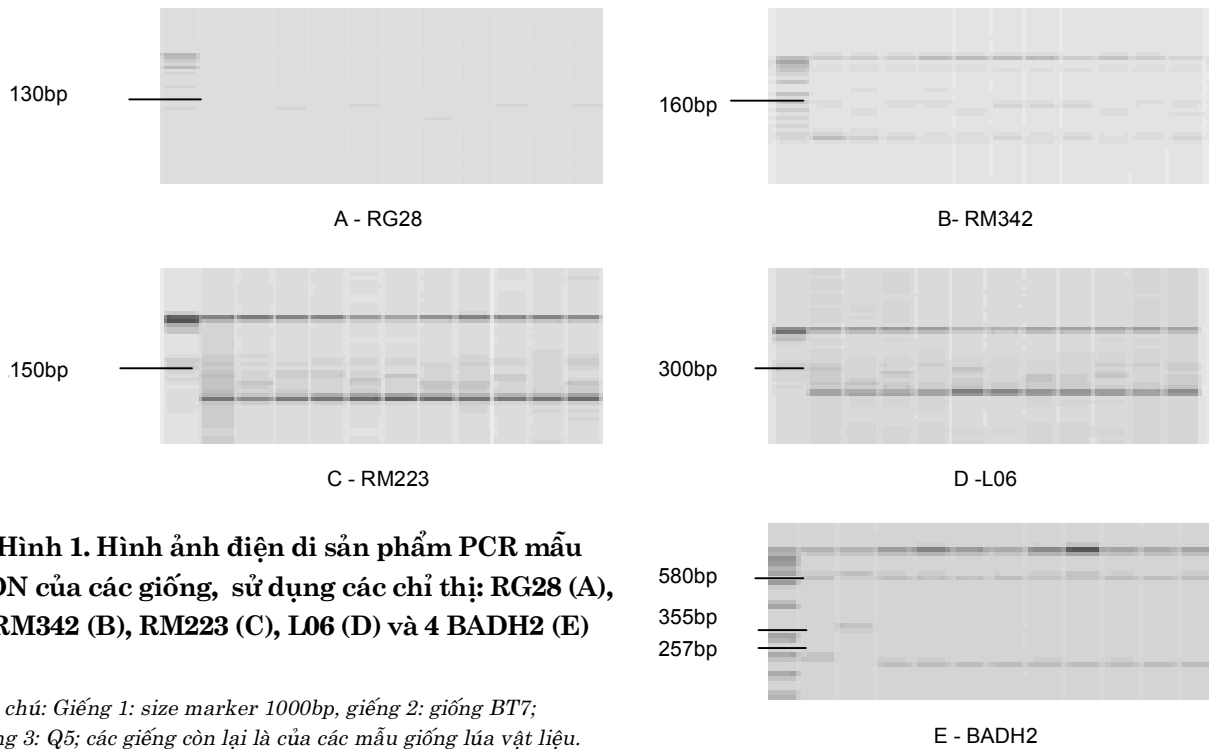
Nếu giá trị  $\chi^2 <$  giá trị tra bảng (ở bậc tự do  $df = 2$ ,  $p = 0,05$ ) thì tỷ lệ phân ly kiểu gen gần với tỷ lệ theo lý thuyết.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nhận biết gen thơm *fgr* trong tập đoàn vật liệu nghiên cứu bằng đánh giá kiểu hình và chỉ thị phân tử

Một số chỉ thị phân tử RG28, RM223, RM342, L06 và BADH2 gồm 4 môi ESP, IFAP, INSP, EAP đã được công bố có liên kết với gen *fgr* qui định tổng hợp chất 2AP tạo mùi thơm trong cây lúa. Đây là những chỉ thị đồng trội, có thể phân biệt được trạng thái đồng hợp tử và dị hợp tử của kiểu gen. Sử dụng các môi chỉ thị này trong phản ứng PCR mẫu ADN của các giống lúa thơm trong tập đoàn vật liệu, kết quả hình ảnh điện di được đưa ra trong hình 1.

Chỉ thị RG28 phát hiện gen *fgr* với vạch băng điện di 130bp là đồng hợp tử, 2 vạch băng 115bp + 130bp là dị hợp và vạch băng 115bp là không có gen *fgr*. Chỉ thị RM342 phát hiện gen *fgr* với vạch băng điện di khoảng 160bp là đồng hợp tử, 2 vạch băng 120bp + 160pb là dị hợp và vạch băng 120bp là không có gen này. Chỉ thị



**Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR mẫu ADN của các giống, sử dụng các chỉ thị: RG28 (A), RM342 (B), RM223 (C), L06 (D) và 4 BADH2 (E)**

Ghi chú: Giếng 1: size marker 1000bp, giếng 2: giống BT7; giếng 3: Q5; các giếng còn lại là của các mẫu giống lúa vật liệu.

RM223 phát hiện gen *fgr* với vạch băng khoảng 150bp đồng hợp tử, 2 vạch 120bp + 150bp là dị hợp và vạch băng khoảng 120bp là không có gen *fgr*. Chỉ thị L06 cho vạch băng khoảng 300bp là đồng hợp tử gen *fgr*, 2 vạch khoảng 200bp + 300bp dị hợp và vạch băng 200bp là không có gen *fgr*. Chỉ thị BADH2 phát hiện gen *fgr* đồng hợp tử với 2 vạch băng 580bp + 257bp, dị hợp tử với 3 vạch băng 580bp + 355bp + 257bp và không có gen *fgr* với 2 vạch băng 355bp + 580bp. Kết quả phân tích gen thơm và đánh giá mùi thơm trong hạt của tập đoàn vật liệu lúa thơm được đưa ra trong bảng 3.

Trong 33 giống lúa có mùi thơm, kiểu gen thơm *fgr* đồng hợp tử được phát hiện bằng chỉ thị RG28 là 18 giống, chỉ thị RM342 là 11 giống, chỉ thị RM223 là 15 giống, chỉ thị L06 là 21 giống và chỉ thị BADH2 là 33 là giống. Như vậy, mùi thơm ở các mẫu giống lúa vật liệu là do chất 2AP, được kiểm soát tổng hợp bởi gen *fgr*. Khả năng nhận dạng gen *fgr* ở các mẫu giống lúa thơm của các chỉ thị RG228, RM342, RM223 và L06 là không hoàn toàn và khác nhau bởi đây là những chỉ thị

liên kết với gen *fgr* ở những khoảng cách di truyền khác nhau. Khoảng cách này càng xa thì khả năng xảy ra trao đổi chéo giữa chỉ thị và gen liên kết càng lớn, độ chính xác của chỉ thị càng thấp. Chỉ thị BADH2 gồm 4 môi ESP, IFAP, INSP và EAP nhân trực tiếp vùng gen *fgr* nên độ chính xác cao, nhận dạng được 100% các mẫu giống lúa mang gen thơm *fgr*.

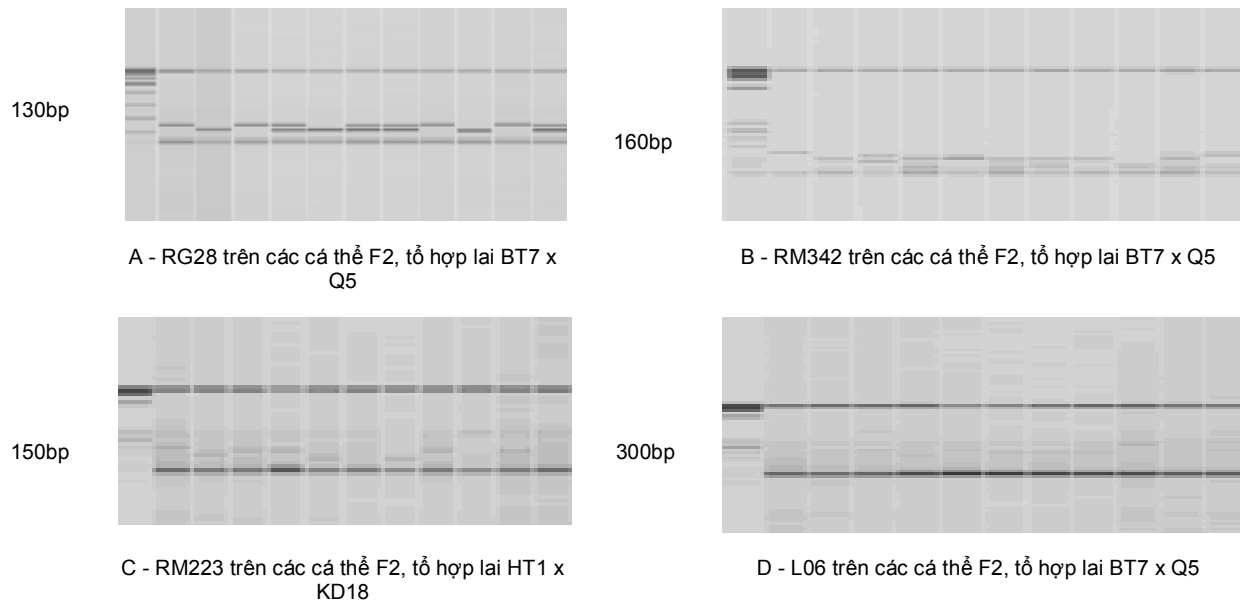
### 3.2. Phân ly tính trạng mùi thơm ở thế hệ F2 của các tổ hợp lai giữa giống lúa thơm và không thơm

Gen *fgr* đã được công bố là gen đơn lặn trên NST số 8, do vậy sự phân ly kiểu gen và kiểu hình ở thế hệ F1 và F2 sẽ tuân theo qui luật di truyền của Mendel. Sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết để kiểm tra gen *fgr* cùng với đánh giá mùi thơm trên quần thể phân ly F2 của tổ hợp lai giữa các giống lúa thơm và các giống lúa không thơm để lựa chọn chỉ thị có độ chính xác cao nhất cho sử dụng trong chọn. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng các môi chỉ thị phân tử được đưa ra đại diện trong hình 2.

**Bảng 3. Kết quả kiểm tra gen thơm *fgr* trong đoàn vật liệu nghiên cứu bằng chỉ thị phân tử**

TT	Tên dòng, giống	Mùi thơm	Gen thơm <i>fgr</i>				
			RG28	RM342	RM223	L06	BADH2
1	BT7	Thơm	+	+	+	+	+
2	HT1	Thơm	+	+	+	+	+
3	AC5	Thơm	+	+	+	+	+
4	AC15	Thơm	+	+	-	+	+
5	HDT8	Thơm	+	-	-	+	+
6	HDT2	Thơm	+	-	+	+	+
7	D16-09	Thơm	+	-	+	-	+
8	D17-10	Thơm	-	+	-	+	+
9	D19-10	Thơm nhẹ	+	-	+	+	+
10	D20-10	Thơm nhẹ	-	+	-	+/-	+
11	D21-10	Thơm	+	-	+	+	+
12	D36-10	Thơm	-	-	-	+	+
13	D44-10	Thơm	+	+	+	-	+
14	D25-10	Thơm	-	+	+	+	+
15	D68-10	Thơm nhẹ	-	-	+/-	+/-	+
16	D26-10	Thơm	+	+/-	+	+	+
17	D11-10	Thơm nhẹ	-	-	-	-	+
18	D40-10	Thơm	+	-	+	+	+
19	D123-10	Thơm nhẹ	-	-	-	-	+
20	D127-10	Thơm	+	-	+	+	+
21	D257-10	Thơm	-	+	+/-	-	+
22	D306-10	Thơm nhẹ	+	-	-	+	+
23	D324-10	Thơm nhẹ	+/-	-	+	-	+
24	D227-10	Thơm	-	+/-	-	+	+
25	D395-10	Thơm	-	-	+	-	+
26	D414-10	Thơm	+	-	-	+	+
27	D416-10	Thơm	+	+	+	-	+
28	D264-10	Thơm nhẹ	-	-	-	+	+
29	D267-10	Thơm	-	+	+	+	+
30	D270-10	Thơm	+/-	-	-	+	+
31	SH8	Thơm	+	-	+	-	+
32	D129-10	Thơm	+	-	+/-	+	+
33	D18-10	Thơm nhẹ	-	+/-	+	-	+
34	IR24	Không thơm	-	-	-	-	-
35	Q5	Không thơm	-	-	-	-	-
36	KD18	Không thơm	-	-	-	-	-
Tổng số cá thể mang thơm <i>fgr</i>			18	11	15	21	33

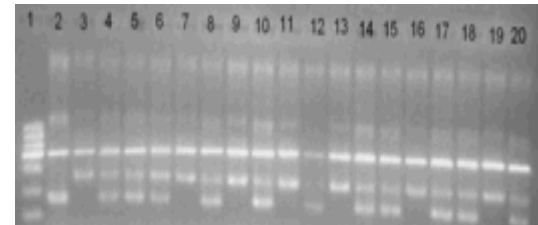
Ghi chú: (+): gen *fgr* đồng hợp tử; (+/-) gen *fgr* dị hợp; (-): Không có gen *fgr*.



**Hình 2. Đại diện hình ảnh điện di sản phẩm PCR mẫu ADN cá thể F2 của tổ hợp lai BT7 x Q5, HT1 x KD18**

Ghi chú: Sử dụng chỉ thị RG28 (A), RM342 (B), RM223 (C), L06 (D) và BADH2 (E). Đối chứng thơm là giống BT7, không thơm là giống Q5

580bp  
355bp  
257bp



E-BADH2 trên các cá thể F2, tổ hợp lai BT7 x Q5

Sử dụng phương pháp kiểm định  $\chi^2$  giữa tỷ lệ phân kiểu gen theo lý thuyết và tỷ lệ phân ly

kiểu gen thực tế được xác định bằng các chỉ thị. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

**Bảng 4. Tỷ lệ phân ly kiểu gen thơm trong quần thể F2 của các tổ hợp lai được phát hiện bằng sử dụng các chỉ thị phân tử ADN**

Chỉ thị	Tên tổ hợp	Kiểu gen thơm phát hiện			Giá trị $\chi^2$
		<i>FgrFgr</i>	<i>Fgrfgr</i>	<i>fgrfgr</i>	
RG28	BT7 x Q5	53	68	39	6,05
	HT1 x KD18	37	70	53	5,70
RM342	BT7 x Q5	62	58	40	18,15
	HT1 x KD18	25	85	50	8,44
RM223	BT7 x Q5	47	65	48	5,64
	HT1 x KD18	58	75	27	12,64
L06	BT7 x Q5	52	67	41	5,74
	HT1 x KD18	47	65	48	5,64
BADH2	BT7 x Q5	50	77	33	3,84
	HT1 x KD18	30	86	50	5,45

Ghi chú: Tra bảng  $\chi^2$  ( $df = 2, p = 0,05$ ) = 5,99

Tỷ lệ phân ly kiểu gen thơm *fgr* trên quần thể F2 ở tổ hợp lai BT7 x Q5 được đưa ra giá trị gần đúng với tỷ lệ phân ly theo lý thuyết (1 : 2 : 1) khi được nhận dạng bằng chỉ thị RM223, L06 và BADH2. Ở tổ hợp lai HT1 x KD18, tỷ lệ phân ly kiểu gen thơm *fgr* được đưa ra gần đúng với tỷ lệ phân ly 1 : 2 : 1 khi sử dụng chỉ thị RG28, L06 và BADH2. Như vậy, chỉ thị L06

và BADH2 có độ tin cậy cao, cho nhận dạng kiểu gen thơm *fgr* trên quần thể phân ly F2 ở cả 2 tổ hợp lai BT7 x Q5 và HT1 x KD18 với tỷ lệ phân ly được đưa ra gần đúng với tỷ lệ phân ly theo lý thuyết.

Kết quả phân tích kiểu gen kết hợp với đánh giá mùi thơm trong hạt của quần thể phân ly F2 ở mỗi tổ hợp lai được trình bày trong bảng 5.

**Bảng 5. Kết quả phân tích kiểu gen thơm *fgr* bằng chỉ thị phân tử kết hợp với đánh giá mùi thơm trong hạt trên quần thể phân ly F2**

Chỉ thị	Kiểu gen	Số cá thể	Thơm	Thơm nhẹ	Không thơm	Chính xác (%)
<i>Tổ hợp lai BT7 x Q5</i>		160	24	10	126	
RG18	<i>FgrFgr</i>	53	3	1	49	
	<i>Fgrfgr</i>	68	1	7	60	64
	<i>fgrfgr</i>	39	20	2	17	
RM342	<i>FgrFgr</i>	62	2	3	57	
	<i>Fgrfgr</i>	58	5	4	49	59
	<i>fgrfgr</i>	40	17	3	20	
RM223	<i>FgrFgr</i>	47	5	4	38	
	<i>Fgrfgr</i>	65	3	6	56	47
	<i>fgrfgr</i>	48	16	0	32	
L06	<i>FgrFgr</i>	52	0	1	51	
	<i>Fgrfgr</i>	67	2	4	61	79
	<i>fgrfgr</i>	41	22	5	14	
4 môi: ESP, IFAP, INSP và EAP	<i>FgrFgr</i>	50	0	0	50	
	<i>Fgrfgr</i>	77	0	2	75	95
	<i>fgrfgr</i>	33	24	8	1	
<i>Tổ hợp lai HT1 x KD18</i>		160	31	15	114	
RG18	<i>FgrFgr</i>	37	2	5	30	
	<i>Fgrfgr</i>	70	4	1	65	74
	<i>fgrfgr</i>	53	25	9	19	
RM342	<i>FgrFgr</i>	25	3	3	19	
	<i>Fgrfgr</i>	85	11	7	67	48
	<i>fgrfgr</i>	50	17	5	28	
RM223	<i>FgrFgr</i>	58	8	6	44	
	<i>Fgrfgr</i>	75	10	2	63	43
	<i>fgrfgr</i>	27	13	7	7	
L06	<i>FgrFgr</i>	47	1	0	46	
	<i>Fgrfgr</i>	65	3	4	58	83
	<i>fgrfgr</i>	48	27	11	10	
BADH2	<i>FgrFgr</i>	30	0	2	28	
	<i>Fgrfgr</i>	92	1	1	78	92
	<i>fgrfgr</i>	50	30	12	8	



Trong kết quả phân tích, những giống có mùi thơm và mùi thơm nhẹ chúng tôi xếp vào nhóm thơm. Do gen *fgr* là gen lặn nên độ chính xác của chỉ thị trong nhận dạng gen thơm *fgr* được tính bằng tỷ lệ giữa số cá thể có gen thơm *fgr* đồng hợp tử được phát hiện bằng chỉ thị đó trong tổng số cá thể được đánh giá có mùi thơm trong hạt. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở 2 tổ hợp lai BT7 x Q5 và HT1 x KD18, độ chính xác của chỉ thị RG28 lần lượt là 64% và 74%, chỉ thị RM342 là 59% và 48%, chỉ thị RM223 là 47% và 43%, chỉ thị L06 là 79% và 83%, chỉ thị BADH2 là 95% và 92%. Độ chính xác của các chỉ thị phân tử nghiên cứu được xếp theo thứ tự giảm dần như sau: BADH2 > L06 > RG28 > RM342 > RM223. Như vậy, chỉ thị BADH2 có độ chính xác cao nhất (92 - 95%) trong phát hiện gen thơm *fgr* đồng hợp tử và ổn định ở cả 2 tổ hợp lai BT7 x Q5 và HT1 x KD18.

Trong quá trình giảm phân hình thành giao tử ở sinh sản hữu tính, trao đổi chéo xảy ra ở bất cứ vị trí nào trên các NST tương đồng. Các locus/gen trên NST có khoảng cách càng xa nhau thì khả năng trao đổi chéo giữa chúng càng dễ xảy ra và ngược lại. Cũng như vậy, khoảng cách giữa chỉ thị và gen qui định tính trạng càng gần nhau thì liên kết càng chặt và ít xảy ra trao đổi chéo giữa chúng. Trong các chỉ thị chúng tôi sử dụng, chỉ thị RG28 đã được đưa ra có khoảng cách di truyền với gen *fgr* trên NST là 4,5cM; chỉ thị RM342 và RM223 được đưa ra với khoảng cách là < 10cM; chỉ thị L06 được tìm ra với vị trí sát với vùng gen thơm *fgr*, chỉ thị BADH2 nhân trực tiếp vùng gen thơm *fgr* bằng 4 môi ESP, IFAP, INSP và EAP. Do khoảng cách di truyền khác nhau của các chỉ thị và gen *fgr* nên độ liên kết khác nhau, dẫn đến độ chính xác của mỗi chỉ thị trong phát hiện gen thơm *fgr* cũng khác nhau.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng rất phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả trên thế giới đã công bố trước đây, một lần nữa khẳng định về gen đơn lặn *fgr* qui định tổng hợp chất 2AP tạo mùi thơm trong cây lúa và độ chính xác của chỉ thị BADH2 để phát hiện kiểu gen này. Độ chính xác của chỉ thị BADH2 cũng phù hợp bởi bản chất của chỉ thị này là nhân trực

tiếp vùng gen thơm *fgr* với 4 môi ESP, IFAP, INSP và EAP, trong đó 2 môi nội biên (IFAP, INSP) nhân vùng gen thơm và vùng gen không thơm và 2 môi ngoại biên (ESP và EAP) nhân cả vùng gen thơm và không thơm (Bradbury et al., 2005b). Chỉ thị này có khả năng phân biệt được dạng đồng hợp tử và dị hợp tử, đơn giản, dễ sử dụng và yêu cầu không cao trong PCR và điện di (chỉ cần điện di trên gel agarose).

#### 4. KẾT LUẬN

Trong các chỉ thị phân tử được sử dụng trong nghiên cứu này, chỉ thị BADH2 có độ chính xác cao nhất, phân biệt chính xác 100% các mẫu giống lúa thơm và không thơm trong tập đoàn vật liệu, với 33 mẫu giống thơm đều mang kiểu gen thơm *fgr* đồng hợp tử. Chỉ thị BADH2 có độ tin cậy và ổn định cao, nhận dạng kiểu gen thơm *fgr* trên quần thể phân ly F2 của các tổ hợp lai giữa các giống lúa thơm với tỷ lệ đưa ra gần đúng với tỷ lệ theo lý thuyết là 1 : 2 : 1. Độ chính xác của chỉ thị này trong phát hiện gen thơm *fgr* được đưa ra với độ chính xác từ 92-95% trong số cá thể F2 được đánh giá hạt có mùi thơm. Các chỉ thị RG28, RM223, RM342, L06 cũng cho thấy có liên kết với gen *fgr* và mùi thơm nhưng độ chính xác thấp hơn và khác nhau giữa các chỉ thị này. Chỉ thị BADH2 gồm 4 môi ESP, EAP, IFAP và INSP sẽ được sử dụng phổ biến trong chương trình chọn tạo giống lúa thơm với kỹ thuật đơn giản, dễ sử dụng, chỉ cần điện di sản phẩm PCR trên gel agarose. Ở thế hệ F2, sử dụng chỉ thị BADH2 có thể chọn được các cá thể mang kiểu gen thơm *fgr* đồng hợp tử và dị hợp tử với độ chính xác cao.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004). Xác định gen *fgr* điều khiển tính trạng mùi thơm bằng phương pháp Fine Mapping với microsatellites, Hội nghị quốc gia về chọn tạo giống lúa, trang 192.
- Mã Thái Hòa và Lê Ngọc Thạch (2011). Phân tích mùi thơm của gạo jasmine 85, Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 18a: 28 - 34.
- Phan Hữu Tôn và Tống Văn Hải (2010). Sàng lọc các giống lúa có chứa gen thơm bằng chỉ thị phân tử,

- Tạp chí Khoa học và Phát triển, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, 8(4): 646 - 652.
- Trần Tấn Phương và cs. (2010). Đánh giá mùi thơm và gen kiểm soát mùi thơm của các giống lúa thơm địa phương và cải tiến, Tạp chí Khoa học và Phát triển, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, 8(3): 410 - 417.
- Ahn S.N. (1992). RFLP tagging of a gene for aroma in rice, Theor Appl Genet, 84: 825-828.
- Asadollah Ahmadikhah et al. (2010). Development of an allele specific amplification (ASA) co-dominant marker for fragrance genotyping of rice cultivars. Archives of Applied Science Research, 2(1): 204-211. Available at <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>.
- Bradbury L. MT et al. (2005a). The gene for fragrance in rice, Plant Biotechnol. J. 3, p. 363- 370.
- Bradbury L.MT et al. (2005b). A perfect marker for fragrance genotyping in rice, Molecular Breeding, 16: 279-283.
- Buttery R.G. et al. (1982). 2-acetyl-1-pyrroline: an important aroma component of cooked rice, Chem Ind, London, p. 958.
- Buttery R.G et al. (1983). Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline, J. Agric. Food Chem., 31: 823-826.
- Chen Saihua et al. (2006). The fgr gene responsible for rice fragrance was restricted within 69kb, Plant Science, 171: 505-514.
- Doyle J.J. and J.L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue, Focus, 12: 11-5.
- Huang N. et al. (1994). Development of an RFLP map from a doubled haploid population in rice, Rice Genet. Newsl., 11: 134-137.
- Jin Q.S. et al. (2003). A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.), Plant Sci., 165: 359-364.
- Kuo S.M. et al. (2006). The betain aldehyde dehydrogenase (BAD2) gene is not responsible for the aroma trait of SA0420 rice mutant derived by sodium azide mutagenesis, National Science Council (NSC 94-2317 - B055-006).
- Laksanalamai V. et al. (1993). Comparison of aroma compound (2-acetyl -1- pyrroline) on leaves from pandan (*pandanum amaryllifolius*) and Thai fragrant rice (Khao Dawk mali-105), Cereal Chem., 70: 381 - 384.
- Lorieux M. et al. (1996). Aroma in rice: Genetic analysis of a quantitative traits Theo. Appl. Genet., 93: 1145-1151.
- Pachauri Vinita et al. (2010). Origin and Genetic Diversity of Aromatic Rice Varieties, Molecular Breeding and Chemical and Genetic Basis of Rice Aroma, Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 19(2): 258 - 262.
- Paule C.M. et al. (1989). Sensory and chemical examination of aromatic and nonaromatic rice. Journal of Food Sci., 54: 343-346.
- Sood B.G. and Siddiq E.A. (1978). A rapid technique for scent determination in rice, Indian J. Genet. Plant Breed, 38: 268-271.
- Stephen Garland and Robert Henry (2001). Molecular markers to rice breeding in Australia, A report for the rural industries research and development corporation, RIRDC Publication, No. 01/38.
- Widjaja R. et al. (1996). Science of Food Agriculture, 70: 151-161.
- Yajima I. et al. (1978). Volatile flavor component of cooked rice. Agric, Biol. Chem., 42: 1229.