

The gene mutations: virescent alboviridis, xanthoviridis, striata, well tillering, big grain, weak dwarf was recessive. The short awn grain and unwell tillering mutations was dominant mutations. The results obtained prove: The penetrance of alboviridis, xanthoviridis, striata, big grain, weak tillering, weak dwarf and short awn grain (in tenth month crop) mutations was complete, but the virescent, well tillering, unwell tillering and short awn grain (in the fifth month crop) mutations was incomplete.

The 9 mutations as was said above have incomplete expressivity.

PHƯƠNG PHÁP RAPD MARKER TRONG ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG HẠT GIỐNG

BÙI MẠNH CUỒNG, TRẦN HỒNG UY,
NGÔ HỮU TÌNH, LÊ QUÝ KHA

Trong công tác giống cây trồng, công việc kiểm nghiệm chất lượng hạt giống có vai trò hết sức quan trọng, là bước đầu tiên giúp chúng ta có những định hướng trong sử dụng hạt giống. Những lô giống thuần chủng (chất lượng cao) thường cho năng suất cao, ngược lại những lô giống lẫn tạp (chất lượng thấp) thường cho năng suất thấp. Một trong những nguyên nhân dẫn tới những lô giống chất lượng thấp là bởi độ thuần di truyền thấp và độ lẫn tạp cơ giới cao.

Hiện nay, việc đánh giá độ lẫn tạp cơ giới cũng như độ thuần di truyền thường dựa trên những đặc tính hình thái. Phương pháp này có nhiều ưu điểm song cũng có những nhược điểm, thường xuyên bị ảnh hưởng bởi môi trường và tính chủ quan của người đánh giá.

Trong thập niên 90 với sự phát triển mạnh mẽ của sinh học phân tử giúp chúng ta nhận biết chính xác độ thuần di truyền cũng như mức độ lẫn tạp cơ giới của các loại giống cây trồng. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả một số thí nghiệm đánh giá độ thuần di truyền và xác định độ lẫn tạp cơ giới của một số loại giống cây trồng thông qua phương pháp RAPD marker, nhằm trợ giúp cho các phương pháp đánh giá truyền thống.

I. THỰC LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

a) *Thực liệu*: Thực liệu để đánh giá độ lẫn tạp cơ giới là hai giống đậu Vetch và Lentil, giống nhau về hình thái (trọng lượng 1000 hạt, màu sắc, kích thước...) mà mắt thường không thể phân biệt được, được hỗn hợp theo tỷ lệ trọng lượng (bảng 1). Thực liệu đánh giá độ thuần di truyền là hạt lai F1 của hai giống ngô SR73 và SK (Sweet Corn Kelvedon).

Hệ thống Primer: đánh giá độ lẫn tạp của mẫu đậu Lentil bằng Primer 5S. Đánh giá độ thuần di truyền của hai giống ngô bằng hệ thống RAPD primer: OBA01, OBA04, OBA05, OBA16, OBA08, OBA10, OBA20, OBB02, OBB04, OBB05, OBB06, OBC14, OBC16, OBC19, ladder 100bp.

Các thí nghiệm nhắc lại 3 lần.

b) *Phương pháp nghiên cứu*: Tách chiết ADN: ADN của Vetch và Lentil được tách chiết theo phương pháp: Hỗn hợp hạt được nghiền nhỏ (dạng huyền phù), sau đó ngâm trong dung dịch CTAB buffer (5 phút), ly tâm (1 phút) ở 13.000 vòng/phút. Chuyển 1000ml dịch nổi vào hỗn hợp dung dịch phenol: Chloroform: Isoaminalcohol (25: 24: 1), ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút, lặp lại 2 lần. Sau khi kết tủa ADN trong ethanol (-20°C), ADN được sấy khô trong điều kiện chân không. Hòa tan dung dịch TE (pH = 8). Xử lý ARN, xác định hàm

lượng ADN, pha loãng ở nồng độ 10ng, bảo quản ở (-20°C).

ADN của ngô được tách chiết theo phương pháp: Mẫu lá được lấy ở tuần thứ 5 theo phương pháp cân bằng trọng lượng. Sau đó nghiền trong nitor lỏng và ngâm trong dung dịch CTAB buffer, 60 phút ở 65°C, được chiết hai lần trong hỗn hợp dung dịch chloroform: Isoaminalcohol (24: 1), kết tủa trong dung dịch Izopropanol và làm khô trong điều kiện chân không, ADN được hòa tan trong dung dịch TE (pH = 8). Xử lý ARN, xác định nồng độ ADN, các mẫu ADN được pha loãng ở nồng độ 10ng bảo quản ở -20°C.

Phản ứng PCR: tổng thể tích cho một phản ứng PCR là 25 µl gồm: H₂O, dNTPs, primer, Taq polymerase, PCR buffer, MgCl₂, ADN mẫu, với chu kỳ nhiệt độ 94°C trong 5 phút ở 45 chu kỳ, 94°C - 1 phút, 40°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút, 72°C trong 7 phút. Nhiệt độ bảo quản mẫu 15°C. Điện di trên gel agarose, đối màu bằng ethidium bromic, phân tích trên hệ thống photographed UV - computer.

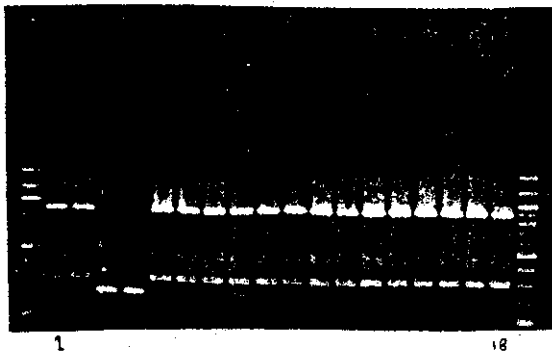
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

a) *Marker đặc trưng của 2 giống đậu Vetch và Lentil*: Mặc dù hạt của 2 giống đậu có kiểu hình giống nhau song khi làm việc với primer 5S người ta đã xác định được 2 giống đậu trên có những markers khác biệt, đây là những markers đặc trưng của hai giống đậu Vetch và Lentil (hình 1).

Trên hình 1 cho thấy: Khi ADN của 2 giống đậu làm việc với Primer 5S thì giống đậu Vetch xuất hiện băng đặc trưng ở locus 210 bp, còn giống đậu Lentil xuất hiện 2 băng đặc trưng, băng 1 ở locus 310 bp và băng 2 ở locus 900 bp. Hình 1 cũng cho

BẢNG 1. Tỷ lệ lẫn tạp của các mẫu thí nghiệm (g/g).

STT	Vetch (g)	Lentil (g)	Tỷ lệ lẫn (%)
1	100,00	0,00	0,00
2	0,00	100,00	0,00
3	50,00	50,00	50,00
4	20,00	80,00	20,00
5	10,00	90,00	10,00
6	5,00	95,00	5,00
7	2,00	98,00	2,00
8	1,00	99,00	1,00
9	0,75	99,25	0,75
10	0,50	99,50	0,50
11	0,25	99,75	0,25
12	0,10	99,90	0,10
13	0,01	99,99	0,01



1- 2: Lentil; 3- 4: Vetch; 5- 18: Lentil
HÌNH 1. Marker 5S thể hiện ở đậu Vetch và Lentil, ladder 100 bp.

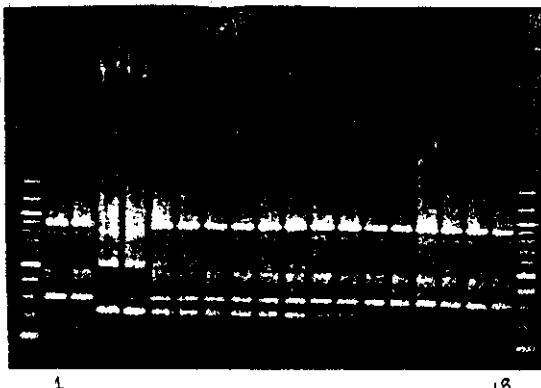
thấy mẫu đậu Lentil thí nghiệm là mẫu thuần không bị lẫn đậu Vetch (5 ... 18).

b) Kết quả xác định độ lẫn tạp của các mẫu đậu Lentil: Kết quả xác định độ lẫn tạp của mẫu đậu Lentil được thể hiện ở hình 2.

Hình 2 cho thấy, các băng 5 ... 12 ngoài 2 băng đặc trưng của đậu Lentil ở locus 310bp và 900 bp còn xuất hiện 1 băng đặc trưng của đậu Vetch ở 210 bp; mức độ thể hiện giảm dần theo tỷ lệ lẫn; ở mức độ lẫn 0,01% đậu Vetch thì không thể hiện. Điều này cho thấy bằng phương pháp RAPD marker 5S có thể phát hiện độ lẫn của mẫu đậu Lentil thí nghiệm ở mức 0,1%.

c) Đánh giá độ thuần di truyền của hai giống ngô: Mẫu lá của mỗi giống được lấy đều trên từng cá thể. Các mẫu lá được tách chiết ADN riêng rẽ. Sau khi làm việc với hệ thống primer kết quả cho thấy: Các mẫu ADN của SP73 làm việc với 9 primer, thể hiện 74 băng ở 13 locus. Trong đó có 3 băng thể hiện sự khác biệt ở primer OBA10; locus 500 bp - 800 bp. Như vậy mẫu ADN của giống SR73 cần kiểm tra giống đối chứng ở mức $71/74 = 95,9\%$, sự khác biệt là 4,1%. Giống ngô SR73 cần kiểm tra giống đối chứng là 95,9%.

Ở giống ngô SK, các mẫu ADN làm việc với 8 primer, kết quả thể hiện 50 băng, 10 locus, không xuất hiện các băng khác biệt, các mẫu ADN này thể hiện sự giống nhau ở tất cả các locus, như vậy mẫu



1, 2 Lentil; 3, 4 Vetch; 5 - 10% Vetch; 6 - 5% Vetch; 7 - 2% Vetch; 8 - 1% Vetch; 9 - 0,75% Vetch; 10 - 0,5% Vetch; 11 - 0,25% Vetch; 12 - 0,1% Vetch; 13 - 18 - 0,01% Vetch

HÌNH 2. RAPD marker 5S thể hiện ở các mẫu Lentil lẫn Vetch ở các tỷ lệ, ladder 100bp.

ADN của giống SK cần kiểm tra giống đối chứng 100%.

Về mặt lý thuyết nếu là giống thuần (nhất là giống ngô lai ở thế hệ con lai F1) thì các cá thể trong cùng một giống phải giống nhau ở tất cả các locus khi làm việc với hệ thống primer. Nếu có một cá thể khác biệt hoặc có một tính trạng khác biệt thể hiện trên một cá thể hoặc ở một nhóm cá thể trong một mẫu kiểm nghiệm nào đó thì mẫu ADN của chúng khi làm việc với hệ thống RAPD marker sẽ xuất hiện các băng khác biệt, ví dụ như ở giống ngô SR73.

Thông qua phương pháp RAPD marker có thể đánh giá được sự khác nhau ở trong cùng một mẫu giống hoặc giữa các mẫu giống. Phương pháp trên cũng đã được áp dụng để đánh giá độ thuần di truyền của dòng (dòng tự phối), hoặc của giống (giống tự thụ phân, giống lai F1) và đăng ký bản quyền giống ở các nước phát triển.

III. KẾT LUẬN

Phương pháp RAPD marker có thể phát hiện độ lẫn tạp của mẫu đậu Lentil ở mức 0,1%, đánh giá độ thuần của giống.

Phương pháp RAPD marker là một công cụ mạnh, có độ chính xác cao, có thể ứng dụng trong công tác kiểm nghiệm chất lượng hạt giống.

APPLICATION OF RAPD MARKERS IN SEED QUALITY CONTROL

(Summary)

PCR based-markers can be used for testing seed purity within or between cultivars. The experiment was done in the Institute of Land and Food Resources, the University of Melbourne, Australia in 1999. Using RAPD marker 5S, two pulse cultivars, Vetch (*Vicia sativa*) which is morphologically similar to Lentil (*Lens culinaris* subsp. *culinaris*) can be differentiated in purity at 0.1% contamination. Genetic purity of F1 maize (*Zea mays* L.) hybrid seeds of SR73 and SK (Sweet corn Kelvedon) was assessed employing RAPD primers: OBA01, OBA04, OBA05, OBA16, OBA08, OBA10, OBA20, OBB02, OBB04, OBB05, OBC14, OBC19, ladder 100bp. The results show that this method is possible to detect genetic purity within and between inbred lines and F1 hybrid maize seed. It can also be used for registration of breeder's right. RAPD markers can be considered as one of the useful, precise tools in seed quality control.

THÀNH PHẦN VI SINH VẬT TRÊN SÂU TƠ HẠI RAU Ở ĐÀ LẠT NĂM 1998

PHẠM THỊ THÙY, TRẦN THỊ VÀN

Đà Lạt có địa hình và khí hậu ôn hòa quanh năm nên từ lâu đã hình thành những vùng chuyên canh rau nổi tiếng với nhiều chủng loại đa dạng. Diện tích rau của toàn tỉnh lên tới 14.600 ha và sản lượng

thu được hàng năm là 245.000 tấn. Do sự phong phú của các loại rau cộng với trình độ thâm canh cao nên ở Đà Lạt đã tích lũy mật độ dịch hại rất cao từ vụ này sang vụ khác. Bên cạnh đó việc sử dụng thuốc