

Chương I

CHỈ THỊ DNA ĐÁNH DẤU GEN TRONG CHỌN TẠO GIỐNG

1. Điểm lại những khái niệm di truyền liên quan

- Gen là đoạn DNA nằm trên nhiễm sắc thể (DNA, RNA virus) quyết định hay đóng góp vào việc tạo thành hay biểu hiện ra tính trạng, trong điều kiện nhất định.
- Khái niệm gen, alen và locus gen, các gen sắp xếp theo đường thẳng trên nhiễm sắc thể và liên kết với nhau.
- Bản đồ liên kết, bản đồ di truyền, bản đồ nhiễm sắc và bản đồ vật lý.
- Liên kết gen và khoảng cách di truyền.
- Phương pháp xác định gen liên kết và khoảng cách giữa các gen bằng cách xác định tần số trao đổi chéo và điều tra thống kê phá hệ hoặc quần thể phân ly.

2. Khái niệm chỉ thị di truyền

- Chỉ thị là bất kỳ một đặc trưng, đặc tính nào đó của sự vật mà dựa vào đó chúng ta suy ra được đặc trưng, đặc tính khác của sự vật đó. Ví dụ dựa vào thành phần hệ thực vật ở một nơi nào đó chúng ta có thể đoán được đất ở đó chua, màu mỡ hay bị ô nhiễm. Trong di truyền chúng ta có thể dựa vào tính trạng này để dự đoán khả năng có chứa tính trạng kia trong cùng một sinh vật. Ví dụ lúa nếp lá bao mầm mầu tím thì cây đó có thể sẽ chứa gen kháng rầy nâu.
- Chỉ thị di truyền là một đặc điểm hay một thuộc tính của sinh vật có thể đo đếm, nhận biết được và có khả năng di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác.
- Theo Paterson và cộng sự 1991 thì chỉ thị di truyền cần có 2 yêu cầu sau:
 - + Phải khác biệt giữa bố và mẹ.
 - + Phải được truyền lại chính xác cho thế hệ sau, cả ở các đời phân ly.
- Cơ sở khoa học của chỉ thị di truyền là do các gen quy định các tính trạng đó liên kết với nhau. Hiện có rất nhiều gen, nhiều chỉ thị di truyền của nhiều sinh vật đã được xác lập bản đồ liên kết trên từng nhiễm sắc thể và khoảng cách di truyền giữa chúng.

3. Các loại chỉ thị di truyền

a. Chỉ thị di truyền hình thái

- Là loại chỉ thị có thể quan sát thấy hoặc đo đếm trực tiếp được, thường do đơn gen quy định (tính trạng chất lượng) như màu sắc hoa, đỏ, trắng, hồng, tím xanh, màu sắc và hình dạng hạt có: màu nâu, vàng, đỏ, có râu hay không, nhăn hay trơn. Về lá có phủ lông hay không, dạng cây có bạch tạng hay không, lùn hay cao.
- Chỉ thị hình thái có ưu điểm là dễ nhận biết và phân biệt ngay bằng mắt thường ở dạng trội, lặn, đồng hợp tử và một số trường hợp có thể là dị hợp tử.

- Các biến dị chỉ thị hình thái thường ít đa dạng, quan sát phụ thuộc vào giai đoạn sinh trưởng phát triển của cây nên việc ứng dụng thường bị hạn chế.
- Chỉ thị giải phẫu, cấu trúc tế bào, mô và cơ quan cũng có thể thuộc vào loại chỉ thị này, tuy nhiên việc nhận biết quan sát đòi hỏi cần đến kỹ thuật, phương tiện quan sát khá phức tạp hơn.

b. Chỉ thị sinh hóa

- Chỉ thị sinh hóa là loại chỉ thị có bản chất dựa trên đa hình protein, bao gồm chỉ thị isozyme và các loại protein cấu trúc và dự trữ khác.
- Các protein- enzyme khác nhau có khối lượng phân tử, cấu trúc hình thể và điểm đẳng điện khác nhau, vì vậy khi điện di trên gel một chiều hay hai chiều chúng sẽ di chuyển với tốc độ khác nhau và phân tách nhau ra thể hiện bằng những vạch băng, các điểm quan sát thấy sau khi được nhuộm màu.
- Vì là protein nên sự biểu hiện phụ thuộc vào mô và vào giai đoạn sinh trưởng phát triển của cá thể cũng như điều kiện môi trường, có liên quan đến điều hòa hoạt hóa của gen.
- Bất kì một protein nào có mặt trong mô sinh vật dù ở giai đoạn nào của sự phát triển cũng là kết quả sản phẩm của dòng thông tin từ DNA (gen) - mRNA - protein- vật chất - tính trạng.
- Chỉ thị protein - enzyme thường là đồng trội, dễ phân biệt giữa các cá thể đồng hợp tử với dị hợp tử nhưng do sự biểu hiện phụ thuộc vào giai đoạn sinh trưởng và phát triển, loại tế bào, mô và điều kiện môi trường nên việc ứng dụng thường bị hạn chế.
- Chỉ thị vật chất trao đổi, dựa trên cơ sở phân tích hay nhận diện một số chất trao đổi nào đó trong tế bào, mô hay cơ quan của sinh vật chúng ta có thể suy diễn ra một đặc tính, một protein, một vật chất hay một tính trạng khác của sinh vật đó và ngược lại.
- Các chỉ thị trên có đặc điểm chung là phụ thuộc vào giai đoạn sinh trưởng và phát triển loại mô, tế bào và trong những điều kiện môi trường nhất định, nếu không có sẽ không biểu hiện ra và không sử dụng được. Chỉ riêng có chỉ thị DNA là không phụ thuộc vào sự biểu hiện của gen và điều kiện môi trường cho việc biểu hiện nên thường được ứng dụng.

4. Chỉ thị DNA

Là bất kì đoạn DNA nào được sử dụng dùng để phân biệt sự khác nhau về kiểu hình (tính trạng) giữa các cá thể, dòng, giống, và giữa các loài đều được gọi là phương pháp chỉ thị DNA đánh dấu gen.

Hiện nay có rất nhiều phương pháp đánh dấu phân tử như sự đa hình về các isozyme, protein, vật chất và DNA trong đó chỉ thị DNA được sử dụng rộng rãi nhất

trong nghiên cứu di truyền và chọn giống. Riêng phương pháp chỉ thị DNA đánh dấu gen tạm thời có thể có 10 phương pháp, xếp theo thứ tự thường được sử dụng như sau:

4.1. Lai DNA/DNA (phương pháp RFLP, sự đa hình các đoạn cắt giới hạn).

Tiến hành phương pháp này cần sử dụng enzyme cắt giới hạn (RE) cắt DNA genome, điện di phân tách trên gel. Nếu genome sinh vật nhỏ như vi khuẩn, virus... thì khi cắt bằng RE thường sẽ cho ra ít đoạn DNA, bên cạnh đó nồng độ các đoạn được cắt ra lại lớn nên chỉ cần sử dụng các phương pháp điện di hiện nay là có thể phân tích được sự đa hình của các đoạn cắt giới hạn. Còn nếu trường hợp genome sinh vật lớn như người và động thực vật thì khi cắt bằng RE sẽ cho ra rất nhiều đoạn DNA, các đoạn này lại chênh nhau rất ít bp, nên khi điện di chúng sẽ chạy xít nhau (hiện tượng smear) nên không thể nhận diện phân biệt được đa hình giữa các đoạn cắt giới hạn. Vì thế sau điện di phải chuyển các vạch băng lên màng lai, rồi lai với mẫu dò. Kết quả có thể thu được các vạch băng lai trên màng lai, vị trí của vạch lai phụ thuộc vào trình tự DNA của genome, loại RE cắt giới hạn và mẫu dò để lai. Vạch băng nào lai được với mẫu dò chứng tỏ đoạn DNA trong chúng phải chứa mẫu dò và nếu hiện hình của vạch băng này có liên quan đến gen đánh dấu thì đoạn DNA mẫu dò đó sẽ chắc chắn hay ít nhất cũng phải chính là đoạn DNA nằm gần lân cận hoặc ngay chính gen đánh dấu.

- Chỉ thị này phải có 2 điều kiện là RE sử dụng và đoạn mẫu dò đem lai có liên kết.
- Tùy số và loại RE sử dụng và độ dài của mẫu dò mà có số vạch băng lai có khác nhau, thường chỉ có 1 – 2 vạch băng được lai, trường hợp nhiều vạch băng lai có thể mỗi vạch băng liên kết với một gen khác nhau.
- Minh họa qua hình vẽ, ví dụ ở một nơi nào đó trên nhiễm sắc thể chứa đoạn mẫu dò liên kết với một gen nào đó, tùy từng kiểu gen mà có vị trí cắt bởi RE khác nhau kết quả sẽ tạo ra các đoạn được lai hay không lai khác nhau. Nếu hiện tượng này có liên quan đến gen nào đó thì chúng ta xác định được chỉ thị RFLP này có liên kết với gen mục tiêu nghiên cứu.
- Hiện nay có thể dùng máy điện di mao quản phân tích một cách chính xác được thành phần các đoạn DNA trong hỗn sau khi được cắt bởi RE và không cần đến việc lai với mẫu dò để xác định đa hình.

4.2. ALP (Amplicon length polymorphism)

Sự đa hình về chiều dài những đoạn DNA được nhân lên trên cơ sở nhân gen PCR. Sự đa hình được phát hiện ngay bằng cách điện di sản phẩm nhân gen (DNA) bằng PCR trên gel thường là agarose hoặc acrylamide. Phương pháp PCR là phương pháp nhân một đoạn DNA nhất định trong genome khi đã biết trước trình tự, ta thiết kế hai mồi chặn biên, xây dựng chu kỳ phản ứng rồi nhân lên. Khi điều tra quần thể, các dòng giống khác nhau có thể thu được các kiểu hình vạch băng như sau:

+ Vạch băng điện di đúng như vạch băng chuẩn về chiều dài kích thước, thường có thể kết luận đoạn DNA mục tiêu nhân lên giữa chúng là giống nhau. Tuy nhiên, chúng có thể khác nhau do thay thế nu nọ bằng nu kia, hoặc vị trí các nu trong đoạn nhân lên thay đổi. Trong trường hợp này muốn phân biệt được đa hình thì phải dùng RE cắt tiếp hoặc phải dùng phương pháp xác định trình tự nu, trong trường hợp này người ta gọi là phương pháp PCR-based RFLP.

+ Vạch băng dài ngắn khác nhau là do đoạn nhân lên so với đoạn gốc xảy ra đột biến tăng hoặc mất đoạn, có thể biết được tăng mất bao nhiêu nu bằng cách so sánh với mẫu DNA chuẩn.

+ Thu được nhiều vạch băng nhân lên là do trình tự lặp lại, ít nhất cũng ở đoạn gần mồi.

- + Không nhân lên được vạch băng nào có thể do đột biến mất đoạn ở kiểu gen đó, hoặc mất đoạn ở một trong hai nơi ghép nối. Chú ý phải loại trừ nguyên nhân do kỹ thuật PCR trong thành phần phản ứng thiếu một vài thành phần. Để khắc phục nên dùng cách pha cocktail góp chung.
- + Khi thấy đa hình có liên kết với gen nào đó thì đa hình vạch băng DNA đó chắc chắn ít nhiều phải nằm cạnh gen liên kết.

4.3.AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*)

Do Vos và cộng sự đề xuất năm 1995. Phương pháp này tiến hành trên cơ sở đầu tiên người ta dùng enzyme cắt giới hạn để cắt DNA genome, ta sẽ thu được các đoạn DNA có 2 đầu cắt chứa trình tự nhận biết của enzyme cắt (1 or 2 RE) và tùy mỗi trình tự enzyme nhận biết cắt mà người ta dùng đoạn DNA adapter dính tương ứng khác nhau, rồi dùng enzyme ligase nối lại. Trên cơ sở trình tự adapter, trình tự đoạn nhận biết của RE ta thiết kế 2 đoạn mồi kéo dài thêm 1 - 2 nucleotide ngẫu nhiên gắn thêm vào đầu 3' của adapter, rồi dùng kỹ thuật PCR để nhân các đoạn DNA được cắt lên. Các đoạn được nhân lên phải là các đoạn có 2 đầu cắt đối diện nhau, được adapter gắn vào và có 2 đầu chứa 1 - 2 nucleotide bổ sung với trình tự nucleotide kéo dài của mồi. Sau đó điện di sản phẩm nhân PCR ta sẽ thu được đa hình các vạch băng. Sự đa hình trong quần thể điều tra phụ thuộc vào kiểu gen, loại enzyme cắt giới hạn sử dụng, trình tự adapter, số lượng và loại nucleotide tiến thêm vào đầu 3 của mồi. Có thể nhân lên được nhiều vạch băng tùy theo genome, các vạch băng sẽ được đánh số và có thể dự đoán được chiều dài nucleotide. Giả sử có một vạch băng nào đó được nhân lên ổn định và liên kết với một gen nào đó thì vạch băng đó ít nhất cũng phải nằm gần gen liên kết. Một chỉ thị có thể áp dụng để điều tra được với nhiều gen liên kết khác nhau, vì mỗi đoạn nhân lên có thể ở các vùng gen khác nhau và như vậy sẽ liên kết với các gen mục tiêu khác nhau.

4.4.RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*)

Sự đa hình những đoạn DNA được nhân lên một cách ngẫu nhiên trên cơ sở phương pháp PCR dùng một đoạn mồi, đơn ngắn, ngẫu nhiên thường dài từ 5 - 10 nucleotide. Do dùng một đoạn mồi đơn nên khi kết gắn mồi sẽ có nhiều chỗ có trình tự bổ sung kết gắn được với mồi, đặc biệt dung mồi là trình tự lặp lại trong genome. Khi phản ứng nhân PCR tiến hành thì chỉ những đoạn DNA nào có hai đầu chứa hai trình tự mồi nhưng ngược chiều nhau mới được nhân lên. Có rất nhiều đoạn dài ngắn khác nhau có thể được nhân lên, tuy nhiên do thiết lập một chế độ nhiệt nên chỉ những đoạn nào có chế độ nhân phù hợp mới nhân được lên, hoặc nhân với số lượng đủ lớn để có thể quan sát được. Nhiều công bố cho thấy đối với nhiều chu kỳ nhiệt, phần lớn các đoạn được nhân lên dài từ 100 đến 800 bp. Số vạch băng nhân lên tùy theo genome thường giao động từ 5 - 25 vạch, tùy khoảng cách giữa các vạch băng xa gần, số vạch băng nhiều ít và lượng DNA trong mỗi vạch băng mà ta chọn gel điện di có chiều dài ngắn và phương pháp nhuộm gel quan sát khác nhau. Giả sử có một vạch băng nào đó có biểu hiện liên kết với một gen nào đó thì đoạn đó ít nhất cũng nằm gần gen liên kết. Các vạch băng được đánh số từ trên xuống dưới và có thể dự đoán chiều dài từng vạch băng cách so sánh với vạch chuẩn của ladder.

4.5. SSR (*Simple sequence repeat, microsatellite*)

- Là phương pháp nhân hoặc lai những đoạn DNA lặp đi lặp lại trong genom, để tìm sự đa hình. Như ta biết trong genome sinh vật có rất nhiều trình tự lặp lại đơn giản, năm rải rác hoặc liên tục. Chúng có thể nằm trong một vùng được chặn biên bởi trình tự không lặp lại. Sử dụng chỉ thị này trong đánh dấu gen có 2 cách:

- Cách thứ nhất chiết tách, phân cắt DNA genome bằng một hoặc vài enzyme cắt giới hạn, phân tách trên trường điện di gel agarose, chuyển lên màng lai, sau đó đem lai với mẫu dò, mẫu dò là các đoạn lặp lại đơn giản được tổng hợp nhân tạo hoặc được biết trước, thí dụ (GT)_n đánh dấu. Kết quả thu được nhiều vạch băng được lai, các vạch băng này chắc chắn bên trong chứa trình tự lặp lại và có 2 đầu là trình tự nhận biết của RE. Nếu đoạn lai nào đó liên kết với một gen thì đoạn đó chắc chắn phải nằm gần gen đó.

- Các thứ 2 bằng cách nào đó ta xác định được một đoạn DNA nhân dòng có chứa bên trong trình tự lặp lại, ta xác định trình tự hai vùng biên, rồi dùng trình tự này thiết kế cặp mồi, Sau đó dùng phản ứng PCR nhân lên sẽ được đa hình chiều dài đoạn đó giữa các genome. Kết quả ta cũng có thể thu được nhiều đoạn nhân lên khác nhau chứng tỏ đoạn đó có độ lặp lại nhất định. Nếu chỉ có 2 vạch băng thì có lẽ chỉ có một trình tự lặp lại nhưng ở giữa đoạn nhân có số và trình tự nu khác nhau.

4.6. *Chỉ thị EST (Expressed site tag)*

Là phương pháp nghiên cứu đa hình các gen biểu hiện của các genome có liên kết với gen mục tiêu. Người ta thiết kế các chip nhỏ trên đỉnh các đoạn oligonucleotide đã biết trước, mỗi đoạn tương ứng bổ sung với một mRNA hoạt động của một loài hay mô sinh vật, dùng làm mẫu lai thử. Hỗn mRNA của các genome mô điều tra được chiết xuất, rồi đem lai với chip sẽ biết được chỗ nào lai được từ đó tìm được đoạn oligonucleotide lai liên kết gen.

4.7. *RT-PCR*

Phương pháp chỉ thị nhằm định lượng một DNA hoặc mRNA ban đầu để xác định sự đa dạng di truyền và liên kết gen với các tính trạng. Có 2 nội dung là Real time PCR và kỹ thuật dùng enzyme Reverse Transcriptase nhân các mRNA mục tiêu sau đó đo lượng và số các phân đoạn để xác định sự có mặt, liều lượng từng nguyên bản ban đầu.

4.8. *MRDHV- DNA* (Moderately repeat, dispersed, and highly variable DNA, minisatellite)

Đây là phương pháp dùng kỹ thuật DNA để nghiên cứu sự đa dạng của những đoạn DNA, mẫu vệ tinh nhỏ dễ biến động, phân tán và lặp đi lặp lại trong bộ genome của sinh vật.

4.9. *Chỉ thị ISSR* (Inter- Simple Sequence Repeat)

Là phương pháp nghiên cứu đa hình trình tự các đoạn nằm giữa 2 đoạn chặn biên lặp lại đơn giản. Thí dụ như đoạn giữa đoạn trình tự lặp lại GT như sau: GTGTGTGTGTGT ATCGGAATTGGCC.....CCATCA GTGTGTGT, người ta thiết kế một cặp mồi trên trình tự lặp lại nằm ở 2 đầu đoạn gạch chân, bổ sung thêm ngẫu nhiên từ 1-2 nu trong 4 nu vào đầu 3' của mồi, các genome khác nhau sẽ có số và chiều dài trình tự ở giữa đoạn

lập lại được nhân lên sẽ khác nhau. Sự khác nhau này có thể có liên quan đến các gen và tính trạng nào đó trong sinh vật.

4.10. Đa hình trình tự sợi đơn (single strand conformation DNA polymorphism)

Là phương pháp nghiên cứu sự đa hình của các đoạn DNA có trình tự sợi đơn trong bộ genome sinh vật có liên kết với các gen quy định tính trạng mục tiêu. Đoạn DNA nào có trình tự sợi đơn khi điện di sẽ di chuyển tốc độ khác nhau so với sợi kép cùng kích thước, từ đó tạo ra sự đa hình, sự đa hình này có liên kết với gen nhất định.

5. Ưu điểm chỉ thị DNA đánh dấu gen trong chọn giống

a. Nhược điểm chọn giống truyền thống

Cho đến hiện nay, phương pháp chọn giống kinh điển gồm lai hữu tính sau đó chọn lọc để tạo ra giống tốt, phương pháp này tuy đã đạt được những thành tựu vô cùng to lớn kể từ cuộc cách mạng xanh phát hiện ra gen lặn vào những năm 60, xong vẫn còn có một số nhược điểm chính như sau:

- Mất rất nhiều thời gian để tạo ra một giống mới, thường mất ít nhất từ 7 đến 10 năm.
- Trong con lai tổ hợp lại hàng triệu gen cả tốt lẫn xấu và hoàn toàn ngẫu nhiên từ bố mẹ.
- Tạo ra những giống thường có phổ di truyền hẹp, ít có khả năng chống chịu được nhiều loại sâu bệnh và các điều kiện xấu của môi trường, khả năng thích ứng hẹp.

Chính vì thế yêu cầu cần đặt ra cho công tác chọn tạo giống trong tương lai là phải ứng dụng các tiến bộ kỹ thuật trong kỹ thuật phân tử DNA để cải lương hơn nữa các giống cây trồng, tạo cho nó có nhiều đặc điểm tốt hơn nữa, phổ thích ứng rộng và đa dạng hơn nữa, năng suất và chất lượng cao hơn nữa mới đáp ứng được nhu cầu ngày càng cao của con người.

Trong những năm gần đây với sự phát triển nhanh chóng của nghiên cứu bộ genom, việc lập bản đồ các gen có sử dụng các chỉ thị DNA để đánh dấu gen. Trên rất nhiều loài cây trồng hiện nay người ta đã thiết lập được bản đồ chi tiết về các chỉ thị DNA đánh dấu gen liên kết với nhiều gen qui định các tính trạng nông sinh học quan trọng khác nhau, trên cơ sở đó đã tiến hành chọn lọc gián tiếp dựa trên các chỉ thị DNA đánh dấu này, đây gọi là phương pháp chọn lọc dựa vào chỉ thị DNA đánh dấu gen (DNA marker-assisted selection).

b. Ưu điểm chọn giống DNA đánh dấu gen

- * Tìm và phát hiện những cá thể có chứa một gen nhất định nào đó trong quần thể đang phân li, trên cơ sở tìm sự có mặt của một đoạn DNA đánh dấu nào đó liên kết chặt với gen đó chứ không phải dựa vào kiểu hình của nó.
- * Chính vì thế mà có thể đánh giá từng cá thể trong quần thể ở bất kì giai đoạn sinh trưởng nào, trong bất kì môi trường hay điều kiện môi trường đánh giá nào.
- * Cùng một lúc đánh giá được nhiều tính trạng khác nhau trên một cá thể sinh vật.
- * Dùng phương pháp chọn lọc DNA đánh dấu gen có thể loại trừ được ảnh hưởng của mối tương tác giữa các alen khác nhau của một locus hoặc giữa các locus khác nhau lên sự biểu hiện của tính trạng.

- * Áp dụng phương pháp này có thể tăng được hiệu quả và độ chính xác của chọn lọc đặc biệt đối với những tính trạng khó biểu hiện ra kiểu hình.
- * Vì tính đa hình của các đoạn DNA là rất cao lên đã tạo khả năng cho nhà chọn giống phân biệt được sự sai khác rất nhỏ giữa hai cá thể sinh vật có họ hàng gần nhau, thậm trí khác nhau chỉ do đột biến nhỏ hoặc cây tái tổ hợp, phân biệt được giữa các alen, các chủng sinh lý gây bệnh v. v.

6. Trình tự các bước nghiên cứu ứng dụng chỉ thị DNA đánh dấu gen

6.1. Tham khảo và ứng dụng các chỉ thị đánh dấu gen đã công bố

Đã từ lâu, rất nhiều gen qui định các tính trạng về hình thái, nông sinh học, isozyme, tính chống chịu và một số tính trạng khác v. v. bằng phương pháp truyền thống đã được định vị trên bản đồ liên kết và hiện nay người ta đã xác định được mức độ liên kết giữa chúng với nhau và với các đoạn DNA đánh dấu.

Bản đồ gen là sự định vị và mối quan hệ liên kết giữa các gen với các chỉ thị và tính trạng trong bộ genome của một loài sinh vật. Gần đây hơn nữa nhờ thành tựu của kỹ nghệ DNA người ta đã xác định được sự liên kết giữa những đoạn DNA đánh dấu khác nhau trong bộ genome của nhiều loài sinh vật có liên quan đến nhiều tính trạng. Khi muốn áp dụng chỉ thị DNA trong việc phát hiện và chọn lọc gen thì chúng ta tr-ớc hết phải tìm, đọc các bài báo khoa học nghiên cứu về gen và chỉ thị quan tâm. Các thông tin cần làm rõ là: loại chỉ thị nào, cách tiến hành và để phát hiện gen là gì, gen đó quy định tính trạng nào. Liệu gen đó có đúng là gen quy định tính trạng hay gần giống với gen quy định tính trạng mà mình muốn quan tâm không. Muốn trả lời các câu hỏi trên chúng ta phải kiểm tra lại kết quả phân tích DNA với đánh giá kiểu hình trên vật liệu giống cụ thể của mình, để lựa chọn chỉ thị đúng liên kết chặt.

6.2. Xác định chỉ thị phân tử mới liên kết gen

Để tiến hành nghiên cứu lập bản đồ xác định một chỉ thị DNA liên kết với một gen quy định một tính trạng nào đó (mới) dựa trên các đoạn DNA đánh dấu gen, người ta phải tuân thủ các bước cơ bản sau đây:

- * Chọn tính trạng cần thiết để đánh dấu, tính trạng đó phải có ý nghĩa quan trọng đối với mỗi loại cây trồng;
- * Chọn bố mẹ khác nhau về tính trạng đó để lai với nhau;
- * Tạo ra quần thể sử dụng để nghiên cứu lập bản đồ gen;
- * Đo đếm, phân tích tính trạng đó trong quần thể nghiên cứu;
- * Phân tích di truyền sự đa hình của gen đánh dấu trong quần thể;
- * Phân tích khả năng liên kết và xác định độ liên kết. Sau đây sẽ trình bày lần lượt các bước và kèm theo ví dụ minh họa.
- * Xác định lần lượt mối quan hệ giữa từng gen, chỉ thị một, nếu chúng có liên kết thì chắc chắn phải cùng nằm trên một nhiễm sắc thể, hay một nhóm liên kết. Xác định từng nhóm liên kết, lần lượt đến tất cả các nhóm liên kết và đến toàn genome.

6.3. Chọn tính trạng để đánh dấu gen

Tính trạng cần thiết để lập bản đồ gen nên là những tính trạng nông sinh học quan trọng vì chi phí cho quá trình lập bản đồ gen còn quá đắt đối với chúng ta đặc biệt là ở các nước đang phát triển. Tính trạng chọn lọc đánh dấu cần phải có khả năng sau này hiện thực được trong thực tế bằng phương pháp chọn lọc đánh dấu gen. Mặt khác cũng cần quan tâm đến những hiểu biết của chúng ta về tính trạng đó được nhiều hay ít, chúng ta đã có trong tay dòng hoặc giống nào có tính trạng này chưa, cũng như thông tin liên kết của gen đó trên bản đồ nhiễm sắc. Nếu vị trí của gen định đánh dấu đã biết là nằm trên một nhiễm sắc thể nào đó rồi thì việc xác định lập bản đồ gen này sẽ đơn giản đi rất nhiều.

6.4. Chọn bố mẹ để lai và tạo quần thể

Điều quan trọng nhất trong chọn cặp bố mẹ là phải có sự sai khác nhau rõ rệt về tính trạng nghiên cứu và sự di truyền tính trạng này phải do nhân quy định và có thể được truyền từ cả hai bố hoặc mẹ. Nếu sự phân li rõ ràng về kiểu hình không thể thu được từ hai bố mẹ thì việc lập bản đồ gen cho tính trạng này sẽ gặp rất nhiều khó khăn. Mức đa hình giữa hai bố mẹ nhìn chung càng cao thì càng tốt, tuy nhiên thí dụ đối với lúa mức đa hình giữa giống Indica và Japonica là rất cao nhưng tính bất dục của con lai giữa chúng lại rất lớn do vậy đây cũng là một trở ngại cho công tác lai giữa hai dạng lúa này. Quần thể sẽ có nhiều biểu hiện thiên hướng mạnh về phía bố mẹ nào thích ứng với điều kiện môi trường mà từ đó quần thể được tạo ra.

Kích thước quần thể (số lượng các cá thể trong quần thể) dùng để tiến hành lập bản đồ gen, nhìn chung phải đủ lớn để cho phép đánh giá được một cách chính xác giá trị liên kết. Tuy nhiên vẫn chưa rõ ràng lắm về quần thể nên lớn bao nhiêu là vừa để có kết quả chính xác nhưng lại chỉ cần chi phí thấp. Vì việc lập bản đồ di truyền dựa trên các chỉ thị phân tử vẫn còn quá đắt, rất nhiều báo cáo khoa học đã sử dụng một quần thể nhỏ. Đối với tính trạng chất lượng đơn gen, tiêu chuẩn hiện tại đang dùng ở nhiều phòng thí nghiệm là từ 100 đến 150 cá thể.

6.5. Tạo ra quần thể dùng để lập bản đồ gen

Sau khi lai giữa các bố mẹ khác nhau về cặp tính trạng cần đánh dấu, từ tổ hợp lai này ta có thể tạo ra được các kiểu quần thể thích hợp cho công việc lập bản đồ gen như sau:

Quần thể các dòng nhị bội hóa (DHL, double haploid lines), được tạo ra từ nuôi cấy bao và hạt phấn cây F1 sau đó lưỡng bội hoá tạo thành các dòng thuần có các gen hầu như đồng hợp tử toàn bộ.

Quần thể các dòng thuần tái tổ hợp (RIL, recombinant inbreeding lines), bằng cách tự thụ phấn liên tục nhiều đời (thường từ 7 - 8 đời) không tiến hành chọn lọc bất cứ tính trạng nào. Có thể tạo được quần thể này bằng phương pháp để lại một hạt, bắt đầu tiến hành từ quần thể F2, sau đó cho tự thụ liên tục đến khoảng đời F7 hoặc F8 là được.

- Những dòng đẳng gen cùng quần thể F2 tương ứng, có nhiều cách tạo ra dòng đẳng gen như tự thụ liên tục các đời cây dị hợp tử về tính trạng đó đến 7-8 đời sẽ thu được các dòng đẳng gen. Hoặc có thể tiến hành dùng 2 cá thể đời F2, có hoặc không có tính trạng đó lai lại liên tục với một bố mẹ và đồng thời chọn lọc theo 2 hướng trái ngược nhau sẽ tạo được dòng đẳng gen.
- Quần thể các cá thể đời F2, số lượng cá thể phải nhiều.
- Quần thể được tạo ra do lai lại giữa các cây F1 với bố hoặc mẹ (BC1F1).

- Một vài quần thể khác như lai test cross và lai 3 cũng có thể được sử dụng trong nghiên cứu lập bản đồ gen, tuy nhiên việc chọn quần thể nào còn tùy theo nhà nghiên cứu có nó hay không.

6.5. Quan sát, đo đếm và đánh giá kiểu hình

- Nhìn chung tính trạng chất lượng đơn gen dễ đo đếm và đánh giá, tuy nhiên biểu hiện của chúng phần nào có chịu tác động của môi trường, do vậy cần phải đo và đánh giá một cách chính xác sự biểu hiện kiểu hình.
- Sử dụng quần thể nào cho phép kiểu hình lặp lại ở các điều kiện môi trường khác nhau sẽ làm tăng được độ chính xác khi đánh giá, đặc biệt đối với tính trạng mẫn cảm đối với sự thay đổi của môi trường.
- Một số trường hợp dựa vào kiểu hình không còn chính xác nữa thì nên dùng quần thể các dòng lưỡng bội hoá hoặc dòng tái tổ hợp thuần chủng sẽ có hiệu quả hơn nhiều.
- Nếu chỉ có quần thể F2 thôi thì cố gắng chiết xuất DNA của từng cá thể một để phân tích rồi sau đó đối chiếu với số liệu kiểu hình của đời F2.
- Trong bất kì trường hợp nào việc phân tích kiểu hình đều vất vả và cả, tuy nhiên đây là bước cực kì quan trọng quyết định độ chính xác của lập bản đồ gen.

6.6. Phân tích kiểu gen

Phân tích kiểu gen là cốt lõi của kĩ thuật lập bản đồ gen. Đầu tiên tiến hành phân tích hai bố mẹ về sự đa hình của gen đánh dấu, sau đó điều tra sự phân ly của sự đa hình này trong quần thể phân ly F2. Cả hai phương pháp RFLP và PCR đều có thể được người ta đang dùng hiện nay. Vì phân tích kiểu gen khá tốn kém cho nên nhiều nhà nghiên cứu đã rút ngắn nhiều công đoạn, tìm và sử dụng những kĩ thuật dễ dàng và rẻ nhất như chỉ lập bản đồ những gen đã biết trước trên nhiễm sắc thể; sử dụng những dòng đẳng gen để nghiên cứu; dùng kĩ thuật phân tích phân ly hỗn hợp, chi tiết sẽ được bàn kĩ ở phần sau.

6.7. Phân tích mức độ liên kết

- Phân tích mức độ liên kết giữa 2 gen rất đơn giản có thể tiến hành trực tiếp bằng tỷ lệ số cá thể có trao đổi chéo trên tổng số cá thể nghiên cứu thông qua lai phân tích.
- Dùng phương pháp điều tra thống kê các cá thể trong các quần thể giao phối tự nhiên, các phá hệ đối với người và động vật sau đó thử xem độ lặp lại.
- Có thể dùng phương pháp phân tích đơn hạt phấn từ cây dị hợp tử để xác định khả năng liên kết giữa các gen với chỉ thị DNA, trường hợp này cần tiến hành phân tích trên 1000 hạt phấn đơn mới có kết quả chính xác.
- Trường hợp khi cùng một lúc cần tính toán độ liên kết giữa hai hay nhiều gen đánh dấu với các gen tính trạng khác thì hiện nay người ta phải dùng đến máy tính điện tử có chương trình phần mềm riêng (Mapmaker).

7. Phương pháp đeo thẻ tính trạng đơn gen ở lúa

Mặc dầu hiện nay người ta đã tìm ra được rất nhiều các RFLP đánh dấu bao phủ lên hầu như toàn bộ genome cây lúa, nhưng việc tiến hành đánh dấu gen cho từng tổ hợp lai cụ thể vẫn còn là một công việc khá hóc búa. Chính vì vậy cần thiết phải nghiên cứu để

tìm ra được một quy trình lập bản đồ gen đơn giản, hiệu quả và dễ thực hiện. Sau đây là một số trường hợp cụ thể:

7.1. Lập bản đồ gen khi biết vị trí trên nhiễm sắc thể

Các bước tiến hành như sau:

1. Chọn gen để lập bản đồ
2. Chọn bố mẹ có sự sai khác về ví dụ chống và mẫn cảm bệnh
3. Lai để có quần thể F2 phân ly
4. Chiết xuất DNA từ mỗi cá thể F2 và bố mẹ
5. Lây nhiễm từng cây F2 và bố mẹ rồi thu và tính được tỷ lệ cây chống chịu
6. Chọn các chỉ thị đánh dấu trên cơ sở bản đồ RFLP, các chỉ thị này cách nhau khoảng 20 cM.
7. Điều tra sự đa hình (các vạch băng) của các chỉ thị chọn lọc trên cây bố mẹ. Thí dụ bố kháng bệnh dùng chỉ thị này cho ra vạch băng này còn mẹ nhiễm bệnh thì dùng đúng chỉ thị đó lại không cho ra vạch băng đó hoặc cho ra vạch băng khác.
8. Sử dụng khoảng 6 enzyme cắt hạn chế để có cơ hội tạo ra sự đa hình.
9. Cho điểm và đánh dấu tất cả các cá thể F2 về tính đa hình đối với từng RFLP đánh dấu.
10. Ghi chép số liệu.
11. Tiến hành phân tích độ liên kết, sử dụng máy tính điện tử nếu có.

Ví dụ như lập bản đồ liên kết cho gen Xa-4. Để tiến hành, trước hết người ta phải tạo ra quần thể từ tổ hợp lai giữa giống Ma Hae với giống IR36. Đánh giá xác định kiểu hình về tính kháng bệnh và mẫn cảm bệnh của từng cá thể được tiến hành trên quần thể F2 và F3. Trước đó người ta đã được biết gen Xa-4 này nằm trên nhiễm sắc thể số 11, vì thế người ta chỉ chọn những RFLP đánh dấu nào nằm trên nhiễm sắc thể số 11 để điều tra nghiên cứu về tính đa hình giữa bố và mẹ và mức độ liên kết của những RFLP chọn lựa này với gen nghiên cứu đó thôi. Sau khi phân tích độ liên kết đã phát hiện thấy rằng gen Xa-4 nằm ở giữa hai RFLP đánh dấu là RZ536 và RG 303 được trình bày ở hình sau:

RZ536	Xa-4	RG303	RG1109	CD0520
Mc: 0,0	8,0	12,5		17,5

Bằng cách chọn lọc các gen đánh dấu đã biết trước vị trí của nó trên nhiễm sắc thể thì có thể loại trừ được trên 90% công việc thử, tìm và thăm dò các RFLP khác khi không có chút thông tin nào về chúng.

Chú ý không cần lai DNA đối với những RFLP đánh dấu có biểu hiện đa hình nhưng không có trao đổi chéo có nghĩa là các chỉ thị này liên kết quá chặt với gen nghiên cứu đó rồi. Ví dụ để tiến hành định vị gen xa-5, người ta đã điều tra phân tích 53 cá thể F2, đã phát hiện thấy có 3 vùng tập trung các marker liên kết với gen xa-5 theo sơ đồ như sau:

<u>RFLP</u>	<u>Độ liên kết Mc</u>
RG558	
RZ395	1,0
RG207	
xa-5	27,9
CD0520	
	7,9
RG360	

Bằng cách làm như vậy chúng ta có thể xác định một cách chính xác những cá thể có tái tổ hợp (có trao đổi chéo) và mức độ liên kết của bất kì một chỉ thị nào với gen cần nghiên cứu.

7.2. Lập bản đồ gen dùng các dòng đẳng gen

- Dòng đẳng gen là các dòng hoặc các cá thể hầu như giống nhau hoàn toàn về kiểu gen trừ một vài gen quan tâm nào đó là khác nhau.
- Dòng đẳng gen thường được tạo ra bằng cách lai lại liên tục với một bố hoặc mẹ nhiều đời rồi tiến hành chọn lọc theo một gen hay 2 hướng tính trạng tương phản nào đó (ví dụ như kháng và nhiễm bệnh).
- Đối với cây tự thụ phấn chọn lọc liên tục từ cây dị hợp tử ở mỗi đời về chỉ 2 tính trạng tương phản đó thì có thể tạo ra được cặp dòng đẳng gen, có nghĩa là giữa các dòng đẳng gen với nhau chỉ khác nhau bởi phần DNA liên quan đến gen quan tâm, thí dụ như giống IR24 miễn cảm với bệnh bạc lá với các dòng đẳng gen với nó là các dòng NIL. Chúng giống hệt nhau và giống hệt với giống dung là nền gen IR 24 nh-ng chứa các gen kháng bệnh bạc lá khác nhau, kí hiệu là IRBB1, IRBB2, IRBB3....IRBB21, có nền gen chung là giống IR24 và lần lượt chứa các gen Xa1 đến Xa21.
- Trình tự các bước tiến hành: bước đầu tiên quan trọng nhất là phải tạo ra được các dòng đẳng gen, sau đó tiến hành phân tích chỉ thị DNA đối với 2 quần thể đẳng gen chứa gen đó và không chứa gen đó trong dòng hợp này là IR24 và bố mẹ. Có thể thử lại kết quả ở các quần thể F2 và dòng giống khác có chứa gen đó.

7.3. Lập bản đồ gen trên cơ sở phân tích phân ly hỗn hợp(BSA)

Đây được coi là phương pháp tiến hành dựa trên việc tạo thành các dòng đẳng gen giả từ quần thể F2.

Các bước cụ thể như sau:

1. Chọn gen để lập bản đồ.
2. Chọn bố mẹ để lai cần sai khác rõ rệt về tính trạng cần lập bản đồ.
3. Tiến hành lai và tạo quần thể F2.
4. Chiết xuất DNA của từng cá thể F2 và bố mẹ chúng.
5. Tiến hành phân tích kiểu hình.
6. Chọn những chỉ thị trong số bản đồ các RFLP đã được biết qua một số công trình nghiên cứu nào đó đã công bố, mỗi một chỉ thị nên cách nhau khoảng 20 cM.
- 7a. Trồng các gia đình cây F3 để xác định những cá thể F2 đồng hợp tử, có 2 nhóm kiểu cây đồng hợp tử trội và lặn về tính trạng định lập bản đồ.
- 7b. Hỗn hợp DNA của các cây cùng một kiểu đồng hợp tử, như vậy sẽ có 2 hỗn hợp ADN của 2 nhóm đồng hợp tử.
- 7c. Tiến hành điều tra sự đa hình của các chỉ thị ở 2 DNA bố mẹ cùng với hỗn hợp DNA hai nhóm đồng hợp tử.
8. Cho điểm tất cả các cá thể F2 có đa hình về các chỉ thị đánh dấu.
9. Tiến hành phân tích độ liên kết bằng máy nếu có. Độ liên kết = % tổng số cá thể có trao đổi chéo/ tổng số cá thể nghiên cứu.

Hiện nay kỹ thuật RAPD đang được ứng dụng rộng rãi nhất trong trường hợp ứng dụng phương pháp này vì cho kết quả nhanh. Hình sau đây sẽ trình bày ví dụ mẫu về kết quả giả định khi sử dụng RAPD để lập bản đồ liên kết.

<u>Ps</u>	<u>Pr</u>	<u>S pool</u>	<u>R pool</u>	<u>Các trường hợp đa hình có thể xảy ra</u>
-----	-----	-----	-----	Đơn hình
-----		-----	-----	Đa hình nhưng không liên kết gen mục tiêu
-----		-----		Liên kết với dạng mầm cảm
	-----	-----	-----	Đa hình nhưng không liên kết
	-----		-----	Liên kết với tính chống chịu

Ghi chú: Ps là kiểu gen bố (mẹ) mầm cảm bệnh; Pr là kiểu gen của bố (mẹ) kháng bệnh. S pool là hỗn hợp DNA của các cây đồng hợp tử đời F₂ mầm cảm bệnh; còn R pool là hỗn hợp DNA của các cây đồng hợp tử đời F₂ kháng bệnh. Các vạch chấm là các vết băng điện di khi dùng một đoạn mồi để nhân gen phương pháp RAPD thu được.

Câu hỏi ôn tập

Chương 2.

PHƯƠNG PHÁP PCR TRÊN CƠ SỞ RFLP

1. Đặt vấn đề

Lúa là cây lương thực nuôi sống trên 50% dân số trên thế giới. Thông qua công tác chọn giống truyền thống, các nhà khoa học đã tạo ra được rất nhiều giống lúa tốt có tiềm năng năng suất cao, chất lượng tốt và có nhiều đặc tính nông sinh học quý, góp phần đáng kể làm tăng sản lượng lúa trên thế giới. Tuy nhiên dân số trên thế giới vẫn còn đang và sẽ tăng với tốc độ tương đối cao so với sản lượng lúa gạo được tăng lên như hiện nay. Chính vì vậy các nhà khoa học cần phải tìm tòi, nghiên cứu, đề ra và chọn tạo được mô hình giống cây lúa kiểu mới, có năng suất cao hơn nữa so với các giống hiện tại để đáp ứng được nhu cầu về lúa gạo ngày càng tăng ở thế kỷ 21 này. Một trong những hướng đi hiện nay là sử dụng kỹ nghệ chuyển nạp gen ngoại vào cây trồng đồng thời ứng dụng kỹ thuật chỉ thị ADN đánh dấu gen để chọn lọc các tính trạng. Để phát triển và khai thác được phương pháp chọn lọc này đối với lúa thì cần phải có những nghiên cứu về genom và lập được bản đồ di truyền những gen qui định tính trạng nông sinh học quan trọng. Hiện nay bằng phương pháp chỉ thị RFLP người ta đã lập được bản đồ di truyền liên kết rất chặt giữa các chỉ thị RFLP với nhiều gen qui định các tính trạng nông sinh học quan trọng, tạo cơ sở di truyền cho việc ứng dụng kỹ thuật chỉ thị ADN đánh dấu gen trong chọn lọc gián tiếp nhiều tính trạng. Bảng dưới đây trình bày kết quả nghiên cứu về bản đồ di truyền liên kết giữa các chỉ thị RFLP với các gen nông sinh học quan trọng, đây là tài liệu tham khảo vô cùng quan trọng giúp các nhà chọn giống khi muốn ứng dụng kỹ nghệ này trong chọn lọc gián tiếp những tính trạng.

Bảng 1.4. Bản đồ liên kết di truyền giữa gen qui định tính trạng nông sinh học quan trọng với RFLP đánh dấu

Gen	Tính trạng	Nguồn cho	NS Thế	RFLP và độ liên kết	Tài liệu tham khảo
<i>Bph-10(t)</i>	Kháng rầy nâu	<i>O. austral-iensis</i>	12	RG457 3.68cM	Iishi et al. 1994
<i>ef</i>	Chín sớm	<i>O. austral-iensis</i>	10	CDO98 9.96cM	Iishi et al. 1994
<i>fgr</i>	Mùi thơm	Della	8	RG28 4.5 cM	Ahn et al. 1992
<i>Gm-2</i>	Kháng sâu lằn	Phalguna	4	RG329 1.3cM RG476 3.4 cM	Mohan et al. 1994
<i>Gm</i>	Kháng sâu lằn	Duokang #1	4	M-6-1400 5-10cM	Katiyar et al. 1994
<i>Glh</i>	Kháng rầy xanh	ARC 11554	4	RZ262 2.1 cM	Sebastian et al. 1995

<i>Pi-1</i>	Kháng bệnh đạo ôn	LAC23	11	Npb181 3.5cM RZ536 7.9 cM	Yu 1991 Mew et al. 1994
<i>Pi-z5</i>	Kháng bệnh đạo ôn	5173	6	RG64 2.1 cM RG612 7.2 cM	Yu et al. 1991 Mew et al. 1994
<i>Pi-ta</i>	Kháng bệnh đạo ôn	Tẻ tép	12	RZ397 3.3 cM RG241 5.2cM	Yu et al. 1991 Mew et al. 1994
<i>Pi-5(t)</i>	Kháng bệnh đạo ôn	Moroberek-an	4	RG498 5-10cM	Wang et al. 1994
<i>Pi-6(t)</i>	Kháng bệnh đạo ôn	Apura	12	RG869 20 cM	Yu 1991
<i>Pi-7(t)</i>	Kháng bệnh đạo ôn	Moroberek-an	11	RG103 5-10cM	Wang et al. 1994
<i>Pi-11 (t)</i>	Kháng bệnh đạo ôn	Zhaiyeqing	8	BP127 2.4cM	Zhu et al. 1992
<i>Pi-10 (t)</i>	Kháng bệnh đạo ôn		5		Naqvid et al. 1994
<i>Pi-12 (t)</i>	Kháng bệnh đạo ôn	Hong Jiao Zhan	12	RG869 5.1cM	Zheng et al. 1995
<i>Rf</i>	Phục hồi hữu dục	A-58	10	RG561 CDO94	Yu 1991
<i>Rf-3</i>	Phục hồi hữu dục	IR 24	1	RZ382 RG458 0-3 cM	Zhang et al. 1994
<i>RTSV</i>	Kháng virus vàng lụi hình cầu	ARC11554	4	RZ262 4.5cM	Sebastian et al. 1995
<i>S-5</i>	Tính tương hợp rộng	Pecos 02428 Nekken 2	6 6 6	RG138 12.7cM RG213 4.4 cM	Zheng et al.1992 Liu et al. 1992 Yanagihara et al. 1995
<i>Se-1</i>	Mẫn cảm quang chu kì	Puang Rai 2	6	RG64,0	Mackill et al. 1993
<i>Se-3</i>	Mẫn cảm quang chu kì	Puang Rai 2	6	A19 5-10cM	Maheswaran 1995
<i>sd-1</i>	Gen lùn	TN1	1	RG109 0.8 cM RG220	Cho et al. 1994
<i>sdg</i>	Gen lùn	XGA	5	RZ182 4.3cM	Liang et al. 1994
<i>Wph-1</i>	Kháng rầy lưng	N-22	7		McCouch 1990

	trắng				
<i>Xa-1</i>	Kháng bệnh bạc lá	Kogyoku	4	Npb235 3.3cM Npb197 7.2 cM	Yoshimura et al. 1992
<i>Xa-2</i>	Kháng bệnh bạc lá	Tétép	4	Npb235 3.4cM Npb197 9.4 cM	Yoshimura et al. 1992
<i>Xa-3</i>	Kháng bệnh bạc lá	Chugoku45	11	Npb181 2.3cM Npb78 3.5cM	Yoshimura et al. 1992
<i>Xa-4</i>	Kháng bệnh bạc lá	IR20	11	Npb181 1.7cM Npb78 1.7cM	Yoshimura et al. 1992
<i>xa-5</i>	Kháng bệnh bạc lá	IR1545-339	5	RG556 0-1cM	McCouch et al.1991
<i>Xa-13</i>	Kháng bệnh bạc lá	Long grain	8	RZ28 5.1cM	Zhang et al. 1994
<i>Xa-21</i>	Kháng bệnh bạc lá	O. longistaminata	11	pTA818,p TA248 0-1 cM RG103	Ronald et al. 1992
<i>PMS 1</i>	Gen bất dục đực mẫn cảm ánh sáng		7	RG477 4.3 cM	Zhang et al. 1993
<i>PMS2</i>	Gen bất dục đực mẫn cảm ánh sáng		3	RG191	Zhang et al. 1993

Trong chương 3 chúng ta đã đề cập là đầu tiên có rất nhiều phương pháp chỉ thị DNA đánh dấu gen đang được ứng dụng, trong đó phương pháp chỉ thị RFLP là phổ biến nhất.

Tuy nhiên việc áp dụng phương pháp chỉ thị RFLP có một số nhược điểm chính sau:

- Thời gian tiêu tốn nhiều để hoàn thành một phân tích mẫu.
- Luôn luôn phải nuôi và duy trì các thể plasmide trong E.coli để tạo nguồn mẫu dò.
- Cần lượng DNA mẫu lớn ít nhất một lần thí nghiệm cần 100 ng, với chất lượng tinh khiết cao.
- Các thao tác thí nghiệm đòi hỏi kỹ thuật và trang thiết bị khá cao.
- Để phân tích mẫu DNA lại cần đến chất phóng xạ và các hoá chất hóa màu phức tạp nguy hiểm, điều này ở nhiều nước không thể tiến hành được.

Để khắc phục những nhược điểm trên người ta đề xuất phương pháp chọn lọc gián tiếp dựa trên cơ sở nhân DNA bằng phương pháp PCR.

2. Nội dung phương pháp

Khi đã có những công bố kết quả nghiên cứu về độ liên kết giữa gen nào đó với mẫu dò dùng trong RFLP (độ liên kết càng nhỏ chọn lọc càng chính xác), người ta tiến hành xác định trình tự sắp xếp các nucleotide của đoạn mẫu dò này, sau đó chọn một đoạn đặc hiệu trên mẫu đó rồi thiết kế hai đoạn mồi, dùng PCR để nhân đoạn đó lên. Sản phẩm nhân PCR này đưa lên điện di agarose có thể trực tiếp phát hiện được sự sai khác giữa có gen (trội) của tính trạng hoặc lặn. Trường hợp không trực tiếp phát hiện ra sự sai khác này thì người ta tiếp tục cắt sản phẩm nhân PCR bằng một hoặc một vài enzyme cắt hạn chế thích hợp sẽ tạo ra sự đa hình.

2.1. Ưu, nhược điểm so với phương pháp RFLP

- Phân tích một mẫu mất rất ít thời gian, và tương đối rẻ tiền. Giá thành phân tích một mẫu mất khoảng gần 2 đôla.
- Chỉ cần dùng một lượng rất nhỏ DNA, không cần tinh khiết lắm, bớt công chi phí để chiết xuất và tinh khiết DNA.
- Nhận biết đa hình rất đơn giản, chỉ cần dùng phương pháp điện di là đủ.

2.2. Yêu cầu phương pháp

- Gen nghiên cứu phải nằm trong nhân, nhiễm sắc thể cơ thể nhị bội.
- Gen nghiên cứu cần được đánh dấu, liên kết chặt với RFLP và sự liên kết này phải ổn định và bền vững qua nhiều thế hệ quần thể.
- Biết được thông tin về trình tự sắp xếp nucleotide chuỗi DNA của RFLP đó để tiến hành thiết kế, tổng hợp hai đoạn mồi cho phản ứng PCR.

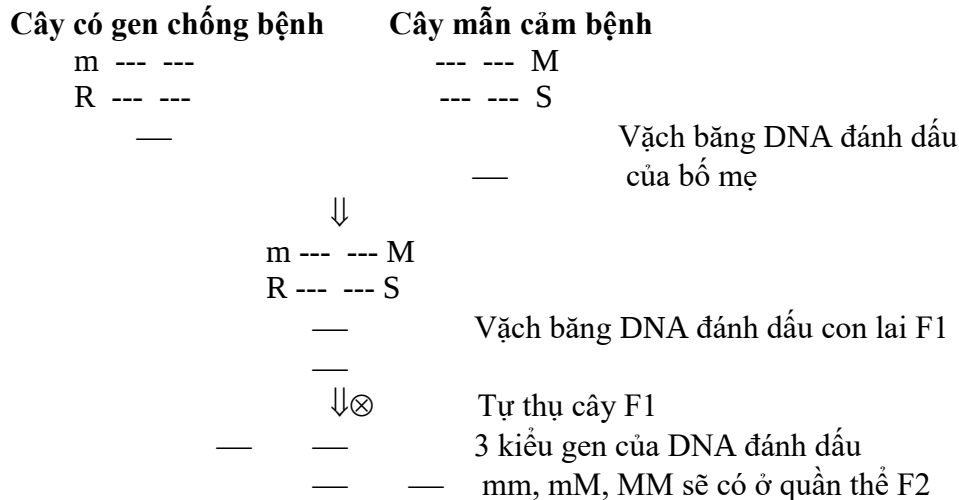
3. Nguyên lý và cơ sở di truyền

Trong chọn giống kinh điển đã từ lâu các nhà chọn giống đã tiến hành chọn lọc gián tiếp nhiều tính trạng kinh tế quan trọng thông qua một tính trạng khác thường là do đơn gen kiểm soát. Thí dụ như ở lúa, gen chống rầy nâu (BPH) được phát hiện là có liên kết rất chặt với gen qui định màu tím của lá mầm, cặp tính trạng này luôn đồng thời tìm thấy trong một số giống lúa địa phương ở miền Đông Bắc Ấn độ. Khi dùng cây chống rầy, có lá mầm tím lai với cây mầm cảm sâu có lá mầm xanh, sẽ thu được trên 95% cây trong quần thể F2 có lá mầm tím chống rầy. Trong trường hợp này màu lá mầm tím được dùng làm tính trạng hình thái chỉ thị để chọn lọc tính chống rầy nâu.

Rất đáng tiếc là hiện nay có ít những tính trạng hình thái như vậy được biết là có liên kết với tính trạng nông sinh học quan trọng khác, đặc biệt đối với lúa, thì hầu hết các tính trạng hình thái như vậy đều là thể đột biến có hại đối với cây. Dùng cách chọn lọc gián tiếp này thì không phân biệt được kiểu gen đồng hợp tử trội với kiểu gen dị hợp tử. Hơn thế nữa dựa vào các đánh dấu hình thái này chỉ áp dụng được đối với những tính

trạng được kiểm tra bởi những gen chính đơn, chứ không áp dụng được đối với rất nhiều tính trạng nông sinh học quan trọng khác, mà được kiểm tra bởi nhiều gen không liên kết.

Dùng phương pháp chọn lọc chỉ thị DNA đánh dấu gen sẽ khắc phục được những nhược điểm trên. Cơ sở di truyền của phương pháp này được minh họa ở hình dưới đây:

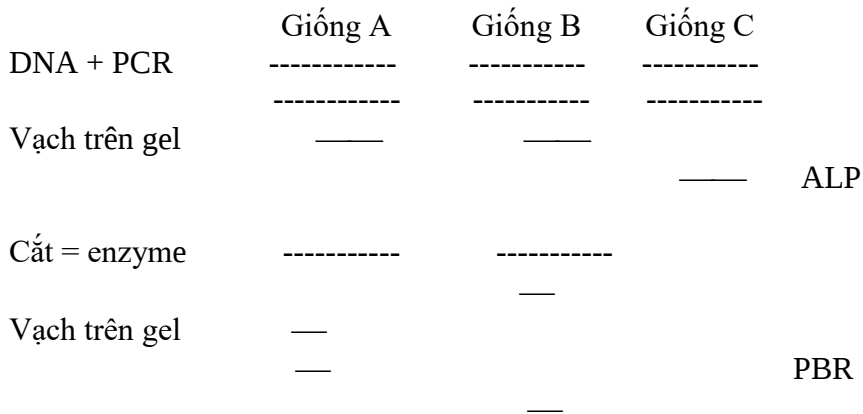


Nếu m,M (chỉ thị) và R,S gene liên kết (kháng, nhiễm) với tần số trao đổi chéo $r = 0,05$ thì từ nhóm cá thể kiểu gen mm sẽ bao gồm 3 nhóm kiểu gen với tần số tương ứng là: $RR(1-r = 0,95)$; $RS (r = 0,05)$ và $SS (r^2 = 0,0025)$.

Giả sử chúng ta thừa nhận rằng có một locus trên một nhiễm sắc thể qui định tính chống bệnh chẳng hạn. Thì cây có tính trạng này là cây cho mang gen R liên kết chặt với một đoạn DNA đánh dấu alen m và bố hoặc mẹ nhận phải mang alen mầm cảm S, alen này liên kết với một locus DNA đánh dấu khác tương ứng M. Hai cặp locus này có tần số trao đổi chéo $r = 0,05\%$. Sau khi lai giữa 2 cây ta sẽ thu được cây lai F1 dị hợp tử ở cả 2 locus, gen chống chịu và đoạn DNA đánh dấu, biểu hiện qua các vệt band trên nền phân tích gel điện di. Tự phối cây F1 sẽ cho ra quần thể cây F2, trên cơ sở phân tích vệt băng trên gel agarose về đoạn DNA đánh dấu ta thấy chúng phân ly thành 3 kiểu gen mm, Mm và MM. Trong nhóm cá thể mm thì phần lớn các cá thể mang gen chống chịu R do liên kết. Giá trị của r càng nhỏ thì tỷ lệ các cây trong số cây mang mm có chứa gen R càng cao. Bởi vậy chọn lọc dựa trên DNA gen đánh dấu cho phép chọn lọc gián tiếp và chính xác một tính trạng liên kết khác trừ khi cá thể đó có chứa nhiễm sắc thể trao đổi chéo tái tổ hợp. Nếu như tần số tái tổ hợp giữa đoạn DNA đánh dấu gen với gen tính trạng không thay đổi từ quần thể dùng để nghiên cứu lập bản đồ gen đến quần thể tiến hành áp dụng chọn lọc thì có thể chọn lọc gián tiếp theo cách này sẽ đạt độ chính xác cao.

Sự khác biệt về di truyền giữa 2 giống cũng có thể được phân biệt bởi sự khác nhau về chiều dài đoạn DNA được nhân lên bằng PCR khi cùng dùng chung 2 đoạn mồi, vì có sự thay thế hay sắp xếp lại các bazơ tại vị trí ghép cặp giữa đoạn mồi với đoạn nguyên bản dẫn đến đoạn nhân lên giữa 2 giống có chiều dài, ngắn khác nhau trên gel. Đây gọi là sự đa hình về chiều dài amplicon, (amplicon length polymorphism, ALP). Trong trường hợp không phân biệt được bằng amplicon giữa 2 giống thì người ta phải tiến hành dùng enzym cắt hạn chế, cắt sản phẩm DNA nhân bằng PCR của 2 giống,

enzym này cắt DNA được nhân lên thành những đoạn dài ngắn khác nhau, sau đó đưa lên trường điện di sẽ tạo ra tính đa hình giữa 2 giống. Đây gọi là phương pháp đa hình đoạn cắt hạn chế sản phẩm nhân PCR, PCR-based RFLP (PBR). Hình dưới đây minh họa sự sai khác và lí giải giữa 2 phương pháp ALP và PBR.



Hình 1.4. Sơ đồ so sánh cơ chế phân tử giữa 2 phương pháp ALP và PBR

Cả 2 phương pháp ALP và PBR đều phải dùng đến kĩ nghệ PCR và cần có 2 đoạn mồi. Đoạn mồi này được thiết kế và tổng hợp trên cơ sở chọn một vùng **đặc thù** đoạn DNA của RFLP liên kết chặt với gen chọn lọc gọi là vị trí chuỗi đeo thẻ, sequence tagged site (STS). STS là một đoạn DNA ngắn trong chuỗi DNA genome nằm ở mẫu dò dùng trong chỉ thị RFLP và như vậy cũng định vị ở một nơi nhất định trong genome.

Bảng 2.4. Giới thiệu một số STS được chọn lọc từ một số RFLP liên kết với một số gen chống chịu trong cây lúa.

Đánh dấu RFLP	gen liên kết	NS T	Đoạn mồi 5'-----3'	Ampl icon (bp)	ALP/ enzyme for PBR	Tài liệu tham khảo
RG64	Pi-z5	6	F5'GTTGTTTGAGCTCTCCAA TGCCTGTTC3' 5'R CTGCAGTGCAATGTACGGC CAGG	1155	HaeIII	Hittalmani et al. 1995
pTA2 48	Xa-21	11	5'AGACGCGGAAGGGTGGTT CCCGGA3' 5'AGCGCGGTGTAATCGAAA GATGAAA3'	1000 700	ALP	Chunwongse et al. 1993
RG55 6	xa-5	5	5'TAGCTGCTGCCGTGCTGTG C3' 5'AATATTTTCAGTGTGCATCT C5'	1500	DraI	J.Bennett and N. Huang unpublished data
P265.	Pi-	12	5'CAGCTGTTTCAGTCGTTTG3'	560	ALP	Lu et al.

560	12(t)		5'CAGCTGTTTCATACAAGAA AT3'			unpublished data
-----	-------	--	-------------------------------	--	--	------------------

Sau khi thiết kế các đoạn mồi để nhân đoạn STS liên kết chặt với gen chọn lọc lên, thì tiến hành các thao tác nhân gen PCR theo các bước sau:

1. Chiết xuất DNA của genome lúa.
2. Nhân DNA bằng PCR.
3. Cắt sản phẩm DNA nhân PCR bằng enzyme cắt giới hạn nếu cần thiết.
4. Tiến hành điện di trên gel agarose
5. Trên cơ sở phân tích kết quả gel agarose kết luận mẫu cây DNA có mang gen cần chọn lọc hay không.

4. Quy trình nhân DNA bằng PCR

4.1. Chiết xuất DNA

Việc chiết xuất DNA cũng có thể là một khâu hạn chế khi sử dụng các chỉ thị phân tử trong chọn giống, vì quần thể điều tra nghiên cứu thường quá lớn. Chính vì vậy cần phải có phương pháp chiết xuất DNA thật đơn giản, nhanh và tách lọc có hiệu quả. Phương pháp chiết xuất DNA do Dellaporta và cộng sự năm (1983) đề xuất cũng rất có hiệu quả đối với lúa, tuy nhiên tiêu tốn khá nhiều thời gian, vất vả và không thích hợp cho việc phân tích một số lượng lớn cá thể mẫu F2. Chính vì thế Zheng và cộng sự năm (1995) đã đề xuất một phương pháp chiết xuất DNA rất đơn giản nhưng lại phù hợp với PCR, phương pháp này không cần nitor lỏng, chỉ cần một lượng mô mẫu nhỏ, làm rất nhanh và lượng DNA chiết xuất được cũng đủ để chạy và phân tích PCR.

a. Quy trình chiết xuất

1. Thu ngắt mẫu lá cây lúa khoẻ dài 2 cm, bỏ vào ống nghiệm có dung tích 1,5 ml, sau đó đánh dấu theo số cây rồi đập dập đặt vào đá lạnh.
2. Trong phòng thí nghiệm lại cắt nhỏ mẫu lá thành mẫu nhỏ dài 0,5 cm rồi đặt vào bàn đá có các lỗ.
3. Nhỏ 400 µl dung dịch chiết xuất DNA vào mỗi lỗ rồi lấy chày đá nhỏ, đầu nhọn nghiền như mô cây.
4. Nghiền kỹ mô để dung dịch chiết xuất chuyển sang màu xanh đen chứng tỏ tế bào lá đã vỡ và diệp lục được giải phóng ra.
5. Đổ thêm 400 µl dung dịch chiết xuất DNA vào rồi trộn lẫn, và chuyển 400 µl dung dịch này vào ống nghiệm đã đánh dấu trước theo số thẻ của từng cây rồi lại đặt vào đá lạnh.
6. Đổ vào ống nghiệm này 400 µl chloroform, trộn lẫn kỹ rồi quay li tâm khoảng 30 giây, sau đó chuyển phần dung dịch trên ống nghiệm sang ống nghiệm dung tích 1,5ml khác rồi đánh dấu lại. Chú ý khi lấy đừng làm phá vỡ lớp màng chloroform.
7. Đổ 800 µl ethanol rồi trộn đều kỹ, quay li tâm 3 phút với tốc độ cao tối đa, đổ bỏ phần lỏng phía trên giữ lại phần kết tủa (pellet) ở đáy ống nghiệm.
8. Rửa pellet bằng 70% ethanol rồi làm khô tự nhiên, ở nhiệt độ trong phòng bằng cách úp ống nghiệm lên giấy thấm khoảng 20 phút.
9. Hoà tan pellet (DNA) trong 50 µl dung dịch TE rồi dự trữ ADN ở nhiệt độ – 20°C hoặc 4°C.
10. Lấy 1 µl dung dịch DNA trên cho mỗi ống phản ứng PCR.

- Thành phần của dung dịch chiết xuất DNA gồm:

Thành phần	N.Đ.D.D mẹ (Stock)	N.Đ.D.D làm việc	Hỗn hợp 5 ml cần	Hỗn hợp 10 ml cần
Tris (pH 8,0)	1 M	50 mM	0,25 ml	0,5 ml
EDTA (pH 8,0)	0,5 M	0,25 mM	0,25 ml	0,5 ml
NaCl	5 M	300 mM	0,3 ml	0,6 ml
SDS	10%	1%	0,5 ml	1,0 ml
H ₂ O			3,7 ml	7,4 ml

N.Đ.D.D: Nồng độ dung dịch.

- Dung dịch đệm TE (pH 8,0) gồm:

Thành phần	N.Đ.D.D mẹ	N.Đ.D.D. làm việc	Hỗn hợp 50 ml	Hỗn hợp 100ml
Tris (pH 8,0)	1 M	10 mM	0,5 ml	1 ml
EDTA (pH 8,0)	0,5 M	1 mM	0,1 ml	0,2 ml
H ₂ O			49,4 ml	98,8 ml

b. Cách pha chế các dung dịch mẹ

Dung dịch mẹ có thể dự trữ ở nhiệt độ trong phòng được khoảng 6 tháng.

- Cách pha dung dịch Tris-HCl nồng độ 1M, pH 8,0: Hoà tan 30,28 g Trizma base (Sigma, FW= 121,1) trong 200 ml nước cất sau đó chỉnh pH tới 8 bằng HCl đậm đặc (khoảng 10,5 ml), nhớ để nguội dung dịch ở nhiệt độ trong phòng (25°C) trước khi chỉnh tới pH trên. Sau đó chỉnh thể tích đến 250 ml bằng nước cất rồi hấp khử trùng.
- Dung dịch EDTA 0,5 M pH 8,0: Đổ 46,53 g disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) ngâm 2H₂O vào 200 ml nước cất chứa 4g NaOH, khuấy mạnh bằng thanh khuấy từ, sau đó chỉnh pH tới 8 bằng NaOH. Rồi đổ thêm nước cất để đạt được tổng số 250 ml dung dịch và hấp khử trùng.
- Dung dịch NaCl 5M: Hoà tan 73,05 g NaCl (Sigma, FW= 58,44) trong 200 ml nước cất. Chỉnh thể tích tới 250 ml bằng nước cất sau đó khử trùng bằng nồi hấp.
- Dung dịch 10% SDS: Hoà tan 25 g sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma, FW = 288,4) trong 200 ml nước vô trùng. Đun nóng đến khoảng 65°C để xúc tiến hoà tan nhanh SDS, sau đó chỉnh nước cất vô trùng đầy đến vạch 250 ml. Chú ý: không được hấp, đeo khẩu trang khi cân SDS, lau chùi sạch sẽ cân, dọn vệ sinh nơi cân để tránh bụi tinh thể SDS.

4.2. Xây dựng phản ứng PCR

Khi đã biết một gen nghiên cứu có liên kết chặt với một RFLP, mẫu DNA của RFLP này phải được xác định trình tự sắp xếp chuỗi nucleotit, từ chuỗi này chọn lấy một đoạn đặc trưng rồi thiết kế 2 đoạn mồi, thuê hay tự tổng hợp lấy đoạn mồi nếu có máy. PCR có khả năng nhân lên từ một lượng DNA ban đầu rất nhỏ, do vậy tất cả các dung dịch, ống nghiệm và pipet phải tuyệt đối không được lẫn tạp DNA khác và bụi bẩn. Nếu bị lẫn tạp DNA lạ sẽ dễ dẫn đến những kết luận nhầm lẫn.

a. Các bước pha chế phản ứng

1. Làm tan băng tất cả các dung dịch lấy từ tủ lạnh, rồi lại đặt ngay và giữ trong đá rôi.
2. Chuẩn bị pha trộn một ống chia(cocktail) cỡ dung tích 0,5 ml cho mỗi một cặp đoạn mồi, theo bảng hướng dẫn sau:

Thành phần	N.Đ.D.D. mẹ	N.Đ.H.Đ	Dung tích 1 ống phản ứng chứa	10 ống phản ứng chứa	50 ống phản ứng chứa
PCR buffer	10 X	1 X	2,0 µl	20 µl	100 µl
dNTP	1 mM	0.05 mM	1,0 µl	10 µl	50 µl
Taq polymerase I	5 u/µl	0,05 u/µl	0,2µl	2,0µl	10µl
Đoạn mồi đầu 5'	50ng/µl	2,5 ng/µl	1,0 µl	10µl	50µl
Đoạn mồi đầu 3'	50ng/µl	2,5 ng/µl	1,0 µl	10µl	50µl
Nước			13,8µl	138µl	690µl
Tổng số			19,0µl	190µl	950µl

Ghi chú: N.Đ.D.D. mẹ: Nồng độ dung dịch mẹ; N.Đ.H.Đ: Nồng độ hoạt động.

Một ống phản ứng chứa 20 µl hỗn hợp dung dịch cho mỗi mẫu, chuẩn bị ống chia có thể chỉ dùng cho 1 phản ứng, cho 10 ống phản ứng hoặc cho 50 ống phản ứng, theo lượng đã ghi ở trên.

3. Đổ 1 µl dung dịch DNA nguyên bản đã được chiết xuất vào mỗi ống nghiệm, rồi nhỏ một lớp dầu mỏ lên trên mặt dung dịch (hiện nay nhiều máy PCR người ta khuyên là không cần nhỏ dầu).
4. Đậy nắp cẩn thận, rồi đánh dấu số hiệu mẫu lại.
5. Quay li tâm nhẹ rồi đặt vào giá có lỗ, đặt vào máy PCR.
6. Thiết lập chương trình máy PCR theo chu kỳ hoạt động sau:

Nhiệt độ	Thời gian(phút)	Mục đích	số chu kì
94 ⁰ C	2	Tách sợi đôi thành 2 sợi đơn	1
94 ⁰ C	0,5	Tách sợi đôi thành 2 sợi đơn	30 chu kì
55 – 60 ⁰ C	0,5	Kết nối đoạn mồi	
72 ⁰ C	1,0	Tổng hợp DNA	
72 ⁰ C	5,0	Tổng hợp DNA	1
4 ⁰ C		Bảo quản sản phẩm tại máy	

b. Chuẩn bị các dung dịch thành phần

A. Đoạn mồi

1. Đoạn mồi được tổng hợp trên cơ sở những thông tin về trình tự chuỗi DNA của đoạn định nhân, đã được công bố, và nhận được thường dưới dạng kết tủa (pellet) trong ống nghiệm eppendorf.
2. Quay li tâm nhẹ trước khi mở nắp.
3. Pha loãng DNA thành nồng độ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bằng cách thêm vào lượng tương ứng TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA). Chuyển 50 μl dung dịch này vào các ống nghiệm dung tích 0,5 ml rồi đặt trong tủ lạnh sâu -20°C .
4. Trước khi dùng lại tiếp tục pha loãng nồng độ trên thành nồng độ 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ cũng bằng cách thêm TE, rồi lấy 200 μl dung dịch này cho vào ống nghiệm dung tích 0,5ml để dùng làm dung dịch mẹ làm việc và cũng phải dự trữ ở nhiệt độ -20°C .

B. Chuẩn bị các dung dịch dNTP(dATP/dCTP/dGTP/dTTP)

Hoà tan dung dịch mẹ có nồng độ 100 mM của mỗi dNTP mua từ công ty bán hoá chất, thành nồng độ 1 mM với dung dịch TE (cứ 10 μl mỗi một dNTP thêm 960 μl TE).

C. Chuẩn bị dung dịch đệm PCR đậm đặc 10 lần (10 X) theo bảng sau:

Thành phần	N.Đ.D.D.mẹ	N.Đ. 10 X	Lượng 5 ml	Lượng 10 ml
Tris(pH8,3)	1M	200 mM	cần 1,0 ml	cần 2,0 ml
KCl	1M	500 mM	cần 2,5 ml	cần 5,0 ml
MgCl ₂	150 mM	15 mM	cần 0,5 ml	cần 1,0 ml
Gelatin		0,01%	cần 0,5 mg	cần 1,0 mg
H ₂ O			1,0 ml	2,0 ml

Đổ vào ống nghiệm 1,5 ml và dự trữ ở nhiệt độ -20°C .

D. Cách chuẩn bị các dung dịch mẹ (Stock solution)

1. Dung dịch Tris (pH 8,4 ở nhiệt độ 25°C): Hoà tan 30,28 g Trizma base trong 200 ml nước cất, điều chỉnh pH đến 8,4 bằng HCl đậm đặc(khoảng 10 ml), nhớ để dung dịch nguội ở nhiệt độ trong phòng (25°C) trước khi chỉnh pH 8,4. Sau đó chỉnh thể tích đến 250 ml bằng nước cất, rồi hấp khử trùng.
2. Dung dịch KCl 1M: Hoà tan 18,64 g KCl (Sigma, FW=95,21) trong 200 ml nước cất, rồi lại thêm nước cất đến 250 ml, hấp khử trùng bằng nồi hấp.
3. Dung dịch MgCl₂ 150 mM: Hoà tan 1,43 g MgCl₂ (Sigma, FW =95,21) trong 80 ml nước cất, rồi chỉnh đến 100 ml bằng nước cất, khử trùng bằng nồi hấp.
4. Taq polymerase: Mua enzyme này, nồng độ hoạt động của enzym thường ở 5u/ μl , cần giữ ở nhiệt độ -20°C .
5. Dầu khoáng(Mineral oil): Mua từ Sigma, dùng lọ nhỏ giọt.

4.3. Kiểm tra sản phẩm

Những đoạn DNA được sinh ra bằng PCR được phân tách thông qua điện di trên gel agarose. Vì DNA chứa một số nhóm gốc photphat mang điện tích âm ở môi trường pH trung tính, cho nên nó sẽ di chuyển về phía cực anốt trong trường điện di. Trục liên kết photpho của tất cả các DNA đều giống nhau cho nên chúng có cùng một mật độ điện tích. Bởi vậy khi đặt trong trường điện di, môi trường có cấu tạo lỗ như gel agarose thì nó sẽ chuyển động về cực anốt nhanh hay chậm tùy theo khối lượng phân tử của chúng. Kỹ thuật này cũng được áp dụng nhằm tách các mẫu DNA có kích thước khác nhau được

nhân lên bằng PCR hoặc tách các mẫu ADN sản phẩm nhân PCR sau khi đã phân đã bằng enzym cắt hạn chế.

Quy trình điện di agarose được chia ra thành 3 bước: 1) Chuẩn bị gel agarose có nồng độ thích hợp (thường từ 1-2%); 2) Mẫu sản phẩm DNA được đổ vào lỗ gel và chạy điện di ở điện thế và thời gian thích hợp nhằm thu được khả năng phân tách lớn nhất; 3)

Sau đó DNA có thể được nhuộm bằng ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV hoặc nhuộm bằng methylene blue và quan sát dưới ánh đèn thường.

a. Chuẩn bị gel agarose

1. Chuẩn bị đủ lượng dung dịch điện di (1 x TAE) để có thể đổ đầy bể điện di rồi chuẩn bị gel.
2. Đổ một lượng cần thiết agarose loại dùng cho điện di, có nồng độ 1% đối với việc tách mẫu DNA không cần dùng đến enzym cắt hạn chế và 1,5% đối với việc phân tách mẫu DNA cần phải dùng đến enzym cắt hạn chế, vào khuôn gel. Kích thước khuôn gel cỡ 18 x 30 cm thì cần chuẩn bị khoảng 300 ml dung dịch agarose.
3. Hoà tan agarose trong tủ vi sóng, chú ý phải kiểm tra kháng định chắc chắn đã hoà tan hoàn toàn bằng cách lấy ra lắc nhẹ và quan sát.
4. Gián bằng dính vào khuôn để tránh dò rỉ gel ra ngoài, rồi lấy cốc agarose từ tủ vi sóng ra, để nguội đến nhiệt độ 55°C mới đổ vào khuôn, đặt lược tạo lỗ khuôn mẫu. Chú ý không để có bong bóng ở đáy lỗ khuôn, để gel đông kết rồi mới bỏ lược ra.

b. Nhỏ mẫu DNA nhân PCR vào gel và chạy điện di

1. Sau khi gel đã đông cứng bỏ băng ở đầu cuối khuôn gel và bỏ lược ra.
2. Đặt cả khay khuôn gel chứa gel vào bể điện di, đổ đủ lượng dung dịch điện di phủ ngập gel sâu 1 mm, chú ý không để bong bóng ở chân lược.
3. Trải một mảnh parafin lên tấm gỗ cứng, rồi nhỏ lên đó mỗi điểm một giọt 1 µl dung dịch 10 X loading bufer, sau đó thêm vào mỗi điểm giọt đó 9 µl dung dịch DNA nhân PCR, dùng pipet thụt lên xuống 3 lần để trộn lẫn, chú ý không được làm lẫn mẫu giữa các giọt với nhau.
4. Trong số các mẫu đổ vào gel cần phải để chừa 1 lỗ để đổ mẫu chuẩn, mẫu chuẩn chứa các mẫu DNA đã biết trước kích thước từng đoạn, được tạo ra bằng cách dùng enzym HindIII cắt DNA của thực khuẩn thể λ thành các đoạn to nhỏ khác nhau, mẫu chuẩn được bán trên thị trường. Những vạch DNA này được làm vạch chuẩn, từ đó chúng ta có thể dự đoán được kích thước sản phẩm DNA được nhân lên.
5. Trước khi điện di chú ý cắm nguồn điện đúng chiều để DNA chạy trong gel về cực dương anode, hiệu điện thế 1,5 V/cm và chạy trong 5-6 h. chú ý hiệu điện thế càng mạnh chạy càng nhanh, nếu để điện thế 50 vôn chạy 10 h, để điện thế 10 vôn chạy mất 5 h, muốn kiểm tra xem DNA chạy hết về cực anode chưa thì chỉ cần quan sát di chuyển của vạch xanh trên gel.
6. Ngắt điện khi vệt xanh bromphenol trong gel di chuyển một khoảng cách đủ dài để tách được các mẫu DNA ra khỏi nhau, nếu dùng bromphenol thì tốc độ chạy của nó nhanh bằng tốc độ chạy của vệt DNA kích thước 400 bp trong gel 1% agarose và bằng đoạn 150 bp chạy trong gel có nồng độ 1,5% Agarose.

c. Quan sát các đoạn DNA

Có hai cách quan sát mẫu DNA của PCR trong gel:

- Nhuộm DNA trong gel agarose bằng ethidium bromide, đây là phương pháp quan sát tốt nhất. Dung dịch ethidium bromide nồng độ 10 mg/ml có thể được bán trực tiếp trên thị trường, khi dùng người ta pha loãng xuống còn nồng độ 0,5 µg/ml. Dìm gel vào dung dịch này ở nhiệt độ trong phòng khoảng 15 phút tùy theo bề dày của gel, sau đó rửa qua nước cất rồi đặt lên đèn UV để quan sát. Các vết DNA hiện lên và được nhìn thấy rồi chụp ảnh bằng máy Photodyne, nếu cần có ảnh. Nếu thấy vết DNA bị nhuộm quá đậm thì nên làm nhạt bằng cách ngâm trong nước dài hơn. Một cách khác có thể nhuộm DNA là trộn lẫn ethidium bromide trực tiếp vào gel với nồng độ 0,5 µg/ml, bằng cách này cũng sẽ thu được kết quả như phương pháp trên chỉ trừ một số mẫu DNA nhỏ khó nhìn thấy vì ethidium bromide di chuyển ngược chiều với DNA khi điện di. Chú ý phải đeo gang tay và mặt nạ để chống tia UV.
- Cách thứ 2 nhuộm DNA trong gel agarose bằng methylene blue, dung dịch làm việc có nồng độ 0,025% methylene blue. Dìm ngập gel trong dung dịch này khoảng 20 - 30 phút, sau đó rửa bằng nước cất, thay nước vài lần dần dần vết DNA sẽ rõ dần lên, để có kết quả quan sát rõ ràng thì nên nhuộm qua đêm, khi nhuộm như vậy phải phủ nylon lên khay tránh bay hơi, và quan sát bằng ánh sáng thường. Sử dụng phương pháp nhuộm methylene rẻ và an toàn hơn nhiều phương pháp nhuộm ethidium bromide.

d. Cách pha dung dịch nhuộm để quan sát

1. Ethidium bromide, dung dịch mẹ chứa 10 mg/ml được bán trên thị trường, chú ý: ethidium là chất gây đột biến và ung thư, phải đeo gang tay khi tiếp xúc.
2. Cách pha dung dịch loading bufer mẹ đậm đặc 10 lần (10 X), trộn 40 mg bromphenol blue, 40 mg xylene cyanole FF với 5 ml glycerol, sau đó chỉnh dung tích đến 10 ml bằng nước cất, rồi đổ vào ống nghiệm dung tích 1,5ml đầy nắp, đặt vào nước sôi trong 10 phút, để nguội và bảo quản trong nhiệt độ 4°C.
3. Pha dung dịch 50 X TAE. Trộn lẫn 242 g Trizma base, 57 ml axit glacial acetic và 100 ml dung dịch EDTA nồng độ 0,5 M (pH 8,0) với 700 ml nước cất sau đó điều chỉnh thể tích đến 1000 ml.
4. Dung dịch Methylene blue, hoà tan 250 mg methylene blue trong 1 lít nước cất rồi để dự trữ trong tủ lạnh 4°C.
5. Cách tạo ra đoạn DNA chuẩn dài 1Kb, dung dịch mẹ nồng độ 0,9 µg/ µl được bán trên thị trường, dung dịch làm việc có nồng độ 0,05µg/µl được tạo ra bằng cách trộn 11µl dung dịch mẹ trên với 20 µl dung dịch 10 X loading bufer và 169 µl nước vô trùng rồi để trong tủ lạnh 4°C.

4.4. Cắt ADN sản phẩm nhân PCR bằng enzyme giới hạn (RE)

Trong trường hợp khi nhân PCR có thu được DNA, chạy điện di trên gel agarose, quan sát vết băng trên gel vẫn không phân biệt được giữa các kiểu hình thì người ta phải dùng đến enzym giới hạn để cắt đoạn DNA được nhân thành nhiều đoạn khác nhau. Như chúng ta đã rõ enzym giới hạn có khả năng nhận biết một đoạn DNA nhất định nào đó và cắt, nếu 2 đoạn DNA có cùng 2 đầu 5' và 3' và có chiều dài giống nhau, nhưng ở đoạn giữa có trình tự và cấu trúc các nucleotit khác nhau thì sẽ bị cắt thành các đoạn dài ngắn khác nhau, nếu điện di sẽ phân tách thành các vết khác nhau từ đó có thể phân biệt được kiểu hình giữa các kiểu gen. Thí dụ nếu dùng enzym PstI sẽ cắt đoạn:

5' CTGCA/G 3'
3' G/ACGTC 5'

Còn nếu dùng enzyme HaeIII thì lại nhận biết và cắt đoạn: 5' GG/CC 3'
3' CC/GG 5'

a. Một số quy tắc khi thiết lập phản ứng phân giải RE:

- Enzyme cắt hạn chế đắt và dễ bị mất hoạt tính nên phải thường xuyên đặt vào đá lạnh khi sử dụng và giữ trong tủ lạnh - 20°C. Để tránh lẫn tạp, phải luôn luôn dùng tip mới.
- Mỗi RE hoạt động tối ưu trong những điều kiện phản ứng nhất định, cần dung dịch đệm riêng, cần tuân thủ khuyến cáo của các hãng sản xuất. Các dung dịch đệm này thường khác nhau bởi nồng độ muối NaCl, nếu cùng một phản ứng cần dùng nhiều enzyme chúng yêu cầu cùng một dung dịch đệm thì có thể sử dụng đồng thời, còn nếu mỗi RE yêu cầu một dung dịch đệm riêng thì DNA trước hết phải được phân cắt bởi RE cần nồng độ muối thấp trước, sau đó thêm NaCl vào để đạt nồng độ muối tối ưu cho RE kia rồi cho tiếp tục phản ứng.
- Để đo hoạt tính của enzyme người ta thường dùng đơn vị tính là unit (u), một unit được xác định là lượng enzyme cần thiết để có thể cắt hết 1µg DNA tinh khiết của thực khuẩn λ trong thời gian 1 giờ ở điều kiện nhất định. Hầu hết các enzyme bán trên thị trường nằm trong dung dịch có nồng độ 1000 unit / 100 µl, tuy nhiên tùy từng công ty sản xuất nồng độ có khác nhau. Để cắt 10 µl sản phẩm PCR thường cần 3 unit enzyme = 0,3µl, mỗi enzyme thường được bán kèm với dung dịch đệm mẹ đậm đặc 10 lần, như vậy dung dịch đệm làm việc thì cần phải pha loãng đi 10 lần.
- Cần tiến hành phản ứng trong một thể tích càng nhỏ càng tốt để tạo điều kiện thuận lợi cho RE tiếp xúc với cơ chất.

b. Cách thiết lập phản ứng phân cắt

- Sau khi lấy 10 µl sản phẩm nhân PCR để chạy điện di và khẳng định chắc chắn là nhân được DNA, thì dùng phần DNA còn lại 10 µl để cắt. Thường tổng lượng dung dịch phản ứng cắt của một mẫu là 15 µl, do vậy cần phải lấy các thành phần là: nước cất 3,2 µl; dung dịch đệm 10 X, 1,5µl; enzyme (10U/µl) là 0,3 µl; dung dịch DNA nhân PCR là 10,0 µl.
- Khi muốn phân cắt nhiều mẫu cùng một lúc, thì cần phải chuẩn bị một ống nghiệm chung chứa: nước cất vô trùng, dung dịch cắt đệm, và enzym cắt nhưng chưa có DNA nhân PCR từng mẫu, sau đó lấy 5 µl hỗn hợp trên cho vào mỗi ống PCR rồi li tâm nhẹ nhằm trộn lẫn sản phẩm nhân PCR với enzyme.
- Ủ hỗn hợp phản ứng trong tủ định ôn ở nhiệt độ 37°C với thời gian từ 3 h đến qua đêm.
- Các đoạn DNA được cắt sau phân cắt sẽ được tách nhau ra qua điện di và quan sát như đã mô tả ở trên, chú ý nồng độ agarose của gel điện di nên cao hơn một chút.

4.5. Ghi chép đánh giá và chọn lọc

Khi có sự đa hình (ALP) về sản phẩm nhân PCR giữa hai bố mẹ lai thì có thể ghi chép trực tiếp được kết quả trong quần phân li thể khảo sát, thường chỉ có một vệt có kích thước đặc biệt ở mỗi lane trên gel. Trong trường hợp cần phải dùng đến enzyme cắt hạn chế thì sau cắt, điện di chắc chắn thể nào cũng tìm thấy ít nhất một vệt band trong số các vệt được cắt tương ứng phân biệt được kiểu gen giữa bố, mẹ và quần thể phân li thì ghi chép lại. Từ vạch band ta có thể đánh dấu kiểu gen và dự đoán được cây-mẫu khảo sát đó có chứa gen liên kết qui định kiểu hình tính trạng của bố mẹ hay không. Trong chọn lọc chỉ thị phân tử, DNA được chiết xuất từ các cá thể trong quần thể phân li từ tổ hợp lai

giữa 2 bố mẹ. Để chọn được những cây có mang gen chọn lọc, thì DNA của bố, mẹ và của từng cá thể trong quần thể được dùng làm DNA nguyên bản cho PCR và phải dùng cùng một đoạn mỗi tương ứng, do vậy sản phẩm của PCR chính là hiện diện của DNA nguyên bản. Trong ví dụ chỉ thị RFLP, RG64 liên kết chặt với gen chống đạo ôn *Pi-z5* và primer thiết kế từ đoạn RFLP, RG64 này được trình bày ở Bảng 2.

5. Quy tụ nhiều gen kháng bệnh thông qua chọn lọc chỉ thị phân tử

Một trong những mục đích của công tác chọn giống chống bệnh đạo ôn là phải quy tụ được nhiều gen chống bệnh khác nhau vào một giống. Bệnh đạo ôn là một trong những bệnh phá hại rất nặng trong nhiều vùng trồng lúa trên thế giới. Chọn giống chống bệnh có ý nghĩa kinh tế vô cùng to lớn trong việc phòng trừ bệnh này. Khác với bệnh bạc lá, bệnh đạo ôn phức tạp và đa dạng cả về gen chống bệnh và số chủng đang tồn tại, chính vì thế chọn giống chống đạo ôn khó khăn hơn nhiều việc chọn giống chống bệnh bạc lá. Hiện nay người ta đã phát hiện ra cả thảy có 30 locus gen chống bệnh đạo ôn khác nhau. Trong đó có 20 gen gây hiệu quả chính và không alen với nhau. Tương ứng với các gen chống bệnh là các nòi sinh lý gây bệnh. Người ta cũng đã phát hiện thấy trên thế giới có cả thảy 256 chủng đạo ôn khác nhau nằm rải rác trên khắp các vùng trồng lúa thế giới. Mỗi một gen chống được một hoặc vài chủng nhất định, những giống lúa có chứa chỉ một gen chính chống bệnh sẽ bị mất cảm với bệnh sau vài năm đưa trồng ra ngoài sản xuất, do vậy cần tổ hợp nhiều gen chống chịu vào cùng một giống, có như vậy giống mới tồn tại được lâu dài trong sản xuất. Trong chọn giống kinh điển việc đánh giá cùng một lúc nhiều gen khác nhau khó có thể thực hiện hoặc không thể thực hiện được khi mà các nòi gây bệnh tương ứng không có, trong trường hợp đó dùng chỉ thị phân tử có thể đánh giá cùng một lúc nhiều gen khác nhau.

Giả sử chúng ta tiến hành quy tụ nhiều gen chống đạo ôn vào một giống, từ các dòng đẳng gen, chứa các gen chống đạo ôn khác nhau như *Pi-1*, *Pi-z5* và *Pi-ta* (Yu et al. 1991). 3 gen này được Mew *et al.* (1994) định vị chi tiết trên bản đồ di truyền và độ liên kết như sau (Fig 6). Từ bản đồ này ta thấy chỉ thị RFLP, RG64 liên kết chặt với gen *Pi-z5* và đã được xác định trình tự sắp xếp các nucleotit và từ đó người ta chọn và tổng hợp 2 đoạn mồi (Bảng 2). Sự đa hình PBR giữa dòng đẳng gen chứa *Pi-z5*, giống C101A51 và giống CO39 không chứa gen này, bị mất cảm với bệnh được phát hiện bằng cách phân giải sản phẩm PCR với enzym HaeIII. Kết quả cho thấy vệt band 750 bp tương ứng với alen chống bệnh và vệt band 650 bp tương ứng với alen mất cảm bệnh.

Tiến hành lai giữa các dòng đẳng gen C101LAC chứa gen *Pi-1* với dòng C101A51 chứa gen *Pi-z5*, và lai giữa dòng C101LAC với C101PKT chứa gen *Pi-ta*, và lai giữa C101A51 với C101PKT theo sơ đồ hình dưới đây. Tất cả các cây F1 cho tự thụ và thu được khoảng 150 cây F2 đối với mỗi tổ hợp. ADN được chiết xuất từ lá tươi từng cây F2 của 3 quần thể trên. Sau đó người ta lại chọn các cây có đủ 2 gen chống chịu của 2 bố mẹ lại lai tiếp với các cây ở quần thể F2 khác có 2 gen chống chịu khác từ 2 bố mẹ kia.

C101LAC X C101A51 (<i>Pi-1</i>) (<i>Pi-2</i>)	C101LAC X C101PKT (<i>Pi-1</i>) (<i>Pi-4</i>)	C101A51 X C101PKT (<i>Pi-2</i>) (<i>Pi-4</i>)
F1 $\oplus$	F1 $\oplus$	F1 $\oplus$
F2	F2	F2
Chọn cây đồng hợp tử gen <i>Pi-1</i> và <i>Pi-2</i>	Chọn cây đồng hợp tử X gen <i>Pi-1</i> và <i>Pi-4</i>	Chọn cây đồng hợp tử gen <i>Pi-2</i> và <i>Pi-4</i>
	F1 $\oplus$	

F2

Chọn cây có chứa cả 3 gen *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-4*

Trong tổ hợp lai giữa 2 dòng đẳng gen C101A51 chứa gen *Pi-z5* với C101PKT chứa gen *Pi-ta*, cây đồng hợp tử mang gen *Pi-z5* được chọn thông qua chỉ thị RG64 bằng được cả 2 phương pháp RFLP và PCR vì chỉ thị này liên kết với gen chống bệnh với độ liên kết bằng 2,1 cM, sau đó các cây này lại được chọn xem có chứa gen *Pi-ta* hay không bằng cách lai với Probe chỉ thị RZ397.

Tương tự như vậy ta đã biết chỉ thị RFLP, RZ536 liên kết với gen *Pi-1* và RZ397 liên kết với gen *Pi-ta*, việc chọn những cây đồng hợp tử 2 gen này được tiến hành bằng phương pháp RFLP. Kết quả cho thấy tất cả 10 cây được chọn đều có chứa đồng thời cả 2 gen trên đồng hợp tử vì có vệt band lai giống hệt với 2 dòng chống chịu chứa 2 gen này là C101LAC và C101PKT. Cũng làm như vậy đối với những chỉ thị khác liên kết với 2 gen *Pi-1* và *Pi-z5* và cách tiến hành tương tự để chọn những cá thể chứa cả 2 gen này. Để kiểm chứng độ chính xác của phương pháp chúng ta tiến hành đánh giá và lây nhiễm nhân tạo trực tiếp.

6. Những yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả áp dụng

Qui trình kỹ thuật dùng chỉ thị phân tử PCR được nêu ở trên đã cho phép các nhà khoa học áp dụng phương pháp công nghệ sinh học mới này vào trong chương trình chọn giống của họ. Qui trình này không những biểu hiện tính ưu việt nhanh và chính xác của kỹ nghệ PCR mà còn là một tiến bộ nhanh chóng của quá trình nghiên cứu genôm lúa. Nhờ kỹ nghệ này, một gen bất kỳ nào đều có thể được chọn lọc từ trong quần thể đang phân ly bằng chỉ thị phân tử DNA. Đặc biệt phương pháp này áp dụng rất phù hợp đối với những gen được lập bản đồ di truyền dùng các chỉ thị phân tử bằng nhân PCR. Để đánh giá về hiệu quả và độ hữu dụng của kỹ nghệ này chúng ta nên đánh giá và kiểm tra lại một vài chỉ tiêu sau, đó là giá thành của phương pháp, độ chính xác của chọn lọc, và khả năng hiện thực của phương pháp.

6.1. Giá thành

Nhiều gen chính và gen phụ trong cây lúa chủ yếu đã được định vị di truyền với các chỉ thị RFLP, tuy nhiên việc phân tích trên cơ sở dùng chỉ thị RFLP đòi hỏi phải:

- Nuôi và duy trì vi khuẩn *E.coli* để thường xuyên có Probe,
- Cần lượng DNA mẫu lớn và có chất lượng,
- Tốn nhiều thời gian, các công đoạn để phát hiện và đòi hỏi phải có chất phóng xạ hoặc những hoá chất phức tạp khác.

Phương pháp chỉ thị phân tử PCR đã khắc phục được những nhược điểm trên. Phương pháp phân tích RAPD có ưu điểm là nhanh, tương đối kinh tế, tuy nhiên dùng RAPD đôi lúc thiếu chính xác, trong nhiều trường hợp còn phụ thuộc vào từng quần thể. RAPD thường không phân biệt được trạng thái dị hợp tử với một trong hai kiểu gen đồng hợp tử. áp dụng kỹ thuật PCR chuẩn mực sẽ được tiến hành nhanh và có hiệu quả kinh tế (rẻ), chỉ cần có vài nanogram DNA là có thể cho kết quả đáng tin cậy. Chính vì thế phương pháp RFLP và RAPD cần được chuyển thành phương pháp chỉ thị phân tử PCR, áp dụng trong chọn lọc sẽ nhanh, tốn ít công và giá thành hạ. Lý do giảm thời gian phân tích trong phương pháp PCR là do giảm công chiết xuất DNA vì sử dụng phương

pháp chiết xuất DNA nhanh, yêu cầu lượng mẫu cây rất nhỏ, không làm tổn thương cây khi lấy mẫu. Nhờ có phương pháp này một kỹ thuật viên một ngày có thể chiết xuất được 100 mẫu cây. Vì chỉ cần lượng mẫu nhỏ nên có thể lấy mẫu ở giai đoạn sinh trưởng sớm, điều này cho phép tránh việc cấy trồng những cây mạ không mong muốn ra ngoài đồng ruộng. Nghiền mẫu không cần nitor lỏng cũng là một tiến bộ của kỹ thuật chiết xuất này. Vì nhiều phòng thí nghiệm ở những nước đang phát triển khó có điều kiện sản xuất được nitor lỏng. Việc giảm giá thành của phương pháp là nhờ công đoạn chiết xuất DNA không cần những hoá chất đặc biệt, chiết xuất lượng DNA nhỏ, giá chi phí cho hoá chất hạ, chủ yếu giá thành hoá chất dùng chỉ cho mua agarose, để khắc phục chi phí nên dùng gel có chứa nhiều lỗ và cùng một lúc đổ nhiều mẫu vào một gel. Kiểm tra sản phẩm PCR là một bước của phương pháp, nếu dùng ethidium bromide thì nguy hiểm và đắt hơn dùng methylene blue. Giá thành khi phân tích một quần thể phân ly 300 cá thể có thể bao gồm các khoản như sau cho 1 gen đơn, cần dùng PBR để nhận biết và đã có sẵn primer. Công việc tiến hành chọn lọc gen bao gồm chiết xuất 300 mẫu DNA, chạy 300 mẫu PCR, phân giải 300 mẫu bằng enzyme cắt hạn chế, chuẩn bị gel điện di 300 mẫu trên, quan sát chúng trên gel. Dự toán chi phí tất cả các khoản liên quan đến các bước sẽ như sau:

Các công đoạn phân tích	Giá USD
Chiết xuất DNA	50
PCR	190
Phân cắt sản phẩm PCR bằng enzym cắt hạn chế	100
Điện di agarose	100
Chụp ảnh	20
Tổng cộng	460

Ngoài ra còn phải chi phí cho việc khấu hao, bảo dưỡng, sửa chữa và vận hành máy móc, điện, nước, gas đặc biệt là phải cần lượng lớn nước cất vô trùng, tổng chi phí cuối cùng cho phân tích 300 mẫu cây mỗi tổ hợp lai F2 mất khoảng 600 USD, tính ra trung bình cứ phân tích một cây mất khoảng 2 đô la, như vậy việc chọn lọc một gen quan trọng, mà bằng phương pháp truyền thống khó chọn lọc được chính xác thì nên áp dụng phương pháp này.

Phần lớn các chi phí cho áp dụng phương pháp này là tiền mua enzym cắt hạn chế, agarose, tip, ống nghiệm, nếu những thứ trên sau này có giá thành hạ thì hy vọng phương pháp sẽ được áp dụng thành công ở nhiều nước đang phát triển.

6.2. Độ chính xác

Trong chọn lọc dựa vào chỉ thị DNA phân tử thì độ chính xác của phương pháp phụ thuộc rất lớn vào việc chọn kiểu chỉ thị nào, vì nó không chịu ảnh hưởng của điều kiện môi trường. Bởi thế có thể chọn lọc được gen liên kết ấy ở bất kỳ giai đoạn sinh trưởng nào. Nên nhớ rằng mặc dù gen chọn lọc với chỉ thị phân tử có liên kết, nhưng đôi khi cũng bị phá vỡ nếu như có trao đổi chéo giữa chúng xảy ra. Khoảng cách di truyền giữa chúng phản ánh tần số trao đổi chéo. Tần số trao đổi chéo giữa locus gen và chỉ thị phân tử có thể thay đổi tùy theo quần thể, để có độ chính xác cao trong phương pháp chọn lọc chỉ thị phân tử, điều quan trọng là phải làm sao giảm được tần số trao đổi chéo

giữa gen chọn lọc và chỉ thị phân tử xuống. Độ chính xác của chọn lọc chỉ thị phân tử phụ thuộc vào các yếu tố sau:

a. Có được bản đồ chi tiết về liên kết chặt giữa gen chọn lọc và chỉ thị

Bản đồ gen là sự định vị của từng gen trên nhiễm sắc thể và mối liên kết của nó đối với một số chỉ thị phân tử. Bảng 1 trình bày bản đồ liên kết của một số gen chính chống chịu với một số điều kiện vô, hữu sinh môi trường, trong đó có cả những gen số lượng chống bệnh đạo ôn và các yếu tố cấu thành năng suất cũng được định vị trong những quần thể khác nhau bởi Wang *et al.* (1994), Lin *et al.* (1995). Tuy nhiên có rất nhiều gen liên kết với chỉ thị phân tử với khoảng cách lớn hơn 5 cM, khoảng cách liên kết vô cùng quan trọng quyết định độ chính xác của phương pháp chọn lọc chỉ thị phân tử. Liên kết càng chặt đặc biệt nằm cạnh kề sườn thì chọn lọc càng chính xác và có hiệu quả.

Có rất nhiều gen chính chống bệnh đạo ôn được phát hiện liên kết với chỉ thị phân tử, trong đó có 3 gen là *Pi-1*, *Pi-z5*, *Pi-ta* được định vị nằm trên nhiễm sắc thể lần lượt là số 11, 6 và số 12 theo Yu *et al.* (1991). *Pi-1* liên kết với RFLP RZ536 với khoảng cách liên kết là 14,0 + 4,5 cM. *Pi-z5* thì liên kết chặt với RFLP RG64 với độ liên kết là 2,8 + 1,4 cM còn *Pi-ta* liên kết với RG869 bằng độ liên kết là 15,4 + 4,7, và cách xa RZ397 khoảng 18,1 + 5,5 cM. Khoảng cách giữa *Pi-1* và *Pi-ta* là rất xa và hiện vẫn không tìm thấy một RFLP nào nằm kề gen *Pi-z5*.

Để tiến hành lập bản đồ liên kết chi tiết, Mew *et al.* (1994) đã phải tạo ra 3 quần thể F2 và F3 bằng cách lai giữa bố mẹ hồi qui mắc cảm bệnh, giống C039 với 3 dòng đẳng gen lần lượt chứa các gen *Pi-1*, *Pi-z5* và *Pi-ta*. Kích thước quần thể dùng cho nghiên cứu lập bản đồ liên kết giữa gen *Pi-1* là 160 dòng, đối với gen *Pi-z5* là 120 và đối với *Pi-ta* là 80 dòng. Ít nhất đã chọn 9 chỉ thị RFLP nằm trên nhiễm sắc thể tương ứng được chọn để điều tra và khảo sát sự liên kết với mỗi gen. Để phát hiện ra nhiều đa hình và lập bản đồ chi tiết giữa các chỉ thị với các gen người ta đã phải dùng đến 30 enzym cắt hạn chế và nhiều Probe khác nhau. Kết quả thu được cho thấy gen chống đạo ôn ở giống Hong Jiao Zhan nằm trên nhiễm sắc thể số 12 liên kết với chỉ thị RFLP: RG869 và RZ397 với khoảng cách xa trên 5 cM, cả 2 RFLP đều nằm cùng 1 phía với gen trên, đồng thời chưa phát hiện thấy có một RFLP chỉ thị nào nằm kề cạnh. Qua kết quả điều tra nghiên cứu của Lu *et al.* (1994) trong một quần thể F2, dùng 99 đoạn môi ngẫu hứng dài 10 nucleotit thì phát hiện thấy có một mẫu RAPD liên kết rất chặt với gen chống bệnh vì trong số 143 cây F2 điều tra không tìm thấy một cây trao đổi chéo nào.

b. Sự thay đổi tần số tái tổ hợp giữa các quần thể

Trong thực tế chọn tạo giống, bố mẹ dùng để tạo ra quần thể phân ly không cần thiết phải khác biệt như đối với quần thể dùng để lập bản đồ gen, thậm chí nhiều trường hợp cả 2 bố mẹ đều cho gen như nhau. Thực tế người ta đã phát hiện là có sự thay đổi về tần số tái tổ hợp giữa gen chọn lọc với chỉ thị phân tử ở trong những quần thể khác nhau, do vậy cần thiết phải nắm được sự thay đổi này. Để tìm hiểu sự thay đổi này Abenes *et al.* 1994 đã nghiên cứu tần số trao đổi chéo giữa 10 cặp chỉ thị phân tử nằm trên nhiễm sắc thể số 11, trên 3 quần thể khác nhau kết quả thu được như sau:

Cặp chỉ thị phân tử	Tần số trao đổi chéo ở các quần thể F2			Trung bình	Sai số chuẩn SD
	1	2	3		
RZ536-RG303	12,5	24,3	16,0	16,56	4,67
RG303- RG1109	4,8	1,4	8,0	5,18	2,56
RG1109-CD0520	0,8	0,0	0,0	0,32	0,39
CD0520-pTA818	6,1	5,5	4,1	5,22	0,89
pTA818- RG103	6,2	5,4	1,0	4,10	2,39
RG103-CD0365	2,4	6,6	3,5	3,79	1,67
CD0365-RG2	16,1	17,3	17,5	17,63	1,50
RG2-RG167	17,2	17,4	27,3	20,96	4,85
RG167-RG247	4,5	8,2	1,1	4,12	2,75
RG247-RG1094	35,0	35,3	9,2	25,59	12,53

Kết quả trên chứng tỏ rằng có sự biến động về tần số trao đổi chéo trong một cặp chỉ thị giữa các quần thể, tuy nhiên cặp nào liên kết chặt thì sự thay đổi này ít. Một nghiên cứu khác khi sử dụng cùng cặp chỉ thị nhưng ở 2 quần thể F2 khác nhau, đều có cùng bố và cùng kích thước điều tra là 171 cá thể F2 do Lin *et al.* (1995) tiến hành cũng cho kết quả tương tự. Chính vì có sự biến động này mà khi áp dụng trong chọn giống đối với từng gen nên điều tra kích thước quần thể giống nhau và chỉ nên áp dụng đối với những chỉ thị nào có độ liên kết với gen chọn lọc < 5 cM.

c. Dùng những chỉ thị phân tử đơn và kẻ cậnh

Một số chỉ thị phân tử liên kết rất chặt với gen chống bệnh đạo ôn đã được nghiên cứu, chúng ta đầu tiên nên sử dụng những chỉ thị này để tìm gen chống chịu trong quần thể phân li. Ronald và Tanksley (1991) đã áp dụng chỉ thị phân tử pTA248 để tìm và chọn gen *Xa-21* ở quần thể F2, kết quả chọn lọc cũng đã được kiểm nghiệm đánh giá lại bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo và chọn lọc truyền thống. So sánh kết quả 2 phương pháp chọn lọc cùng một quần thể phân li đối với gen *Xa-21* được trình bày ở bảng dưới đây.

Bảng 3.4. So sánh sự sai khác về kiểu gen giữa 2 phương pháp chọn lọc dùng chỉ thị PCR và kiểm tra thể hệ

Phân tích bằng PCR		Phân tích bằng kiểm tra thể hệ F3		Độ chính xác %
Kiểu gen	Số cây	Kiểu gen	Số cây	
RR	34	RR	31	91,2%
		Rr	3	
Rr	28	RR	4	85,7%
		Rr	24	

Qua kiểm tra cho thấy độ chính xác của phương pháp dùng chỉ thị phân tử để chọn lọc sẽ chọn chính xác được khoảng 91%. Sai số 9% có thể phản ánh sự nhầm lẫn trong việc xác định kiểu hình hoặc là có sự biến động về tần số trao đổi chéo từ quần thể lập bản đồ di truyền đến quần thể chọn giống.

Đứng về mặt lí thuyết thì sai số trên có thể điều chỉnh chính xác được nếu chúng ta sử dụng thêm chỉ thị phân tử kề cạnh để phối hợp chọn lọc. Người ta đã kiểm chứng điều này đối với gen chống chịu bệnh đạo ôn *Pi-z5*, gen này đã được Yu *et al.* (1991) định vị liên kết với chỉ thị RFLP, RG64, đồng thời người ta cũng phát hiện thấy rằng một chỉ thị khác bên cạnh gen này là RG456 và sử dụng cả 2 chỉ thị này để chọn lọc. Độ chính xác của chọn lọc khi dùng cả 2 chỉ thị này được trình bày ở bảng dưới đây. Như vậy trong tổng số 109 cá thể F2 điều tra, dùng chỉ thị RG456 chọn được 31 cây có kiểu gen RR, 53 cây có kiểu gen Rr và 25 cây có kiểu gen rr. Để kiểm chứng độ chính xác của phương pháp chọn lọc chỉ thị này, người ta kiểm tra lại các kiểu gen bằng việc sử dụng thêm chỉ thị RG64. Kết quả kiểm tra cho thấy trong số 31 cây đồng hợp tử gen chống chịu RR nhờ sử dụng chỉ thị chọn lọc RG456, khi dùng chỉ thị RG64 đã phát hiện thấy có 25 cây có kiểu gen RR và 6 cây có kiểu gen Rr. Các cây này lại được kiểm chứng lại bằng phương pháp lấy nhiễm đời con F3 cho kết quả chọn cây RR dùng 2 chỉ thị là chính xác 100%, riêng có việc chọn cây Rr thì độ chính xác khoảng 97,7%, còn chọn cây rr cũng chính xác gần 100%.

Bảng 4.4. Chọn lọc gen *Pi-z5* với trợ giúp của chỉ thị phân tử ở quần thể phân ly

Tỷ lệ kiểu gen chọn lọc khi dùng các chỉ thị phân tử khác nhau		Kết quả kiểm tra lại kiểu gen bằng lấy nhiễm đánh giá các thế hệ con cháu truyền thống			Tỷ lệ chính xác %
RG456	RG64	RR	Rr	rr	
RR (31)	RR(25)	25			100%
	Rr (6)	2	6		
Rr (53)	RR (4)	4			97,7%
	Rr (44)	1	43		
	rr (5)				
rr (25)	Rr (1)		1		≈100%
	rr (24)				

Số liệu trong ngoặc là số cây dự đoán mang kiểu gen tương ứng.

7. Tính khả thi

Muốn tiến hành phương pháp chọn lọc chỉ thị phân tử PCR thì cần thiết phải có được thông tin về trình tự sắp xếp các nucleotit trên chuỗi RFLP liên kết với gen chọn lọc, đồng thời khi áp dụng, chúng ta phải tạo được tính đa hình giữa cây có gen và không có gen chọn lọc cao. Điều tra một cách có hệ thống các chỉ thị PCR phân tử và khả năng, vị trí phân cắt của các enzym cắt hạn chế đối với sản phẩm PCR sẽ hỗ trợ cho việc áp dụng phương pháp này.

7.1. Tần số của các chỉ thị ALP và PBR ở lúa

Sản phẩm nhân PCR có thể trực tiếp tạo ra sự đa hình giữa kiểu gen có và không có, nếu chỉ thị nào thuộc loại này, sẽ được ứng dụng khá phổ biến và dễ dàng. Tuy nhiên tần số chỉ thị này ít hơn nhiều so với phương pháp RFLP vì nó chỉ phân biệt được sự đa hình trong nội vi vùng 2 đoạn môi, kích thước vùng này thường bằng với Probe từ 0,5 đến 2 Kb. Phân giải sản phẩm PCR bằng enzym cắt hạn chế cắt đoạn 4 nucleotit sẽ làm tăng mức độ đa hình của nhiều chỉ thị phân tử và alen trong cây lúa. Nghiên cứu về tần

số các chỉ thị thuộc ALP và PBR được tiến hành trong một tập đoàn các giống lúa gồm 35 giống nhập từ Iran, 3 giống kiểu Indica, và 2 giống thuộc loại hình Japonica bởi Ghareyazie *et al.* (1994). Các DNA được nhân lên khi sử dụng 14 bộ cặp đoạn mồi. Đồng thời các sản phẩm ADN nhân PCR này đều được cắt bởi 9 enzyme khác nhau, enzyme này nhận biết và cắt ở vị trí có 4 nu. Tiến hành so sánh theo cặp trong số 40 giống về tính đa hình sau khi cắt và trước khi cắt cho kết quả như sau: Trong số 9895 cặp so sánh thì có 1277 cặp giống có thể tìm thấy đa hình thông qua ALP chiếm 13 %, số còn lại phải cắt sản phẩm nhân PCR bằng enzyme cắt hạn chế mới tìm thấy sự đa hình.

7.2. Tần số vị trí cắt của enzyme cắt giới hạn trong genome lúa

Người ta đã phát hiện ra rằng số vị trí cắt enzyme trong bộ genome lúa khác nhau tùy enzyme. Enzyme HinfI và RsaI cắt thường xuyên hơn là enzyme ClaI và StyI (Williams *et al.* 1991). Số vị trí cắt 15 sản phẩm nhân PCR của 40 giống lúa khác nhau đã được nghiên cứu bởi Ghareyazie *et al.* (1995) cho thấy có 40 vị trí cắt đối với enzyme RsaI, trong khi đó chỉ có 11 vị trí cắt đối với enzyme StyI. Số lượng vị trí cắt trên 1Kb genome lúa giao động từ 0,60 đối với enzyme Styl và 2,38 đối với enzyme RsaI.

Để kiểm tra tần số cắt của enzyme sẽ được sử dụng trong phân tích PBR trong cây lúa người ta đã quyết các vị trí cắt tồn tại trong chuỗi genome lúa được dự trữ trong ngân hàng gen. Khi quyết 189 Kb genome lúa, dùng 98 enzyme, kết quả cho thấy tỷ lệ giữa vị trí cắt quan sát được(OB) trên số vị trí cắt chờ đợi (EP) biến động từ 0,24 đến 3,0, xem bảng 4-5 dưới đây. Khoảng một nửa trong số 105 enzyme có tỷ lệ này lớn hơn 1,0. Đây là dữ liệu rất quý giá cho việc phân tích PBR cây lúa sau này.

Bảng 5.4. Tần số vị trí cắt enzyme có ở 123 đoạn ADN genome lúa dự trữ trong ngân hàng gen

Enzyme giới hạn	Vị trí cắt	KLPT chờ đợi đoạn cắt giới hạn (bp)	Số vị trí cắt quan sát (OB)	Số vị trí cắt chờ đợi (EP)	Tỷ lệ OB/EP
AatII	gacgt/c	4096	49	46	1,07
AccI	gt/mkac	1024	153	184	0,83
AclI	c/cgc	256	823	735	1,12
AflII	c/ttaag	4096	28	46	0,61
AflIII	a/crygt	1024	126	184	0,69
AgeI	a/ccggt	4096	23	46	0,5
AluI	ag/ct	256	948	735	1,29
Apal	gggcc/c	4096	27	46	0,59
ApalI	g/tgcac	4096	26	46	0,57
AseI	at/taat	4096	102	46	2,22
Aval	c/ycgrg	1024	112	184	0,61
AvalI	g/gwcc	512	199	368	0,54
AvrII	c/ctagg	4096	26	46	0,57
BalI	tgg/cca	4096	70	46	1,52
BamHI	g/gatcc	4096	34	46	0,74

BanI	g/gyrcc	1024	278	184	1,51
BanII	grgcy/c	1024	214	184	1,16
BbeI	ggcgc/c	4096	138	46	3
BclI	t/gatca	4096	82	46	1,78
BglII	a/gatct	4096	66	46	1,44
BsaHI	gr/cgyc	1024	318	184	1,73
BsiWI	c/gtacg	4096	23	46	0,5
Bsp12861	gdgch/c	455	420	414	1,01
BspEI	t/ccgga	4096	14	46	0,3
BspHI	t/catga	4096	61	46	1,33
BsrBI	gag/cgg	4096	28	46	0,61
BsrGI	t/gtaca	4096	63	46	1,37
BssHII	g/cgcgc	4096	74	46	1,61
BstBI	t/cgaa	4096	23	46	0,5
BstUI	cg/cg	256	602	735	0,82
BstYI	r/gatcy	1024	201	184	1,09
Cfrt01	r/ccggy	1024	275	184	1,5
Clal	at/cgat	4096	55	46	1,2
Ddel	c/tnag	256	491	735	0,67
Dpnt	ga/tc	256	814	735	1,11
DraI	att/aaa	4096	92	46	2
EaeI	y/ggCCR	1024	267	184	1,45
EagI	c/ggccg	4096	58	46	1,26
Eco47III	agc/gct	4096	19	46	0,41
EcoRI	g/aattc	4096	50	46	1,09
EcoRII	/ccwgg	512	348	368	0,95
EcoRV	gat/atc	4096	35	46	0,76
Flu4HI	gc/ngc	256	1303	735	1,77
FspI	tgc/gca	4096	29	46	0,63
HaeI	wgg/ccw	1024	205	184	1,11
HaeII	rgcgc/y	1024	226	184	1,23
HaeIII	gg/cc	256	722	735	1,77
HgiAI	gwgCW/c	1024	246	184	1,34
HhaI	gcg/c	256	678	735	0,92
HinCII	gty/rac	1024	167	184	0,91
HinDIII	a/agctt	4096	55	46	1,2
HinfI	g/antc	256	492	735	0,67
HinPII	g/cgc	256	678	735	0,92
HpaI	gtt/aac	4096	15	46	0,33
KasI	g/gcgcc	4096	138	46	3
KpnI	ggtac/c	4096	39	46	0,85
MaeI	c/tag	256	425	735	0,58
MaeII	g/cgt	256	412	735	0,56
MaeIII	/gtnac	256	422	735	0,6
MluI	a/cgcgt	4096	19	46	0,41

MseI	t/taa	256	848	735	1,15
MspI	c/cgg	256	714	735	0,97
MvaI	cc/wgg	512	348	368	0,95
NaeI	gcc/ggc	4096	121	46	2,63
NarI	gg/cgcc	4096	138	46	3
NciI	cc/sgg	512	293	368	0,8
NcoI	c/catgg	4096	94	46	0,24
NdeI	ca/tatg	4096	54	46	1,17
NgoMI	g/ccggc	4096	121	46	2,63
NheI	g/ctagc	4096	47	46	1,02
NlaIII	catg/	256	1030	735	1,4
NlaV	ggn/ncc	256	634	735	0,86
NruI	tcg/cga	4096	11	46	0,24
NsiI	atgca/t	4096	88	46	1,91
NspI	rcatg/y	1024	240	184	1,31
NspBII	cmg/ckg	1024	180	184	0,98
PmlI	cac/gtg	4096	14	46	0,3
PstI	ctgca/g	4096	79	46	1,72
PvuI	cgat/cg	4096	30	46	0,65
PvuII	cag/ctg	4096	44	46	0,96
RsaI	gt/ac	256	631	735	0,86
SacI	gagct/c	4096	96	46	2,09
SacII	ccgc/gg	4096	70	46	1,52
SaII	g/tcgac	4096	74	46	1,61
Sau3AI	/gatc	256	814	735	1,11
Sau96I	g/gncc	256	455	735	0,62
ScaI	agt/act	4096	52	46	1,13
ScrFI	cc/ngg	256	641	735	0,87
SmaI	ccc/ggg	4095	27	46	0,59
SnaBI	tac/gta	4096	20	46	0,44
SpeI	a/ctagt	4096	39	46	0,85
SphI	gcatg/c	4096	58	46	1,26
SspI	aat/att	4096	80	46	1,74
StuI	agg/cct	4096	33	46	0,72
StyI	c/cwwgg	1024	262	184	1,42
TagI	t/cga	256	689	735	0,94
XbaI	t/ctaga	4096	38	46	0,83
XhoI	c/tcgag	4096	47	46	1,02

Ghi chú: M=A/C, D=G/A/T, H=C/A/T, K=T/G, R=Pu, Y=Py, W=A/T, S=C/G, N=A/C/G/T.

8. Tương lai áp dụng chỉ thị PCR trong chọn tạo giống lúa

8.1. Thuận lợi

Sự phát triển nhanh chóng của kỹ thuật chỉ thị DNA đã cho phép các nhà khoa học có cơ hội sử dụng những phương tiện mới thay thế phương pháp cũ trong chọn giống cây trồng. Ưu việt cơ bản của phương pháp chọn lọc chỉ thị phân tử là rút ngắn thời gian tạo giống và giảm giá thành trong việc chọn lọc những tính trạng mà khó có thể đánh giá được trong điều kiện truyền thống. Do vậy chọn lọc chỉ thị phân tử cho phép tăng hiệu quả của chọn lọc, qui tụ được nhiều gen nhằm tăng khả năng chống bệnh cho lúa góp phần vào việc tăng sản lượng lúa.

8.2. Khó khăn

Tuy nhiên vẫn còn 3 trở ngại cần được khắc phục để sử dụng có hiệu quả phương pháp này.

- Thứ nhất là hiện nay tốc độ nghiên cứu về định vị gen còn rất chậm đã làm hạn chế vốn gen có thể dùng phương pháp này. Thêm vào nữa rất nhiều gen chọn lọc còn nằm khá xa các chỉ thị phân tử đã được nghiên cứu, do vậy không thể sử dụng được. Vấn đề này không chỉ xảy ra đối với lúa mà còn đối với cây trồng khác, cần phải phát triển kỹ thuật mới nhằm định vị nhanh và nhiều gen hơn.
- Trở ngại thứ hai là số lượng có hạn các chỉ thị PCR được ứng dụng trong chọn lọc chỉ thị phân tử. Mặc dầu có nhiều gen đã được định vị với RFLP hoặc các chỉ thị khác nhưng ít chỉ thị có thể dùng chuyển sang phương pháp PCR, bởi vì có trường hợp sự đa hình của sản phẩm PCR bị biến mất khi RFLP hoặc chỉ thị phân tử khác được chuyển đổi thành phương pháp PCR chỉ thị phân tử. Để khắc phục vấn đề này, việc điều tra có hệ thống nhiều nguồn gen lúa về sự đa hình của chúng trên cơ sở phương pháp chỉ thị PCR là rất cần thiết. Kết quả điều tra sẽ cung cấp số liệu cơ sở từ đó nhà chọn giống có thể chọn những chỉ thị nào có thể chuyển sang PCR cho kết quả một cách đáng tin cậy.
- Trở ngại thứ 3 là giá thành của phương pháp chỉ thị phân tử còn khá cao, giá này thay đổi tùy theo tính trạng, giá này còn phụ thuộc vào từng nước. Những tính trạng nào bằng phương pháp chọn giống thông thường không thể qui tụ nhiều gen vào 1 cây được thì nên áp dụng phương pháp chỉ thị phân tử sẽ có ý nghĩa hơn.

CÂU HỎI CHƯƠNG 2

1. Thế nào là phương pháp nhân DNA bằng PCR trên cơ sở RFLP. Nêu tóm tắt các bước tiến hành.
2. Nêu ý nghĩa của phương pháp nhân DNA bằng PCR trên cơ sở RFLP. Giải thích ý nghĩa cột “RFLP và độ liên kết” ở bảng 1.4 có ghi RG457, 3,68 cM là gì.
3. Nêu ưu điểm của phương pháp nhân DNA bằng PCR trên cơ sở RFLP. Điều kiện để tiến hành phương pháp này.
4. Minh họa cơ sở di truyền của phương pháp chỉ thị phân tử DNA đánh dấu gen.
5. Thế nào là phương pháp ALP và PBR, sự giống và khác nhau giữa 2 phương pháp. Khi nào phải tiến hành phương pháp PBR.
6. STS là gì, tại sao lại dùng STS.
7. Nêu cơ sở khoa học việc xác định STS.
8. Nêu tóm tắt các bước nhân DNA bằng PCR.
9. Khi nào cần phải dùng RE để xác định đa hình. Chọn RE để phân cắt sản phẩm PCR dựa vào cơ sở khoa học nào, tại sao.
10. Khi thiết lập phản ứng phân giải sản phẩm nhân gen PCR cần dựa trên nguyên tắc gì?
11. Tại sao cần quy tụ nhiều gen vào một giống. Tại sao bằng phương pháp chọn giống truyền thống rất khó thực hiện được.
12. Nêu và phân tích khả năng quy tụ nhiều gen vào một giống nhờ áp dụng chỉ thị phân tử DNA.
13. Nêu và phân tích những yếu tố ảnh hưởng đến độ chính xác của phương pháp nhân DNA trên cơ sở RFLP.
14. Tần số tái tổ hợp giữa 2 chỉ thị DNA là 2,3 cM có nghĩa như thế nào. Tần số tái tổ hợp giữa gen và chỉ thị DNA như thế nào thì áp dụng phương pháp chọn lọc dựa vào chỉ thị DNA được.
15. Thế nào là dùng chỉ thị đơn và kề cạnh, tại sao phải tiến hành phương pháp này.
16. Tại sao thường tần số ALP trong bộ genôm sinh vật thường thấp hơn rất nhiều PBR.
17. Tần số vị trí cắt của enzym giới hạn trong genôm là gì. Nêu ý nghĩa của tần số vị trí cắt.
18. Nêu ưu điểm phương pháp chỉ thị PCR trong chọn tạo giống cây trồng. Để phổ áp dụng được rộng hơn nữa cần phải có những yêu cầu gì.

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

I. Xác định mức tương đồng và khoảng cách di truyền

1. Đa dạng di truyền

- Là sự đa dạng, phong phú về hình thái, kiểu hình hay tính trạng giữa các cá thể trong một quần thể, một giống hay giữa các dòng giống hoặc giữa các loài với nhau.
- Đa dạng về hình thái, màu sắc, dạng hạt, chiều cao....
- Đa dạng về alen/locus, dãy alen.
- Đa dạng về enzyme, isozyme và protein cấu trúc, dự trữ và chức năng.
- Đa dạng về kháng thể, kháng nguyên.
- Sự đa dạng trên là do kết quả tác động giữa kiểu gen kết hợp với điều kiện môi trường. Nguyên nhân sâu xa là do quá trình biến dị, di truyền và chọn lọc xảy ra qua nhiều thế hệ.
- Đa dạng về DNA, rất phong phú xảy ra trong genome, nhiều trường hợp ch- a đ- ọc biểu hiện ra nên không chịu sự tác động của chọn lọc.
- Giữa các cá thể sinh vật trong một quần thể, giống hay một loài luôn tồn tại 2 mặt là giống và khác nhau. Nếu chúng có nhiều DNA, gen hay tính trạng càng giống nhau thì chúng có thể sẽ là họ hàng gần nhau hay thậm chí là một cá thể, thí dụ các cá thể trong một dòng thuần. Ngược lại nếu chúng có nhiều DNA, gen hay tính trạng khác nhau thì càng xa nhau hay không có họ hàng với nhau.
- Để đo sự đa dạng người ta dùng các thông số về đa hình kiểu hình, số alen, đối với tính trạng số lượng dùng phạm vi biến động, ph- ơng sai... Tất cả các thông số trên khi đánh giá đều gặp phải 2 vấn đề: tính đa hình đều có hạn hoặc không có và phải luôn luôn phụ thuộc vào môi trường.
- Riêng đối với đa hình DNA thì rất lớn, khi đánh giá không cần phụ thuộc vào môi trường, có thể đánh giá đa hình ở cả những vùng không chứa gen hoạt động.

2. Các thông số biểu thị đa hình DNA

Hiện nay với sự phát triển của sinh học phân tử, người ta có thể phân nhóm và xác định sự đa dạng di truyền giữa các loài, giống và cá thể ở mức độ phân tử. Như vậy sự chính xác sẽ cao hơn rất nhiều so với phương pháp phân định dựa vào các tính trạng kiểu hình.

Công thức để xác định mức gần nhau về di truyền giữa các cá thể, giữa các loài... bằng các phương pháp chỉ thị phân tử (RFLP, RAPD, AFLP...), khi dùng các chỉ thị này để khảo sát tập đoàn các dòng giống thường biểu hiện bằng các vạch băng trên nền điện di agarose hoặc phim x-quang. Công việc đầu tiên là chúng ta phải xác định đ- ọc trong các kiểu gen nghiên cứu có tổng số hiện diện bao nhiêu vạch băng, những vạch băng nào trùng và khác nhau của mỗi kiểu gen. Nếu kiểu gen có vạch băng nào đó chúng ta cho điểm 1 (có) và điểm 0 (không có) khi không có vạch băng thể hiện. So sánh 2 kiểu gen 1 và 2 suy cho cùng là xem chúng có giống nhau hay khác nhau về kiểu gen không, muốn vậy chúng ta phải xác định giá trị tương đồng và khoảng cách di truyền là những giá trị nhằm ước đoán về mặt định lượng mô tả sự gần gũi hay xa nhau về mặt di truyền. Khi chúng ta dùng một chỉ thị DNA nào đó điều tra giữa 2 kiểu gen thấy xuất hiện 3 kiểu vạch băng: m là số vạch băng có chung giống nhau giữa 2 kiểu gen có trị số $= a + d$ (a: số

vạch băng kiểu gen 1 và 2 cùng có, giống nhau; d: số vạch băng không có, giống nhau); u: tổng số vạch băng có riêng của mỗi kiểu gen bằng $b + c$ (b: số vạch băng có riêng của kiểu gen 1, c là số vạch băng có riêng của kiểu gen 2); còn n là tổng số vạch băng ghi nhận được biểu hiện ở cả 2 kiểu gen. Trường hợp điều tra nhiều chỉ thị cùng một lúc thì các chỉ số trên sẽ bằng tổng các số liệu tương ứng.

Hiện nay có một số công thức tính chỉ số tương đồng (Similarity) như sau:

- Chỉ số tương đồng đơn giản (simple matching coefficient)

$S_{sm} = m / n$, áp dụng khi cả 2 kiểu gen cùng có một số vạch băng tương ứng không biểu hiện ra.

- Chỉ số tương đồng tính theo Jiccard (Jaccard's coefficient)

$S_j = a / a + u$, áp dụng khi cả 2 kiểu gen các vạch băng tương ứng đều được biểu hiện nhưng ở những vị trí khác nhau.

- Chỉ số Dice (Dice's coefficient)

$S_d = 2a / 2a + u$, áp dụng trong trường hợp các vạch băng vừa có và không có ở các kiểu gen tương ứng. Công thức này có thể được viết lại khi muốn đề cập đến thành phần các vạch băng biểu hiện: $S_d = 2a / n_1 + n_2$, trong đó n_1 là tổng số vạch băng của kiểu gen 1, n_2 tổng số vạch băng của kiểu gen 2. Trong các cách tính trên thì cách tính dựa theo chỉ số Dice đang được dùng rộng rãi nhất.

Sau khi tính được S chúng ta tính tiếp khoảng cách di truyền $GD = 1 - S$. Khoảng cách di truyền là độ lệch của những chỉ số biểu hiện giống nhau, S biến thiên từ 0 đến 1. Chúng ta có thể tính toán để chuyển đổi chỉ số Dice thành chỉ số khoảng cách, ngoài ra hiện nay đã có phần mềm máy tính NTSYS trợ giúp.

- Các bước tính toán

- Đếm tổng số vạch băng của kiểu gen 1 và 2, tương ứng ký hiệu là n_1 và n_2 .

- Đếm số vạch băng trùng nhau giữa kiểu gen 1 và 2 ký hiệu a_{12}

- Tính chỉ số Dice theo công thức $S_d = 2.a_{12} / (n_1 + n_2)$.

- Chuyển đổi thành giá trị GD, $GD = 1 - S_d$.

- Lặp lại các bước trên với các cặp kiểu gen còn lại ví dụ như 1 và 3, 1 và 4...; 2 và 3, 2 và 4, vv, rồi ký hiệu GD₁₂, GD₁₃, GD₁₄; GD₂₃, GD₂₄ vv, rồi lập thành bảng sẽ trình bày dưới đây.

3. Xếp theo nhóm tương đồng bằng phương pháp UPGMA

Đây còn gọi là phân tích tụ cụm (cluster analysis) là phương pháp sắp xếp các kiểu gen nghiên cứu có khoảng cách di truyền (GD) giống nhau thành từng cụm nhóm. Các bước tiến hành như sau:

- Tìm các cặp GD có giá trị nhỏ nhất, từ thấp đến cao.

- Nhập các cặp GD có giá trị tương đương thành một nhóm.

- Tạo tìm ra nhóm cặp mới có giá trị GD lớn hơn, cũng dựa trên giá trị khoảng cách di truyền giống nhau.

- Cứ làm như vậy cho đến hết các kiểu gen nghiên cứu.

Hiện nay phương pháp tính khoảng cách di truyền đơn giản nhất là phương pháp UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) cụ thể tiến hành như sau:

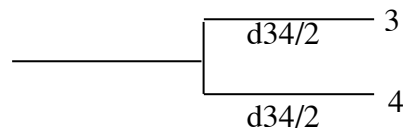
- Tìm giá trị khoảng cách di truyền của cặp kiểu gen nào nhỏ nhất.

- Xếp nhóm 2 kiểu gen này lại với nhau có giá trị khoảng cách ghi ở giữa 2 kiểu gen.
- Xây dựng nhóm khoảng cách mới bằng sự phối hợp giữa nhóm 2 kiểu gen trên với một kiểu gen thứ 3 nhưng với giá trị trung bình có khoảng cách di truyền gần nhất.
- Lặp lại qui trình trên cho đến hết các kiểu gen còn lại.

Ví dụ ta có 5 kiểu gen cần xác định khoảng cách di truyền, ta lập bảng sau:

Kiểu gen	1	2	3	4
2	d12			
3	d13	d23		
4	d14	d24	d34	
5	d15	d25	d35	d45

Giả sử từ bảng trên ta có d34 là nhỏ nhất tức kiểu gen 3 và 4 gần nhau nhất thì 2 kiểu gen này được xếp vào một nhóm với khoảng cách di truyền nhánh 2 kiểu gen này nằm trong sơ đồ hình cây 5 kiểu gen sẽ là: $d_{34}/2$

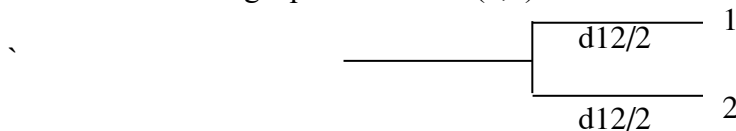


Từ d34 lập khoảng cách di truyền mới với các kiểu gen khác còn lại rồi trình bày ở bảng sau:

Kiểu gen	1	2	(3,4)
2	d12		
(3,4)	d1(3,4)	d2(3,4)	
5	d15	d25	d(3,4)5

Cách tính $d1(3,4) = (d13 + d14) / 2$; $d2(3,4) = (d23 + d24) / 2$; $d5(3,4) = (d35 + d45)/2$.

Từ bảng trên ta lại tìm giá trị khoảng cách nhỏ nhất d của cặp mới nào đó giả dụ như d12 là nhỏ nhất ta ghép thành nhóm (1,2).

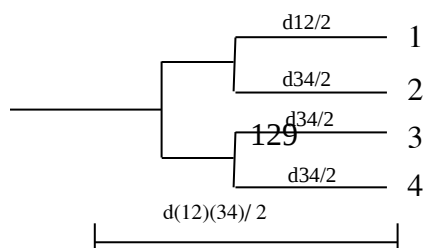


Sau khi được cụm nhóm mới (1,2) ta lập bảng ma trận mới với số nhóm kiểu gen được gộp ít đi như sau:

Kiểu (nhóm) gen	(1,2)	(3,4)
(3,4)	d(1,2) (3,4)	
5	d(1,2)5	d(3,4)5

$d(1,2)5$ được tính toán giống như trên, còn $d(1,2)(3,4)$ bằng trung bình cộng của $d1(3,4)$ và $d2(3,4)$. Bảng trên cho ta một hệ ma trận mới, trong đó giả sử ta thấy $d(12)(34)$ có giá trị nhỏ nhất, có nghĩa là hai cụm nhóm (1,2) và (3,4) nằm trong cùng một cụm nhóm mới với khoảng cách $GD = d(12)(34) / 2$.

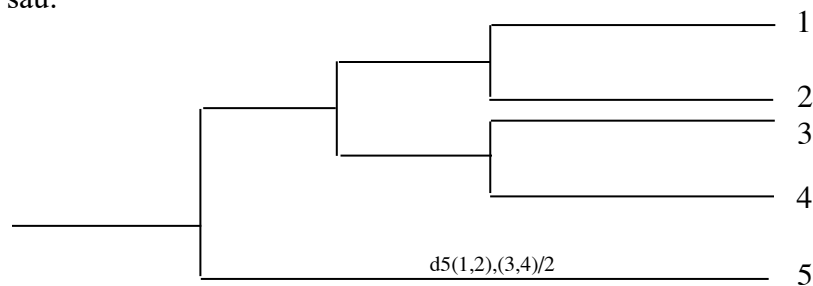
Lúc này ta có thể vẽ đồ thị hình cây mới như sau:



Ma trận mới được tính toán bằng cách lấy giá trị trung bình của $d5(12)$ và $d5(34)$, ta lại lập bảng gộp nhóm mới là:

Kiểu (cụm) gen	$((1,2), (3,4))$
5	D5 $((1,2), (3,4))$

Trong đó giá trị khoảng cách $d5((1,2), (3,4)) = (d5(12) + d5(34)) / 2$.
Cuối cùng ta có giản đồ hình cây nói nên khoảng cách di truyền của 5 kiểu gen nghiên cứu như sau:



Từ giản đồ trên chúng ta có thể biết được mức độ đa dạng di truyền của các kiểu gen và khoảng cách di truyền giữa chúng. Trong đó nhóm 1 và 2 gần nhau về di truyền nhất tiếp đến là nhóm 3 và 4, 2 cụm nhóm này lại có phần chung giống với kiểu gen 5. Ngoài phương pháp tính bằng tay trên hiện nay đã có chương trình phần mềm máy tính có tên là NTSYS-pc do Rohlf (1992) thiết kế trợ giúp.

4. ứng dụng

- Xác định quan hệ họ hàng trong cây tiến hóa.
- Xác định quan hệ gần xa nhau giữa các loài, chủng vi sinh vật gây bệnh, có ích từ đó có thể suy đoán ra nhiều đặc tính giống và khác nhau để có biện pháp phòng trừ hoặc nuôi dưỡng và sử dụng.
- Xác định sự đa dạng di truyền trong quần thể, sự đồng nhất hay khác nhau giữa các cá thể trong quần thể.
- Định cặp bố mẹ để lai cho - u thế lai cao hoặc phân ly mạnh.

II. Ứng chỉ thị phân tử DNA đối với tính trạng số lượng

1. Tính trạng số lượng

Trong quần thể phân ly của sinh vật, hầu hết các tính trạng nông sinh học quan trọng đều biểu hiện tính biến dị liên tục hoặc di truyền theo tính trạng số lượng. Đặc điểm của tính trạng số lượng thường do nhiều gen điều khiển, mỗi gen có tác động nhất định,

không bằng nhau lên sự biểu hiện của tính trạng. Vấn đề đặt ra là gen nào đóng vai trò tác động chính, gen nào tác động phụ và cụ thể từng gen đóng góp bao nhiêu cho kiểu hiện. Các gen qui định QTL cũng di truyền theo quy luật của Mendel, hoạt động giữa chúng có thể theo phương thức cộng tính, tính trội hay siêu trội? Gen QTL nào hoạt động như là tương tác không alen (epistasis)? Vì là tính trạng số lượng nên thường: Biểu hiện kiểu hình = Phần đóng góp của kiểu gen + Môi trường. Vấn đề đặt ra là chúng ta cần nghiên cứu phát hiện ra gen chủ lực điều khiển tính trạng số lượng, Sax (1923) là người đầu tiên đã tìm được gen chủ lực điều khiển tính trạng số lượng QTL quy định màu sắc vỏ hạt cây đậu. Với sự phát triển mạnh mẽ các công trình nghiên cứu chỉ thị phân tử DNA và isozyme đã cho phép chúng ta có thể lập được bản đồ giữa các chỉ thị phân tử với nhiều tính trạng số lượng.

Để lập bản đồ liên kết giữa các chỉ thị phân tử với các tính trạng số lượng QTL cũng cần tuân thủ các bước sau:

2. Tạo quần thể phân ly về tính trạng QTL

Để phát hiện ra được gen chủ lực quy định tính trạng QTL thì cần phải tiến hành lai nhiều cặp bố mẹ, khác nhau ở nhiều mức độ biểu hiện về tính trạng QTL. Từ các tổ hợp lai này tạo ra các quần thể để xây dựng bản đồ liên kết. Cũng giống như tính trạng đơn gen, nhiều quần thể có thể được sử dụng là: Quần thể lai lại (BC), quần thể đơn bội kép (DH), quần thể các dòng thuần tái tổ hợp (RIL), quần thể F₂, F₃ hoặc S₁. Quần thể F₂, F₃ và BC thường được tạo ra dễ dàng bằng phương pháp truyền thống. Các dòng RIL có thể tạo thành bằng phương pháp tự phối đôi với cây giao phấn hoặc tự thụ phấn hay giao phối giữa các con lai có cùng bố hoặc mẹ (sib-mating) kết hợp với phương pháp một hạt (single seed descent). Việc tạo ra quần thể này có thể được rút ngắn nếu:

- Vòng đời của cây trồng đó ngắn, một năm có thể quay vòng nhiều thế hệ.
- Giống cây không phản ứng với quang chu kỳ ánh sáng và.
- Đã có được một kỹ thuật nhân giống nhanh và hiệu quả đối với cây trồng đó.

3. Ghi chép đánh giá kiểu hình

Cần phải cảm thử theo dõi từng cá thể một để phân tích chỉ thị ADN và đo tính trạng QTL, dựa vào biểu hiện dạng bằng chỉ thị mà kết luận là đồng trội lẫn hay dị hợp tử. Đối với nhiều tính trạng QTL, quần thể F₂ hoặc BC rất khó phân biệt một cách chính xác giữa các cá thể khác nhau về kiểu gen và kiểu hình, do vậy cần phải tiến hành kiểm nghiệm lại con lai ở thế hệ F₃. Đối với quần thể RI và DH do mức độ đồng hợp tử của các gen là rất cao, đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc đánh giá lặp lại về tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình, đồng thời qua đó cũng có thể đánh giá được mối tương tác giữa kiểu gen với những điều kiện môi trường khác nhau. Chính vì thế 2 quần thể này được các nhà khoa học ứng dụng nhiều trong lập bản đồ gen liên kết.

a. Quy mô của quần thể và ảnh hưởng của tần số trao đổi chéo đến độ chính xác trong việc lập bản đồ liên kết giữa chỉ thị DNA với QTL

Quần thể nghiên cứu đánh giá càng lớn thì càng đảm bảo độ chính xác, tuy nhiên khi quan sát quần thể lớn thường kèm với chi phí thí nghiệm tăng. Vấn đề cần phải xác định

quần thể đủ lớn vừa đảm bảo được độ chính xác cao lại vừa giảm thấp nhất chi phí. Khi xác định một chỉ thị DNA liên kết với QTL thì cần thiết phải nghiên cứu trong quần thể có nhiều cá thể có chứa alen trao đổi chéo. Về phương diện này quần thể BC và DH lại có ít cá thể chứa alen trao đổi chéo thấp nhất, còn quần thể F2 thì lại có tần số trao đổi chéo cao nhất. Quần thể F3 và RI tùy theo số đời và trạng thái đồng hợp tử mà tần số trao đổi chéo cũng giảm dần qua các thế hệ.

b. Phương pháp xác định khả năng liên kết giữa chỉ thị DNA với QTL

Tương tự như tính trạng đơn gen, có rất nhiều các chỉ thị được dùng để xác định khả năng liên kết với QTL, chính xác hơn là liệu có liên kết với một hoặc vài gen quy định tính trạng QTL. Các chỉ thị này phải liên kết chặt và ổn định với QTL hoặc nằm kề cạnh với QTL và có tần số trao đổi chéo thấp, để sau này có thể ứng dụng trong các chương trình chọn tạo giống.

Cơ sở di truyền của phương pháp này như sau: giả sử chúng ta tiến hành lai giữa 2 giống khác nhau về cặp tính trạng QTL tương phản là T1T1 và t1t1. Dùng chỉ thị phân tử DNA điều tra 2 giống bố mẹ trên cho thấy giống T1T1 cho biểu hiện chỉ thị phân tử dạng M1M1, còn bố kia giống t1t1 cho biểu hiện chỉ thị phân tử dạng m1m1. Giả sử M1M1 liên kết với T1T1 và m1m1 liên kết với t1t1, công thức lai có thể được viết như sau: M1M1T1T1 X m1m1t1t1. Trong đó M1 và m1 là cặp alen của locus chỉ thị 1, còn T1 và t1 là cặp alen của một gen đóng góp quy định tính trạng QTL. Ở quần thể tổ hợp F2 của tổ hợp lai này, các đồng hợp tử của bố và mẹ sẽ được phục hồi với tần suất là $0,5(1-r)^2$, trong đó r là tần số trao đổi chéo.

- Nếu $r = 0$ khi locus chỉ thị M1 và tính trạng QTL T1 liên kết hoàn toàn với nhau thì sẽ không có tái tổ hợp ở quần thể F2 mà chỉ có 3 nhóm cá thể với tần suất như sau: 0,25 M1M1T1T1 : 0,5 M1m1T1t1 : 0,25 m1m1t1t1

- Nếu $r = 0,5$ có nghĩa là 2 alen, chỉ thị phân tử M1,m1 và tính trạng QTL T1,t1 không liên kết tự do tổ hợp với nhau.

Cách đơn giản nhất xác định alen chỉ thị với alen tính trạng QTL có liên kết với nhau hay không trong quần thể F2 là so sánh 2 trị số trung bình tính trạng QTL của 2 nhóm biểu hiện chỉ thị đồng hợp tử. Nếu hiệu số này có ý nghĩa thì kết luận chỉ thị phân tử ấy có liên kết với QTL. Các bước tiến hành như sau: Giả sử giống T1T1 có giá trị kiểu hình là a, cây F1 có trị số là d còn giống bố kia là -a. Khi đó giá trị trung bình tính trạng QTL của các cây có kiểu gen sau đây trong quần thể F2 sẽ là: M1M1 = $\{a(1-2r) + 2r(1-r)d\}$; M1m1 = $\{d(1-2r) + 2r^2\}$; m1m1 = $\{-a(1-2r) + 2r(1-r)d\}$. Hiệu số M1M1 - m1m1 = $2a(1-2r)$, hiệu số này phụ thuộc vào 2 biến số là r và a, nếu $r = 0,5$ (trường hợp không liên kết) thì hiệu số trên sẽ bằng 0. Nếu $r = 0$ liên kết hoàn toàn thì hiệu số bằng cực đại là 2a. Như chúng ta đã biết tính trạng số lượng do nhiều gen điều khiển, các gen nay có thể nằm trên cùng một vài nhiễm sắc thể khác nhau, có trường hợp một locus QTL chứa chỉ thị ở một thời điểm tức thời nào đó, hoặc tất cả các locus quy định QTL chứa chỉ thị phân tử ở một lần nào đó thôi. Do vậy để ước đoán chính xác tác động của mỗi locus alen tính trạng QTL, trong trạng thái điều hoà với những locus khác, chúng ta cần tiến hành điều tra trên nhiều dạng quần thể: ở quần thể F2 cần điều tra cả những con lai giữa các dòng đồng hợp tử F2, các cá thể F2, các con lai tự phối từ cây F2, con lai cận giao tái tổ hợp RI, các cá thể BC1.

Có thể có hàng loạt các chỉ thị cùng liên kết với một QTL được phát hiện, như vậy các chỉ thị này chắc phải cùng nằm trên một nhiễm sắc thể, tuy nhiên điều đó vẫn chưa đủ để định vị một cách chính xác cả một tính trạng QTL. Phương pháp xác định liên kết giữa chỉ thị và tính trạng QTL đang được ứng dụng trong chọn lọc gián tiếp tính trạng QTL, tuy nhiên độ lặp lại của phương pháp ở các tổ hợp lai khác và trong điều kiện môi trường khác nhau cũng như cần tham khảo kết quả số liệu nghiên cứu từ nhiều chỉ thị khác nhau sẽ làm tăng độ chính xác khi ước đoán tổ hợp liên kết giữa QTL và chỉ thị. Trong trường hợp liên kết này lỏng lẻo thì khi lai ngẫu nhiên có thể sẽ làm mất mối liên kết này.

Tóm lại việc ứng dụng chỉ thị phân tử DNA chọn lọc gián tiếp tính trạng số lượng QTL tùy thuộc vào mức độ liên kết chặt chẽ của chỉ thị. Trong trường hợp số gen quy định QTL ít, mỗi chúng có tác động rất lớn lên kiểu hình thì chọn lọc chỉ thị phân tử sẽ có hiệu quả và chính xác hơn.

III. Sử dụng chỉ thị DNA liên kết gen kháng bệnh, sâu

1. Yêu cầu khi áp dụng

Muốn áp dụng trước hết phải biết:

- Có bao nhiêu typ hay chủng đang tồn tại, chủng nào chính chủng nào phụ ở mỗi nước, vùng sinh thái và trên thế giới, chủng nào gây độc mạnh, gây độc nhẹ.
- Có bao nhiêu gen kháng đã được phát hiện, gen nào trội, lặn. Gen nào kháng hữu hiệu với chủng nào và với bao nhiêu chủng, để xác định gen cần quan tâm.
- Phải biết phương pháp nuôi cấy vi sinh vật gây bệnh và sâu, cách và tiêu chuẩn đánh giá khả năng kháng nhiễm.
- Tìm hiểu bản đồ liên kết giữa các gen, và các bài báo công bố nghiên cứu về chỉ thị DNA liên kết đối với gen quan tâm.
- Lựa chọn chỉ thị có thể ứng dụng và cho hiệu quả chọn lọc cao.
- Nắm chắc cách thức tiến hành áp dụng chỉ thị để tìm và chọn lọc gen.
- Kiểm tra lại kết quả bằng đánh giá lại kiểu hình, xác định độ liên kết thực giữa chỉ thị và gen quan tâm.

2. Ứng dụng chỉ thị DNA xác định gen kháng bệnh bạc lá lúa

a. Đặc điểm bệnh bạc lá

- Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra là một trong những bệnh gây hại nghiêm trọng đối với lúa, đặc biệt đối với vùng thâm canh và vụ mùa ở miền Bắc VN.
- Kí sinh gây bệnh hiện đang tồn tại rất nhiều nòi sinh lý khác nhau tùy theo mỗi nước và mỗi vùng trồng lúa, các chủng này biểu hiện ở mức độ gây nhiễm khác nhau cho mỗi giống. ở Philippin người ta đã phát hiện thấy hiện đang tồn tại 6 nòi, Nhật bản có 12 chủng, Ấn độ có 9 chủng còn ở Miền Bắc Việt Nam theo Phan Hữu Tôn và cộng sự (2002) thì tạm thời phân thành 10 nhóm chủng khác nhau.
- Đã phát hiện trên 30 gen kháng bệnh trội lặn khác nhau. Mỗi gen đã xác định kháng được một số chủng nhất định. Đã xác định có 4 gen kháng hữu hiệu với nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh miền Bắc VN là Xa4, xa5, Xa7 và Xa21. Đã có dòng đẳng gen chứa các gen kháng bệnh bạc lá khác nhau.

- Thường thì mỗi một chủng có phản ứng gây hại đối với một số giống nhất định và mỗi một giống lại có những gen chống chịu bệnh khác nhau, theo thuyết gen chống gen giữa kí sinh với kí chủ.
- Các gen đã được định vị trên từng nhiễm sắc thể và nhiều chỉ thị phân tử liên kết với từng gen cũng đã được xác định.
- Phương pháp đánh giá nhân tạo khả năng kháng bệnh của từng giống và gen kháng bằng lây nhiễm qua cắt đầu lá.
- Ứng dụng trong chọn tạo giống kháng bệnh bền vững.

b. Nghiên cứu chỉ thị DNA liên kết gen kháng bệnh mới

Để nghiên cứu một RAPD hay một RFLP nào đó có liên kết với gen mới lặn kháng bệnh này hay không thì cần thiết phải tiến hành theo các bước như sau:

Chuẩn bị vật liệu cây nghiên cứu

Gồm 2 nguồn:

- Tạo dòng đẳng gen cho gen mới chống chịu, gen này có nguồn gốc từ một giống hạt dài có tên là Acc.35023. Bố hoặc mẹ dùng làm cây hồi quy, bị nhiễm bệnh trong trường hợp này là giống IR24. Dòng gần đẳng gen được tạo ra bằng cách lai lại liên tục 5 lần giữa cây lai IR24/Acc.35023 với giống IR24 sau đó cho tự thụ liên tiếp 5 đời nữa.
- Và 132 cây F2 được tạo ra bằng cách lai giữa cây dòng đẳng gen chứa gen lặn chống chịu với giống IR24.

Nghiên cứu phản ứng của các cây vật liệu với bệnh bạc lá

Bố mẹ và quần thể F2 được trồng trong ô xi măng. Đến giai đoạn đẻ nhánh tối đa, các cây này được lây nhiễm với chủng số 6 (PX099) bệnh *Xanthomonas oryzae* theo phương pháp dập ghim lá. Phản ứng của cây đối với bệnh được đánh giá sau khi lây nhiễm 14 ngày trên cơ sở quan sát % diện tích vết bệnh trên lá rồi phân ra nhóm cây chống bệnh (R) và cây mẫn cảm bệnh (S).

Chiết xuất DNA, phân giải enzyme, điện di và lai DNA

Người ta dùng lá lúa tươi đựng trong tủ lạnh để chiết xuất DNA theo phương pháp Dellaporta và cộng sự (1983). DNA tổng số của các giống IR24, giống IRBB13, giống Acc. 35023 và của hỗn hợp các cây chống chịu và mẫn cảm với bệnh đời F2 được phân cắt bằng 12 enzym cắt hạn chế là: BamHI, BglII, DraI, EcoRV, HindIII, PstI, SalI, SacI, ScaI, XbaI và XhoI). Hai hỗn hợp DNA của nhóm cây chống và nhiễm bệnh được lấy từ 10 cây mỗi nhóm từ quần thể F2 được tạo ra ở trên. Để thanh lọc con cháu F2 đồng hợp tử chống và nhiễm người ta chỉ sử dụng những enzyme trong số 12 enzyme trên, enzyme nào cho kết quả phân biệt được sự sai khác giữa 2 kiểu gen rõ nét. Điện di và lai DNA được tiến hành theo phương pháp của Sambrook và cộng sự năm (1989).

Phương pháp phân tích RAPD

Người ta đã sử dụng 260 đoạn mồi đơn, chiều dài 10 nucleotit để nhân ngẫu nhiên những đoạn đa hình DNA của bố, mẹ, của hỗn hợp các cây chống bệnh và mẫn cảm bệnh theo phương pháp của Williams và cộng sự (1990), và của Martin và cộng sự (1991). Vết băng DNA nhân lên nào phân biệt được sự đa hình thì được tách cắt ra khỏi gel, tinh lọc và đánh dấu phóng xạ, sử dụng phương pháp đánh dấu phóng xạ ngẫu nhiên

của Feinberg và Vogelstein (1983). Liên kết giữa RAPD chỉ thị với gen chống bệnh mới đã được phát hiện nhờ sử dụng vệt băng DNA đặc thù làm mẫu dò để điều tra 132 cây F2. Kết quả cho thấy RAPD chỉ thị được xác định nằm trên một nhiễm sắc thể giống như các nhà khoa học viện lúa IRRI đã xác định.

Phân tích mối liên kết giữa locus gen với RFLP đánh dấu

Để phân tích người ta đã dùng 10 đoạn RFLP nằm gần với đoạn RAPD được chọn để điều tra, đánh giá các giống IRBB13, Long grain, IR24, hỗn hợp các cây F2 chống chịu đồng hợp tử, và hỗn hợp các cây F2 mẫn cảm đồng hợp tử. Những RFLP nào phân biệt được sự sai khác giữa nhóm chống bệnh và mẫn cảm với bệnh sẽ được sử dụng để nghiên cứu khả năng liên kết của nó với gen mới trên cơ sở phân tích 132 cây của quần thể F2.

Phân tích mối liên kết của RAPD với gen nghiên cứu

Phân tích RAPD được dùng ngay từ khi tiến hành lập bản đồ gen mới. Người ta đã sử dụng 260 đoạn mồi ngẫu nhiên, thì thấy đoạn mồi AC5 nhận được đoạn DNA phân biệt được sự sai khác giữa cây chống bệnh bạc lá gồm: Bố mẹ chống bệnh, cây cho gen chống bệnh và hỗn hợp các cây F2 chống bệnh, với cây mẫn cảm bệnh gồm: Bố mẹ mẫn cảm bệnh, và hỗn hợp DNA của các cây F2 mẫn cảm bệnh. Kết quả phát hiện thấy một đoạn DNA được nhận lên khi dùng đoạn mồi AC5 dài 0,9 kb, đặc trưng cho cây bị bệnh, mặc dầu có một vệt mờ tương tự khác cũng được nhận lên ở hỗn hợp DNA của các cây chống bệnh F2 nhưng vệt này lại không xuất hiện ở bố mẹ chống bệnh và cây cho gen chống bệnh. Thêm vào đó khi lấy DNA từ mỗi hỗn hợp 10 cây chống bệnh và nhiễm bệnh F2 làm nguyên bản để nhận DNA dùng đoạn mồi AC5 thì thấy vệt băng 0,9 kb chỉ có ở tất cả các cây mẫn cảm. Để khẳng định sự liên kết giữa locus gen mới với RAPD dùng AC5-900, vệt băng 0,9 Kb được tách khỏi gel và dùng làm mẫu dò để lai với DNA genome được cắt bằng 9 enzyme cắt hạn chế. Những đoạn DNA phân biệt được sự sai khác giữa giống mẫn cảm IR24 với cây chống bệnh gồm IRBB13, Long grain và hỗn hợp DNA cây kháng bệnh F2. Hỗn hợp cây F2 mẫn cảm bệnh có xuất hiện 2 vạch băng trên vì có chứa một số cây dị hợp tử. Dùng đoạn ADN của AC5-900 làm probe để nghiên cứu mức độ liên kết trên cơ sở dùng 132 cây F2, kết quả cho thấy tần số trao đổi chéo giữa chúng là 5,3 cM.

Nghiên cứu vị trí chỉ thị RAPD trên bản đồ RFLP

Sau khi điều tra sự sai khác giữa hai bố mẹ, người ta dùng đoạn DNA AC5-900 làm probe để lai với các đoạn DNA của quần thể đang được sử dụng để lập bản đồ RFLP của IRRI, enzyme cắt hạn chế là enzyme ScaI. Kiểu gen nào nếu có đoạn DNA lai với probe trên thì được đánh dấu và cho điểm, sau đó tính toán mức độ liên kết giữa AC5-900 với từng RFLP một. Kết quả chứng tỏ rằng AC5-900 nằm ở giữa RFLP: RZ66 và CDO99 trên nhiễm sắc thể số 8.

Xác định mức liên kết giữa gen quan tâm với những RFLP gần nhất nó

Dùng 10 chỉ thị RFLP nằm xung quanh locus AC5-900 được chọn để lai với DNA của giống IRBB13, giống Long grain, IR24, hỗn hợp cây F2 chống bệnh và hỗn hợp cây F2 mẫn cảm bệnh. Bằng việc sử dụng 12 enzyme cắt hạn chế, đã tìm thấy 2 đoạn DNA của RFLP là: RZ28 và CDO116, khi xử lý XhoI, phân biệt được sự sai khác giữa những dòng

chống bệnh và dòng nhiễm bệnh. Còn RG136 chỉ phân biệt được sự khác nhau nếu xử lý DNA bằng BgIII, EcoRI, SacI, XbaI, XhoI và DraI. 7 chỉ thị RFLP khác là: RZ926, CDO565, RZ66, RZ549, RZ572, CDO99 và RZ997 chỉ biểu hiện đơn hình. Những chỉ thị RFLP nào biểu hiện được sự sai khác giữa cây chống và cây mẫn sẽ được dùng để điều tra quần thể gồm 132 cây F2. Không tìm thấy một cá thể nào có xảy ra tái tổ hợp giữa RZ28 và CDO116. Khoảng cách liên kết giữa RFLP, RZ28 và CDO116 và gen mới dự đoán dài 5,1 cM. RG136 nằm ở phía đối diện với gen mới với khoảng cách dài khoảng 3,8 cM.

3. Sử dụng chỉ thị phân tử DNA chọn tạo giống kháng bệnh đạo ôn lúa

- Bệnh đạo ôn do nấm *pyricularia oryzae* gây ra, hiện đã phát hiện có khoảng 256 chủng nấm khác nhau đang tồn tại ở các vùng trồng lúa khác nhau trên thế giới.
- Mỗi vùng có những chủng phổ biến và đặc hữu khác nhau.
- Gen kháng bệnh hiện đã phát hiện có khoảng trên 30 locus gen cả trội và lặn đều có khả năng kháng bệnh. Mỗi gen kháng được mạnh yếu với các chủng nấm khác nhau. Đã có giống chỉ thị kháng đạo ôn.
- Các gen đã được định vị trên từng nhiễm sắc thể và đã được xác định nhóm liên kết với nhiều gen tính trạng khác.
- Nhiều gen đã xác định nhiều chỉ thị phân tử liên kết với từng gen và phương pháp tiến hành.
- Đã xác định được phương pháp lây nhiễm bằng phun bào tử lên nương mạ. Xác định chủng nấm bằng phương pháp nuôi đơn bào tử.
- Phương pháp xác định và đánh giá nhân tạo khả năng kháng bệnh đạo ôn.
- Ứng dụng trong chọn tạo giống kháng bệnh đã tiến hành và thu được nhiều kết quả ở cả trong và ngoài nước.

4. Sử dụng chỉ thị DNA chọn tạo giống kháng sâu (rầy nâu lúa)

- Rầy nâu và tác hại
- Các biotype rầy nâu, rầy nâu nhỏ, rầy xanh đuôi đen, rầy lưng trắng và phân bố của.
- Gen kháng rầy nâu và các loại rầy khác và có giống chỉ thị kháng rầy nâu.
- Phương pháp xác định và đánh giá nhân tạo tính kháng rầy nâu
- Chỉ thị phân tử
- Ứng dụng chọn tạo giống

5. Sử dụng chỉ thị DNA chọn tạo giống kháng virus (xoăn vàng lá cà chua)

- Bệnh xoăn vàng lá và nguyên nhân gây bệnh và tác hại.
- Chủng virus và gen kháng virus và gen kháng bộ phận vector.
- Xác định và đánh giá nhân tạo tính kháng virus và vector truyền bệnh
- Chỉ thị phân tử
- Ứng dụng chọn tạo giống, chú ý kết hợp với các tính trạng khác và liên kết gen.

IV. Sử dụng chỉ thị DNA xác định gen chống chịu hạn và mặn

- Tác hại của hạn, cây sinh trưởng kém, phân cành đẻ nhánh kém, lá héo khô, hạt bị lép lửng nhiều, tỷ lệ đậu hoa quả thấp, nếu hạn nặng và lâu cây có thể bị chết.

- Các dạng hạn, hạn đất, hạn không khí và hạn sinh lý có nước nhưng cây không hút được nước.
- Biểu hiện chống hạn, lá dày, ít khí khổng, điều khiển đóng mở khí khổng hợp lý, trong điều kiện hạn cây vẫn sinh trưởng tốt, đẻ nhánh tốt, rễ to ăn sâu và lan rộng, rễ bên nhiều, áp suất thẩm thấu cao để hút nước, đối với lúa bông trổ thoát, lá cuộn lại đối với ngô, tỷ lệ hạt chắc cao đối với lúa hoặc khả năng hồi phục sau hạn tốt hay hiệu suất sử dụng nước cao.
- Tác hại của mặn, bị mặn cây tích lũy nhiều Na^+ và Cl^- làm phá vỡ và cản trở sinh lý của tế bào làm cây sinh trưởng yếu vàng úa, chiều cao cây bị thấp hẳn, rễ thối đen, đẻ nhánh và phân cành yếu, tỷ lệ hạt lép nhiều.
- Cây chống mặn biểu hiện sinh trưởng phát triển bình thường hoặc ít giảm trong điều kiện bị mặn, tích lũy ít ion Na^+ trong lá.
- Cơ chế sinh lý của tính chống hạn và mặn khá giống nhau, đó là khả năng duy trì hoạt động sinh lý bình thường trong điều kiện thiếu nước.
- Tính trạng chống hạn và mặn đều là tính trạng số lượng do đa gen kiểm soát, khi lập bản đồ QTL cần phân tách thành các tính trạng thành phần để lai và tạo lập quần thể lập bản đồ liên kết.
- Muốn đánh giá chính xác kiểu hình thì việc xác định được và sử dụng phương pháp đánh giá đúng đóng vai trò quyết định.
- Hiện đã có rất nhiều chỉ thị phân tử được xác định có liên kết với tính trạng chống hạn và mặn, nhiều gen dự tuyển chống hạn ở cây này có thể cũng tồn tại ở cây khác gần gũi nhau.
- Các gen hoạt động tương tác hỗ trợ và ảnh hưởng lẫn nhau.

V. Sử dụng chỉ thị DNA trong chọn tạo lúa lai

1. Sử dụng chỉ thị phân tử DNA xác định gen tự bất hợp

- Khái niệm về tính tự bất hợp và hiện tượng tự bất hợp.
- Tính tự bất hợp giao tử thể và bào tử thể, các gen và dãy alen tự bất hợp.
- Xác định và đánh giá kiểu hình tính tự bất hợp.
- Các chỉ thị liên kết gen tự bất hợp.
- Ứng dụng tính tự bất hợp, tạo quả không hạt, ngăn cản tự thụ phấn, sản xuất hạt lai không cần khử đực trên cây mẹ.
- Hiện có rất nhiều chỉ thị phân tử có liên quan đến gen và từng alen tự bất hợp.

2. Sử dụng chỉ thị phân tử DNA xác định gen tương hợp rộng lúa

- Hiện tượng khi lai giữa các giống lúa thuộc loài phụ indica với Japonica thì con lai F1 cho ưu thế lai về các tính trạng sinh trưởng phát triển rất cao nhưng lại bất dục rất mạnh, hạt lép nhiều.
- Kiểm soát hiện tượng này do gen quy định, giống lúa indica thường chứa gen S^i còn những giống lúa Japonica thường chứa gen S^j . Con lai F1 nào có chứa $S^i S^j$ sẽ bất dục.
- Tuy nhiên có một số giống thuộc cả loài indica và Japonica lại chứa gen S^n hoặc WC, gen tương hợp rộng. Giống nào chứa gen này lai với bất kỳ loài phụ indica hay japonica đều cho con lai hữu thụ.

- Chỉ thị DNA liên kết gen tương hợp rộng
- Tìm và sử dụng gen này trong việc tạo ra lúa lai giữa 2 loài phụ cho ưu thế lai cao đang là một trong những su hướng chọn tạo giống lúa lai hiện nay.
- Hiện người ta đã xác định được một số chỉ thị liên kết gen và sử dụng chúng trong công tác chọn tạo giống lúa lai phân tử.

3. Sử dụng chỉ thị phân tử DNA xác định gen CMS, gen duy trì và phục hồi

a. Khái niệm và cơ chế di truyền

- Có nhiều dạng CMS được phát hiện ở nhiều loài thực vật. Ở lúa, hiện đã phát hiện có 35 dạng, chúng khác nhau về mức và kiểu bất dục hạt phấn, trong đó CMS-WA được sử dụng rộng rãi nhất trong sản xuất hạt lai F1 trong lúa lai 3 dòng. Cơ chế di truyền tính bất dục được gây lên là do mối tương tác giữa các gen gây bất dục nằm trong tế bào chất (ty thể, ký hiệu S, tế bào chất bình thường ký hiệu là N) với gen duy trì tính bất dục nằm trong nhân gây lên (*rf*). Kiểu gen cho hạt phấn bình thường NRfRf, NRfrf, Nrfrf, SRfRf, SRfrf, cây cho hạt phấn bất dục: Srfrf. Có thể phát hiện được khả năng chứa từng gen trong tập đoàn các giống bằng lai phân tích và chỉ thị phân tử.
- Kết quả làm tổn hại đến một số khâu trong quá trình hình thành hạt phấn hữu dục bình thường, trong khi đó sự phát triển của nhụy và giao tử cái của cùng cây này vẫn bình thường.
- Mỗi dạng CMS có gen CMS và số gen duy trì hay phục hồi riêng, có thể do một hoặc 2 gen quy định
- TGMS, PGMS là kiểu bất dục dục mẫn cảm với điều kiện môi trường (nhiệt độ TGMS, quang chu kỳ là PGMS. Dạng bất dục này do gen lặn trong nhân điều khiển và cũng có nhiều gen kiểm soát khác nhau, thí dụ ở lúa đã xác định có 6 gen *tms* điều khiển TGMS, trong đó *tms2* được dùng phổ biến nhất
- Khái niệm về nhiệt độ ngưỡng khoảng, tối cao và tối thấp của cây cách xác định, giai đoạn mẫn cảm, nhiệt độ bất và hữu dục.
- Khái niệm về hệ thống lúa lai 2, 3 dòng, dòng A, B và R.

b. Các chỉ thị DNA xác định gen CMS, gen duy trì và phục hồi

- Đã xác định có nhiều chỉ thị phân tử liên kết với mỗi gen gây bất dục, duy trì hay phục hồi nhất định, vị trí trên nhiễm sắc thể.
- Khi sử dụng chúng cần kiểm chứng đối với từng gen trường hợp cụ thể, không có một chỉ thị nào chung cho nhiều gen.

4. Sử dụng chỉ thị DNA chọn lọc gen EGMS lúa

- Khái niệm và hiện tượng TGMS, PGMS
- Cách đánh giá TGMS, PGMS
- Gen điều khiển
- Ứng dụng chọn tạo giống

5. Sử dụng chỉ thị phân tử xác định con lai F1

- Con lai F1 và đặc điểm
- Di truyền con lai F1

- Phân tích chỉ thị DNA xác định con lai F1
- Phân tích độ đồng nhất và độ thuần bằng chỉ thị phân tử

6. Sử dụng chỉ thị DNA xác định độ thuần của giống trong sản xuất hạt siêu nguyên chủng.

IV. Sử dụng chỉ thị phân tử DNA xác định gen chất lượng cao

1. Chỉ tiêu chất lượng nông sản

- Mỗi cây trồng có một yêu cầu về chỉ tiêu chất lượng nhất định.
- Chỉ tiêu chất lượng cũng là những tính trạng do gen điều khiển, đã xác định được định vị trên các nhiễm sắc thể.
- Hiện đã xác định chỉ thị phân tử liên kết với các gen quy định tính trạng này.
- Đối với lúa gen mùi thơm sinh ra 2-AP, gen waxy và hàm lượng amylose trung bình đã được xác định chỉ thị.
- Thành phần và hàm lượng các chất như đường, lipid, alkaloid ... tạo thành chất lượng thu hoạch cũng do các gen điều khiển, từng tính trạng đó cũng có thể hoặc đã được xác định chỉ thị phân tử liên kết gen.

2. Chỉ thị phân tử xác định mùi thơm ở lúa

- Mùi thơm, các loại và cơ sở hóa sinh sinh mùi thơm ở lúa.
- Phương pháp đánh giá mùi thơm.
- Đặc điểm di truyền tính trạng mùi thơm ở lúa, các gen quy định các chất mùi thơm.
- Các chỉ thị phân tử liên kết gen mùi thơm.
- Hướng sử dụng chỉ thị trong chọn tạo giống lúa thơm.

V. Sử dụng chỉ thị phân tử trong phép lai lại

1. Khái niệm và mục đích lai lại

- Lai lại là phương pháp lấy con lai các đời lai lại liên tục với một bố hoặc mẹ nhằm tích lũy thu được giống có nhiều gen tính trạng tốt của dạng đem lai lại vào giống con lai.
- Nhằm bổ sung một vài gen tính trạng tốt vào một giống tốt nhưng thiếu những tính trạng đó.
- Tạo con lai có nhân của giống này còn tế bào chất của giống kia trong tạo dòng CMS mới.

2. Cơ sở khoa học và các tiến hành

- Mỗi giống có những gen và tính trạng đặc trưng.
- Các gen này khác nhau là do các đoạn DNA của các gen đó khác nhau hoặc sản phẩm protein (enzyme hay vật chất) của gen đó khác nhau.
- Dùng chỉ thị phân tử trước hết có thể phân biệt được sự khác nhau giữa các dòng giống tham gia vào lai lại.

- Nên chọn những chỉ thị liên kết với các gen khác nhau và trước hết tập trung vào các gen mục tiêu thì kết quả sẽ sớm thành công hơn.
- Dựa vào kết quả phân tích chỉ thị qua mỗi đời lai lại (BC) ta có thể biết được có bao nhiêu % DNA của dòng giống lai lại chuyển vào được con lai lại.
- Để xác định một cách chính xác thì cần phải sử dụng nhiều chỉ thị và yêu cầu các chỉ thị đó phải phủ được hầu khắp hết các vùng khác nhau của genome.

VI. Ứng dụng chỉ thị phân tử chọn tạo giống có phổ di truyền rộng

1. Phổ di truyền rộng và yêu cầu tạo giống

- Khái niệm phổ di truyền rộng, có chứa nhiều gen hoạt động và có nhiều tính trạng ưu việt và thích ứng rộng.
- Yêu cầu cần tạo giống có phổ di truyền rộng do đa dạng môi trường và điều kiện sinh thái, cần ổn định năng suất.
- Sản xuất hàng hóa cần ít loại giống để quản lý.

2. Phương pháp tiến hành

- Tìm kiếm các dạng bố mẹ có các tính trạng mục tiêu.
- Lai nhiều bậc tạo quần thể
- Sử dụng chỉ thị phân tử để chọn lọc

VII. Chỉ thị phân tử trong bảo quản nguồn gen

1. Xác định sự đa dạng của nguồn gen

- Sự đa dạng nguồn gen và tầm quan trọng.
- Sự cần thiết phải nghiên cứu đa dạng nguồn gen trong bảo tồn và sử dụng.
- Các mẫu giống có quan hệ nhau như thế nào.
- Quyết định nên bảo tồn mẫu giống nào và tại sao.
- Quá trình bảo tồn có làm thay đổi nguồn gen không.

2. Xác định quan hệ họ hàng

- Có ý nghĩa khi ghép cặp trong lai tạo giống, trong bảo tồn, trong ghép cặp giữ nguồn gen đối với những cây cần duy trì nguồn gen mở.
- Trong bảo tồn ex-situ cần cách ly tránh tạp giao gần.

3. Đánh giá các tính trạng

- Xây dựng giữ liệu cơ bản của từng mẫu giống để tiện sử dụng.
- Hóa học hóa các khâu đánh giá các tính trạng khó biểu hiện trên đồng ruộng.
- Xác định quyền sở hữu giá trị của các mẫu giống bảo tồn.
- Khuyến cáo và cung cấp cho các nhà chọn giống sử dụng vật liệu giống đúng.

4. Xác định nhiễm sắc thể và nguồn gốc nhiễm sắc thể từ bố mẹ lai xa

- Hiện nay ở nhiều loài sinh vật, mỗi nhiễm sắc thể đã được xác định có một chỉ thị DNA đặc trưng. Nên dựa vào đó ta có thể phân tích được con lai xa có mang từng nhiễm sắc thể của loài nào.
- Trong lai xa, con lai đời hậu thế có thể chứa nhiễm sắc thể của mỗi bố mẹ có khác nhau. Trên cơ sở sử dụng chỉ thị DNA đánh dấu cho mỗi nhiễm sắc thể chúng ta có thể biết được con lai thừa hưởng nhiễm sắc thể của loài bố mẹ nào

VIII. Chỉ thị phân tử trong khảo kiểm nghiệm giống cây trồng

1. Trong xác định tính đúng giống

- Trong định danh công nhận giống, xác định bản quyền tranh chấp giống và giá trị của giống.
- Xác định độ đúng giống, độ thuần và độ thuần nhất của hạt lai.
- Xác định hình thức nhân giống của giống như nhân vô tính, hay hữu tính, nhân bằng giao phối hay tự phối.
- Xác định là giống thuần hay giống lai, giống hỗn dòng.

2. Trong khảo nghiệm DUS(diference, utilization and stability)

- Xác định tính đúng giống, tính khác biệt so với các mẫu giống tương tự mà bằng khảo nghiệm trên đồng ruộng không phân biệt được.
- Xác định vùng phân bố giống trên cơ sở các tính trạng được đánh giá để kết luận.

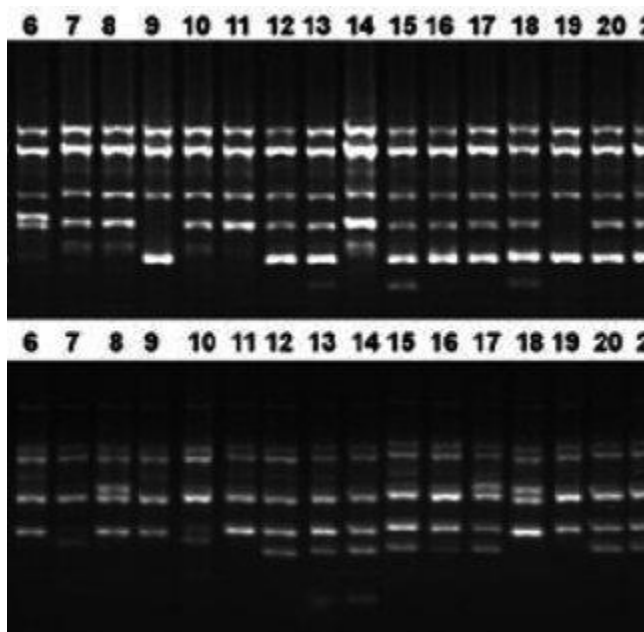
3. Trong xác định nguồn gốc giống

- Dựa vào sự giống và khác nhau về chỉ thị nào đó có thể biết các giống có cùng nguồn gốc bố mẹ hay không.
- Sự giống nhau hay khác nhau nhiều ít giữa các giống công nhận.
- Nhận diện một giống, mỗi giống có một chỉ thị riêng đặc thù mà có thể không mẫu giống nào có được.

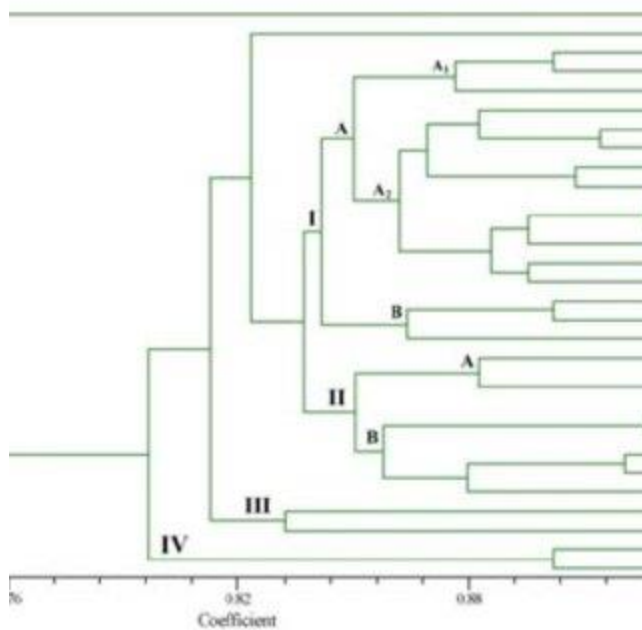
Primers	CN	SSR motif	Nucleotide sequence	AN	Size of bands (bp)	
RM 1	1	(AG)26	GCGAAAACACAATGCAAAAA (F) GCGTTGGTTGGACCTGAC (R)	18	78 – 170	
RM 3	6	(GA)2GG (GA)25	GGTTAGGCATCGTCACGG (F) TCACCTCACCACACGACACG (R)	11	73 – 175	
RM 5	1	(GA)14	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA (F) GCATCCGATCTTGATGGG (R)	16	80 – 167	
RM 6	2	(AG)16	GTCCCCTCCACCCAATTC (F) TCGTCTACTGTTGGCTGCAC (R)	8	160 – 225	
RM 7	3	(GA)19	TTCGCCATGAAGTCTCTCG (F) CCTCCCATCATTTTCGTTGTT (R)	5	165 – 190	
RM 11	7	(GA)17	TCTCCTCTTCCCCCGATC (F) ATAGCGGGCGAGGCTTAG (R)	6	145 – 210	
RM 13	5	(GA) 6- (GA)16	TCCAACATGGCAAGAGAGAG (F) GGTGGCATTTCGATTCCAG (R)	6	115 – 163	
RM 19	12	(ATC)10	CAAAAACAGAGCAGATGAC (F) CTCAAGATGGACGCCAAGA (R)	8	230 – 420	
RM 20	11	(ATT)14	ATCTTGTCCTGCAGGTCAT (F) GAAACAGAGGCACATTTTCATTG (R)	7	218 – 290	
RM 25	8	(GA)18	GGAAAGAATGATCTTTTCATGG (F) CTACCATCAAACCAATGTTC (R)	13	130 – 195	
RM 44	8	(GA)16	ACGGGCAATCCGAACAACC (F) TCGGGAAAACCTACCCTACC (R)	9	100 – 185	
RM 164	5	(GT)16T T (GT)4	TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC (F) GCAGCCCTAATGCTACAATTCTTC (R)	11	235 – 440	
RM 170	6	(CCT)7	TCGCGCTTCTTCCTCGTCGACG (F) CCCGCTTGCAGAGGAAGCAGCC (R)	14	95 – 210	
RM 189	9	(AG)11	GGGAGTTGAAGTGGTCGGAGAAGG (F) CACGCGACTTCAGTTCGTCTTCC (R)	6	290 – 480	
RM 206	11	(CT)21	CCCATGCGTTTAACTATTCT (F) CGTTCCATCGATCCGTATGG (R)	13	102 – 195	
RM 209	11	(GT)19	ATATGAGTTGCTGTCGTGCG (F)	10	100 – 250	

- I. The list of 20 SSR primers used in the estimation of genetic diversity of 30 rice cultivars. Variation of alleles number, allele size range, monomorphic and polymorphic bands and PIC values are shown.

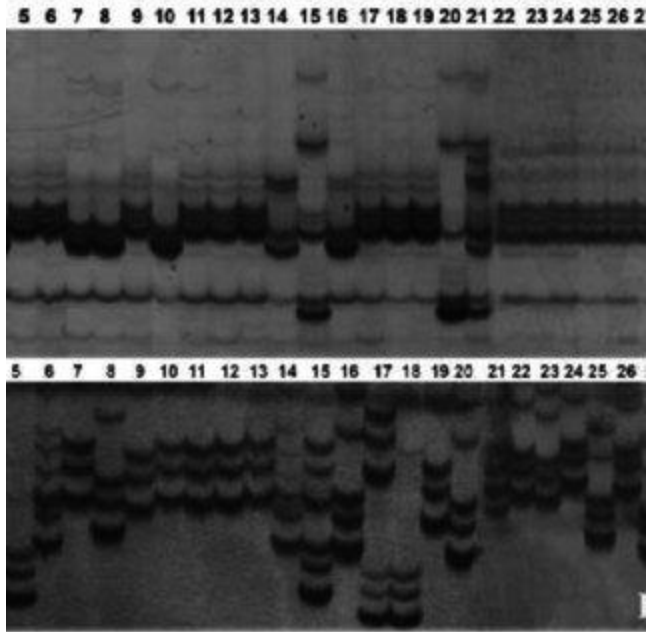
Source publication



4	SPR90	Thailand	RD21/IR4422-96-3-6-1/RD11/RD23	3.61	T
5	RD10	Thailand	Derived from RD1	3.73	T
6	Pathum Thani1	Thailand	BKNA6-18-3-2/PTT85061-26-3-2-1	4.50	MT
7	FL496	IRRI	IR29/Pokkai	4.57	MT
8	MATATAG2	IRRI	IR61009-37-2-1-2/IR1561/Ubi Merah/IR1561	4.66	MT
9	RD15	Thailand	Derived from KDM1105	4.68	MT
10	FL530	IRRI	IR29/Pokkai	4.95	MT
11	IR64	IRRI	IR5657-33-2-1/IR2061-465-1-5-5	5.02	MT
12	Leuang Anan	Thailand	Thai local	5.13	MT
13	Leuang Tahmo	Thailand	Thai local	5.17	MT
14	RD25	Thailand	KDM1105/IR2061-213-2-3-3/KDM1105/IR26	5.19	MT
15	Sew Mae Jun	Thailand	Improved	5.22	MT
16	Haem Om	Thailand	Thai local	5.61	MS
17	RD33	Thailand	KDM1105/IR70177-76-3-1	5.83	MS
18	Surin1	Thailand	IR61076/IR46329-SRN-18-2-2-2	5.95	MS
19	KDM1105	Thailand	Improved	5.97	MS
20	Haem Nang Nuan	Thailand	Thai local	6.03	MS
21	Daw Haem	Thailand	Thai local	6.11	MS
22	Khao Med Luek	Thailand	Thai local	6.13	MS
23	RD6	Thailand	Derived from KDM1105	6.50	MS
24	KHSPR	Thailand	SPR84177-8-2-2-2/SPR85091-13-1-1-4/KDM1105	6.61	MS
25	Pathum Thani60	Thailand	DML702/Chinese345	7.00	S
26	IR29	IRRI	R533-6-2-1-1/IR1561-149-1/IR244/O Nilava	8.00	S
27	PSBRc 86	IRRI	IR10198-66-2/TCCP266-8-8-8-10-3-1	8.03	S



	SS
	3.44 ^a
	4.91 ^b
-24)	6.08 ^c
	7.80 ^d
	8.88 ^e
	*



[Genetic diversity analysis of rice cultivars \(*Oryza sativa* L.\) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers](#)

- Nov 2011

•

Nantawan Kanawapee

•

Jirawat Sanitchon

•

Pranee Srihaban

•

Piyada Theerakulpisut

Thirty rice cultivars were evaluated for salinity tolerance during the seedling stage and were divided into five tolerance groups including tolerant (T), moderately tolerant (MT), moderately susceptible (MS), susceptible (S) and highly susceptible (HS) which comprised 5, 10, 9, 4 and 2 cultivars respectively. Genetic diversity of all rice cultivars...

[View](#)

Citations

... The lowest amplicon size belonged to RM10825 (90 bp) and the highest amplicon size belonged to RM10772 and AP3206 (490 bp). These values were comparable to those reported earlier (Kanawapee et al., 2011). Polymorphic Information Content (PIC) values ranged from 0.03 to 0.62 with an average of 0.37. The polymorphic banding pattern with SSR markers tightly linked to Saltol locus (RM10745, RM493, RM3412b, RM1287, and RM140) are presented in Fig. 1, Fig. 2 and Fig. 3 respectively. ...

[Genetic analysis of salt tolerant rice varieties of Kerala through molecular characterization using SSR markers](#)

- Jun 2019
-

Deepa John

[View](#)

... In our experiment, the 1.6 mM MgCl₂ was ideal to amplify the rice DNA. For RAPD optimization in rice (Kanawapee et al., 2011) also used near about similar concentration of MgCl₂. ...

[Mutation determination of rice by using RAPD primers](#)

- Jun 2019
- [Md Saikat](#)
-

Hossain Bhuiyan

- [M A Malek](#)
- [Sariful Haque Bhuiyan](#)
- [Affrida Abu Bt](#)

PCR is a powerful tool for the amplification of genetic sequences but sometimes, even though using an established PCR protocol that had been optimized and successful for the amplification of a particular DNA segment, use of that same protocol on a different region can result in a less than desirable outcome. Therefore, an experiment was conducted at Molecular biology laboratory of Malaysian Nuclear Agency during December 2016 to January 2017 used seeds of 6 indica rice cultivars. To conduct RAPD experiments for the rice species it was established the following reaction conditions for the final volume of 20 µl where 0.1 unit of Taq DNA polymerase, 0.4 µl of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1 µl primer and 2.0 µl of DNA template. From this experiment, it is clear that after mutation the parent MR219 performed some genetic modification and produce genetically different variety namely NMR151, NMR152, ML3, ML10 and ML30. These mutant varieties have two different groups based on their mutation source and it is clear enough from their RAPD profile.

[View](#)

... These results were similar to Petroudi et al. (2010) where wide similarity values ranged from 0.47 to 0.95 with an average similarity index of 0.75. The results of similarity index among and within rice subspecies were in agreement with Chakravarthi and Naravaneni (2006) and Ramadan et al. (2015) who reported low similarity coefficient between japonica type and indica type genotypes, and Kanawapee et al. (2011) who reported relatively high level of similarity between closely related genotypes. Clustering genotypes in the constructed dendrogram was largely dependent on their genetic background. ... [Fingerprinting of some Egyptian rice genotypes using Intron-exon Splice Junctions \(ISJ\) markers](#)

- May 2019
-

[Galal Anis](#)

DNA fingerprinting has become an important tool for diversity assessment and varietal identification in plant breeding programs. Semi-random PCR primers targeting intron-exon splice junctions (ISJ) were used to evaluate the potential of these markers in identification and classification of rice genotypes. A total of 12 ISJ primers were used for screening fourteen Egyptian rice genotypes, including six Japonica, four Indica and four Indica/Japonica rice genotypes. A total of 117 amplified fragments were generated among which 76 fragments were polymorphic revealing average polymorphic ratio of 58.9%. Number of amplified fragments per genotype across the primers ranged from 65 in Japonica rice variety Sakha101 to 85 in Indica/Japonica rice variety Giza179. Number of polymorphic amplified fragments ranged from 3 for primer ISJ-1 to 24 for primer

ISJ-2. The average numbers of amplified bands per primer per genotype were 16.71 and 10.24, respectively. Polymorphic information content (PIC) values ranged from 0.289 for ISJ-9 to 0.480 for ISJ-1 with an average of 0.375. The coefficient of similarities based on semi-random data among the studied genotypes ranged from 0.53 to 0.9 with an average of 0.66. All genotypes clearly grouped into two major clusters in the dendrogram at 58% similarity based on Jaccard's similarity index. The first cluster represents the Indica and Indica/Japonica rice genotypes, while the second cluster represents the Japonica genotypes. These results indicate that fingerprinting using semi-specific DNA markers may be an efficient tool for varietal identification and assessing genetic diversity in rice. The results highlight the existing diversity among the studied genotypes and hence their potential use in breeding programs. The simplicity and reproducibility of ISJ markers indicates the potential utilization for molecular characterization, identification and purity assessment of rice genotypes.

[View](#)

... The main objective of this study is to this microsatellite database will be useful for rice breeders in identifying desirable traits and selection of appropriate parents in rice breeding programs. This baseline data also helps in generating a suitable practical method in salt tolerant genotypes management (Kanawapee et al., 2011). Also to research the genetic diversity among fifteen rice genotypes varying in their tolerance to salinity and drought using SSR markers for developing individual fingerprint for each genotype, and to recognize SSR markers related with some drought tolerance traits or QTLs, and to recognize the better genotype to be used as donors for drought tolerance in breeding program in the future for expansion the suitability of this unique rice molecular marker characterizing among rice genotypes and gave equally helpful for the scientific community and farmers. ...

... Lanes: 1-Amber 33 , 2-Amber AlBaraka, 3-Amber Furat, 4-Amber Baghdad , 5-Amber Munatherha, 6-Sumar, 7-Dijlah, 8-Ghadeer, 9- Brnamge-4-, 10-Dorfak, 11-Gohar, 12-Khazar, 13- Shiroudi, 14-Neda, 15-Nemat Results indicate moderate relationship between genetic divergence and geographic origin of accessions, their ancestor (Mulato et al., 2010). This may due to effect of environment since they came from two different or similar collection sites, which presented that SSR molecular markers force be potential to recognize germplasm in rice genotypes (Kanawapee et al., 2011). Who announced relatively high level of similarity between closely linked genotypes. ...

[Efficiency of SSR markers system in accessing genetic variation for rice \(*Oryza sativa* L.\) genotypes](#)

- Jan 2019
-

Balqees H Al-Musawi

- Nidhal Abd
- H Al-Badeiry
-

Mohammed A Al-Anbari

To estimate the genetic diversity in fifteen rice (*Oryza sativa* L.) genotypes differed in drought and salinity tolerance by using two primers RM585 and RM8085 (SSR) markers related to above traits and used to fingerprint among genotypes. The results indicated that among SSR markers used, 6 SSR loci were polymorphic and produced a total of 10 alleles. The number of alleles per locus created by each marker varied from 4 to 6 alleles with an average of 5 alleles per locus. The overall size of amplified fragments ranged from 142.946 to 216.064 bp. The polymorphic information content (PIC) values obtained from the microsatellite primer panels ranged from 0.635 to 0.788 with an average of 0.712. This Unweighted Pair Group Method (UPGMA) cluster analysis separated the 15 genotype into two major groups : The first cluster A contained 7 genotypes cluster A and a large cluster B. The major group A comprised 7 genotypes, while the second cluster B comprised 8 depending on their geographic origin, their ancestor. The results specified the ability of SSR markers to identify and to detect the allelic diversity and genetic variation among the studied rice genotypes and findings the prospect role for further improvement of drought and salinity tolerance rice genotypes through marker helpful breeding.

[View](#)

... Sadia et al. (2012) and 28 improved Pakistani rice using RABD markers and noted that RABD markers are a useful tool for assessing genetic differences between cultivars. Nantawan et al. (2011) used the RAPD and SRS markers to analyze the genetic diversity of saline tolerant rice varieties. While, Ravindra et al. (2012) using simple sequence repeats (SSR) markers for evaluation of genetic diversity in rice. ...

... More than one primer can be used to know the sequence, differences and differences in DNA. Electrophoresis device can easily separate the DNA fragments depending on molecular weight this is in line with many researchers (Mehfuz and Raihan, 2014; Rajani et al., 2013; Malik, 2008 and Nantawan et al., 2011), who have referred to 2. 100 mL.L⁻¹ fruits of (*Citrullus colocynthis*) extract. 3. 200 mL.L⁻¹ fruits of (*Citrullus colocynthis*) extract. ...

[In vitro genetic variations of two rice varieties seeds using \(*Citrullus colocynthis*\) fruits extract](#)

- Oct 2018

-

Saja J S Baday

Two rice varieties seeds (Furata-1 and Yasamin) were laboratory geminated in (0.0, 100.0, 200.0 and 300.0) mL.L-1 of (Citrullus colocynthis) fruits extract; the buds then dried and grinded. The DNA samples were extracted by electrophoresis, PCR-RAPD marker using the primers OPA-12, OPB-11 and OPC-13. PCR results depending on RAPD and electrophoresis for DNA samples which isolated from buds to two varieties and subjected to various concentrations of (Citrullus colocynthis) fruit extract the concentrations 200 and 300 mL.L-1 showed differences in amplified bands, molecular weights by using primers OPA-12, OPB-11 and OPC-13, while PCR results depending on RAPD and electrophoresis for DNA samples, which isolated from buds to two varieties did not show differences in amplified bands and molecular weights using concentration 100 mL.L-1 of (Citrullus colocynthis) fruit extract by using primers OPB-11 and OPC-13.

[View](#)

... All 11 RAPD primers produced 75 polymorphic bands with 100% polymorphism. The high level of polymorphism generated by all RAPD markers in this study was dramatically higher compared to the results of previous studies conducted in Thailand (Kanawapee et al., 2011), Bangladesh (Hasan & Raihan, 2015), Iraq (Abdul-razzak Tahir, 2014) and India (Rajani et al., 2013). Guo et al. (2007) reported that geographic isolation may play an important role during the process of genetic diversification and variation. ...

... Jaccard's coefficient of similarity in this study ranged from 0.095 to 0.864, representing a high level of genetic variation among all Sabah traditional rice varieties. A high level of genetic variation of rice was also reported in different countries including in Thailand, with genetic similarity ranging from 0.64 to 0.94 (Kanawapee et al., 2011), India, with genetic similarity ranging from 0.47 to 0.81 (Rajani et al., 2013) and Bangladesh, with genetic similarity ranging from 0.101 to 0.911 (Hasan & Raihan, 2015). When stratified to different divisions, the estimated allele frequency with number of different alleles (N_a) and effective alleles (N_e) was highest in ID ($N_a = 1.693 \pm 0.080$, ...

[Genetic diversity and relationship of Sabah traditional rice varieties as revealed by RAPD markers](#)

- Feb 2018

-

Eric Tzyy-Jiann Chong

-

Lucky Poh Wah Goh

-

Jovita Jun Wong

-

Zaleha Abdul Aziz

-

Ping-Chin Lee

Sabah, also known as North Borneo, is one of the states in Malaysia. It is home to many local varieties of rice, but the self-sufficiency quotient for rice production is only about 30%. Knowledge of the genetic diversity of crops has been utilised to increase crop yields including rice in different countries, but the information regarding the genetic diversity of Sabah traditional rice varieties is very limited. Therefore, we report a comprehensive genetic diversity and relationship study of 22 Sabah traditional rice varieties in three main divisions of Sabah including the West Coast Division (WCD), Sandakan Division (SD), and Interior Division (ID) using 11 random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Our results showed that more than half of the collected rice seeds were medium in size and shape, with moderately high head rice recovery and low moisture content. In addition, about half of them were categorised with high to very high amylose content. Genetic analysis revealed a total of 75 bands were produced using all RAPD markers with 100% polymorphism, and a high degree of genetic variation among all Sabah traditional rice varieties was obtained. The genetic differentiation of Sabah's traditional rice varieties was more likely to occur within divisions rather than among divisions. Furthermore, Sabah traditional rice varieties in ID showed the greatest genetic diversity and polymorphic loci, and were closely related to rice varieties in SD but genetically dissimilar to those in WCD as revealed in both phylogenetic tree and principal component analysis. In conclusion, this study provides breeders with reliable information regarding

diversity of Sabah's traditional rice varieties; the data could also be beneficial for local rice yield enhancement.

[View](#)

... Suatu area disebut lahan salin bila memiliki nilai EC >4 mS/cm (Sposito 2008), dalam keadaan tanah kering dan kadar garam minimal EC 5–6 dS/m dapat menimbulkan defisiensi mineral Zn, P, dan toksin Fe, Al, sehingga menurunkan hasil produksi padi (Li & Xu 2007). Tanaman padi rentan dengan keadaan salinitas tinggi pada fase awal vegetatif dan akhir generatif sedangkan gen tanaman yang bertanggung jawab terhadap sifat toleransi salin diketahui berupa gen aditif (Kanawapee et al. 2011). Beberapa jenis garam di antaranya garam NaCl, NaSO₄, Na₂CO₃, serta garam dari senyawa kalsium dan magnesium, masing-masing akan memberikan berbagai tingkat salinitas (Theerkulpisut et al. 2005). ...

... Namun, daun-daun akan mengalami proses kematian dengan adanya gejala daun mengering dan klorosis. Hal ini dapat terjadi dengan keadaan daun yang terakumulasi kadar salin yang tinggi atau di atas 150 mM dan jangka waktu yang lama hingga fase reproduktif atau panen (Kanawapee et al. 2011;Theerkulpisut et al. 2005;Yeo et al. 1991). Hal ini mempengaruhi rasio K⁺/Na⁺ dalam sel sehingga melimpahnya pemasukan Na⁺ dan akumulasi konsentrasi ion Na⁺ dalam sel telah mengganggu pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Yunita 2009). ...

[Toleransi Plasma Nutfah Padi Lokal terhadap Salinitas](#)

- Feb 2018
- [Tintin Suhartini](#)
- [Try Zulchi](#)

p> Abstract The research was aimed to screen the local rice germplasms for salinity tolerance. The 104 local rice germplasms were derived of collection of Gene Bank of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD) were tested to salinity. The activities was carried out in greenhouse of ICABIOGRAD. The 15 day old seedlings were planted in pots soil contained NaCl 0.4%. One accession of rice was planted in 2 pots, each pot contained 4 seedlings. Observation of plant symptom was conducted after 1 month planted. The experiment was carried out in a Completely Randomized Design with 2 replications. The results of the analysis showed there were different responses among rice accessions to the treatment. Salinity caused dry and dead leaves, there were very significant differences between the varieties for plant height, dry weight plant, number of total leaves, and number of green leaves. There were a high and negative correlation of plant height and total number of leaves with percentage of dead leaves. The result showed 21 accessions were tolerant to moderately-tolerant, while Pokkali as a tolerant check, most tolerant. There were two accessions were tolerant with dead leaf percentage <50%, i.e. Tjempo Brondol (reg. 5800) and

Gembira Putih (reg. 20602), whereas Pokkali as resistant check had low dead leaf percentage (16.9%) and 19 accessions were moderately-tolerant with dead leaf percentage <70%, and 82 accessions were sensitive to highly-sensitive. Abstrak Penelitian ini bertujuan untuk menyaring plasma nutfah padi yang memiliki sifat toleran terhadap salinitas. Sejumlah 104 plasma nutfah padi lokal yang berasal dari koleksi Bank Gen BB Biogen diuji terhadap salinitas. Kegiatan dilakukan di rumah kaca BB Biogen. Bibit padi berumur ± 15 hari ditanam pada pot berisi tanah yang sudah dilumpurkan dengan larutan garam NaCl 0,4% (4.000 ppm). Satu aksesi padi ditanam pada 2 pot, masing masing pot berisi 4 tanaman. Setelah berumur 4 minggu dari tanam dilakukan pengamatan meliputi tinggi tanaman, bobot kering akar, bobot kering tanaman, jumlah daun total, jumlah daun hijau, dan jumlah daun mati. Pengujian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 2 ulangan. Hasil analisis varians menunjukkan terdapat perbedaan respons plasma nutfah padi terhadap perlakuan salin yang diberikan. Perbedaan sangat nyata terdapat pada tinggi tanaman, bobot kering tanaman, jumlah daun total, dan jumlah daun hijau. Terdapat korelasi yang tinggi dan negatif pada tinggi tanaman dan jumlah daun total dengan persentase daun mati. Hasil pengujian telah terpilih 21 aksesi plasma nutfah padi toleran hingga agak toleran, sedangkan Pokkali sebagai cek sangat toleran. Dua aksesi yang toleran dengan persentase daun mati <50%, yaitu Tjempo Brondol (reg. 5800) dan Gembira Putih (reg. 20602), Pokkali sebagai varietas kontrol dengan tingkat persentase daun mati 16,9%, sedangkan 19 aksesi termasuk kelompok agak toleran dengan persentase daun mati <70%, dan 82 aksesi termasuk kelompok peka hingga sangat peka.

[View](#)

... DNA samples extracted using Chelex ®-100 were used as templates in PCR. Sequences were amplified using RAPD primers: OPA04 (5'-AATCGGGCTG-3') and OPA10 (5'-GTGATCGCAG-3') (Kanawapee et al, 2011) in a thermal cycler (Gene Atlas G, Astec Co. Ltd.). Approximately 50 ng genomic DNA was used for amplification in a final reaction volume of 25 μ L made of PCR buffer (EP0702, Thermo Scientific), 0.4 mmol/L dNTP mix (110-002, GeneON), 0.4 μ mol/L of RAPD primer and 1.5 U Taq DNA polymerase (EP0702, Thermo Scientific). ...

... Use of rice grains as a source of DNA in studies also obviates the need of a -80 °C freezer, which is an absolute necessity to store other tissue samples (e.g., seedlings and leaves) for a long period of time. (Evamoni et al, 2014).

Amplification with two random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers, OPA04 and OPA10 (Kanawapee et al, 2011). These DNA samples worked equally well with several other RAPD primers. ...

[A Simple, Efficient and Rapid Method for Good Quality DNA Extraction from Rice Grains](#)

- Mar 2017
- [Rice Sci](#)

-

Abu Ashfaqur Sajib

-

Mohammad Ashraful Islam Bhuiya

- Roksana Huque

An efficient and good DNA extraction protocol should be simple, affordable and yield enough DNA with high quality. Rice (*Oryza sativa* L.) DNA extraction methods often use seedlings or leaves rather than the grains and tend to be time-consuming, involve multiple steps, and use hazardous chemicals and expensive enzymes. Rice grains offer several benefits over seedlings and leaves as a source of DNA for genetic analysis. However, these benefits are underutilized because the bulk of a rice grain is made up of starch. It is particularly important, but difficult to get rid of the starch while extracting DNA from rice grains. This co-precipitated polysaccharide is a known inhibitor of DNA polymerase activity in polymerase chain reaction (PCR). We describe here a very simple and highly affordable Chelex®-100 based DNA extraction method from rice grains. It does not require any hazardous chemicals or enzymes. This method reproducibly extracts DNA with good purity indices (A260/A230 and A260/A280 values), but requires only a few steps.

[View](#)

... Whereas low level of polymorphism (50 per cent) was reported by Beverley et al. (1997) in his study in which he evaluated the genetic diversity in rice with RAPD markers. Kanawapee et al. (2011) also reported (68.94 per cent) low level of genetic diversity among four important rice varieties. The data obtained by RAPD markers was analyzed by NTSYS-PC version 2.02i and dendrogram was constructed by using Jaccard's similarity coefficient value to estimate the genetic similarity of the rice cultivars. ...

[Assessment of Genetic Diversity Using RAPD Marker Among Different Varieties of Rice \(*Oryza sativa*\) 509](#)

- Jan 2017

- P T Karande
- B C Nandeshwar
-

A D Kokane

- R L Chavhan
- A M Dethe

Assessment of the extent and distribution of genetic variation in a crop species and its relatives is essential in understanding pattern of diversity and is highly significant for the improvement of many crop species including rice. The genetic divergence among 12 Indian varieties of rice (*Oryza sativa* L.) was assessed employing random amplified polymorphic DNA markers. A total of 136 clear score able bands were generated, out of which 87.25% were polymorphic. The total number of amplicon varied from 7 to 10 with a mean of 8 amplicon per primer while in case of polymorphic amplicon it varied from 5 to 9 with a mean of 7 polymorphic amplicon per primer. The amplified product size ranged from 0.3 to 1.8 kb. The Jaccard's similarity coefficient values ranged 0.56 to 0.90 with a mean of 0.70. A dendrogram constructed based on the UPGMA clustering method revealed two major clusters CL1 and CL2. The dendrogram has put all the genotypes in two clusters. CL1 comprises of three varieties with 85 per cent similarity coefficient whereas remaining 9 varieties clustered together in CL2, which is further classified into two sub clusters with 65.50 per cent similarity. Current study highlights genetic diversity among various varieties and attributed to recent human selection pertinent to few genes. The study revealed rich genetic diversity among rice varieties.

[View](#)

... Similarly cluster IIA consisted of predominantly susceptible genotypes except AC-43020 and IIB consisted of only tolerant genotypes. Out-grouping and intermixing of few tolerant and susceptible genotypes were reported previously (Mondal and Ganie 2014; Kanawapee et al. 2011; Sudharani et al. 2013). Group IIB might have drought tolerance mechanism or some QTLs and genes differing from those found in cluster I genotypes (Ramadan et al. 2015). ...

[Identification of most important rice root morphological markers in response to contrasting moisture regimes under vegetative stage drought](#)

- Jan 2017
- [ACTA PHYSIOL PLANT](#)
-

Goutam Kumar Dash

-

Madhusmita Barik

-

Akhil Kumar Debata

- Mirza Jaynul Baig

-

Padmini Swain

The experiment was carried out to examine the effect of moisture stress (drought) on different root traits, rooting pattern and to identify important root morphological markers contributing to stress tolerance. Moisture stress was imposed on 21 days old seedlings of selected rice genotypes grown in PVC cylinders. Samplings were done at 10 and 20 days after imposition of stress to examine the effect of stress on root growth and development. Results revealed that rate of assimilate allocation impeded more under 20 days stress (severe) than in 10 days stress (moderate) in terms of enhanced root: shoot ratio, maximum root length to shoot length ratio and root volume. Magnitude of trait variation among genotypes was more pronounced under severe stress than under moderate stress. The root: shoot ratio, maximum root length to shoot length ratio and root volume were observed to be the most crucial morphological markers in determining drought tolerance in rice genotypes analyzed through biplot analysis. Among the thirteen genotypes tested, AC-42994, AC-42997, AC-43020, CR-143-2-2, Ronga Bora and Bora were found to possess desirable root traits and these genotypes can be used in the breeding programme for enhancing drought tolerance in rice. © 2016, Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków.

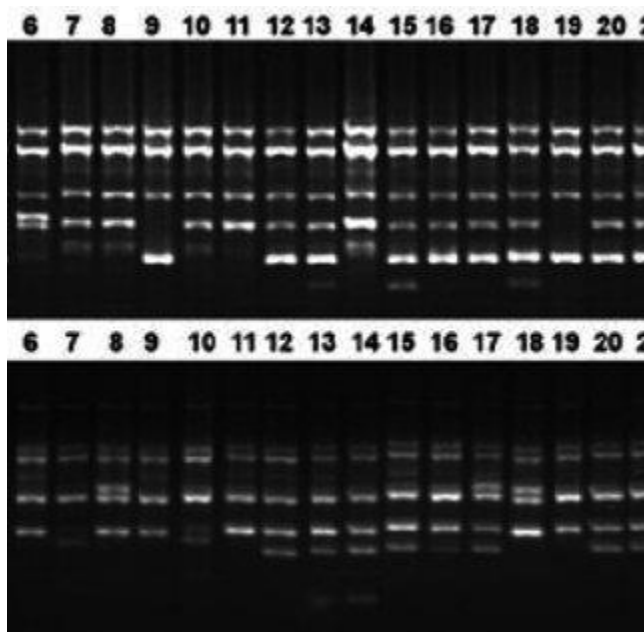
[View](#)

[Show more](#)

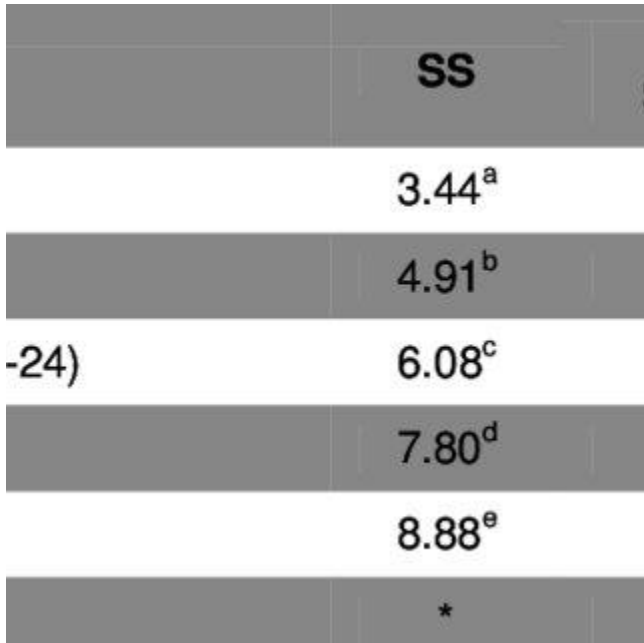
Primers	CN	SSR motif	Nucleotide sequence	AN	Size of bands (bp)
RM 1	1	(AG)26	GCGAAAACACAATGCAAAAA (F) GCGTTGGTTGGACCTGAC (R)	18	78 – 170
RM 3	6	(GA)2GG (GA)25	GGTTAGGCATCGTCACGG (F) TCACCTCACCACACGACACG (R)	11	73 – 175
RM 5	1	(GA)14	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA (F) GCATCCGATCTTGATGGG (R)	16	80 – 167
RM 6	2	(AG)16	GTCCCCTCCACCCAATTC (F) TCGTCTACTGTTGGCTGCAC (R)	8	160 – 225
RM 7	3	(GA)19	TTCGCCATGAAGTCTCTCG (F) CCTCCCATCATTTCGTTGTT (R)	5	165 – 190
RM 11	7	(GA)17	TCTCCTCTTCCCCCGATC (F) ATAGCGGGCGAGGCTTAG (R)	6	145 – 210
RM 13	5	(GA) 6- (GA)16	TCCAACATGGCAAGAGAGAG (F) GGTGGCATTTCGATTCCAG (R)	6	115 – 163
RM 19	12	(ATC)10	CAAAAACAGAGCAGATGAC (F) CTCAAGATGGACGCCAAGA (R)	8	230 – 420
RM 20	11	(ATT)14	ATCTTGTCCTGCAGGTCAT (F) GAAACAGAGGCACATTTTCATTG (R)	7	218 – 290
RM 25	8	(GA)18	GGAAAGAATGATCTTTTCATGG (F) CTACCATCAAACCAATGTTC (R)	13	130 – 195
RM 44	8	(GA)16	ACGGGCAATCCGAACAACC (F) TCGGGAAAACCTACCCTACC (R)	9	100 – 185
RM 164	5	(GT)16T T (GT)4	TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC (F) GCAGCCCTAATGCTACAATTCTTC (R)	11	235 – 440
RM 170	6	(CCT)7	TCGCGCTTCTTCCTCGTCGACG (F) CCCGCTTGCAGAGGAAGCAGCC (R)	14	95 – 210
RM 189	9	(AG)11	GGGAGTTGAAGTGGTCGGAGAAGG (F) CACGCGACTTCAGTTCGTCTTCC (R)	6	290 – 480
RM 206	11	(CT)21	CCCATGCGTTTAACTATTCT (F) CGTTCCATCGATCCGTATGG (R)	13	102 – 195
RM 209	11	(GT)19	ATATGAGTTGCTGTCGTGCG (F)	10	100 – 250

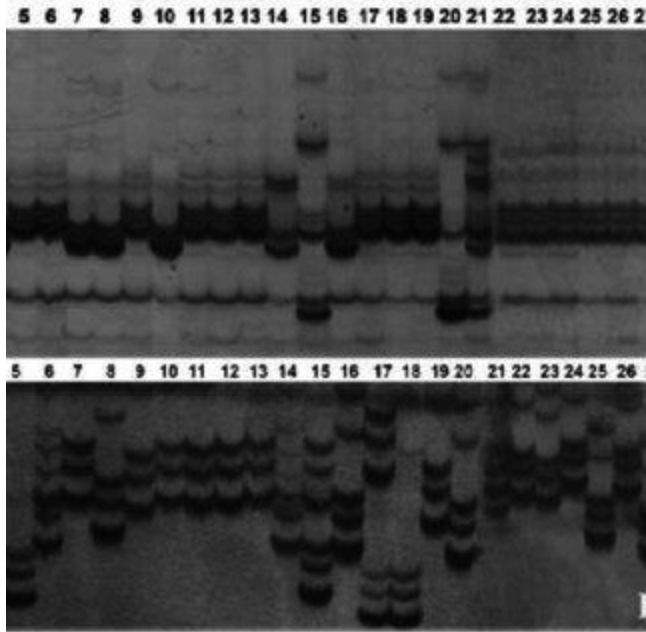
- II. The list of 20 SSR primers used in the estimation of genetic diversity of 30 rice cultivars. Variation of alleles number, allele size range, monomorphic and polymorphic bands and PIC values are shown.

Source publication



4	SPR90	Thailand	RD21/IR4422-96-3-6-1/RD11/RD23	3.61	T
5	RD10	Thailand	Derived from RD1	3.73	T
6	Pathum Thani1	Thailand	BKNA6-18-3-2/PTT85061-26-3-2-1	4.50	MT
7	FL496	IRRI	IR29/Pokkai	4.57	MT
8	MATATAG2	IRRI	IR61009-37-2-1-2/IR1561/Ubi Merah/IR1561	4.66	MT
9	RD15	Thailand	Derived from KDM1105	4.68	MT
10	FL530	IRRI	IR29/Pokkai	4.95	MT
11	IR64	IRRI	IR5657-33-2-1/IR2061-465-1-5-5	5.02	MT
12	Leuang Anan	Thailand	Thai local	5.13	MT
13	Leuang Tahmo	Thailand	Thai local	5.17	MT
14	RD25	Thailand	KDM1105/IR2061-213-2-3-3/KDM1105/IR26	5.19	MT
15	Sew Mae Jun	Thailand	Improved	5.22	MT
16	Haem Om	Thailand	Thai local	5.61	MS
17	RD33	Thailand	KDM1105/IR70177-76-3-1	5.83	MS
18	Surin1	Thailand	IR61076/IR46329-SRN-18-2-2-2	5.95	MS
19	KDM1105	Thailand	Improved	5.97	MS
20	Haem Nang Nuan	Thailand	Thai local	6.03	MS
21	Daw Haem	Thailand	Thai local	6.11	MS
22	Khao Med Luek	Thailand	Thai local	6.13	MS
23	RD6	Thailand	Derived from KDM1105	6.50	MS
24	KHSPR	Thailand	SPR84177-8-2-2-2/SPR85091-13-1-1-4/KDM1105	6.61	MS
25	Pathum Thani90	Thailand	DML702/Chinese345	7.00	S
26	IR29	IRRI	R533-6-2-1-1/IR1561-149-1/IR244/O Nilava	8.00	S
27	PSBRc 86	IRRI	IR10198-66-2/TCCP266-8-8-8-10-3-1	8.03	S





[Genetic diversity analysis of rice cultivars \(*Oryza sativa* L.\) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers](#)

- Nov 2011

•

Nantawan Kanawapee

•

Jirawat Sanitchon

•

Pranee Srihaban

•

Piyada Theerakulpisut

Thirty rice cultivars were evaluated for salinity tolerance during the seedling stage and were divided into five tolerance groups including tolerant (T), moderately tolerant (MT), moderately susceptible (MS), susceptible (S) and highly susceptible (HS) which comprised 5, 10, 9, 4 and 2 cultivars respectively. Genetic diversity of all rice cultivars...

[View](#)

Citations

... The lowest amplicon size belonged to RM10825 (90 bp) and the highest amplicon size belonged to RM10772 and AP3206 (490 bp). These values were comparable to those reported earlier (Kanawapee et al., 2011). Polymorphic Information Content (PIC) values ranged from 0.03 to 0.62 with an average of 0.37. The polymorphic banding pattern with SSR markers tightly linked to Saltol locus (RM10745, RM493, RM3412b, RM1287, and RM140) are presented in Fig. 1, Fig. 2 and Fig. 3 respectively. ...

[Genetic analysis of salt tolerant rice varieties of Kerala through molecular characterization using SSR markers](#)

- Jun 2019
-

Deepa John

[View](#)

... In our experiment, the 1.6 mM MgCl₂ was ideal to amplify the rice DNA. For RAPD optimization in rice (Kanawapee et al., 2011) also used near about similar concentration of MgCl₂. ...

[Mutation determination of rice by using RAPD primers](#)

- Jun 2019
- Md Saikat
-

Hossain Bhuiyan

- M A Malek

- [Sariful Haque Bhuiyan](#)
- [Affrida Abu Bt](#)

PCR is a powerful tool for the amplification of genetic sequences but sometimes, even though using an established PCR protocol that had been optimized and successful for the amplification of a particular DNA segment, use of that same protocol on a different region can result in a less than desirable outcome. Therefore, an experiment was conducted at Molecular biology laboratory of Malaysian Nuclear Agency during December 2016 to January 2017 used seeds of 6 indica rice cultivars. To conduct RAPD experiments for the rice species it was established the following reaction conditions for the final volume of 20 µl where 0.1 unit of Taq DNA polymerase, 0.4 µl of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1 µl primer and 2.0 µl of DNA template. From this experiment, it is clear that after mutation the parent MR219 performed some genetic modification and produce genetically different variety namely NMR151, NMR152, ML3, ML10 and ML30. These mutant varieties have two different groups based on their mutation source and it is clear enough from their RAPD profile.

[View](#)

... These results were similar to Petroudi et al. (2010) where wide similarity values ranged from 0.47 to 0.95 with an average similarity index of 0.75. The results of similarity index among and within rice subspecies were in agreement with Chakravarthi and Naravaneni (2006) and Ramadan et al. (2015) who reported low similarity coefficient between japonica type and indica type genotypes, and Kanawapee et al. (2011) who reported relatively high level of similarity between closely related genotypes. Clustering genotypes in the constructed dendrogram was largely dependent on their genetic background. ... [Fingerprinting of some Egyptian rice genotypes using Intron-exon Splice Junctions \(ISJ\) markers](#)

- May 2019
-

[Galal Anis](#)

DNA fingerprinting has become an important tool for diversity assessment and varietal identification in plant breeding programs. Semi- random PCR primers targeting intron-exon splice junctions (ISJ) were used to evaluate the potential of these markers in identification and classification of rice genotypes. A total of 12 ISJ primers were used for screening fourteen Egyptian rice genotypes, including six Japonica, four Indica and four Indica/Japonica rice genotypes. A total of 117 amplified fragments were generated among which 76 fragments were polymorphic revealing average polymorphic ratio of 58.9%. Number of amplified

fragments per genotype across the primers ranged from 65 in Japonica rice variety Sakha101 to 85 in Indica/Japonica rice variety Giza179. Number of polymorphic amplified fragments ranged from 3 for primer ISJ-1 to 24 for primer ISJ-2. The average numbers of amplified bands per primer per genotype were 16.71 and 10.24, respectively. Polymorphic information content (PIC) values ranged from 0.289 for ISJ-9 to 0.480 for ISJ-1 with an average of 0.375. The coefficient of similarities based on semi-random data among the studied genotypes ranged from 0.53 to 0.9 with an average of 0.66. All genotypes clearly grouped into two major clusters in the dendrogram at 58% similarity based on Jaccard's similarity index. The first cluster represents the Indica and Indica/Japonica rice genotypes, while the second cluster represents the Japonica genotypes. These results indicate that fingerprinting using semi-specific DNA markers may be an efficient tool for varietal identification and assessing genetic diversity in rice. The results highlight the existing diversity among the studied genotypes and hence their potential use in breeding programs. The simplicity and reproducibility of ISJ markers indicates the potential utilization for molecular characterization, identification and purity assessment of rice genotypes.

[View](#)

... The main objective of this study is to this microsatellite database will be useful for rice breeders in identifying desirable traits and selection of appropriate parents in rice breeding programs. This baseline data also helps in generating a suitable practical method in salt tolerant genotypes management (Kanawapee et al., 2011). Also to research the genetic diversity among fifteen rice genotypes varying in their tolerance to salinity and drought using SSR markers for developing individual fingerprint for each genotype, and to recognize SSR markers related with some drought tolerance traits or QTLs, and to recognize the better genotype to be used as donors for drought tolerance in breeding program in the future for expansion the suitability of this unique rice molecular marker characterizing among rice genotypes and gave equally helpful for the scientific community and farmers. ...

... Lanes: 1-Amber 33 , 2-Amber AlBaraka, 3-Amber Furat, 4-Amber Baghdad , 5-Amber Munatherha, 6-Sumar, 7-Dijlah, 8-Ghadeer, 9- Brnamge-4-, 10-Dorfak, 11-Gohar, 12-Khazar, 13- Shiroudi, 14-Neda, 15-Nemat Results indicate moderate relationship between genetic divergence and geographic origin of accessions, their ancestor (Mulato et al., 2010). This may due to effect of environment since they came from two different or similar collection sites, which presented that SSR molecular markers force be potential to recognize germplasm in rice genotypes (Kanawapee et al., 2011). Who announced relatively high level of similarity between closely linked genotypes. ...

[Efficiency of SSR markers system in accessing genetic variation for rice \(*Oryza sativa* L.\) genotypes](#)

- Jan 2019

-

Balqees H Al-Musawi

- Nidhal Abd
- H Al-Badeiry
-

Mohammed A Al-Anbari

To estimate the genetic diversity in fifteen rice (*Oryza sativa* L.) genotypes differed in drought and salinity tolerance by using two primers RM585 and RM8085 (SSR) markers related to above traits and used to fingerprint among genotypes. The results indicated that among SSR markers used, 6 SSR loci were polymorphic and produced a total of 10 alleles. The number of alleles per locus created by each marker varied from 4 to 6 alleles with an average of 5 alleles per locus. The overall size of amplified fragments ranged from 142.946 to 216.064 bp. The polymorphic information content (PIC) values obtained from the microsatellite primer panels ranged from 0.635 to 0.788 with an average of 0.712. This Unweighted Pair Group Method (UPGMA) cluster analysis separated the 15 genotype into two major groups : The first cluster A contained 7 genotypes cluster A and a large cluster B. The major group A comprised 7 genotypes, while the second cluster B comprised 8 depending on their geographic origin, their ancestor. The results specified the ability of SSR markers to identify and to detect the allelic diversity and genetic variation among the studied rice genotypes and findings the prospect role for further improvement of drought and salinity tolerance rice genotypes through marker helpful breeding.

[View](#)

... Sadia et al. (2012) and 28 improved Pakistani rice using RABD markers and noted that RABD markers are a useful tool for assessing genetic differences between cultivars. Nantawan et al. (2011) used the RAPD and SRS markers to analyze the genetic diversity of saline tolerant rice varieties. While, Ravindra et al. (2012) using simple sequence repeats (SSR) markers for evaluation of genetic diversity in rice. ...

... More than one primer can be used to know the sequence, differences and differences in DNA. Electrophoresis device can easily separate the DNA fragments depending on molecular weight this is in line with many researchers (Mehfuz and Raihan, 2014; Rajani et al., 2013; Malik, 2008 and Nantawan et al., 2011), who have referred to 2. 100 mL.L⁻¹ fruits of (*Citrullus colocynthis*) extract. 3. 200 mL.L⁻¹ fruits of (*Citrullus colocynthis*) extract. ...

[In vitro genetic variations of two rice varieties seeds using \(*Citrullus colocynthis*\) fruits extract](#)

- Oct 2018

-

Saja J S Baday

Two rice varieties seeds (Furata-1 and Yasamin) were laboratory geminated in (0.0, 100.0, 200.0 and 300.0) mL.L-1 of (Citrullus colocynthis) fruits extract; the buds then dried and grinded. The DNA samples were extracted by electrophoresis, PCR-RAPD marker using the primers OPA-12, OPB-11 and OPC-13. PCR results depending on RAPD and electrophoresis for DNA samples which isolated from buds to two varieties and subjected to various concentrations of (Citrullus colocynthis) fruit extract the concentrations 200 and 300 mL.L-1 showed differences in amplified bands, molecular weights by using primers OPA-12, OPB-11 and OPC-13, while PCR results depending on RAPD and electrophoresis for DNA samples, which isolated from buds to two varieties did not show differences in amplified bands and molecular weights using concentration 100 mL.L-1 of (Citrullus colocynthis) fruit extract by using primers OPB-11 and OPC-13.

[View](#)

... All 11 RAPD primers produced 75 polymorphic bands with 100% polymorphism. The high level of polymorphism generated by all RAPD markers in this study was dramatically higher compared to the results of previous studies conducted in Thailand (Kanawapee et al., 2011), Bangladesh (Hasan & Raihan, 2015), Iraq (Abdul-razzak Tahir, 2014) and India (Rajani et al., 2013). Guo et al. (2007) reported that geographic isolation may play an important role during the process of genetic diversification and variation. ...

... Jaccard's coefficient of similarity in this study ranged from 0.095 to 0.864, representing a high level of genetic variation among all Sabah traditional rice varieties. A high level of genetic variation of rice was also reported in different countries including in Thailand, with genetic similarity ranging from 0.64 to 0.94 (Kanawapee et al., 2011), India, with genetic similarity ranging from 0.47 to 0.81 (Rajani et al., 2013) and Bangladesh, with genetic similarity ranging from 0.101 to 0.911 (Hasan & Raihan, 2015). When stratified to different divisions, the estimated allele frequency with number of different alleles (N_a) and effective alleles (N_e) was highest in ID ($N_a = 1.693 \pm 0.080$, ...

[Genetic diversity and relationship of Sabah traditional rice varieties as revealed by RAPD markers](#)

- Feb 2018

-

Eric Tzyy-Jiann Chong

-

Lucky Poh Wah Goh

-

Jovita Jun Wong

-

Zaleha Abdul Aziz

-

Ping-Chin Lee

Sabah, also known as North Borneo, is one of the states in Malaysia. It is home to many local varieties of rice, but the self-sufficiency quotient for rice production is only about 30%. Knowledge of the genetic diversity of crops has been utilised to increase crop yields including rice in different countries, but the information regarding the genetic diversity of Sabah traditional rice varieties is very limited. Therefore, we report a comprehensive genetic diversity and relationship study of 22 Sabah traditional rice varieties in three main divisions of Sabah including the West Coast Division (WCD), Sandakan Division (SD), and Interior Division (ID) using 11 random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Our results showed that more than half of the collected rice seeds were medium in size and shape, with moderately high head rice recovery and low moisture content. In addition, about half of them were categorised with high to very high amylose content. Genetic analysis revealed a total of 75 bands were produced using all RAPD markers with 100% polymorphism, and a high degree of genetic variation among all Sabah traditional rice varieties was obtained. The genetic differentiation of Sabah's traditional rice varieties was more likely to occur within divisions rather than among divisions. Furthermore, Sabah traditional rice varieties in ID showed the greatest genetic diversity and polymorphic loci, and were closely related to rice varieties in SD but genetically dissimilar to those in

WCD as revealed in both phylogenetic tree and principal component analysis. In conclusion, this study provides breeders with reliable information regarding diversity of Sabah's traditional rice varieties; the data could also be beneficial for local rice yield enhancement.

[View](#)

... Suatu area disebut lahan salin bila memiliki nilai EC >4 mS/cm (Sposito 2008), dalam keadaan tanah kering dan kadar garam minimal EC 5–6 dS/m dapat menimbulkan defisiensi mineral Zn, P, dan toksin Fe, Al, sehingga menurunkan hasil produksi padi (Li & Xu 2007). Tanaman padi rentan dengan keadaan salinitas tinggi pada fase awal vegetatif dan akhir generatif sedangkan gen tanaman yang bertanggung jawab terhadap sifat toleransi salin diketahui berupa gen aditif (Kanawapee et al. 2011). Beberapa jenis garam di antaranya garam NaCl, NaSO₄, Na₂CO₃, serta garam dari senyawa kalsium dan magnesium, masing-masing akan memberikan berbagai tingkat salinitas (Theerkulpisut et al. 2005). ...

... Namun, daun-daun akan mengalami proses kematian dengan adanya gejala daun mengering dan klorosis. Hal ini dapat terjadi dengan keadaan daun yang terakumulasi kadar salin yang tinggi atau di atas 150 mM dan jangka waktu yang lama hingga fase reproduktif atau panen (Kanawapee et al. 2011;Theerkulpisut et al. 2005;Yeo et al. 1991). Hal ini mempengaruhi rasio K⁺ /Na⁺ dalam sel sehingga melimpahnya pemasukan Na⁺ dan akumulasi konsentrasi ion Na⁺ dalam sel telah mengganggu pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Yunita 2009). ...

[Toleransi Plasma Nutfah Padi Lokal terhadap Salinitas](#)

- Feb 2018
- [Tintin Suhartini](#)
- [Try Zulchi](#)

p> Abstract The research was aimed to screen the local rice germplasms for salinity tolerance. The 104 local rice germplasms were derived of collection of Gene Bank of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD) were tested to salinity. The activities was carried out in greenhouse of ICABIOGRAD. The 15 day old seedlings were planted in pots soil contained NaCl 0.4%. One accession of rice was planted in 2 pots, each pot contained 4 seedlings. Observation of plant symptom was conducted after 1 month planted. The experiment was carried out in a Completely Randomized Design with 2 replications. The results of the analysis showed there were different responses among rice accessions to the treatment. Salinity caused dry and dead leaves, there were very significant differences between the varieties for plant height, dry weight plant, number of total leaves, and number of green leaves. There were a high and negative correlation of plant height and total number of leaves with percentage of dead leaves. The result showed 21 accessions were tolerant to moderately-tolerant,

while Pokkali as a tolerant check, most tolerant. There were two accessions were tolerant with dead leaf percentage <50%, i.e. Tjempo Brondol (reg. 5800) and Gembira Putih (reg. 20602), whereas Pokkali as resistant check had low dead leaf percentage (16.9%) and 19 accessions were moderately-tolerant with dead leaf percentage <70%, and 82 accessions were sensitive to highly-sensitive.

Abstrak Penelitian ini bertujuan untuk menyaring plasma nutfah padi yang memiliki sifat toleran terhadap salinitas. Sejumlah 104 plasma nutfah padi lokal yang berasal dari koleksi Bank Gen BB Biogen diuji terhadap salinitas. Kegiatan dilakukan di rumah kaca BB Biogen. Bibit padi berumur ± 15 hari ditanam pada pot berisi tanah yang sudah dilumpurkan dengan larutan garam NaCl 0,4% (4.000 ppm). Satu aksesi padi ditanam pada 2 pot, masing masing pot berisi 4 tanaman. Setelah berumur 4 minggu dari tanam dilakukan pengamatan meliputi tinggi tanaman, bobot kering akar, bobot kering tanaman, jumlah daun total, jumlah daun hijau, dan jumlah daun mati. Pengujian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 2 ulangan. Hasil analisis varians menunjukkan terdapat perbedaan respons plasma nutfah padi terhadap perlakuan salin yang diberikan. Perbedaan sangat nyata terdapat pada tinggi tanaman, bobot kering tanaman, jumlah daun total, dan jumlah daun hijau. Terdapat korelasi yang tinggi dan negatif pada tinggi tanaman dan jumlah daun total dengan persentase daun mati. Hasil pengujian telah terpilih 21 aksesi plasma nutfah padi toleran hingga agak toleran, sedangkan Pokkali sebagai cek sangat toleran. Dua aksesi yang toleran dengan persentase daun mati <50%, yaitu Tjempo Brondol (reg. 5800) dan Gembira Putih (reg. 20602), Pokkali sebagai varietas kontrol dengan tingkat persentase daun mati 16,9%, sedangkan 19 aksesi termasuk kelompok agak toleran dengan persentase daun mati <70%, dan 82 aksesi termasuk kelompok peka hingga sangat peka.

[View](#)

... DNA samples extracted using Chelex ®-100 were used as templates in PCR. Sequences were amplified using RAPD primers: OPA04 (5'-AATCGGGCTG-3') and OPA10 (5'-GTGATCGCAG-3') (Kanawapee et al, 2011) in a thermal cycler (Gene Atlas G, Astec Co. Ltd.). Approximately 50 ng genomic DNA was used for amplification in a final reaction volume of 25 μ L made of PCR buffer (EP0702, Thermo Scientific), 0.4 mmol/L dNTP mix (110-002, GeneON), 0.4 μ mol/L of RAPD primer and 1.5 U Taq DNA polymerase (EP0702, Thermo Scientific). ...

... Use of rice grains as a source of DNA in studies also obviates the need of a -80 °C freezer, which is an absolute necessity to store other tissue samples (e.g., seedlings and leaves) for a long period of time. (Evamoni et al, 2014).

Amplification with two random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers, OPA04 and OPA10 (Kanawapee et al, 2011). These DNA samples worked equally well with several other RAPD primers. ...

[A Simple, Efficient and Rapid Method for Good Quality DNA Extraction from Rice Grains](#)

- Mar 2017
- [Rice Sci](#)

-

Abu Ashfaqur Sajib

-

Mohammad Ashraful Islam Bhuiya

- Roksana Huque

An efficient and good DNA extraction protocol should be simple, affordable and yield enough DNA with high quality. Rice (*Oryza sativa* L.) DNA extraction methods often use seedlings or leaves rather than the grains and tend to be time-consuming, involve multiple steps, and use hazardous chemicals and expensive enzymes. Rice grains offer several benefits over seedlings and leaves as a source of DNA for genetic analysis. However, these benefits are underutilized because the bulk of a rice grain is made up of starch. It is particularly important, but difficult to get rid of the starch while extracting DNA from rice grains. This co-precipitated polysaccharide is a known inhibitor of DNA polymerase activity in polymerase chain reaction (PCR). We describe here a very simple and highly affordable Chelex®-100 based DNA extraction method from rice grains. It does not require any hazardous chemicals or enzymes. This method reproducibly extracts DNA with good purity indices (A260/A230 and A260/A280 values), but requires only a few steps.

[View](#)

... Whereas low level of polymorphism (50 per cent) was reported by Beverley et al. (1997) in his study in which he evaluated the genetic diversity in rice with RAPD markers. Kanawapee et al. (2011) also reported (68.94 per cent) low level of genetic diversity among four important rice varieties. The data obtained by RAPD markers was analyzed by NTSYS-PC version 2.02i and dendrogram was constructed by using Jaccard's similarity coefficient value to estimate the genetic similarity of the rice cultivars. ...

[Assessment of Genetic Diversity Using RAPD Marker Among Different Varieties of Rice \(*Oryza sativa*\) 509](#)

- Jan 2017

- P T Karande
- B C Nandeshwar

-

A D Kokane

- R L Chavhan
- A M Dethé

Assessment of the extent and distribution of genetic variation in a crop species and its relatives is essential in understanding pattern of diversity and is highly significant for the improvement of many crop species including rice. The genetic divergence among 12 Indian varieties of rice (*Oryza sativa* L.) was assessed employing random amplified polymorphic DNA markers. A total of 136 clear score able bands were generated, out of which 87.25% were polymorphic. The total number of amplicon varied from 7 to 10 with a mean of 8 amplicon per primer while in case of polymorphic amplicon it varied from 5 to 9 with a mean of 7 polymorphic amplicon per primer. The amplified product size ranged from 0.3 to 1.8 kb. The Jaccard's similarity coefficient values ranged 0.56 to 0.90 with a mean of 0.70. A dendrogram constructed based on the UPGMA clustering method revealed two major clusters CL1 and CL2. The dendrogram has put all the genotypes in two clusters. CL1 comprises of three varieties with 85 per cent similarity coefficient whereas remaining 9 varieties clustered together in CL2, which is further classified into two sub clusters with 65.50 per cent similarity. Current study highlights genetic diversity among various varieties and attributed to recent human selection pertinent to few genes. The study revealed rich genetic diversity among rice varieties.

[View](#)

... Similarly cluster IIA consisted of predominantly susceptible genotypes except AC-43020 and IIB consisted of only tolerant genotypes. Out-grouping and intermixing of few tolerant and susceptible genotypes were reported previously (Mondal and Ganie 2014; Kanawapee et al. 2011; Sudharani et al. 2013). Group IIB might have drought tolerance mechanism or some QTLs and genes differing from those found in cluster I genotypes (Ramadan et al. 2015). ...

[Identification of most important rice root morphological markers in response to contrasting moisture regimes under vegetative stage drought](#)

- Jan 2017
- [ACTA PHYSIOL PLANT](#)
-

Goutam Kumar Dash

-

Madhusmita Barik

-

Akhil Kumar Debata

- Mirza Jaynul Baig
-

Padmini Swain

The experiment was carried out to examine the effect of moisture stress (drought) on different root traits, rooting pattern and to identify important root morphological markers contributing to stress tolerance. Moisture stress was imposed on 21 days old seedlings of selected rice genotypes grown in PVC cylinders. Samplings were done at 10 and 20 days after imposition of stress to examine the effect of stress on root growth and development. Results revealed that rate of assimilate allocation impeded more under 20 days stress (severe) than in 10 days stress (moderate) in terms of enhanced root: shoot ratio, maximum root length to shoot length ratio and root volume. Magnitude of trait variation among genotypes was more pronounced under severe stress than under moderate stress. The root: shoot ratio, maximum root length to shoot length ratio and root volume were observed to be the most crucial morphological markers in determining drought tolerance in rice genotypes analyzed through biplot analysis. Among the thirteen genotypes tested, AC-42994, AC-42997, AC-43020, CR-143-2-2, Ronga Bora and Bora were found to possess desirable root traits and these genotypes can be used in the breeding programme for enhancing drought tolerance in rice. © 2016, Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków.

[View](#)



CÂU HỎI CHƯƠNG 3

1. Đa dạng di truyền là gì, nêu đa dạng phân tử và ứng dụng
2. Các thông số biểu thị đa hình DNA và cách xác định
3. Nêu cách xác định chỉ thị phân tử DNA liên kết với các gen quy định tính trạng số lượng.
4. Nêu các yêu cầu khi áp dụng chỉ thị phân tử DNA đánh giá, chọn lọc các gen quy định tính trạng chống chịu bệnh, sâu.
5. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống kháng bệnh bạc lá lúa.
6. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống kháng bệnh đạo ôn lúa.
7. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống kháng rầy nâu lúa.
8. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA chọn tạo giống kháng virus xoăn vàng lá cà chua.
9. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA chọn tạo giống lúa kháng mặn và hạn.
10. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA xác định và chọn tạo dòng giống cây có tính tự bất hợp.
11. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong đánh giá và chọn tạo giống lúa tương hợp rộng.
12. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống chứa gen CMS, gen duy trì và phục hồi trong lúa lai 3 dòng.
13. Ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống lúa lai 2 dòng EGMS.
14. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong xác định con lai F1 và tính đồng nhất.
15. Nêu nguyên lý ứng dụng chỉ thị phân tử DNA chọn giống chất lượng cao. đạo ôn.
16. Nêu phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA chọn tạo giống lúa có mùi thơm. đạo ôn.
17. Nêu khái niệm, mục đích và cơ sở khoa học ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống bằng phương pháp lai lại.
18. Nêu nguyên lý và phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong bảo tồn nguồn gen.
19. Nêu nguyên lý và phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống có phổ di truyền rộng.
20. Nêu nguyên lý và phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong bảo tồn nguồn gen, xác định sự đa dạng, quan hệ họ hàng và đánh giá tính trạng.
21. Nêu nguyên lý và phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử DNA trong khảo kiểm nghiệm giống, xác định tính đúng giống, khảo nghiệm DUS và xác định nguồn gốc giống.

