

XÁC ĐỊNH CÁC DÒNG LÚA LAI BẰNG HỆ ISOENZYM ESTERAZA

**Hoàng Thị Hoà, Nguyễn Thị Biên,
Ngô Thị Hoan, Trần Thị Nhuận**
*Khoa Sinh học, Trường ĐHKHTN,
ĐQGHN*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa có tầm quan trọng sống còn đối với đời sống của hơn một nửa dân số thế giới. Trong ba thập kỷ gần đây, thành tựu nổi bật trong nông nghiệp Trung Quốc là sử dụng rộng rãi lúa lai F1 trong sản xuất. Lúa lai đã đạt năng suất cao hơn lúa thường 20% trong nhiều năm trên phạm vi toàn quốc. Chỉ với 7% diện tích trồng trọt so với toàn thế giới, Trung Quốc đã sản xuất đủ lương thực nuôi sống 22% nhân loại [7].

Việt Nam bắt đầu nghiên cứu lúa lai từ những năm 1980. Những năm gần đây, nước ta đã nhập một số tổ hợp lúa lai của Trung Quốc. Trung tâm nghiên cứu lúa lai của Việt Nam và một số Viện, Trường Đại học đang đảm trách việc tạo ra các tổ hợp lúa lai của Việt Nam có những tính trạng quý để ngày càng đáp ứng được nhu cầu tiêu dùng trong nước và xuất khẩu.

Muốn đạt được những tính trạng mong muốn như năng suất, tính chống chịu, khả năng thích nghi, chất lượng sản phẩm và nhân tố hình thái có liên quan, thì việc chọn bố mẹ cho chương trình lai có vai trò quyết định sự thành công trong chọn, tạo con lai sau này. Có thể nói tính đa dạng di truyền là một trong các yếu tố quan trọng để tạo ra con lai có ưu thế lai cao.

Trong lĩnh vực di truyền và chọn giống thực vật, phân tích hệ isozym được coi như một biện pháp cực kỳ hữu hiệu. Đây là phương pháp đã được áp dụng thành công để tạo ra các con lai có ưu thế lai một cách dễ dàng. Đã có nhiều công trình trong và ngoài nước sử dụng

một số hệ isozym để phân tích tính đa hình và nhận biết con lai ở thực vật. Nhiều tác giả đã công bố kết quả về các vấn đề có liên quan như nghiên cứu hệ isozym esteraza và peroxidaza của một số dòng nội phối và các cặp lai ở ngô [5], nghiên cứu tính đa hình phổ isozym EST của một số dòng lúa [1, 4, 8], xác định con lai khoai tây từ các thể dung hợp tế bào trần [6], phân loại sả chanh bằng isozym [3]. Trong những năm gần đây, việc phân tích sự đa hình phổ isozym đã được ứng dụng rộng rãi cho nghiên cứu đa dạng di truyền của thực vật. Tính đa dạng di truyền có vai trò rất quan trọng. Trên thế giới có tới 50% số loài thực vật biểu hiện tính đa hình lớn. Việc sử dụng thực vật hoang dại và tính đa hình của chúng như là một nguồn gen quý để cải tạo giống cây trồng đang là mục tiêu hàng đầu của nền nông nghiệp bền vững [9].

Ngày nay với sự hỗ trợ của các chỉ thị phân tử, người ta có thể xác định được nhanh chóng mức độ tương đồng di truyền ở mức độ quần thể, nhóm loài, thậm chí cá thể, xác định con lai v.v... Tuy nhiên, không phải phòng thí nghiệm nào cũng có đầy đủ máy móc và hoá chất để nghiên cứu ở mức độ phân tử. Việc sử dụng hệ isoenzym để xác định các cặp bố mẹ trước khi đem lai và để xác định con lai vừa dễ sử dụng, đỡ tốn kém và có độ chính xác cao đã và đang được ứng dụng rộng rãi. Vì lý do trên chúng tôi đã lựa chọn đề tài nghiên cứu: Xác định các dòng lúa lai bằng một số hệ isoenzyme.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Các dòng lúa bố, mẹ và các tổ hợp lúa lai được Trung tâm nghiên cứu lúa lai, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

2.1.1. Các dòng lúa được dùng làm dòng mẹ

- + BOA : Nguồn gốc Trung Quốc.
- + 25A : Gốc IR 58025A (IRRI).
- + II32A: Nguồn gốc Trung Quốc (CMS).
- + CL64S

2.1.2. Các dòng lúa được dùng làm dòng bố

- + 68-2 : Nguồn gốc Trung Quốc.
- + AYT-77 Dòng thuần chọn từ con lai hai dòng PEIAI x C70.
- + PM-3 : Dòng thuần của Trung tâm nghiên cứu lúa lai, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam.
- + Q5 : Nguồn gốc Trung Quốc.
- + MK-63: Minkhôi 63, Trung Quốc.
- + Sơn Thanh.

2.1.3. Sơ đồ các phép lai

Thứ tự	♀	♂	Tổ hợp lai
1	BOA	68-2	BOA/68-2
2	BOA	AYT-77	BOA/AYT-77
3	25A	PM-3	25A/PM-3
4	25A	Q5	25A/Q5 = HYT-83
5	II 32A	MK-63	Nhị ưu- 63
6	CL64S	Sơn Thanh	CL64S/Sonthan =HYT-84

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng phương pháp nghiên cứu của S.D. Tanksley và T. J. Orton (1983) và W.J. Zimmerman (1989) có cải tiến.

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Ngâm các hạt thóc đã được chọn cẩn thận vào nước ấm trong vòng 48 giờ. Tiếp theo ủ hạt trong các hộp lồng trên tờ giấy lọc thấm nước. Sau 2 ngày ủ như vậy hạt nảy mầm và chọn các hạt đã nhú mầm cho vào trong các khay nhựa đã có một lớp đất vườn dày khoảng 2 cm được tưới nước. Tiếp theo xếp các khay nhựa đã có hạt thóc nảy mầm dưới giàn đèn của phòng trồng cây. Ánh sáng có cường độ 6000 lux. Mỗi ngày cây mạ được chiếu sáng 12 giờ. Độ ẩm 80-90%. Khi cây cao khoảng 10 cm, tức là sau 10 ngày tuổi thì cả thân và lá được dùng cho việc nghiên cứu isozym esterase.

2.2.2. Chuẩn bị mẫu

Sau khi cắt cả cây mạ, rửa sạch, thấm khô, cân 300 mg cho vào cối sứ nghiền với 300 μ l đệm nghiền trong điều kiện lạnh. Sau khi tạo thành dịch đồng nhất, cho dịch vào ống Eppendorf, đem ly tâm 14000 rpm ở 4°C trong 15 phút. Lấy dịch trong phía trên để chạy điện di.

2.2.3. Chuẩn bị gel polyacrylamid

Sử dụng gel polyacrylamid hai lớp cho việc nghiên cứu. Gel có thành phần có 6 % polyacrylamid và gel tách là 12 %. Gel đúc trước khi điện di. Để gel trùng hợp hoàn toàn thì cho mẫu vào chạy điện di.

2.2.4. Phương pháp điện di

TIẾN HÀNH ĐIỆN DI TRÊN MÁY ĐIỆN DI ĐÚNG CỦA HÃNG BIORAD. KÍCH THƯỚC BẢN GEL 10 X 10 CM.

Dung dịch đệm chạy điện di: pH = 8,3.

Tris-bazơ, Glycin, nước cất 1000 ml.

Cho vào mỗi giếng 30 μ l mẫu (đã có Bromophenol). Cho đệm chạy ngập bản gel. Điện di trong 2 giờ, điện thế 120 Vol, dòng 60 mA. Sau khi điện di lấy gel ra khỏi khuôn và nhuộm.

2.2.5. Phương pháp nhuộm esteraza

Sử dụng dung dịch cơ chất α -naphthylacetat, β -naphthylacetat trong dung dịch đệm pH = 6,45. Thuốc nhuộm Fast Garnet, Fast blue RR hoà tan trong axêton trước khi cho vào dung dịch cơ chất.

Cho dung dịch thuốc nhuộm vào bản gel, ủ trong tối. Sau khi các băng xuất hiện thì đổ dịch nhuộm đi. Rửa nước cất nhiều lần, cố định bằng axetic trong metanol.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

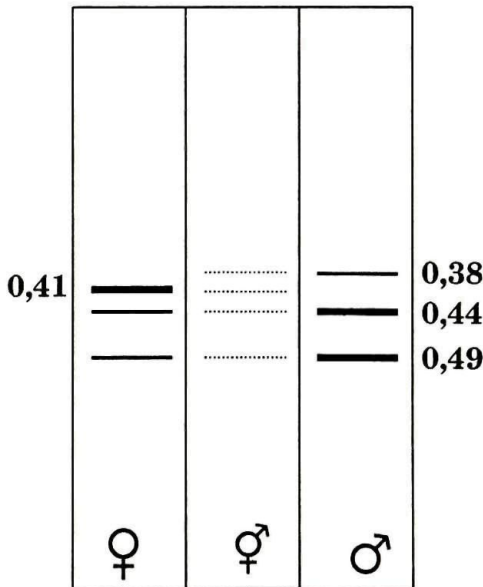
Khi phân tích phổ isozym esteraza (EST) của sáu tổ hợp lúa lai khác nhau và các dòng lúa bố mẹ bằng điện di trên gel polyacrylamid hai lớp trong cùng điều kiện, nhuộm màu phát hiện hoạt động của enzym bằng phản ứng màu giữa hỗn hợp hai cơ chất - naphthylacetat

và - naphthylaxetat với thuốc nhuộm Fast garnet và Fast blue RR salt chúng tôi đã thu được những kết quả sau trình bày và thảo luận dưới đây:

3.1. EST của các dòng lúa BOA (♀), AYT-77 (♂) và tổ hợp lai BOA/AYT-77

Hình 1 cho thấy phổ điện di EST của dòng lúa BOA (♀) có ba băng đậm tương đương $R_f = 0,41$; $R_f = 0,44$ và $R_f = 0,49$. ở dòng AYT-77 (♂) cũng có ba băng đậm tương đương $R_f = 0,38$; $R_f = 0,44$ và $R_f = 0,49$. Như vậy cả hai dòng lúa này đều có ba băng rất đậm. Cả 2 dòng đều có hai băng giống nhau là $R_f = 0,44$ và $R_f = 0,49$. Nhưng mỗi dòng lúa lại có một băng đặc trưng riêng là băng $R_f = 0,41$ (đối với dòng BOA) và băng $R_f = 0,38$ (đối với dòng AYT-77).

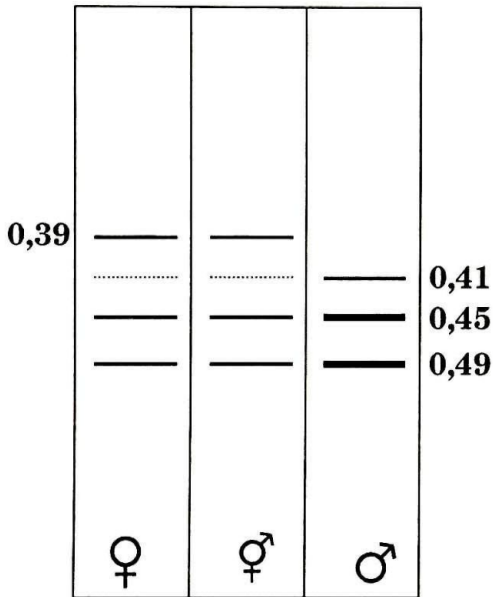
Phổ isozym của tổ hợp lai BOA/AYT-77 có bốn băng mảnh hơn. Ngoài hai băng chung của bố và mẹ đều có là băng $R_f = 0,44$ và $R_f = 0,49$, ở con lai còn có thêm một băng đặc trưng riêng của mẹ là băng $R_f = 0,41$ và 1 băng đặc trưng riêng của bố là $R_f = 0,38$. Phổ điện di isozym của con lai hầu như là sự cộng lại của phổ điện di bố mẹ. Điều này tương tự như kết luận của một số nghiên cứu trước đây của Tansley và Orton (1983), Zimmerman (1989) và Nguyễn Văn Mùi (1999).



Hình 1. Phổ isozym EST của các dòng lúa BOA (♀), BOA/AYT-77 (♀ = con lai), AYT-77 (♂)

3.2. EST của các dòng lúa 25A (♀), Q5 (♂) và tổ hợp lai HYT-83

Qua phân tích phổ isozym ở hình hai ta thấy dòng 25A (♀) có bốn băng với $R_f = 0,39$; $R_f = 0,41$; $R_f = 0,45$ và $R_f = 0,49$. Ở dòng Q5 (♂) ta thấy có ba băng là $R_f = 0,41$; $R_f = 0,45$ và $R_f = 0,49$ nhưng không có băng $R_f = 0,39$. ở tổ hợp lai HYT-83 ta cũng thấy có 4 băng, trong đó có 3 băng chung của bố mẹ là $R_f = 0,41$; $R_f = 0,45$ và $R_f = 0,49$. Ngoài ra HYT-83 cũng có băng đặc trưng riêng của mẹ là $R_f = 0,39$.



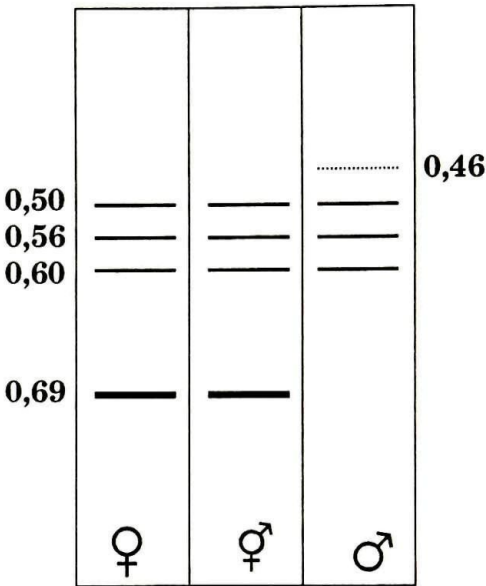
Hình 2. Phổ isozym EST của các dòng lúa 25A (♀), HYT-83 (♀= con lai), Q5 (♂)

3.3. EST của các dòng lúa II32A (♀), MK-63 (♂) và tổ hợp lai Nhị ưu- 63

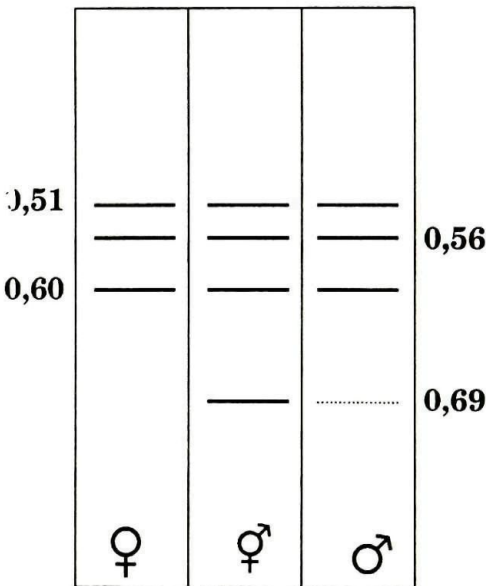
Hình 3 cho thấy phổ điện di isozym EST của dòng lúa II32A (♀) có bốn băng đậm tương đương $R_f = 0,50$; $R_f = 0,56$; $R_f = 0,60$ và $R_f = 0,69$. ở dòng MK-63 (♂) cũng có bốn băng là $R_f = 0,46$; $R_f = 0,50$; $R_f = 0,56$ và $R_f = 0,60$. Trong đó băng $R_f = 0,46$ mờ hơn các băng khác. Như vậy hai dòng bố và mẹ có ba băng chung là $R_f = 0,50$; $R_f = 0,56$ và $R_f = 0,60$.

Mỗi dòng bố hoặc mẹ lại có một băng đặc trưng riêng. Phổ isozym EST của tổ hợp lai Nhị ưu- 63 có 4 băng. Trong đó có 3 băng chung của bố mẹ là $R_f = 0,50$; $R_f = 0,56$ và $R_f = 0,60$. Ngoài ra, Nhị ưu- 63

cũng cho thấy có băng của mẹ là $R_f = 0,69$. Băng đặc riêng của bố là $R_f = 0,46$ không thấy xuất hiện ở con lai.



Hình 3. Phổ isozym EST của các dòng lúa II32A (♀), Nhị ưu-63 (♂♀= con lai), MK-63 (♂)



3.4. EST của các dòng lúa BOA (♀), 68-2 (♂) và tổ hợp lai BOA/68-2

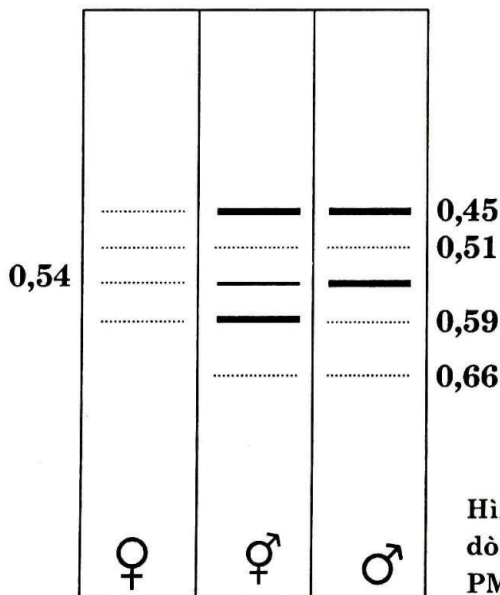
Phổ isozym EST của dòng BOA (♀) có 3 băng là $R_f = 0,51$; $R_f = 0,56$; $R_f = 0,60$ (Hình 4). Phổ isozym EST của dòng 68-2 (♂) có 4 băng. Ngoài 3 băng có R_f giống với dòng BOA Là $R_f = 0,51$; $0,56$ và $0,60$ thì dòng 68-2 còn có một băng đặc trưng riêng là $R_f = 0,69$. Phổ isozym EST của tổ hợp lai BOA/68-2 cũng có 4 băng. Ngoài 3 băng chung của cả bố và mẹ, tổ hợp lai còn có cả băng riêng của bố.

Hình 4. Phổ isozym EST của các dòng lúa BOA (♀), BOA/68-2 (♂♀), 68-2 (♂)

3.5. EST của các dòng lúa 25A (♀), PM3 (♂) và tổ hợp lai 25A/PM3

Từ Hình 5 ta thấy phổ isozym EST của dòng 25A (♀) có bốn băng là $R_f = 0,45$; $R_f = 0,51$; $R_f = 0,54$ và $R_f = 0,59$. Phân tích phổ isozym EST của dòng PM3 (♂) thấy có năm băng. Ngoài bốn băng chung với dòng mẹ còn có thêm 1 băng riêng là $R_f = 0,66$. Ở tổ hợp lai 25A/PM3 ta cũng thấy có năm băng. Ngoài 4 băng chung của bố và mẹ ra, tổ hợp lai còn có thêm một băng riêng của bố $R_f = 0,66$.

Quan sát độ đậm nhạt của các băng ta thấy cả 4 băng của mẹ đều mờ. Ở dòng bố có hai băng đậm là $R_f = 0,45$ và $R_f = 0,54$. Băng $R_f = 0,59$ của dòng bố cũng mờ, trong khi đó băng $R_f = 0,59$ của con lai lại rất đậm. Phổ isozym của tổ hợp lai 25A/PM3 vừa có những băng chung của bố mẹ, vừa có băng riêng của bố nhưng độ đậm nhạt của các băng lại khác hẳn so với bố mẹ.



Hình 5. Phổ isozym EST của các dòng lúa 25A (♀), 25A/PM3 (♀), PM3 (♂)

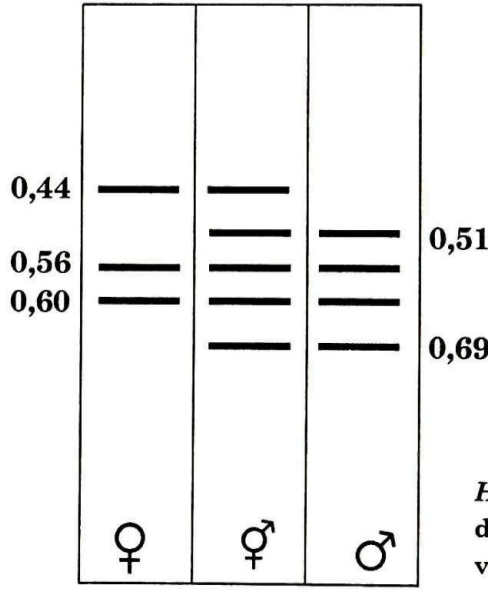
3.6. EST của các dòng lúa CL64S (♀), Sơn Thanh (♂) và tổ hợp lai CL64S/Sơn Thanh (HYT-84)

Qua Hình 6, ta thấy phổ điện di EST của dòng CL64-S có ba băng với $R_f = 0,44$; $R_f = 0,56$ và $R_f = 0,60$. Dòng Sơn Thanh có bốn băng với

$R_f = 0,51$; $R_f = 0,56$; $R_f = 0,60$ và $R_f = 0,69$. Như vậy hai dòng lúa dùng làm bố và mẹ này có 2 băng chung là $R_f = 0,56$ và $R_f = 0,60$.

Dòng CL64S (♀) có một băng riêng là $R_f = 0,44$; Dòng Sơn Thanh (♂) cũng có hai băng riêng với $R_f = 0,51$ và $R_f = 0,69$. Phổ điện di EST của tổ hợp lai CL64S/Sơn Thanh (HYT-84) có năm băng. Ngoài hai băng chung của bố và mẹ có $R_f = 0,56$ và $R_f = 0,60$, tổ hợp lai còn có cả băng đặc trưng riêng của mẹ là $R_f = 0,44$ và hai băng đặc trưng riêng của bố là $R_f = 0,51$ và $R_f = 0,69$.

Như vậy trong trường hợp này con lai đã nhận được các băng “lai” từ bố mẹ. Dựa vào phổ isozym EST. chúng tôi đã có thể kết luận được HYT-84 là con lai thực sự giữa CL64S và Sơn Thanh.



Hình 6. Phổ isozym EST của các dòng lúa CL64S (♀), HYT-84 (♀), và Sơn Thanh (♂)

2.5. KẾT LUẬN

Qua phân tích phổ isozym EST của các dòng lúa bố, mẹ và con lai; Qua phân tích số lượng các băng, tần số R_f , độ đậm nhạt của các băng kết hợp với kiểu hình của cây mạ khi gieo trồng, chúng tôi rút ra các kết luận sau:

1. Tổ hợp lai BOA/AYT-77 là con lai thực sự giữa dòng lúa BOA (♀) và dòng AYT-77 (♂).
2. Tổ hợp lai HYT-83 là con lai thực sự giữa dòng lúa 25A (♀) và dòng Q5 (♂).
3. Tổ hợp lai Nhị ưu -63 là con lai thực sự giữa dòng lúa II32A (♀) và dòng MK-63 (♂).
4. Tổ hợp lai BOA/68-2 là con lai thực sự giữa dòng lúa BOA (♀) và dòng 68-2 (♂).
5. Tổ hợp lai 25A/PM3 là con lai thực sự giữa dòng lúa 25A (♀) và dòng PM3 (♂).
6. Tổ hợp lai CL64S/Sơn Thanh (HYT-84) là con lai thực sự giữa dòng lúa CL64S (♀) và dòng Sơn Thanh (♂).
7. Có thể sử dụng hệ isozym EST như là một nhân tố “chìa khoá” để xác định con lai ở lúa, cũng như nghiên cứu tính đa dạng di truyền của các dòng lúa bố mẹ trước khi tiến hành các phép lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Minh Công, Nguyễn Văn Mùi (1999). *Phổ isozym peroxidaza và esteraza của giống lúa nếp TK90 và các dòng đột biến từ nó*, Di truyền học và ứng dụng (3), tr. 1-7.
2. Lâm Quang Dự (2000). *Chọn tạo các dòng lúa bất dục đực di truyền nhân nhạy cảm nhiệt độ bằng lai hữu tính để phục vụ phát triển lúa lai hai dòng ở Bắc Việt Nam*. Luận án tiến sỹ sinh học, trường ĐHKHTN, Hà Nội.
3. Nguyễn Văn Mùi, Hoàng Thị Ngọc Lan, Trần Ninh (1994). *Góp phần xác định loài sả chanh (citral) ở vườn thuốc Văn Điển bằng isozym esteraza*. Di truyền học và ứng dụng, (2), tr. 14-17.
4. Nguyễn Văn Mùi, Đào Thị Mai, Phạm Đức Hùng (1994). *Isozym esteraza và peroxidaza trong mầm mạ của một số lúa chống chịu*. Di truyền học và ứng dụng, (4), tr. 14-17.
5. Nguyễn Văn Mùi (1999). *Nghiên cứu sự đa hình phổ điện di isozym esteraza và peroxidaza của các giống ngô ở Việt Nam*. Di truyền học và ứng dụng (1), tr. 29-32.

6. Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Văn Mùi, Nguyễn Thị Phương Mai (1995). *Sử dụng kỹ thuật isozym để tách con lai soma tái sinh từ dung hợp tế bào trần (protoplast) khoai tây có tính kháng virus khác nhau*. Di truyền học và ứng dụng (3), tr. 4-9.
7. Nguyễn Thị Trâm (1994). *Lúa lai một dòng*. Di truyền học và ứng dụng (3), tr. 32-37.
8. Glaszmam S.C. (1987). *Isozymes and clasification of Asian rice varieties*. Theor. Appl. Genet. (74), pp. 21-30.
9. Hamrick S.L and Godtm (1989). *Allozym diversity in palnt species*. Genome 36, pp. 43-49.
10. Tanksley S.D. and Orton T.J. (1983). *Isozymes in plant genetics and breeding*, part A, Elsevier Science publishers B.V., Amsterdam.
11. Iwao Watanabe, W.S. Zimmerman, Do Van Cat, et al *Sexual hybridization among Azolla species*, Canadian Journal of Botany, Vol. 67, N^o. 12, pp 3482-3485.
12. Wei Wenxiong (1987). *The study of Azolla sexual hybridization*. International Azollatraining Course Fuzhou, Fujian, China.