

ĐẶC ĐIỂM CÁC MICROSATELLITE CỦA GEN TỔNG HỢP TINH BỘT Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA VIỆT NAM

Phan Thị Bầy, Nguyễn Công Hương, Lê Thị Muội, Nguyễn Đức Thành

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Gạo chứa gần 90% tinh bột. Tinh bột gạo là hợp chất của amylose và amylopectin. Sự tổng hợp tinh bột trong nội nhũ lúa được điều khiển chủ yếu bởi các gen *wx*, *sbe* và gen *sss*. Gen *wx* mã hóa cho enzyme tổng hợp tinh bột dạng hạt liên kết mạch thẳng GBSS (granule-bound starch synthase) hay còn gọi là protein waxy, có vai trò hoạt động chính trong sự tổng hợp amylose. Gen *sbe* mã hóa cho enzyme phân cành tinh bột SBE (starch branching enzyme) và gen *sss* mã hóa cho enzyme tổng hợp tinh bột hòa tan SSS (soluble starch synthase), 2 gen này có vai trò hoạt động chính trong sự tổng hợp amylopectin. Việc nghiên cứu mối liên quan giữa các microsatellite có trong các gen *wx*, *sbe* và gen *sss* với các đặc điểm chất lượng tinh bột ở một số giống lúa đã được nghiên cứu và công bố trước đây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai cặp mồi Wx (484F, 485R) và Sbe (486F, 487R) để nhân các đoạn DNA microsatellites (CT)_n có trong các gen *wx* và *sbe* ở 17 dòng/giống lúa thí nghiệm thuộc 2 nhóm lúa indica và japonica (5 dòng/giống lúa tẻ thuộc nhóm indica và 12 giống lúa nếp thuộc nhóm japonica). Kết quả PCR của cặp mồi 484 F, 485R với 17 dòng/giống lúa đã nhận được 4 allele *wx*, sản phẩm PCR có độ dài nằm trong khoảng 100 - 200 bp. Hai đoạn DNA nhân được trong gen *sbe* của các dòng/giống lúa có độ dài nằm trong khoảng 200 - 300 bp. Phân tích trình tự DNA sản phẩm PCR gen *sbe* của 11 giống lúa nếp và 4 dòng/giống lúa tẻ cho thấy có 2 loại microsatellite (CT)_n lặp lại là (CT)₈ (allele *sbe-A*) và (CT)₁₀ (allele *sbe-B*). Tất cả các dòng/giống lúa indica có allele *sbe-A*, các giống lúa japonica có 9 giống mang allele *sbe-B* và 2 giống mang allele *sbe-A*. Allele *sbe-A* dài 206 bp, allele *sbe-B* dài 202 bp. Các microsatellite này có thể sử dụng trong việc đánh giá và chọn giống lúa chất lượng.

Từ khóa: Chất lượng tinh bột, gen *sbe*, gen *wx*, enzyme phân cành tinh bột, enzyme tổng hợp tinh bột hạt liên kết

MỞ ĐẦU

Chất lượng nấu và ăn của gạo bị ảnh hưởng chính bởi các tính chất lý, hóa của tinh bột gạo. Đặc biệt, sự biến đổi hàm lượng amylose ảnh hưởng trực tiếp đến độ mềm dẻo của cơm. Gạo có hàm lượng amylose thấp cho cơm bóng mềm và dính, ngược lại gạo có hàm lượng amylose cao cho cơm cứng và rời. Tuy nhiên, chất lượng ăn của gạo còn có sự khác nhau giữa các giống lúa có hàm lượng amylose như nhau, điều đó là do có sự khác nhau về cấu trúc của amylopectin (Reddy *et al.*, 1993). Đặc biệt, các giống lúa nếp là các giống lúa có hàm lượng amylose rất thấp, chủ yếu là amylopectin, nên chất lượng nấu và ăn của chúng bị ảnh hưởng chủ yếu bởi tính chất của các nhóm amylopectin (Bao *et al.*, 2002).

Về hóa sinh học, hàm lượng amylose được điều khiển bởi protein waxy sản phẩm của gen *wx*. Bốn microsatellite (CT)_n tiêu biểu trong gen *wx*, gen ghi mã cho enzyme tổng hợp amylose là (CT)₁₆, (CT)₁₇,

(CT)₁₈, (CT)₁₉ đã được xác định bởi Bao và đồng tác giả (2002) ở một số giống lúa có protein waxy. Trong đó, các microsatellite (CT)₁₇, (CT)₁₈ có chủ yếu ở các giống lúa japonica và có hàm lượng amylose thấp hơn các giống lúa mang microsatellite (CT)₁₆ hoặc (CT)₁₉ ở các giống lúa indica. Một số nghiên cứu khác cũng đã cho thấy đa dạng các microsatellite (CT)_n trong vùng 5'- không dịch mã của gen *wx* có 8 microsatellite và sự tác động của các microsatellite này ảnh hưởng đến sự biến đổi hàm lượng amylose ở các giống lúa indica là 82-88% (Ayres *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1999; Bergman *et al.*, 2001). Hàm lượng Amylopectin được điều khiển chủ yếu bởi gen *sbe* (gen ghi mã cho enzyme phân cành tinh bột) và gen *sss* (gen ghi mã cho enzyme tổng hợp tinh bột hòa tan) (Smith *et al.*, 1997). Các nghiên cứu ban đầu đã phát hiện gen *sbe* có các microsatellite (CT)_n (Akagi *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1994...). Gần đây, Bao và đồng tác giả (2002) đã tìm thấy các microsatellite (CT)_n trong gen *sbe* là (CT)₈ và (CT)₁₀. Các đoạn đó tạo thành 3

nhóm allele microsatellite kết hợp với đoạn chèn dài 11 bp. So sánh tính chất lý hóa của tinh bột gạo giữa các nhóm microsatellite trong gen *sbe* cho thấy: nhóm allele *sbe-A* chứa microsatellite (CT)₁₀ có nhiệt độ hóa hồ và hàm lượng amylose cao hơn nhóm allele microsatellite (CT)₈. Các tác giả cũng đã xác định ở lúa indica chỉ có allele *sbe-A* và ở lúa japonica chủ yếu là allele *sbe-B*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng 17 dòng/giống lúa (12 giống lúa nếp thuộc nhóm japonica và 5 dòng/giống lúa tẻ thuộc nhóm indica) với hai cặp mồi Wx (484, 485) và Sbe (486, 487) đã được Bao và đồng tác giả công bố năm 2002 để nhân các đoạn DNA có các microsatellites (CT)_n trong gen *wx* và gen *sbe*. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định các microsatellite trong gen *wx* và gen *sbe* ở một số giống lúa nếp đặc sản Việt Nam và một số dòng/giống lúa tẻ chất lượng, mới chọn tạo tại Viện Công nghệ sinh học. Dựa vào đặc điểm các microsatellite có thể đánh giá và phân nhóm các dòng/giống lúa nghiên cứu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Vật liệu thực vật sử dụng trong thí nghiệm này là 17 dòng/giống lúa bao gồm: 12 giống lúa nếp và 5 dòng/giống lúa tẻ thứ tự như sau: 1. Nếp Cái Hoa Vàng; 2. Nếp Hương; 3. Nếp Cái ; 4. Nếp Hoa Vàng;

5. Nếp Cái Nương; 6. Nếp Tú Lệ; 7. Nếp Cẩm; 8. Nếp Nương thơm hạt tròn (RDB 09); 9. Nếp Nương thơm Cao Bằng; 10. Nếp Đập; 11. Nếp Nương hạt dài; 12. Nếp Nương Lạng Sơn (Khẩu nửa chia sây); 13. Khao Dawk mali (KDML105); 14. WAB56-125; 15. HPD61; 16. KW1; 17. HPKW2.

Mười hai giống lúa nếp đặc sản Việt Nam nhận từ Trung tâm Tài nguyên Di truyền Thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. Hai giống KDML105 và WAB56-125 nhận từ Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế. KDML105 là giống lúa chất lượng cao, dài ngày có tính cảm quang với ánh sáng rất chặt, chỉ trồng được vào vụ đông, WAB56-125 giống lúa ngắn ngày chống đổ và chịu hạn tốt. HPD61 là dòng lúa nuôi cấy hạt phấn từ giống lúa KDML105, đã được cải tạo có thời gian sinh trưởng ngắn, trồng được 2 vụ trong năm, HPKW2 là dòng lúa nuôi cấy hạt phấn cây lai F1 của tổ hợp lai giữa hai giống lúa KDML105 và WAB56-125, có năng suất cao chất lượng tốt trồng được 2 vụ trong năm, KW1 là cây lai F7 của tổ hợp lai giữa hai giống lúa KDML105 và WAB56-125, 3 dòng lúa này được chọn tạo tại Phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

Các cặp mồi cho PCR

Hai cặp mồi Wx (484F, 485R) và Sbe (486F, 487R) sử dụng trong thí nghiệm được mua từ hãng Alpha-Canada. Trình tự các cặp mồi được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi.

Tên mồi	Trình tự mồi	Gen liên quan	Kích thước sản phẩm	Tài liệu tham khảo
Wx (484- F)	5'- CTTTGTCTATCTCAAGACAC -3'	<i>wx</i>	120 - 126 bp	Bao <i>et al.</i> , 2002
Wx (485- R)	5'- TTGCAGATGTTCTTCCTGATG -3'			
Sbe (486- F)	5'- ATTTCTTTGGCCACAGGCGA -3'	<i>sbe</i>	191 - 206 bp	Bao <i>et al.</i> , 2002
Sbe (487-R)	5'- CCCAGATTCGGAACAAGAAC -3'			

Phương pháp

Tách chiết DNA từ lá lúa theo phương pháp dùng CTAB của Sahgai-Marooof và đồng tác giả (1984) có cải tiến. Độ tinh sạch và nồng độ DNA được xác định bằng máy đo quang phổ hấp thụ Hewlett Parkard.

PCR được tiến hành với tổng thể tích 25 µl,

thành phần phản ứng bao gồm: nước vô trùng 15 µl; dung dịch đệm 10x PCR: 2,5 µl; dNTP (2,5 mM): 1,5 µl; MgCl₂ (50 mM): 0,5 µl; mồi xuôi (50 ng/µl): 1 µl; mồi ngược (50 ng/µl): 1 µl; Taq polymerase (1 UI/µl): 1 µl; DNA mẫu tách từ lá lúa 2,5 µl (20 ng/µl). Chương trình chạy PCR với 2 mồi Wx và Sbe theo các bước sau: 1: 94°C - 5 phút; 2: 94°C - 45 giây; 3: 58°C - 1 phút; 4: 72°C - 1 phút; 5: 40 chu kì của các bước 2 + 3 + 4; 6: 72°C - 7 phút.

Phương pháp điện di DNA trên gel agarose

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel 1% agarose. Mẫu DNA (sản phẩm PCR) được trộn đều với dung dịch hiển trước khi nạp mẫu vào giếng. Thời gian điện di khoảng 2 h ở điện thế 70 V. Nhuộm DNA bằng ethidium bromide (EtBr), trong thời gian 30 phút. Rửa gel bằng nước cất trong 30 phút. Sau đó, bản gel được quan sát và chụp ảnh dưới đèn tử ngoại.

Phương pháp điện di DNA trên gel polyacrylamide

Sản phẩm PCR (với mỗi Sbe) thêm 8 µl dung dịch tra mẫu 3x SSR (0,2 ml 5 M NaOH; 95 ml formamide 95%; 50 µg bromophenol blue; 50 µg xylene cyanol FF; nước cất vô trùng đến 100 ml), biến tính ở 94°C trong 10 phút sau đó lấy 5 µl hỗn hợp đã biến tính tra vào các giếng. Thời gian chạy điện di khoảng 2 h với dòng điện 70 W. Sau khi chạy điện di cố định gel bằng dung dịch cố định 10% acetic acid trong 30 phút, tiếp theo rửa gel 2 lần, mỗi lần 3 phút bằng nước cất. Nhuộm gel bằng dung dịch nhuộm (1 g AgNO₃; 1,5 ml formaldehyde 37%; trong 1 l nước), thời gian nhuộm 30 - 60 phút. Tráng gel đã nhuộm bằng nước cất, sau đó, cho gel vào dung dịch hiển gồm 30 g natri carbonate; 1,5 ml formaldehyde; 0,4 ml natri thiosulfate 10 mg/µl đã được làm lạnh ở 10°C. Cố định gel bằng dung dịch dừng trong 3 - 5 phút. Cuối cùng tráng gel bằng nước cất và để khô ở nhiệt độ phòng, sau đó soi và chụp ảnh.

Tinh sạch sản phẩm PCR và đọc trình tự nucleotide

Sử dụng Kit tinh sạch "Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega) để loại các ddNTP và mồi còn thừa sau khi PCR nhờ lớp màng được thiết kế đặc biệt để thu nhận DNA tinh sạch. Xác định trình tự DNA bằng máy ABI PRISM™3100 Genetic Analyzer theo phương pháp enzyme của Sanger, đánh dấu mỗi loại ddNTP bằng một màu huỳnh quang khác nhau để thực hiện các phản ứng trên cùng một eppendorf. Điện di trong ống mao quản có gắn với bộ phận dò có khả năng phát hiện các ddNTP khác nhau, sau đó vào hệ thống vì tính xử lý để cho ra kết quả. Trình tự nucleotide được xử lý bằng phần mềm ABI PRISM™ 3100 Data Collection v2.0 và DNA Sequencing Analysis.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân tích vùng gen wx

Cặp mồi Wx (484F-485R) được sử dụng để nhân các đoạn DNA có microsatellite (CT)_n trong gen wx (Bao *et al.*, 2002). Gen wx là gen nằm trên nhiễm sắc thể số 6 mã hóa cho enzyme tổng hợp tinh bột dạng hạt liên kết GBSS, có vai trò tổng hợp các hạt tinh bột, tạo nên thành phần không tan của tinh bột, quyết định hàm lượng amylose trong gạo. Kết quả PCR với cặp mồi Wx (484F-485R) được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR với cặp mồi Wx (484F-485R). 1. Nếp Cái Hoa Vàng; 2. Nếp Hương; 3. Nếp Cái; 4. Nếp Hoa Vàng; 5. Nếp Cái Nương; 6. Nếp Tú Lệ; 7. Nếp Cẩm; 8. Nếp Nương thơm hạt tròn (RDB 09); 9. Nếp Nương thơm Cao Bằng; 10. Nếp Đập; 11. Nếp Nương hạt dài; 12. Nếp Nương Lạng Sơn (Khẩu nửa chia sảy); 13. Khao Dawk mai (KDML105); 14. WAB56-125; 15. HPD61; 16. KW1; 17. HPKW2; M: Marker.

Điện di đồ sản phẩm PCR cho thấy, sản phẩm PCR của DNA các giống lúa thí nghiệm với cặp mồi Wx (484F-485R) là các đoạn DNA có độ dài nằm trong khoảng 100 - 126 bp, so với marker có thể thấy các băng tương ứng từ bé đến lớn ở các giống lúa theo thứ tự sau:

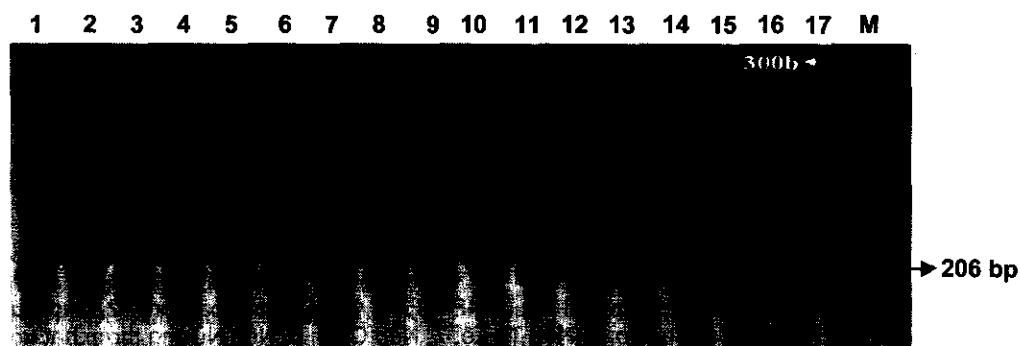
1) Băng có kích thước bé nhất khoảng 100 bp ở các giống: WAB56-125 - số 14 và KW1 - số 16, allele mang băng này ký hiệu *wx-D*. Như vậy, Giống lúa WAB56 - 125 và dòng KW1 có cùng kích thước và cùng allele *wx-D*, có thể dòng lúa KW1 mang gen di truyền của cây bố (WAB56-125) và có gen điều khiển quá trình tổng hợp amylose (gen *wx*) tương tự cây bố. 2) Băng tiếp theo có kích thước lớn hơn 100 bp ở các giống: Nếp Nương hạt dài - số 11; Khẩu nửa chia sây - số 12; KDML105 - số 13; HPD61 - số 15; HPKW2 - số 17, allele mang băng này ký hiệu *wx-C*. Trên hình cũng cho thấy giống Khao Dawk Mali (giống số 13) và dòng nuôi cấy hạt phân của chính nó HPD61 - giống 15 cùng dòng HPKW2 - giống 17 mang băng có kích thước gần như nhau nên cùng nhóm allele *wx-C*, có thể 2 dòng lúa HPD61 và HPKW2 mới chọn tạo bằng phương pháp nuôi cấy hạt phân mang gen di truyền giống cây Khao Dawk Mali. 3) Băng có độ dài lớn hơn 100 bp tiếp theo ở các giống: Nếp Cái - số 3; Nếp Hoa Vàng - số 4; Nếp Cái Nương - số 5; Nếp Cẩm - số 7; RDB 09 - số 8; Nếp Đập - số 10 đây là các giống lúa nếp, allele mang băng này ký hiệu *wx-B*. Theo cơ sở lý thuyết có thể đây là allele có microsatellite (CT)₁₇ đây cũng là nhóm allele có ở nhiều giống lúa nhất của thí nghiệm. 4) Ứng với băng có kích thước lớn nhất có: Nếp Cái Hoa Vàng - số 1; Nếp Hương - số 2; Nếp Tú Lệ - số 6; Nếp Nương thơm cao Bằng -

số 9, đây cũng là các giống lúa nếp nhưng các giống này mang băng có kích thước lớn hơn nhóm trên có thể đây là allele mang microsatellite (CT)₁₈, allele này ký hiệu *wx-A*. Tương tự, nghiên cứu của Bao và đồng tác giả (2002) cũng đã cho thấy sản phẩm PCR của cặp mồi Wx (484F - 485R) với DNA các giống lúa mang gen *waxy* có độ dài trong khoảng 120 - 126 bp, trình tự các microsatellite là (CT)₁₆, (CT)₁₇, (CT)₁₈, (CT)₁₉. Trong đó phổ biến nhất là microsatellite (CT)₁₇. Tác giả cũng đã xác định các giống lúa thuộc nhóm japonica chủ yếu mang allele microsatellite (CT)₁₇ và (CT)₁₈.

Như vậy, kết quả PCR với cặp mồi Wx (484F-485R) đã nhận được 4 allele trong gen *wx*. Kết quả thí nghiệm này cũng cho thấy các giống lúa nếp (nhóm japonica) có gen *wx* chứa đoạn DNA lớn hơn, theo cơ sở lý thuyết có thể đó là các microsatellite (CT)₁₇ và (CT)₁₈. Các dòng/giống lúa tẻ (nhóm indica) mang đoạn trình tự (CT)_n ngắn hơn, trong đó nhóm lúa mang allele *wx-C* có thể có microsatellite (CT)₁₆. Kết quả này, có thể đánh giá cặp mồi Wx (484F-485R) sử dụng đã bước đầu xác định được mức độ khác nhau giữa hai nhóm lúa indica và japonica và có thể dùng các allele này để đánh giá và phân nhóm các dòng/giống lúa.

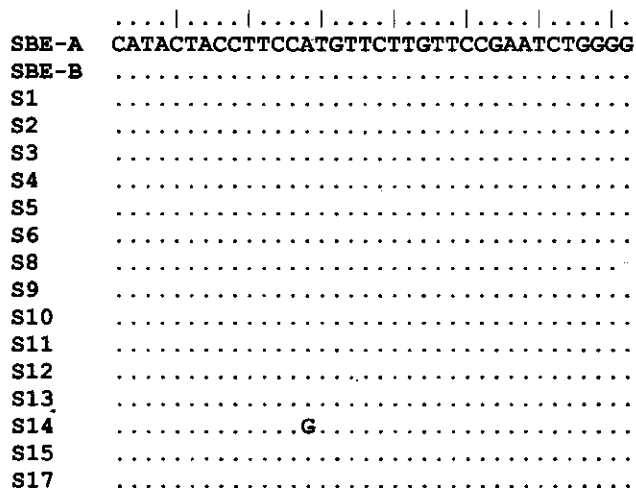
Kết quả phân tích vùng gen *sbe*

Cặp mồi Sbe (486F-487R) được sử dụng để nhân đoạn trình tự (CT)_n có trong gen *sbe* (Bao *et al.*, 2002). Gen *sbe* là gen mã hóa cho enzyme phân nhánh tinh bột-SBE là enzyme quan trọng nhất trong quá trình tổng hợp amylopectin. Gen này nằm trên nhiễm sắc thể số 6. Kết quả PCR với cặp mồi *sbe* (486F-487R) được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR với cặp mồi Sbe (486F - 487R).

		10	20	30	40	50
SBE-A		CCCCGACACCCACCGC	--CGACCACCTCGCCGCCGGC	--CACCGCTCCC		
SBE-B						
S1					GG	
S2					GG	T..
S3					GG	
S4					GG	
S5					GG	
S6					GG	
S8					GG	
S9			AT		GG	
S10					GG	
S11					GG	
S12					GG	
S13					GG	
S14					GG	
S15					GG	
S17					GG	
		60	70	80	90	100
SBE-A		C-TTTGCCGCCGTGGCTCTACCTCCTTCCCACTCTCCCGTCCTTCTCCT				
SBE-B						
S1			C	G		
S2		C				
S3			C			
S4			C			
S5			C			
S6			C			
S8			C			
S9		C		C		
S10		C		C		
S11			C			
S12			C			
S13						
S14						
S15						
S17						
		110	120	130	140	150
SBE-A		AGCCTCCCTCCTCTCTCTCTCTCTCTCAATACTTTTTCTACCTTT				
SBE-B			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S1			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S2			CTCTCTCTCTCTCTCTCT			
S3			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S4			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S5			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S6			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S8			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S9			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S10			CTCTCTCTCTCTCTCTCT			
S11			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S12			CTCTCTCTCTCTCTCT			
S13			CTCTCTCTCTCTCTCTCT			
S14			CTCTCTCTCTCTCTCTCT			
S15			CTCTCTCTCTCTCTCTCT			
S17			CTCTCTCTCTCTCTCTCT			
		160	170	180		



Hình 3. Trình tự đoạn gen *sbe* (sản phẩm PCR) của 15 dòng/kiểu lúa thí nghiệm.

Hình 2 cho thấy, các giống lúa đều mang băng có kích thước ở vùng trên 200 bp. Theo tính toán lý thuyết các băng này dài 202 và 206 bp (Bao *et al.*, 2002). Băng dài 202 bp có ở các giống lúa ứng với giếng số 1,3 - 9,11 - 12 (Nếp Cái Hoa Vàng, Nếp Cái, Nếp Hoa Vàng, Nếp Cái Nương, Nếp Nương thơm Cao Bằng, Nếp Cẩm, Nếp Nương thơm hạt tròn, Nếp Tú Lệ, Nếp Nương hạt dài, Khẩu nửa chia sây). Băng dài 206 bp có ở các giống lúa ứng với giếng số 2, 10,13 - 17 (Nếp Hương, Nếp Đập, KDML105, WAB56-125, HPD61, KW1, HPKW2). Như vậy, có thể thấy cặp mồi Sbe (486F - 487R) đã nhân bản được các đoạn DNA mong muốn đúng kích thước theo cơ sở lý thuyết. Tương tự, Bao và đồng tác giả (2002) đã nghiên cứu và xác định được trong gen *sbe* của một số giống lúa thí nghiệm có các đoạn (CT)₈ hoặc (CT)₁₀ cùng với một đoạn xen CTCTCGGGCGA hoặc không có đoạn xen. Tác giả cũng đã xác định rằng các giống lúa thuộc nhóm indica thường có đoạn (CT)₁₀ còn các giống lúa thuộc nhóm japonica thường có đoạn (CT)₈. Kết quả trên đây đã bước đầu xác định được mức độ đa hình về các allele trong gen *sbe* giữa các giống lúa nghiên cứu và giữa hai nhóm lúa indica và japonica.

Để đánh giá chính xác các microsatellites (CT)_n trong gen *sbe* ở các giống lúa nghiên cứu, chúng tôi đã đọc trình tự DNA sản phẩm PCR của cặp mồi Sbe, kết quả đọc trình tự được ghi nhận ở hình 3.

Hình 3 cho thấy, trình tự nucleotide đọc được của sản phẩm PCR mà chúng tôi thu nhận có độ dài 186 bp (so với độ dài đoạn DNA nhận được 202 và

206 bp trên diện di đồ hình 2 còn thiếu 20 nucleotide của đoạn đầu không đọc được). Các giống lúa mang băng 202 bp chứa microsatellite (CT)₈, còn các giống lúa mang băng 206 bp chứa microsatellite (CT)₁₀.

Trên hình 3 và bảng 2 cũng cho thấy độ tương đồng nucleotide của gen *sbe* ở các giống lúa thí nghiệm so với allele *sbe-A* đã công bố dao động trong khoảng 94 - 99%, so với allele *sbe-B* dao động trong khoảng 95 - 98%. Độ tương đồng giữa các giống lúa với nhau dao động trong khoảng 94 - 100%. Đặc biệt, 6 giống lúa nếp mang allele *sbe-B* chứa microsatellite (CT)₈ có độ tương đồng với nhau 100% bao gồm các giống ứng với các giếng trên điện di theo thứ tự sau: Nếp Cái - số 3 ; Nếp Hoa Vàng - số 4; Nếp Cái Nương - số 5; Nếp Tú Lệ - số 6; Nếp Nương hạt dài - số 11; Khẩu nửa chia sảy - số 12. Các giống lúa tẻ thuộc nhóm indica mang allele *sbe-A* chứa microsatellite (CT)₁₀ có độ tương đồng với nhau 100% bao gồm các giống: KDML105- số 13, HPD61- số 15 và HPKW2- số 17. Như vậy, có thể sử dụng các microsatellite này trong phân loại và chọn giống lúa chất lượng

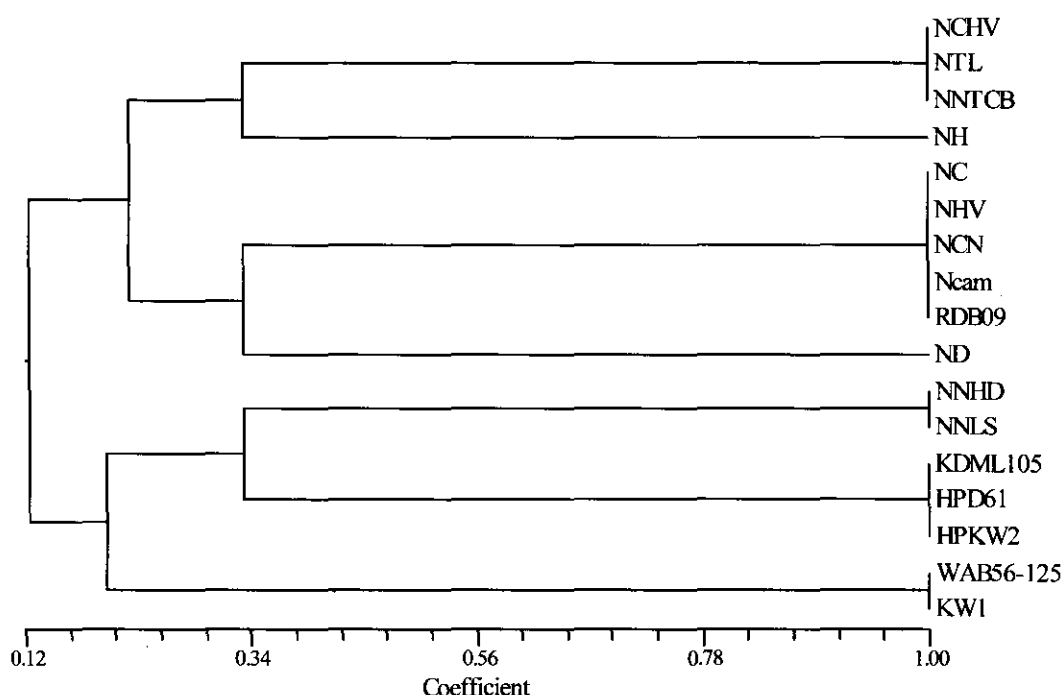
Kết quả PCR của 2 cặp mồi trên đây với 17 dòng/giống lúa thí nghiệm cho thấy: các dòng/giống lúa có di truyền phân tử liên quan đến 2 đại lượng chất lượng tinh bột là: hàm lượng amylose được điều khiển bởi gen *wx* và hàm lượng amylopectin được điều khiển chủ yếu bởi gen *sbe* là khác nhau. Có thể đánh giá bước đầu theo số liệu tổng hợp trong bảng 3.

Bảng 2. Bảng hệ số tương đồng di truyền gen *sbe* giữa 17 dòng/giống lúa thí nghiệm.

Seq->	SBE-A	SBE-B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S17
SBE- ID																	
A																	
SBE- 0.977 ID																	
B																	
S1 0.945 0.966 ID																	
S2 0.978 0.956 0.945 ID																	
S3 0.961 0.983 0.983 0.961 ID																	
S4 0.961 0.983 0.983 0.961 1.000 ID																	
S5 0.961 0.983 0.983 0.961 1.000 1.000 ID																	
S6 0.961 0.983 0.983 0.961 1.000 1.000 1.000 ID																	
S8 0.956 0.977 0.977 0.956 0.994 0.994 0.994 0.994 ID																	
S9 0.946 0.967 0.967 0.956 0.983 0.983 0.983 0.983 0.978 ID																	
S10 0.956 0.977 0.977 0.967 0.994 0.994 0.994 0.994 0.988 0.989 ID																	
S11 0.961 0.983 0.983 0.961 1.000 1.000 1.000 1.000 0.994 0.983 0.994 ID																	
S12 0.961 0.983 0.983 0.961 1.000 1.000 1.000 1.000 0.994 0.983 0.994 1.000 ID																	
S13 0.989 0.967 0.956 0.989 0.972 0.972 0.972 0.972 0.967 0.956 0.967 0.972 0.972 ID																	
S14 0.983 0.961 0.950 0.983 0.967 0.967 0.967 0.967 0.961 0.951 0.961 0.967 0.967 0.994 ID																	
S15 0.989 0.967 0.956 0.989 0.972 0.972 0.972 0.972 0.967 0.956 0.967 0.972 0.972 1.000 0.994 ID																	
S17 0.989 0.967 0.956 0.989 0.972 0.972 0.972 0.972 0.967 0.956 0.967 0.972 0.972 1.000 0.994 1.000 ID																	

Bảng 3. Bảng phân nhóm các giống lúa theo các allele có trong gen *wx* và gen *sbe*.

Giống	Các allele trong gen <i>wx</i>				Các allele trong gen <i>sbe</i>		Phân nhóm các cây lúa giống nhau cả 2 gen
	<i>wx-A</i>	<i>wx-B</i>	<i>wx-C</i>	<i>wx-D</i>	<i>sbe-A</i>	<i>sbe-B</i>	
1. Nếp Cái Hoa Vàng	+					+	2
2 Nếp Hương	+				+		6
3 Nếp Cái		+				+	1
4. Nếp Hoa Vàng		+				+	1
5. Nếp Cái Nương		+				+	1
6. Nếp Tú Lệ	+					+	2
7. Nếp Cẩm		+				+	1
8. Nếp Lạng Sơn		+				+	1
9. Nếp Cao Bằng	+					+	2
10. Nếp Đập		+			+		7
11. Nếp Nương hạt dài			+			+	4
12. Khẩu nửa chia sảy			+			+	4
13. KDML105			+		+		3
14. WAB56-125				+	+		5
15. HPD61			+		+		3
16. KW1				+	+		5
17. HPKW2			+		+		3
Số giống ứng với mỗi allele	4	6	5	2	7	10	



Hình 3. Cây phân nhóm các dòng/giống lúa nghiên cứu dựa vào kết quả 2 cặp mồi Wx (484F - 485R) và Sbe (486F - 487R).

Bảng 3 tổng hợp cho thấy, từ 17 dòng/giống lúa nghiên cứu ứng với mỗi allele có: 4 giống lúa nếp mang allele *wx-A*, 6 giống lúa nếp tiếp theo mang allele *wx-B*, 2 giống lúa nếp còn lại mang allele *wx-C*. Năm dòng/giống lúa tẻ có 3 mang allele *wx-C* và 2 mang allele *wx-D*. Bảy giống (5 tẻ, 2 nếp) mang allele *sbe-A* và 10 giống lúa nếp mang allele *sbe-B*.

Mười bảy dòng/giống lúa ứng với 2 allele có thể phân vào các nhóm trong bảng 3 và hình 3.

Nhóm 1: Năm giống mang allele *wx-B* và *sbe-B* có: Nếp Cái (NC); Nếp Hoa Vàng (NHV); Nếp Cái Nương (NCN); Nếp Cẩm (Ncam); Nếp Nương Lạng Sơn (RDB 09).

Nhóm 2: Ba giống mang allele *wx-A* và *sbe-B* có: Nếp Cái Hoa Vàng (NCHV); Nếp Tú Lệ (NTL); Nếp Nương thơm Cao Bằng (NNTCB).

Nhóm 3: Ba giống mang allele *wx-C* và *sbe-A* có: KDML105; HPD61; HPKW2.

Nhóm 4: Hai giống mang allele *wx-C* và *sbe-B* có: Nếp Nương hạt dài; Nếp Khẩu nửa chia sảy.

Nhóm 5: Hai giống mang allele *wx-D* và *sbe-A* có: WAB56-125; KW1.

Ngoài ra, có 2 giống riêng lẻ là Nếp Hương (NH) mang allele *wx-A* và *sbe-A*, Nếp Đập (ND) - số 10 mang allele *wx-B* và *sbe-A*.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nhận được trên đây chúng tôi có những nhận xét sau:

Kết quả PCR với các cặp mồi Wx (484F - 485R) và Sbe (486F - 487R) đã tổng hợp được các đoạn DNA đặc hiệu.

PCR với mồi Wx (484F - 485R) nhận được 4 nhóm allele từ 17 dòng/giống lúa thí nghiệm. Allele *wx-A* và *wx-B* chỉ có ở các giống lúa nếp, allele *wx-D* chỉ có ở các dòng/giống lúa tẻ, riêng allele *wx-C* có ở cả lúa nếp và lúa tẻ.

Với cặp mồi Sbe (486F - 487R) đã nhận được 2 nhóm allele *sbe-A* và *sbe-B*. Allele *sbe-A* chứa microsatellite (CT)₁₀ và *sbe-B* chứa microsatellite (CT)₈. Allele *sbe-B* chỉ có ở các giống lúa nếp. Các giống lúa tẻ mang allele *sbe-A*, có 2 giống lúa nếp mang allele *sbe-A* là Nếp Đập và Nếp Hương có thể 2 giống lúa này có nguồn gốc từ lúa lai giữa hai họ

phụ khác nhau.

Kết quả thí nghiệm này đã cho thấy sự khác nhau rất rõ về nguồn gen tổng hợp amylose (*wx*) và gen tổng hợp amylopectin (*sbe*) giữa 2 nhóm lúa nếp và lúa tẻ.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Công nghệ sinh học thông qua đề tài cơ sở. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trung tâm Tài nguyên Di truyền thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam đã cung cấp các mẫu giống lúa. Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi đã nhận được sự nhiệt tình cộng tác của KTV Đào Thị Hạnh và sử dụng một số trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện công nghệ sinh học

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fujimura T (1996) Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 93: 1071-1077.

Ayres NM, McClung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA, Park WD (1997) Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. *Theor Appl Genet* 94: 773-781.

Bao JS, Corke H, Sun M (2002) Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa*

L.) *Theor Appl Genet* 105(6-7): 898-905.

Bao JS, Corke H, Sun M (2006) Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and sequence tagged in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet* 113: 1185-1196.

Bergman CJ, Delgado JT, McClung AM, Fjellstrom RG (2001) An improved method for using a microsatellite in the rice waxy gene to determine amylose class. *Cereal Chem* 78:257-260.

Nakamura Y, Nagamura Y, Kurta N, Minobe Y (1994) Linkage location of the starch branching enzyme I (Q-enzyme I) gene in rice. *Theor Appl Genet* 89: 859-860.

Reddy KR, Ali SZ, Bhattacharya KR (1993) The fine structure of rice starch amylopectin and its relation to the texture of cooked rice. *Carbohydr Polym* 22: 267-275.

Shu QY, Wu DX, Xia YW, Gao MW, Ayres NM, Larkin PD, Park WD (1999) Microsatellite polymorphisms on the waxy gene locus and their relationship to amylose content in *indica* and *japonica* rice, *Oryza sativa* L. *Acta Genet Sinica* 26: 350-358.

Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1984) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosome location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466-5470.

Smith AM, Denyer K, Martin (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 67-87.

CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITES IN STARCH - SYNTHESIZING GENES OF SOME VIETNAMESE RICE ACCESSIONS

Phan Thi Bay*, Nguyen Cong Huong, Le Thi Muoi, Nguyen Duc Thanh

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Starch comprises ~ 90% of milled rice and it is composed of amylose and amylopectin. The synthesis of starch in rice endosperm is primarily controlled by *wx*, *sbe*, *sss* genes. The *wx* gene encoding granule-bound starch synthase (GBSS) plays a major role in the synthesis of amylose. The *sbe* gene encoding starch branching enzyme I (SBE) and the *sss* gene encoding soluble starch Synthase I (SSS) play a major role in the synthesis of amylopectin. The study of the relationship between the *wx* (CT)_n, *sbe* (CT)_n, *sss* (CT)_n microsatellites and starch quality parameters has been previously reported. In this study, we used primers for amplifying microsatellites in the *wx* and *sbe* genes in 17 rice accessions (varieties and breeding lines). Five of the 17 accessions were *indica* and 12 were *japonica* rice. Four alleles of *wx* gene

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38363470; E-mail: baypt54@yahoo.com

were amplified in 17 rice accessions, the amplified products ranged from 120 to 126 bp in length. Two alleles of *sbe* (CT)_n were amplified in a region of the *sbe* gene in both the indica and japonica rice subspecies. DNA sequencing analysis of 4 indica and 11 japonica rice accessions showed that there were only two classes of (CT)_n repeats, (CT)₈ and (CT)₁₀ at *sbe* locus. The two *sbe* alleles detected in this study were classified as follows: the allele (CT)₁₀ (*sbe-A*) had 206 bp in length, the allele (CT)₈ (*sbe-B*) had 202 bp in length. All three indica rice accessions had the *sbe-A* alleles, 6 of 7 japonica rice accessions had *sbe-B* and 1 remained had the *sbe-A* alleles. These microsatellites might be useful in marker-assisted breeding in rice.

Keywords: microsatellites, granule-bound starch synthase, starch branching enzyme, *wx* gene, *sbe* gene, starch, starch quality