

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH LOCUS GEN PHỤC VỤ CHO CÔNG TÁC THỬ NGHIỆM VÀ GIÁM ĐỊNH GEN Ở CÂY LÚA THEO TIÊU CHUẨN ISO/IEC 17025:2017

Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Chu Đức Hà¹, Nguyễn Thị Nhài¹,
Nguyễn Bá Ngọc¹, Khuất Thị Mai Lương¹, Phạm Thị Lý Thu¹, Lê Hùng Lĩnh¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, phương pháp xác định 10 gen (locus gen) kháng bệnh và chống chịu bất lợi phi sinh học ở lúa đã được xây dựng cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017. Kết quả khảo sát 10 chỉ thị phân tử, RM153 (liên kết với *xa5*), P3 (liên kết với *Xa7*), pTA248 (liên kết với *Xa21*), RM224 (liên kết với *Pik-h*), pB8 [liên kết với *Pi9(t)*], RM527 (liên kết với *Piz-5*), RM7102 (liên kết với *Pita-2*), ART5 (liên kết với *Sub1*), RM493 (liên kết với *Saltol*) và BAD2 (liên kết với *fgr*) phù hợp cho hoạt động thử nghiệm. Phương pháp xác định gen (locus gen) phục vụ thử nghiệm được xây dựng với bốn bước cơ bản, tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá lúa, khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR, kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose và phân tích kết quả. Kết quả của nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng để xây dựng Quy trình thử nghiệm và vận hành phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

Từ khóa: ISO/IEC 17025:2017, gen, locus, lúa, xác định gen

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, VAAS

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

ISO/IEC 17025:2017 (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) là phiên bản mới nhất của Tiêu chuẩn quốc tế về hệ thống quản lý chất lượng áp dụng riêng cho phòng thử nghiệm/hiệu chuẩn (Honsa and McIntyre, 2003). Đây là tiêu chuẩn cứng, điều kiện bắt buộc được đưa ra cho phòng thử nghiệm/hiệu chuẩn nhằm đảm bảo kết quả đo lường/thử nghiệm đạt được kết quả tin cậy nhất và được quốc tế công nhận. Vì thế, ISO/IEC 17025:2017 được xem là mục tiêu cần hướng đến và đạt được của các phòng thí nghiệm trong nước hiện nay.

Ứng dụng chỉ thị phân tử trong tích hợp gen (locus gen) mục tiêu nhằm cải tiến tính trạng mong muốn của các giống lúa đại trà là cách tiếp cận tối ưu, rút ngắn thời gian và nâng cao hiệu quả chọn tạo giống (Lê Hùng Lĩnh và ctv., 2017). Từ đó, một số giống lúa cải tiến đã được ra đời, với việc tích hợp gen kháng bệnh và chống chịu bất lợi phi sinh học. Do vậy, xác định chính xác sự có mặt của gen (locus gen) mục tiêu trong dòng/giống lúa được xem là yêu cầu cấp bách trong thời gian tới.

Trong nghiên cứu này, phương pháp xác định 10 gen (locus gen) mục tiêu, bao gồm ba gen kháng

bệnh bạc lá *xa5*, *Xa7* và *Xa21*; bốn gen kháng bệnh đạo ôn *Pik-h*, *Piz-5*, *Pita-2* và *Pi9(t)*; locus gen chịu ngập *Sub1*; locus gen chịu mặn *Saltol* và gen qui định mùi thơm *fgf* ở lúa được thiết lập nhằm áp dụng cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu giống lúa cần thử nghiệm được nhân viên phòng giám định thu thập trên đồng ruộng hoặc do khách hàng cung cấp được mô tả như trong nghiên cứu trước đây (Chu Đức Hà và ctv., 2018). Mẫu thử nghiệm phải có lai lịch giống rõ ràng, được lai tạo từ giống chuẩn cho gen (♂) (IRRI cung cấp) và giống gốc (♀).

- Nghiên cứu này sử dụng các mẫu giống chuẩn mang gen/ locus gen mục tiêu và các giống chuẩn không mang gen do Viện Lúa Quốc tế cung cấp cùng với các giống tham khảo BT7, BC15 và Khang dân 18... để hoàn thiện phương pháp xác định các locus gen, xây dựng quy trình (Bảng 1).

Các chỉ thị phân tử liên kết chặt với các gen (locus gen) mục tiêu được khai thác trong nghiên cứu trước đây (Bảng 2).

Bảng 1. Danh sách các giống lúa sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên giống	Gen	Tính trạng	STT	Tên giống	Gen	Tính trạng
1	IRBB5	<i>xa5</i>	Kháng bệnh bạc lá	10	Basmati	<i>fgf</i>	Mùi thơm
2	IRBB7	<i>Xa7</i>		11	CO39	-	Mẫn cảm bệnh đạo ôn
3	IRBB21	<i>Xa21</i>		12	IR24	-	Mẫn cảm bệnh bạc lá
4	IRBLkh-K3[LT]	<i>Pi-kh</i>	Kháng bệnh đạo ôn	13	IR64	-	Mẫn cảm ngập
5	IRBL9-W	<i>Pi9(t)</i>		14	IR29	-	Mẫn cảm mặn
6	IRBLz5-CA	<i>Piz-5</i>		15	BT7	-	Tham khảo
7	IRBLta2-Re	<i>Pita-2</i>		16	BC15	-	Tham khảo
8	IR64- <i>Saltol</i>	<i>Saltol</i>	Chịu mặn	17	KD18	-	Tham khảo
9	IR64- <i>Sub1</i>	<i>Sub1</i>	Chịu ngập				

Bảng 2. Danh sách chỉ thị phân tử liên kết chặt với các gen (locus gen) mục tiêu

STT	Tên môi	Trình tự môi	Gen/locus gen	Khoảng cách đến gen (cM)
1	RM153	F: 3'-GCCTCGAGCATCATCAG-5'	<i>xa5</i>	5,0
		R: 3'-ATCAACCTGCACTGCCTGG-5'		
2	P3	F: 3'-CAGGAATTGACTGGAGTAGTGGTT-5'	<i>Xa7</i>	3,4
		R: 3'-CATCACGGTCACCGCCATAT-5'		
3	pTA248	F: 3'-AGACGCGGAAGGGTGGTCCCGGA-5'	<i>Xa21</i>	0
		R: 3'-AGACGCGGTAATCGAAGATGAAA-5'		
4	RM224	F: 3'-ATCGATCGATCTTCACGAGG-5'	<i>Pik-h</i>	0
		R: 3'-TGCTATAAAAGGCATTCGGG-5'		

Bảng 2. Danh sách chỉ thị phân tử liên kết chặt với các gen (locus gen) mục tiêu (Tiếp)

5	pB8	F: 3'-CCGGACTAAGTACTGGCTTCGATA-5'	<i>Pi9(t)</i>	0
		R: 3'-CCCAATCTCCAATGACCCATAAC-5'		
6	RM527	F: 3'-GGCTCGATCTAGAAAATCCG-5'	<i>Piz-5</i>	0,3
		R: 3'-TTGCACAGGTTGCGATAGAG-5'		
7	RM7102	F: 3'-TTGAGAGCGTTTTTAGGATG-5'	<i>Pita-2</i>	1,3
		R: 3'-TCGGTTTACTTGGTTACTCG-5'		
8	RM493	F: 3'-TAGCTCCAACAGGATCGACC-5'	<i>Saltol</i>	0
		R: 3'-GTACGTAAACGCGGAAGGTG-5'		
9	ART5	F: 3'-CAGGGAAAGAGATGGTGA-5'	<i>Sub1</i>	0
		R: 3'-TTGGCCCTAGGTTGTTTCAG-5'		
10	BAD2	ESP: TTGTTTGGAGCTTGCTGATG-5'	<i>fgr</i>	Khuếch đại vùng gen thơm
		IFAP: CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC-5'		
		INSP: CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA-5'		
		EAP: AGTGCTTTACAAAGTCCCGC-5'		

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp lấy mẫu: Mẫu giống được thu thập và bảo quản dựa trên phương pháp lấy mẫu lúa theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017 của phòng thử nghiệm theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2018).

- Phương pháp tách chiết ADN tổng số: Mẫu lá thử nghiệm được tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) (Semagn, 2014). Chất lượng của ADN được kiểm tra trên hệ thống máy đọc quang phổ SpectroMAX 190 (Molecular Devices, Hoa Kỳ).

- Phương pháp khuếch đại bằng phản ứng PCR: Mẫu ADN pha loãng đến nồng độ 30 ng/μl được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR trên máy C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-rad, Hoa Kỳ) (Rahman *et al.*, 2013).

- Phương pháp kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose: Sản phẩm PCR được tiến hành điện di trên gel agarose 2,5% có bổ sung thuốc nhuộm safeview ADN với dung dịch đệm TBE 0,5X (Tris base, boric acid, EDTA) (Kumar *et al.*, 2015).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 4 đến tháng 10 năm 2018 tại phòng Sinh học phân tử - Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát đa hình ADN nguồn vật liệu nghiên cứu

Khảo sát đa hình ADN giữa giống lúa gốc và giống chuẩn là bước khởi đầu quan trọng để xác

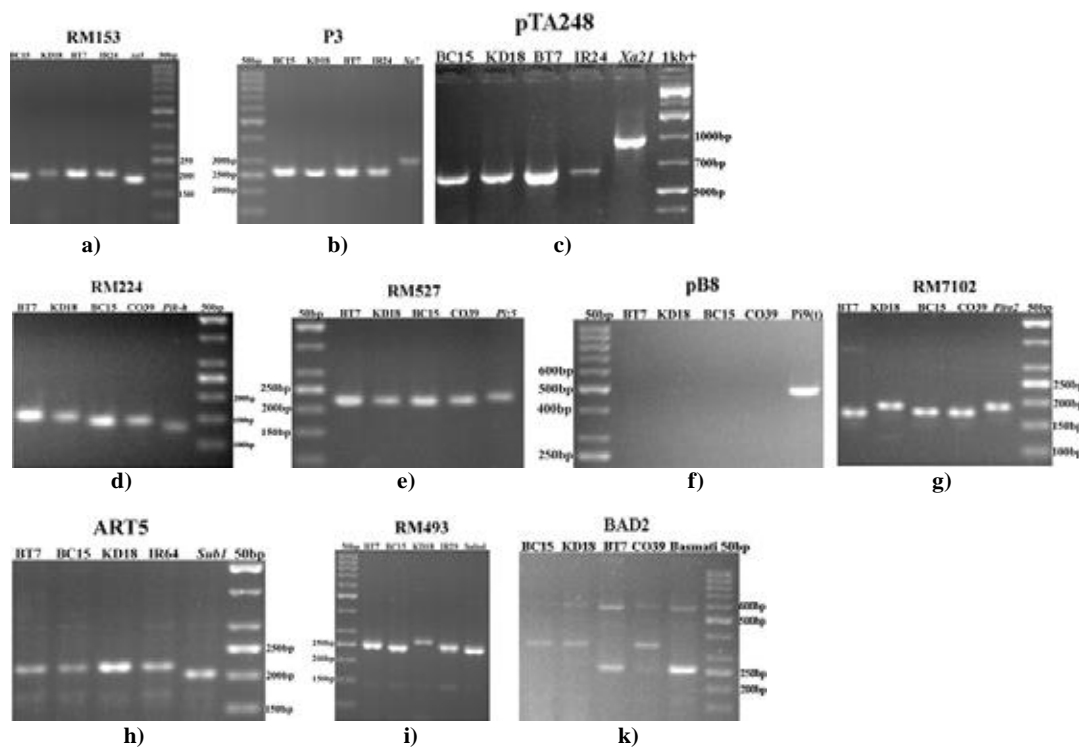
định chỉ thị liên kết gen mục tiêu phù hợp cho phép thử nghiệm. Trong nghiên cứu này, 10 chỉ thị liên kết chặt với 10 gen (locus gen) mục tiêu được sử dụng để phân tích đa hình ADN giữa giống chuẩn mang gen, giống chuẩn không mang gen và các giống tham khảo (Bảng 1, 2).

Đối với các thử nghiệm gen kháng bạc lá, với chỉ thị RM153 liên kết chặt với gen kháng bạc lá *xa5*, IRBB5 (mang gen *xa5*) cho băng điện di ADN ở vị trí ~185bp, thể hiện đa hình di truyền khá rõ với IR24 (không mang gen) và các giống tham khảo BC15, KD18 và BT7 (Hình 1a). Đối với chỉ thị P3 liên kết *Xa7*, IRBB7 cho băng điện di có kích thước ~300bp, thể hiện tính đa hình di truyền rất rõ với các giống còn lại (Hình 1b). Tương tự, đối với chỉ thị pTA248, IRBB21 (mang gen *Xa21*) cho băng ở vị trí ~1000bp, thể hiện đa hình rõ với các giống còn lại (Hình 1c).

Đối với các thử nghiệm gen kháng đạo ôn, chỉ thị RM224 liên kết chặt với gen *Pik-h* cho kết quả đa hình ADN khá rõ giữa giống chuẩn mang gen (băng ADN ở vị trí ~135bp) với giống CO39 (không mang gen) và ba giống tham khảo (Hình 1d). Các phân tích cũng cho kết quả tương tự khi đánh giá mức độ đa hình giữa giống cho gen, giống không có gen và các giống tham khảo đối với chỉ thị RM527 (liên kết với *Piz-5*) và RM7102 (liên kết *Pita-2*) (Hình 1e, g). Trong khi đó, chỉ thị pB8, liên kết với *Pi9(t)*, được ghi nhận trong nghiên cứu trước đây là chỉ thị trội (Xiao *et al.*, 2012), do vậy kết quả điện di cho thấy giống chuẩn mang gen *Pi9(t)* cho băng ADN ở vị trí ~500bp, các giống còn lại đều không cho băng ADN (Hình 1f).

Đối với các thử nghiệm gen chống chịu bất lợi phi sinh học, kiểm tra sản phẩm PCR đã xác nhận chỉ thị ART5 (liên kết với gen chịu ngập *Sub1*) cho đa hình ADN khá rõ ràng giữa giống chuẩn mang gen *Sub1* (băng điện di ~200bp) với IR64 và các giống tham khảo (Hình 1h). Tương tự, phân tích với RM493 (liên kết chặt với gen chịu mặn *Saltol*) cho

thấy IR64-*Saltol* cho băng ADN ở vị trí ~228bp, đa hình khá rõ nét với các giống còn lại (Hình 1i). Cuối cùng, đối với thử nghiệm gen qui định mùi thơm *fgr*, chỉ thị BAD2 cho kết quả điện di đa hình rõ rệt giữa hai giống lúa thơm Basmati, BT7 với các giống lúa không thơm BC15, KD18 và CO39 (Hình 1k).



Hình 1. Kết quả phân tích đa hình ADN giữa các giống lúa nghiên cứu với các chỉ thị liên kết các gen mục tiêu: (a) *xa5*, (b) *Xa7*, (c) *Xa21*, (d) *Pik-h*, (e) *Piz-5*, (f) *Pi9(t)*, (g) *Pita-2*, (h) *Sub1*, (i) *Saltol* và (k) *fgr*

3.2. Xây dựng phương pháp xác định locus gen mục tiêu phục vụ thử nghiệm và giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017

Xác định sự có mặt của 10 gen (locus gen) mục tiêu trên các mẫu giống lúa được thực hiện theo quy trình chung gồm bốn bước thử nghiệm, (1) tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá lúa, (2) khuếch đại gen (locus gen) bằng kỹ thuật PCR, (3) kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose và (4) phân tích kết quả.

Để thực hiện hoạt động thử nghiệm, các hóa chất sinh học phân tử được chuẩn bị bao gồm dịch đệm chiết (0,1M Tris-HCl, pH 8; 0,05M EDTA; 0,5M NaCl; 0,07% β-mercaptoethanol); dung dịch SDS 10%; đệm CTAB (0,2M Tris-Cl, pH7,5; 0,05M EDTA; 2M NaCl; 2% (w/v) CTAB); hỗn hợp Chloroform: Isoamylalcohol (24:1); đệm TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1,0 mM EDTA); RNase (10mg/ml); Isopropanol; Ethanol; Môi PCR (Bảng 2); Thang ADN chuẩn; Enzyme Taq polymerase (5U); PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl và 1,5 mM

MgCl₂); dNTPs; Agarose; Dung dịch đệm TBE 5X (1,1M Tris; 900mM Borate; 25mM EDTA; pH 8,3) và thuốc nhuộm ADN Safeview. Dụng cụ, vật tư tiêu hao cơ bản gồm kéo cắt mẫu, găng tay; eppendorf 1,5 - 2,0 ml; đầu tip (10, 200, 1000 μl), plate PCR, bút ghi nhãn. Thiết bị cần sử dụng gồm máy nghiền mẫu RETSCH Mixer Mills MM 200; bể ổn nhiệt Memmert WNB14; máy li tâm Eppendorf 5430R; máy làm khô ADN Eppendorf™ Vacufuge™ Concentrator; máy định lượng ADN Molecular Devices SpectraMax 190; máy PCR Bio-Rad C1000 Touch; bộ điện di ngang Owl A2-BP; máy chụp ảnh gel điện di Analytik Jena UVP Geldoc-it2; bộ pipette Research® plus.

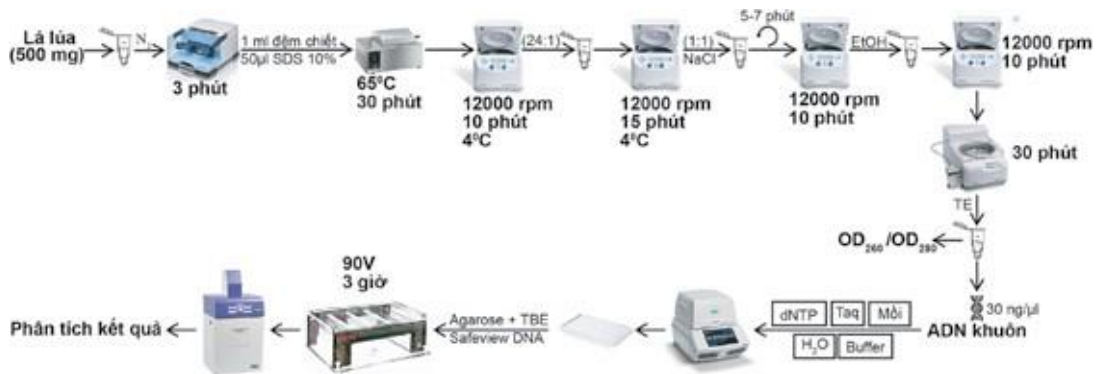
(1) Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá lúa: Kỹ thuật tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá lúa thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp CTAB có cải tiến (Semagn, 2014). Cụ thể, khoảng 500 mg mẫu lá lúa được cắt nhỏ vào ống eppendorf 2 ml có sẵn 1 viên bi nghiền. Ống eppendorf và giá

đựng xử lý N₂, được đưa vào máy nghiền mẫu trong 3 phút để nghiền thành dạng bột mịn. Bổ sung 1 ml đệm chiết và 50µl SDS 10%, trộn đều và ủ 30 phút trong bể ổn nhiệt ở 65°C, lắc nhẹ. Ly tâm với tốc độ 12.000 rpm trong 15 phút. Thu lấy dịch nổi ở trên vào ống eppendorf mới và thêm một thể tích tương ứng isopropanol, lắc nhẹ và ủ đá trong 10 - 30 phút. Ly tâm với 12.000 rpm trong 10 phút, sau đó loại bỏ pha dịch, làm khô kết tủa tự nhiên. Thêm 400 µl TE để hoà tan. Thêm 1µl RNase (10mg/ml), ủ mẫu ở 37°C trong 2h. Bổ sung 1 ml dung dịch đệm CTAB và đảo đều ống trong 15 giây. Hỗn hợp được ủ trong bể ổn nhiệt ở 65°C trong 30 phút. Ống được ly tâm ở 12.000 rpm trong 10 phút ở 4°C, phần dịch nổi được chuyển sang ống mới. Bổ sung 800 µl hỗn hợp chloroform: isoamylalcohol (24:1) và lắc đều, tiếp tục ly tâm với tốc độ 12.000 rpm trong 15 phút ở 4°C. Phần dịch nổi được chuyển sang ống mới; Isopropanol được bổ sung vào ống theo tỉ lệ 1:1 cùng với 5µl NaCl 1M. Hỗn hợp được đảo đều trong 5-7 phút và ly tâm 12.000 rpm trong 10 phút. Kết tủa được rửa trong 500 µl Ethanol 70% và ly tâm 12.000 rpm trong 10 phút để thu tủa ADN. ADN tinh sạch được làm khô trong 30 phút và hòa tan với đệm TE. Đánh giá nồng độ và chất lượng ADN bằng máy đọc quang phổ. Mẫu ADN được bảo quản ở -20°C hoặc -86°C cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 2). Trong nghiên cứu này, mẫu ADN được coi là đạt tiêu chuẩn khi $1,8 \leq OD_{260/280} \leq 2,1$ (Storchova *et al.*, 2000).

(2) Phương pháp khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR: Mẫu ADN đã pha loãng tới nồng độ 30 ng/µl được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR bằng môi

đặc hiệu cho từng (locus) gen mục tiêu. Mỗi mẫu giống lúa cần thử nghiệm sẽ được phân tích 100 mẫu ADN đại diện cho 100 cá thể của mẫu giống lúa. Mẫu giống chuẩn mang gen/ locus gen mục tiêu, mẫu giống chuẩn không mang gen và giống tham khảo được phân tích 1 mẫu ADN/ mẫu giống. Các thao tác chuẩn bị phản ứng và chu trình nhiệt được thực hiện dựa trên mô tả đã được nghiên cứu trước đây (Rahman *et al.*, 2013). Tổng thể tích cho một phản ứng (1X) là 10 µl, bao gồm 30 ng ADN tổng số, 12 pmol mỗi, 0,2 mM dNTPs, 1X dung dịch đệm PCR, và 1,0 đơn vị Taq Polymerase (Rahman *et al.*, 2013). Chu trình nhiệt được thiết lập một cách tối ưu, 94°C - 5 phút; 35 chu kỳ của 94°C - 15 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 1 phút; 72°C - 7 phút và giữ mẫu ở 4°C (Rahman *et al.*, 2013). Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Bio-Rad C1000 Touch (Hình 2).

(3) Phương pháp kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose: Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 2,5% (Kumar *et al.*, 2015). Cân 7,5 gam agarose bổ sung vào 300 ml dung dịch TBE 0,5X. Đun và khuấy đều để tạo thành dạng gel trong 2 phút, sau đó bổ sung 10 µl thuốc nhuộm safeview ADN vào gel. Đổ gel nóng vào khay điện di đã cắm lược, để nguội trong 45 phút. Chuẩn bị 3 lít dung dịch đệm TBE 0,5X. Dùng pipette hút 10 µl sản phẩm PCR vào mỗi giếng và sử dụng thang ADN chuẩn 50bp. Tiến hành điện di ở hiệu điện thế 90V trong 3 giờ cho đến khi băng màu xanh Bromophenol gần ra khỏi bản gel. Bản gel sau khi điện được đưa vào máy chụp ảnh gel điện di Analytik Jena UVP Geldoc-it2 để ghi nhận kết quả (Hình 2).



Hình 2. Sơ đồ phương pháp xác định locus mục tiêu theo ISO/IEC 17025:2017

(4) Phân tích kết quả: Kết quả phân tích PCR với cặp môi đặc hiệu (Bảng 2) được ghi nhận bằng ảnh điện di. Phương pháp phân tích kết quả dựa vào kích thước băng của giống chuẩn mang gen mục tiêu. Mẫu thử nghiệm được coi là dương tính, có phát hiện gen mục tiêu khi giếng chứa mẫu thử nghiệm xuất hiện băng điện di có kích thước giống như của giống chuẩn mang gen tương ứng (Bảng 1, Hình 1).

Mẫu được coi là không phát hiện gen mục tiêu khi giếng chứa mẫu thử nghiệm xuất hiện băng điện di có kích thước khác với giống chuẩn mang gen. Với phương pháp thử nghiệm như trên, kết quả phân tích cho phép đưa ra nhận định về sự có mặt/ vắng mặt của gen mục tiêu trong mẫu giống và tỷ lệ cá thể mang gen (%) trong lô mẫu thử nghiệm.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã xác định chỉ thị RM153 liên kết *xa5*, P3 liên kết *Xa7*, pTA248 liên kết *Xa21*, RM224 liên kết *Pik-h*, pB8 liên kết *Pi9(t)*, RM527 liên kết *Piz-5*, RM7102 liên kết *Pita-2*, ART5 liên kết locus gen *Sub1*, RM493 liên kết locus gen *Saltol* và BAD2 liên kết *fgr* phù hợp cho thử nghiệm 10 chỉ tiêu gen kháng bệnh và chống chịu bất lợi phi sinh học.

Đã thiết lập được phương pháp xác định locus gen mục tiêu phục vụ thử nghiệm và giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017. Quy trình gồm bốn bước chính, tách chiết ADN tổng số, khuếch đại gen (locus gen) bằng PCR, kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose và phân tích kết quả. Kết quả phân tích 10 cá thể ngẫu nhiên cho phép đưa ra nhận định về sự có mặt/ vắng mặt của gen mục tiêu trong mẫu giống thử nghiệm và tỷ lệ cá thể mang gen (%) trong lô mẫu đưa vào thử nghiệm.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu sẽ được tiếp tục hoàn thiện và cải tiến nhằm nâng cao hiệu quả thử nghiệm xác định locus gen mục tiêu và áp dụng cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu nằm trong hoạt động xây dựng Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017, thuộc Tiểu dự án FIRST-AGI “Nâng cao năng lực nghiên cứu, làm chủ công nghệ genom học (Genomics-assisted breeding - GAB) và công nghệ chọn giống ứng dụng chỉ thị phân tử (Marker-assisted backcrossing - MABC) để chọn tạo các giống lúa kháng đa yếu tố ứng phó với biến đổi khí hậu”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Bá Ngọc, Khuất Thị Mai Lương, Phạm Thị Lý Thu, Lê Hùng Lĩnh, 2018. Thiết lập phương pháp lấy mẫu lúa theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017 phục vụ thử nghiệm xác định locus gen. *Tap chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 11(96): 46-50.
- Lê Hùng Lĩnh, Chu Đức Hà, Đào Văn Khởi, Phạm Thị Lý Thu, 2017. Tích hợp gen/QTL trong cải tiến giống lúa ứng phó biến đổi khí hậu bằng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử kết hợp lai trở lại. *Tap chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 15(4): 60-64.
- Honsa, J. D., McIntyre, D. A., 2003. ISO 17025: Practical benefits of implementing a quality system. *IAOAC Int*, 86(5): 1038-1044.
- Kumar, M., Kim, S. R., Sharma, P. C., Pareek, A., 2015. Simple and efficient way to detect small polymorphic bands in plants. *Genom Data*, 5: 218-222.
- Rahman, M., Iqbal, M. A., Shaheen, N., Zafar, Y., 2013. Microsatellites: Methods & Protocols. In *Stress and Plant Biotechnology*, 130-152.
- Semagn, K., 2014. Leaf tissue sampling and DNA extraction protocols. In *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 53-67.
- Storchova, H., Radmila, H., Chrtek, J., Tetera, M., Fitze, D., Fehrer, J., 2000. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, 49(1): 79-84.
- Xiao, W., Yang, Q., Wang, H., Duan, J., Guo, T., Liu, Y., Zhu, X., Chen, Z., 2012. Identification and fine mapping of a major *R* gene to *Magnaporthe oryzae* in a broad-spectrum resistant germplasm in rice. *Mol Breed*, 30(4): 1715-1726.

Establishment of the protocol for detection of locus genes toward the gene detection in rice with ISO/IEC 17025:2017 standard

Nguyen Thi Minh Nguyet, Chu Duc Ha, Nguyen Thi Nhai, Nguyen Ba Ngoc, Khuat Thi Mai Luong, Pham Thi Ly Thu, Le Hung Linh

Abstract

In this study, the protocol of detection of 10 disease- and abiotic stress (es)- resistance genes (locus) in rice have been successfully constructed. Ten molecular markers, including RM153 (for *xa5*), P3 (for *Xa7*), pTA248 (for *Xa21*), RM224 (for *Pik-h*), pB8 (for *Pi9(t)*), RM527 (for *Piz-5*), RM7102 (for *Pita-2*), ART5 (for *Sub1*), RM493 (for *Saltol*) and BAD2 (for *fgr*) was suitable for gene detection. The protocol of gene detection was established with four basic steps: (1) total DNA extraction from rice leaves, (2) amplification of target genes by PCR, (3) agarose gel electrophoresis and (4) data analysis. This result contributes significantly to the establishment and operation of the Laboratory of Molecular Biology for Gene Detection in plant with ISO/IEC 17025:2017 standard.

Keywords: Detection, ISO/IEC 17025:2017, gene, locus, rice

Ngày nhận bài: 19/2/2019

Ngày phản biện: 26/2/2019

Người phản biện: PGS. TS. Lã Tuấn Nghĩa

Ngày duyệt đăng: 11/3/2019