



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



(51)⁷ **C12N 15/09**

(13) **Y**

(21) 2-2013-00018

(22) 30.01.2013

(45) 25.12.2018 369

(43) 25.08.2014 317

(73) **VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP (VN)**

Km số 2 đường Phạm Văn Đồng, Cổ Nhuế, Từ Liêm, thành phố Hà Nội

(72) **Lưu Minh Cúc (VN)**

(54) **QUY TRÌNH KHẢO NGHIỆM GIỐNG LÚA BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC
PHÂN TỬ**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình khảo nghiệm giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) xác định độ đồng nhất của giống; b) kiểm tra độ ổn định của giống; c) kiểm tra độ khác biệt của giống; và d) đánh giá kết quả phân tích. Trong đó quy trình sử dụng các bộ chỉ thị phân tử đặc hiệu để xác định độ đồng nhất, độ ổn định và độ khác biệt của giống lúa cho phép giảm được số lượng các chỉ thị phân tử cần sử dụng. Quy trình cho phép phân biệt được $1,40169 \times 10^{22}$ mẫu giống khác nhau bởi ít nhất 1 alen.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử ứng dụng trong di truyền nông nghiệp, cụ thể là đề cập đến quy trình khảo nghiệm giống lúa (quy trình DUS: Distiness, Uniformity, Stability) bằng kỹ thuật sinh học phân tử để hỗ trợ cho công tác xác định giống lúa mới.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã có nhiều nghiên cứu trong việc xác định giống thực vật bằng kỹ thuật sinh học phân tử, cụ thể là dựa vào các mô hình lặp lại trong ADN đã cho một kết quả đáng tin cậy mà không quá phức tạp, tiết kiệm chi phí. Trong thực vật có các trình tự lặp lại liên tiếp ngắn (short tandem repeat - hay STR) và trình tự lặp lại giản đơn (Simple Sequence Repeats - SSRs). Những trình tự lặp lại nằm rải rác trong khắp hệ gen của thực vật trở thành các chỉ thị di truyền, có thể sử dụng phản ứng PCR để nhân lên một cách dễ dàng. Số lượng đoạn lặp lại trong các trình tự lặp lại kế tiếp này dao động khác nhau giữa các cá thể, điều đó đã giúp cho các nhà khoa học sử dụng chúng để phân biệt cá thể với kết quả đáng tin cậy.

Một locus SSR được sử dụng cho mục đích xác định cá thể phải thoả mãn một số yêu cầu nhất định. Thứ nhất, locus SSR phải có mức độ đa hình cao (nhiều alen), điều này giúp các nhà phân tích chỉ cần sử dụng số lượng locus tối thiểu đã đạt được độ tin cậy cao trong mỗi lần giám định. Thứ hai, các SSR có độ dài trung bình từ 85 - 300 bp. Các locus ngắn có độ bền cao, ít bị đứt gãy trong quá trình thao tác, do vậy phản ứng nhân ADN sẽ được thực hiện khi ADN còn nguyên vẹn. Thứ ba, các locus SSR sử dụng trong phân tích cần nằm trên các NST khác nhau để đảm bảo cho tính độc lập của từng locus. Thứ tự, các SSR nằm trên những vùng liên quan đến hoạt động sống của cơ thể. Thứ năm, các chỉ thị cho kết quả tốt, rõ nét, thuận lợi cho sử dụng, phân biệt rõ ràng trên gel polyacrylamit.

Trong số các cây một lá mầm, lúa có bộ nhiễm sắc thể $2n=24$ và có kích thước hệ gen tương đối nhỏ - khoảng 430 triệu cặp nucleotit (430 Mb) với gần 50.000 gen khác nhau. Hệ gen này là nhỏ nhất trong số các hệ gen của cây một lá mầm như ngô, lúa mì, lúa mạch, v.v.. Do đó, lúa có thể được xem như là một cây mô hình cho những nghiên cứu cấu trúc hệ gen cây một lá mầm nói riêng và thực vật nói chung. McCouch và cộng sự (1997) đã phát triển bộ chỉ thị SSR ở lúa ban đầu gồm khoảng 400 chỉ thị. Cho tới nay các nhà khoa học đã phát hiện được hơn chục nghìn chỉ thị SSR trên cây lúa. Các chỉ thị này đã được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền, lập bản đồ gen, chọn giống nhờ chỉ thị phân tử ở một loạt các cơ sở nghiên cứu di truyền chọn giống lúa.

Chỉ thị SSR được sử dụng rộng rãi và hiệu quả trong các nghiên cứu cấu trúc di truyền của loài lúa trồng *Oryza sativa*, nghiên cứu quá trình tiến hóa, đánh giá giống, lập bản đồ di truyền liên kết cho một số tính trạng quan trọng. Chỉ thị SSR đặc trưng cho loài, là chỉ thị đồng trội cho đa hình cao và ổn định. Hiện nay, hơn 15.000 chỉ thị SSR đã được thiết lập (www.gramene.org, 2006), phủ kín trên bản đồ liên kết di truyền của lúa (Giarrocco và đồng tác giả, 2007). Trong những năm gần đây, nhiều công trình sử dụng chỉ thị SSR nghiên cứu đa dạng di truyền và dấu chuẩn ADN để nhận dạng giống lúa đã được công bố (Kalyan và đồng tác giả, 2006; Jalaluddin đồng tác giả, 2007; Muhammad và đồng tác giả, 2009; Navraj và đồng tác giả, 2009).

Các nhà khoa học Trung Quốc đã đi tiên phong trong lĩnh vực sử dụng chỉ thị phân tử SSR cho đánh giá và khảo nghiệm lúa lai. Ở Tứ Xuyên, các nhà chọn giống lúa đã sử dụng 208 chỉ thị SSR để đánh giá 42 cây bố mẹ lúa lai và con lai F1. Cuối cùng họ đã chọn được 2 bộ chỉ thị chuẩn (1 bộ gồm 10 chỉ thị, bộ kia gồm 12 chỉ thị) để sử dụng (Xiao và ctv., 2006). Tiếp theo, các nhà khoa học ở Viện Nghiên cứu Lúa Quốc gia (Hàng Châu) phối hợp với Trường Đại học Nông nghiệp Hoa Nam và Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI) đã sử dụng bộ chỉ thị chuẩn gồm 24 chỉ thị SSR (2 chỉ thị SSR trên mỗi NST lúa) để đánh giá 63 dòng bố mẹ lúa lai cùng các con lai (Ying và ctv., 2007). Theo các tác giả

này, chỉ cần sử dụng bộ gồm 12 chỉ thị chính để đánh giá. Chỉ nên sử dụng thêm 12 chỉ thị còn lại nếu bộ 12 chỉ thị chính không cho kết quả tin cậy.

Rahman đã phân biệt 28 giống lúa địa phương của Bangladesh bằng các chỉ thị: RM5, RM55, RM105, RM151, RM153, RM170, RM206, RM264, RM266, RM278, RM287, RM307, RM333, RM334, M335, RM475 và RM481 (Rahman et al., 2010). Những chỉ thị này phân biệt tốt các giống lúa địa phương dùng trong nghiên cứu với đặc điểm nguồn gốc xuất xứ của các giống lúa *O. rufipogon* L. và *O. nivara* L.

Mark đã phân biệt các giống lúa mang tên Basmati trong thị trường Anh bằng các chỉ thị RM1, RM9, RM19, RM55, RM201, RM202, RM208, RM225, RM229 và đã xác định mẫu giống lúa thứ 5 rất giống với giống lúa Pusa có nguồn gốc từ Ấn Độ chứ không phải là giống lúa của Anh (Mark và cộng sự, 2004).

Borba đã đánh giá phân biệt 417 giống lúa Brazil: RM9, OG17, RM231, RM252, OG61, RM204, RM248, RM223, OG106, RM304, OG7, RM247 (Borba và cộng sự, 2009).

Ấn Độ sử dụng 27 chỉ thị để phân biệt 15 dòng chọn giống: RM21, RM216, RM171, RM286, RM536, RM206, RM19, RM20, RM167, RM333, RM264, RM125, RM566, RM320, RM247, RM544, RM346, RM547, RM10, RM286, RM519, RM149, RM210, RM144, RM561, RM47, RM222 (Chakravarthil and Naravaneniz, 2006).

Trung tâm tài nguyên Di truyền Thực vật sử dụng 50 chỉ thị để phân biệt đánh giá đa dạng di truyền các giống lúa nếp địa phương: RM5, RM128, RM174, RM263, RM266, RM279, RM509, RM16, RM22, RM251, RM142, RM273, RM335, RM349, RM36, RM153, RM164, RM267, RM3, RM133, RM340, RM559, RM51, RM172, RM180, RM346, RM72, RM152, RM264, RM284, RM242, RM245, RM285, RM296, RM171, RM216, RM244, RM20, RM21, RM144, RM286, RM332, RM17, RM19, RM20, RM309 (Trần Danh Sửu và cộng sự, 2010).

Đối với quy trình khảo nghiệm DUS (Distiness, Uniformity, Stability: DUS) hiện nay, việc xác định giống lúa trên cơ sở đánh giá một loạt các tính trạng hình thái gặp phải một loạt các hạn chế như tính chủ quan khi phân tích tính trạng, ảnh hưởng của môi trường và kỹ thuật canh tác lên tính trạng, sự khác biệt không rõ ràng giữa các giống có nguồn gốc gần nhau nên cần nhiều chỉ thị khác nhau để đánh giá dẫn đến việc xác định giống lúa phức tạp và tốn kém. Do đó, cần có phương pháp khảo nghiệm giống lúa nhằm với khả năng phân biệt rõ rệt hơn, khả năng đánh giá khách quan các dữ liệu, khảo nghiệm với lượng chỉ thị ít nhất, nhưng vẫn đánh giá được các kỳ giai đoạn phát triển cây trồng và rút ngắn thời gian đánh giá.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp kỹ thuật nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, trên cơ sở khảo sát tập đoàn 261 giống lúa thu thập được và 180 giống lúa để lập cơ sở dữ liệu giống cùng với 557 chỉ thị phân tử dùng để khảo sát lập bộ chỉ thị, các tác giả đã xây dựng được quy trình khảo nghiệm giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử, trong đó, các tác giả đã sàng lọc, lựa chọn và đề xuất ra các bộ chỉ thị sơ bộ gồm 5 chỉ thị đặc hiệu bao gồm RM11, RM21, RA163, RM481 và RM3412 RM1 để kiểm tra độ đồng nhất và độ ổn định của giống, và bộ chỉ thị tham chiếu gồm 15 chỉ thị đặc hiệu bao gồm RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033 để kiểm tra độ khác biệt dùng để đánh giá ba chỉ tiêu quan trọng bao gồm độ đồng nhất, độ ổn định và độ khác biệt của giống trong quy trình khảo nghiệm DUS (Distiness, Uniformity, Stability) giống lúa một cách nhanh chóng và hiệu quả trong số hàng trăm, hàng ngàn chỉ thị có trên www.gramene.org.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình khảo nghiệm giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Quy trình này nhằm đánh giá các chỉ tiêu về độ đồng nhất, độ ổn định và độ khác biệt của giống lúa để xác định đúng giống lúa cần kiểm tra. Quy trình khảo nghiệm giống lúa theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

a) Xác định độ đồng nhất của giống từ 50 đến 100 cây lúa của giống cần đánh giá bằng cách chạy PCR với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm: RM11, RM21, RA163, RM481 và RM3412 và xác định độ đồng nhất trên cơ sở so sánh kết quả điện di sản phẩm PCR với từng bộ chỉ thị này;

b) Kiểm tra độ ổn định của giống trên 30 cây trong ba thế hệ liên tiếp của giống cần đánh giá bằng cách chạy PCR với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm: RM11, RM21, RM163, RM481 và RM3412 và xác định độ ổn định bằng cách so sánh kết quả điện di sản phẩm PCR với từng bộ chỉ thị này;

c) Kiểm tra độ khác biệt của giống cần đánh giá bằng cách chạy PCR với 15 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu bao gồm: RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033 và xác định độ khác biệt bằng cách so sánh kết quả điện di sản phẩm PCR với từng bộ chỉ thị này; và

d) Đánh giá kết quả phân tích dựa trên điện di sản phẩm phản ứng PCR trên gel polyacrylamit 4,5-10% và so sánh với cơ sở dữ liệu để đưa ra kết luận khảo nghiệm về giống lúa;

khác biệt ở chỗ giải pháp sử dụng 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm: RM11, RM21, RA163, RM481 và RM3412 để kiểm tra độ đồng nhất và độ ổn định của giống, sử dụng 15 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu bao gồm: RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033 để xác định độ khác biệt của giống.

Theo khía cạnh thứ nhất của giải pháp hữu ích, trong đó bước a) xác định độ đồng nhất của giống bao gồm các công đoạn:

- Tách chiết ADN tổng số của mẫu bao gồm từ 50 đến 100 cá thể của giống cần đánh giá;
- Chạy phản ứng PCR với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm RM11, RM21, RA163, RM481 và RM3412;
- Điện di sản phẩm của phản ứng PCR trên gel polyacrylamit từ 4,5-10%.

Theo khía cạnh thứ hai của giải pháp hữu ích, trong đó bước b) kiểm tra độ ổn định của giống bao gồm các công đoạn:

- Tách chiết ADN tổng số của 30 cây của giống cần đánh giá được gieo từ hạt giống của ba vụ liên tiếp.
- Chạy phản ứng PCR với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm: RM11, RM21, RM163, RM481, RM3412.
- Điện di sản phẩm của phản ứng PCR trên gel polyacrylamit từ 4,5-10%.

Theo khía cạnh thứ ba của giải pháp hữu ích, trong đó bước c) kiểm tra độ khác biệt giống cần đánh giá bao gồm các công đoạn:

- Chia mẫu thành các nhóm có các thành phần alen khác nhau;
- Tách chiết ADN tổng số của từng nhóm;
- Chạy phản ứng PCR từng nhóm với 15 chỉ thị còn lại của bộ chỉ thị tham chiếu bao gồm: RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033;
- Điện di sản phẩm của phản ứng PCR trên gel polyacrylamit từ 4,5-10% để tổng hợp kết quả đánh giá.

Theo khía cạnh thứ tư của giải pháp hữu ích, trong đó bước d) đánh giá kết quả phân tích được dựa trên kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR trên gel polyacrylamit 4,5-10% và so sánh với cơ sở dữ liệu để đưa ra kết luận khảo nghiệm về giống lúa.

Theo khía cạnh thứ năm của giải pháp hữu ích, trong đó, tùy ý, bước kiểm tra độ khác biệt của giống còn được thực hiện với 10 chỉ thị mở rộng nhằm đánh giá bổ sung độ khác biệt trong trường hợp kết quả đánh giá trên 95% độ tương đồng với các giống có trong cơ sở dữ liệu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Ảnh chụp của sản phẩm PCR điện di trên gel polyacrylamit để đánh giá độ đồng nhất của giống với 50 cây của giống cần xác định bằng chỉ thị RM481.

Hình 2. Ảnh chụp của sản phẩm PCR điện di trên gel polyacrylamit để đánh giá độ khác biệt bên trong của giống với 50 cây của giống cần xác định bằng chỉ thị MADS3.

Hình 3. Ảnh chụp của sản phẩm PCR điện di trên gel polyacrylamit để đánh giá phân biệt 19 giống bằng chỉ thị RM6318.

Hình 4. Ảnh chụp của sản phẩm PCR điện di trên gel polyacrylamit để đánh giá phân biệt 19 giống bằng chỉ thị RM7558.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình khảo nghiệm giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử bao gồm các bước: a) xác định độ đồng nhất của giống; b) kiểm tra độ ổn định của giống; c) kiểm tra độ khác biệt của giống; và d) đánh giá kết quả phân tích.

Trong bước xác định độ đồng nhất của giống, các công đoạn thực hiện bao gồm: chiết ADN tổng số của mẫu; chạy phản ứng PCR với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ; điện di sản phẩm của phản ứng PCR.

Công đoạn chiết ADN tổng số: Mẫu dùng để chiết ADN tổng số là lá lúa non, các phương pháp chiết ADN là các phương pháp chung, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong một phương án cụ thể phương pháp tách chiết và tinh sạch được áp dụng theo phương pháp CTAB cải tiến (của phòng thí nghiệm Di truyền học, Trường đại học Gent, Bỉ). Phương pháp được thực hiện như sau:

Nghiền 1 gam mẫu lá trong nitor lỏng bằng cối chày sứ. Bột đã nghiền cho vào ống eppendorf 1,5 ml. Thêm 0,7 ml đệm CTAB đã làm ấm ở 65°C trong 10 phút. Tiếp đó, để các ống trong bể ổn nhiệt ở điều kiện 65°C trong 90 phút, lắc nhẹ nhàng, nhưng dứt khoát 15 phút một lần. Sau đó, chuyển các ống ở bể ổn nhiệt ra để ở nhiệt độ phòng 5 phút. Bổ sung 0,7 ml dung dịch cloroform/Isoamyl alcohol (24: 1) và lắc ống nhẹ nhàng 15 phút. Sau đó, ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 15 phút ở nhiệt độ phòng và hút lớp trên cùng vào ống eppendorf 1,5 ml mới. Bổ sung 0,7 ml dung dịch cloroform/Isoamyl alcohol (24: 1), lắc ống nhẹ nhàng 10 phút. Sau đó, ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Dùng pipetman hút lớp trên cùng sang ống eppendorf 1,5 ml mới. Bỏ

sung 1 ml cồn tuyệt đối lạnh và 15 μ l muối NaCl 5 M. Sau đó, xoay ống nhẹ nhàng vài phút. Để mẫu ở tủ -20°C trong 30 phút rồi ly tâm tốc độ 10.000 vòng/phút trong 7 phút. Bỏ phần dịch phía trên thu lấy tủa. Hoà tan tủa bằng 0,3 ml TE pH 8,0 và để tủ lạnh 4°C qua đêm. Hút dung dịch sang ống eppendorf mới, thêm 15 μ l RNAsa đã được đun cách thủy trong 20 phút, sau đó ủ ở 37°C trong 180 phút rồi bổ sung 0,7 ml hỗn hợp phenol/cloroform/Isoamyl alcohol (25: 24: 1) và lắc nhẹ trong 15 phút. Sau đó, ly tâm các ống trên với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm hút phần dịch trên sang ống eppendorf 1,5 ml mới sau đó thêm 0,8ml dung dịch cloroform/Isoamyl alcohol (24: 1) rồi lắc ống nhẹ nhàng trong 15 phút. Sau khi tiến hành ly tâm ở 12.000 vòng/ phút trong 15 phút, hút dịch nổi sang ống mới và bổ sung 1 ml cồn tuyệt đối lạnh và 15 μ l muối NaCl 5M rồi lắc nhẹ. Ly tâm 10.000 vòng/ phút trong 7 phút. Bỏ phần dịch nổi phía trên đi, thu tủa và rửa tủa hai lần bằng cồn 70 % lạnh. Sau khi thổi khô tủa trong 20 phút ở Laminar và hoà tan tủa bằng TE thu được mẫu. Giữ mẫu này trong tủ 4°C đến -20°C để cho các thí nghiệm tiếp theo.

Công đoạn chạy phản ứng với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ: PCR với các cặp mồi SSR được thực hiện với tổng thể tích là 20 μ l/mẫu gồm những thành phần được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần phản ứng SSR - PCR

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	H ₂ O	12,5 μ l
2	Buffer 10xPCR	2 μ l
3	dNTP (1mM)	2,5 μ l
5	Mồi xuôi (50 mg/ μ l)	0,5 μ l
6	Mồi ngược (50 mg/ μ l)	0,5 μ l
7	Enzyme Taq polymeraza (1 U/ μ l)	1 μ l
8	ADN tổng số (25 ng/ μ l)	1 μ l
	Tổng	20 μ l

Trộn đều các thành phần của hỗn hợp rồi chuyển vào máy PCR sau đó chạy theo chương trình của nhà sản xuất, cụ thể các bước như trong Bảng 2.

Bảng 2. Các bước chạy PCR

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
1	94	4
2	94	1
3	55-60	1
4	72	1
5	lặp lại 2-4 với khoảng từ 35-40 chu kỳ	
6	72	1
7	4	30

Bộ chỉ thị sơ bộ thực tế là các cặp mồi đặc hiệu (bao gồm mồi xuôi và mồi ngược) gồm có các bộ chỉ thị: RM11, RM21, RM163, RM481 và RM 3412 với các trình tự nucleotit trong Bảng 3.

Bảng 3. Trình tự nucleotit của 5 bộ chỉ thị sơ bộ

Stt	Chỉ thị	NST	Số alen	Trình tự
1	RM11	7	5	TCTCCTCTTCCCCGATC ATAGCGGGCGAGGCTTAG
2	RM21	11	6	ACAGTATTCCGTAGGCACGG GCTCCATGAGGGTGGTAGAG
3	RM163	5	6	CGCCTTTATGAGGAGGAGATGG AAACTCTTCGACACGCCTTGC
4	RM481	7	12	TAGCTAGCCGATTGAATGGC CTCCACCTCCTATGTTGTTG
5	RM3412	1	11	TGATGGATCTCTGAGGTGTAAAGAG TGCACTAATCTTTCTGCCACAGC

Công đoạn điện di sản phẩm PCR:

Sau khi chương trình kết thúc, kiểm tra mẫu phản ứng trên gel agarosa 0,8-1%, kiểm tra trên gel polyacrylamit 4,5%-10% nhuộm bạc hoặc gel polyacrylamit 6-8% nhuộm sybersaf.

Trong một phương án ưu tiên, điện di sản phẩm PCR được thực hiện trên gel agarosa 0,8%. Thành phần của gel bao gồm 0,8 gram agarosa trong 100ml dung dịch đệm TBE 0,5X, 5µl ethidium bromit 10mg/ml. 10X Dung dịch đệm

TBE (Tris-Boric acid-EDTA): 108 gram Tris- bazơ, 55,2 gram axit boric, 40 ml 0,5M EDTA, nước khử ion cho đủ 1 lít. 5X đệm tải (cho 100ml): 0,16 gram Bromophenol Blue, 0,16 gram Xylen Cyanol FF, 50% (v/v) Glyxeron và bổ sung nước cho đủ 100 ml.

Các bước tiến hành điện di trên gel agarosa 0,8% được thực hiện như sau:

Cân 0,8g agarosa, đong 100 ml TBE 0.5X cho vào bình tam giác và đun trong lò vi sóng cho đến khi tạo thành một dung dịch đồng nhất (1 - 2 phút), sau khi để nguội đến khoảng 50- 60°C, bổ sung 5µl ethidium bromit và lắc đều.

Đổ dung dịch agarosa vào khay sao cho không để lại bọt khí. Để gel đông lại trong khoảng 45 - 60 phút và lắp đặt gel đã chuẩn bị vào bể điện di rồi cho dịch đệm 0,5X TBE vào bể đến khi ngập gel rồi rút lược ra khỏi gel. Tiếp đó nạp mẫu ADN vào các giếng trên gel (2 - 3µl ADN + 1µl 5X đệm tải) và chạy điện di điện thế 100 - 125V và 100 mA trong thời gian 15 - 30 phút. Sau khi chạy gel, soi gel dưới ánh sáng UV, ghi kết quả, chụp ảnh hoặc lưu qua máy tính để làm kết quả so sánh.

Trong một phương án ưu tiên, điện di sản phẩm PCR được thực hiện trên gel polyacrylamit từ 4,5-10% (theo phòng thí nghiệm Ghent-Bỉ) như sau:

Hóa chất và dung dịch cần chuẩn bị:

- Dung dịch gốc 40% acrylamit (19:1= acrylamit: bisacrylamit).

Thể tích cần pha	500 ml	1000ml
Acrylamit	190g	380g
Bis- acrylamit	10g	20g
H ₂ O khử ion	cho đủ 500 ml	cho đủ 1000 ml

- Dung dịch làm việc (4,5% acrylamit)

Dung dịch gốc	Nồng độ cuối cùng	Lượng cần cho 500ml
40% acrylamit	4,5%	56,25ml
Urê	42%	210g
10X TBE	1X	50ml
H ₂ O khử ion		cho đủ 500 ml

- Dung dịch cố định/dừng phản ứng: 10% glacial axit axetic.
- Dung dịch Nhuộm: 1% AgNO_3 , sau đó bổ sung thêm 1,5ml formaldehyt 37%/1 lít dung dịch.
- Dung dịch hiện băng: 30% natri cacbonat (NaCO_3) và làm lạnh ở -20°C . Khi sử dụng cho thêm 1,5ml formaldehyt 37% và 200 μl natri thiosulfat/1lít dung dịch.
- 10X Dung dịch đệm TBE (Tris-axit boric -EDTA): 108 gram Tris- bazơ, 55,2 g axit boric, 40 ml 0,5M EDTA, nước khử ion cho đủ 1 lít
- 5X đệm tải (cho 100ml): 0,16 gram Bromophenol Blue, 0,16 gram Xylen Cyanol FF, 50% (v/v) Glyxeron, thêm nước cho đủ 100 ml

Các bước tiến hành:

Lau sạch bề mặt hai tấm kính bằng nước cất, sau đó lau lại bằng ethanol 95%. Lau tấm kính gắn với giấy lụa tấm Rain X. Lau tấm kính dài với dung dịch tạo liên kết (Binding solution: 2 μl Binding Silane, 1ml 95% ethanol, 5% glacial axit axetic), để 5 phút cho kính khô. Lau tiếp tấm kính dài bằng ethanol 95% ba lần, mỗi lần sau 5 phút và lắp ghép 2 tấm kính lại với nhau, sử dụng nẹp Sigma 0,4 mm.

Lấy dung dịch 4,5% acrylamit từ dung dịch gốc 40% acrylamit (19:1= acrylamit: bisacrylamit). Đổ 60 ml dung dịch làm việc vào 1 cốc đong 100ml. Thêm 600 μl ammonium persulfate (APS 10%) và 60 μl TEMED, trộn đều sau đó bơm dung dịch gel vào giữa hai tấm kính sao cho không có bọt khí và cài lược vào giữa hai tấm kính (răng lược hướng ra phía ngoài). Dùng kẹp cố định lược. Sau khi để gel polymer hoá trong 2 giờ, tháo lược và loại bỏ hết các mảnh gel thừa bám trên mặt tấm kính và lắp vào bộ điện di, pha 1lít đệm TBE 1X vào buồng đệm trên và dưới.

Chạy tiền điện di (prerun) với cường độ dòng điện là 50-60A, điện thế là 92-100W. Sau đó trộn sản phẩm PCR với 8 μl dung dịch dừng (10mM NaOH; 95% formamit; 0,05% Bromophenol Blue; 0.05% xylen cyanol). Sau khi biến tính các sản phẩm PCR và chỉ thị trọng lượng phân tử ở 95°C trong 5 phút, ngay

lập tức đặt vào trong nước đá và phủ nước đá lên trên ít nhất khoảng 5 phút. Tiếp đó tra vào mỗi giếng 6µl sản phẩm PCR đã được làm biến tính, giếng đầu tiên cho 6µl chỉ thị trọng lượng phân tử.

Tiến hành điện di với điện thế 60W tại 50°C, thời gian khoảng 60-90 phút. Tiếp đó, tháo gỡ tấm kính bám gel và cố định gel bằng cách đặt tấm kính vào khay sao cho mặt bám gel hướng lên trên, đổ dung dịch cố định/dùng phản ứng vào và lắc nhẹ trong 30 phút. Sau đó lấy gel ra khỏi dung dịch, chú ý giữ lại dung dịch này để dùng cho bước sau.

Rửa gel bằng cách đổ 1lít nước cất vào khay đựng tấm kính bám gel, lắc nhẹ trong 5 phút. Rửa lặp lại 2 lần, sau khi nhuộm gel trong 1 lít dung dịch nhuộm trong 30 phút, lấy gel ra khỏi dung dịch nhuộm và rửa lại bằng nước cất trong 5 giây. Tiếp đó đưa gel này vào dung dịch hiện băng và lắc nhẹ đến khi thấy các băng xuất hiện thì chuyển gel vào dung dịch cố định/dùng phản ứng ở trên trong 3-6 phút rồi rửa lại bằng nước cất. Sau khi để gel khô ở nhiệt độ phòng, tiến hành đọc và sao chụp kết quả.

Trong bước kiểm tra độ ổn định của giống, các công đoạn thực hiện bao gồm: chia mẫu thành các nhóm có các thành phần alen khác nhau dựa trên kết quả đã chạy điện di ở trên và kiểm tra 30 cây/giống trong ba thế hệ liên tiếp với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ và điện di sản phẩm của phản ứng PCR.

Công đoạn chia mẫu thành nhóm có các thành phần alen khác nhau phải tuân theo nguyên tắc tối đa mỗi giống cho phép đến 5 nhóm. Nếu một giống có nhiều hơn 5 nhóm thì có thể kết luận trực tiếp về độ ổn định của giống mà không cần làm tiếp. Công đoạn chạy PCR được thực hiện giống như bước kiểm tra độ khác biệt với 5 chỉ thị sơ bộ bao gồm RM11, RM21, RM163, RM481 và RM3412.

Trong bước kiểm tra độ khác biệt của giống, các công đoạn thực hiện bao gồm: tách chiết ADN tổng số của mẫu; chạy phản ứng PCR với 15 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ; và điện di sản phẩm của phản ứng PCR.

Trong bước kiểm tra độ khác biệt của giống cần đánh giá, được thực hiện khi giống kiểm tra đã đáp ứng các yêu cầu trong các bước trên. Các công đoạn thực hiện bao gồm: tách chiết ADN tổng số của mẫu; chạy phản ứng PCR và điện di sản phẩm của phản ứng PCR thực hiện giống như trên chỉ khác được thực hiện với 15 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu bao gồm RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033.

Bảng 4. Trình tự của 15 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu

stt	Chỉ thị	NST	Số alen	Trình tự
1	RM1	1	6	GCGAAAACACAATGCAAAA GCGTTGGTTGGACCTGAC
2	RM5	1	5	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA GCATCCGATCTTGATGGG
3	RM6	2	4	GTCCCCTCCACCCAATTC TCGTCTACTGTTGGCTGCAC
4	RM17	12	6	TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC GGTGATCCTTTCCCATTTCA
5	RM25	8	6	GGAAAGAATGATCTTTTCATGG CTACCATCAAAACCAATGTTC
6	RM206	5	8	CCCATGCGTTTAACTATTCT CGTTCCATCGATCCGTATGG
7	RM215	9	5	CAAAATGGAGCAGCAAGAGC. TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG
8	RM333	10	6	GTACGACTACGAGTGTCACCAA GTCTTCGCGATCACTCGC
9	RM3252	1	7	GGTAACTTTGTTCCCATGCC GGTCAATCATGCATGCAAGC
10	RM3843	4	4	ACCCTACTCCCAACAGTCCC GGGGTCGTACGCTCATGTC
11	RM7097	3	5	GGGAGGAGGAGAGGAGATTG TTAGGCCTGCACTTTTGGAG
12	R4M13	4	4	TACACGGTAGACATCCAACA ATGATTTAACCGTAGATTGG

13	MADS3	6	4	ATGCGGATAATCAAATAGACTACG CTGTGCTGGCCGGAGTGCT
14	SO1160	1	4	TTGCGATTTATTTGCCAGTG CCAGGCATCCAATGCTTATT
15	S11033	11	6	TGCCCTAGTCAGTCCCTCTG TTTTCGCGTACGGATAGGAT

Theo một phương án ưu tiên, bước kiểm tra độ khác biệt của giống có thể được thực hiện bổ sung với 10 chỉ thị mở rộng để kiểm tra các trường hợp đặc biệt (nếu cần).

Bộ chỉ thị mở rộng bao gồm 10 chỉ thị với các trình tự nucleotit sau:

Stt	Chỉ thị	Trình tự
1	RM19	CAAAAACAGAGCAGATGAC CTCAAGATGGACGCCAAGA
2	RM223	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC GAAGGCAAGTCTTGGCACTG
3	RM341	CAAGAAACCTCAATCCGAGC CTCCTCCCGATCCCAATC
4	RM3486	TCTCTTTTCCCTCCTTTCCC GGCCTGCAAGAGGAGAAAAC
5	RM5758	GAGGCCCTGATATTCAATGG TATGGCTTAGCGTTAGACCG
6	RM10825	GGACACAAGTCCATGATCCTATCC GTTTCCTTTCCATCCTTGTTGC
7	RM17954	ATTTCAGTACAAGGCACCCATGC GTAGACGAGGGAGTACCAACTTGC
8	RM26063	GATCCATATGCCTCTTCGATTGG AACTCCAGCAGTGAGAGCGTAGC
9	MADS8	TGCCGTTGCCCTAAGTTGTCTTCT AGGCCCTAGGGCTTGCTGTTTCT
10	EST20	GACCTGGCTGATCTGGCTTCTTCA AACTCCCCCATTTCTCGATGAGCT

So sánh kết quả thu được với cơ sở dữ liệu trong phần mềm DUS-DFP được Viện di truyền Nông nghiệp xây dựng, quản lý và hiện có thể tiếp cận được tại Viện di truyền Nông nghiệp, Km số 2, đường Phạm Văn Đồng, Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà nội. Nếu giống có phổ “vân tay ADN” (DNA fingerprinting) không tương đồng với bất kỳ một giống nào đã có trong thư viện quá 95% thì kết luận đó là giống mới.

Trong trường hợp nếu phổ ADN so sánh với cơ sở dữ liệu có mức tương đồng trên 95% thì, tùy ý, có thể lựa chọn thêm bước kiểm tra bổ sung bao gồm thực hiện với bộ chỉ thị mở rộng (RM19, RM223, RM341, RM3486, RM5758, RM10825, RM17954, RM26063, MADS8, EST20). Giống mới là giống có phổ ADN khác hoàn toàn với các giống đã được lưu giữ trong thư viện bởi ít nhất một trong số các chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu chính thức và một trong số các chỉ thị của bộ chỉ thị mở rộng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả với các ví dụ cụ thể để thực hiện quy khảo nghiệm giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử, tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích chứ không nhằm thu hẹp phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1. Xác định độ đồng nhất của giống

Nghiền 1 gam mẫu lá của giống cần xác định trong nitor lỏng bằng cối chày sứ. Bột đã nghiền cho vào ống eppendorf 1,5 ml. Thêm 0,7 ml đệm CTAB đã làm ấm ở 65°C trong 10 phút. Tiếp đó, để các ống trong bể ổn nhiệt ở điều kiện 65°C trong 90 phút, lắc nhẹ nhàng nhưng dứt khoát 15 phút một lần. Sau đó, chuyển các ống ở bể ổn nhiệt ra để ở nhiệt độ phòng 5 phút. Bổ sung 0,7 ml dung dịch cloroform/Isoamyl alcohol (24: 1) và lắc ống nhẹ nhàng 15 phút. Sau đó, ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 15 phút ở nhiệt độ phòng và hút lớp trên cùng vào ống eppendorf 1,5 ml mới. Bổ sung 0,7 ml dung dịch cloroform/Isoamyl alcohol (24: 1), lắc ống nhẹ nhàng 10 phút. Sau đó, ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 15

phút ở nhiệt độ phòng. Dùng pipetman hút lớp trên cùng sang ống eppendorf 1,5 ml mới. Bổ sung 1 ml cồn tuyệt đối lạnh và 15 μ l muối NaCl 5 M. Sau đó, xoay ống nhẹ nhàng vài phút. Để mẫu ở tủ -20°C trong 30 phút rồi ly tâm tốc độ 10.000 vòng/ phút trong 7 phút. Bỏ phần dịch phía trên thu lấy tủa. Hoà tan tủa bằng 0,3 ml TE pH 8,0 và để tủ lạnh 4°C qua đêm. Hút dung dịch sang ống eppendorf mới, thêm 15 μ l RNAsa đã được đun cách thủy trong 20 phút, sau đó ủ ở 37°C trong 180 phút rồi bổ sung 0,7 ml hỗn hợp phenol/cloroform/Isoamyl alcohol (25: 24: 1) và lắc nhẹ trong 15 phút. Sau đó, ly tâm các ống trên với tốc độ 12.000 vòng/ phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm hút phần dịch trên sang ống eppendorf 1,5 ml mới sau đó thêm 0,8ml dung dịch cloroform/Isoamyl alcohol (24: 1) rồi lắc ống nhẹ nhàng trong 15 phút. Sau khi tiến hành ly tâm ở 12.000 vòng/ phút trong 15 phút, hút dịch nổi sang ống mới và bổ sung 1 ml cồn tuyệt đối lạnh và 15 μ l muối NaCl 5M rồi lắc nhẹ. Ly tâm 10.000 vòng/ phút trong 7 phút. Bỏ phần dịch nổi phía trên đi, thu tủa và rửa tủa hai lần bằng cồn 70 % lạnh. Sau khi thổi khô tủa trong 20 phút ở Laminar và hoà tan tủa bằng TE thu được mẫu. Giữ mẫu này trong tủ 4°C đến -20°C để cho các thí nghiệm tiếp theo.

Các cặp mồi tương ứng với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm RM11, RM21, RM163, RM481, RM3412 được chuẩn bị bởi nhà cung cấp. Các thành phần được chuẩn bị theo Bảng 1 nêu trên và chạy PCR.

Sau khi PCR, tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamit 4,5% bằng cách lấy 4,5% acrylamit từ dung dịch gốc 40% acrylamit (19:1= acrylamit: bisacrylamit). Đổ 60 ml dung dịch làm việc vào 1 cốc đong 100ml. Thêm 600 μ l ammonium persulfate (APS 10%) và 60 μ l TEMED, trộn đều sau đó bơm dung dịch gel vào giữa hai tấm kính sao cho không có bọt khí và cài lược vào giữa hai tấm kính (răng lược hướng ra phía ngoài). Dùng kẹp cố định lược. Sau khi để gel polymer hoá trong 2 giờ, tháo lược và loại bỏ hết các mảnh gel thừa bám trên mặt tấm kính và lắp vào bộ điện di, pha 1lít đệm TBE 1X vào buồng đệm trên và dưới.

Chạy tiền điện di (prerun) với cường độ dòng điện là 50-60A, điện thế là 92-100W. Sau đó trộn sản phẩm PCR với 8μl dung dịch dừng (10mM NaOH; 95% formamit; 0,05% Bromophenol Blue; 0.05% xylen cyanol). Sau khi biến tính các sản phẩm PCR và chỉ thị trọng lượng phân tử ở 95°C trong 5 phút, ngay lập tức đặt vào trong nước đá và phủ nước đá lên trên ít nhất khoảng 5 phút. Tiếp đó tra vào mỗi giếng 6μl sản phẩm PCR đã được làm biến tính, giếng đầu tiên cho 6μl chỉ thị trọng lượng phân tử.

Tiến hành điện di với điện thế 60W tại 50°C, thời gian khoảng 60-90 phút. Tiếp đó, tháo gỡ tấm kính bám gel và cố định gel bằng cách đặt tấm kính vào khay sao cho mặt bám gel hướng lên trên, đổ dung dịch cố định/dừng phản ứng vào và lắc nhẹ trong 30 phút. Sau đó lấy gel ra khỏi dung dịch, chú ý giữ lại dung dịch này để dùng cho bước sau.

Rửa gel bằng cách đổ 1lít nước cất vào khay đựng tấm kính bám gel, lắc nhẹ trong 5 phút. Rửa lặp lại 2 lần, sau khi nhuộm gel trong 1 lít dung dịch nhuộm trong 30 phút, lấy gel ra khỏi dung dịch nhuộm và rửa lại bằng nước cất trong 5 giây. Tiếp đó đưa gel này vào dung dịch hiện băng và lắc nhẹ đến khi thấy các băng xuất hiện thì chuyển gel vào dung dịch cố định/dừng phản ứng ở trên trong 3-6 phút rồi rửa lại bằng nước cất. Sau khi để gel khô ở nhiệt độ phòng, kết quả ảnh chụp sản phẩm PCR với chỉ thị RM480 được thể hiện trên Hình 1.

Ví dụ 2. Kiểm tra độ ổn định của giống

+ Đánh giá sơ bộ sự ổn định bên trong của mẫu

Trước khi kiểm tra độ ổn định của giống, tiến hành kiểm tra sự ổn định bên trong của giống ở Ví dụ 1 nhằm khẳng định các giống khảo nghiệm có độ đồng nhất theo tiêu chuẩn đánh giá.

Để thực hiện việc kiểm tra độ ổn định bên trong của mẫu đối với giống cần khảo nghiệm, các bước chiết ADN tổng số, PCR được thực hiện như trong Ví dụ 1. Sau khi PCR 4 cặp mỗi chuẩn và kiểm tra sản phẩm trên gel polyacrylamit.

Kết quả đối với chỉ thị MADS3 được thể hiện trong Hình 2. Căn cứ vào kết quả điện di cho thấy các dòng thuộc mỗi giống khi điện di đều cho các dải giống hệt so với các dòng còn lại do vậy có thể kết luận các dòng này có kiểu gen giống hệt nhau. Các giống này được sử dụng làm mẫu để kiểm tra độ ổn định của giống.

+ Kiểm tra độ ổn định của giống

Để tiến hành kiểm tra độ ổn định của giống. Sử dụng mẫu của 3 thể hệ (mẫu được gieo trồng trong 3 vụ liên tiếp được sử dụng) giống được xác định ở trên. Các kỹ thuật chiết ADN tổng số, chạy PCR được thực hiện như trong Ví dụ 1. Kết quả ảnh chụp của sản phẩm PCR điện di trên gel polyacrylamit để đánh giá độ ổn định của giống với 30 cây/giống của 04 giống khảo nghiệm với các chỉ thị trong bộ chỉ thị tham chiếu sơ bộ. Kết quả ảnh chụp sản phẩm PCR trên gel polyacrylamit với chỉ thị RM7558 được thể hiện trong Hình 3.

Ví dụ 3. Kiểm tra độ khác biệt của giống cần đánh giá

Để tiến hành đánh giá độ khác biệt của giống cần đánh giá với các giống đã có cần phân tích ADN 1cây/1giống. Tiến hành chạy PCR với 15 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu. Các bước chiết ADN, tổng số, chạy PCR được thực hiện như trong Ví dụ 1. Các chỉ thị tham chiếu được sử dụng trong thí nghiệm này bao gồm RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033. Kết quả điện di trên gel polyacrylamit 19 giống điển hình với chỉ thị RM17 được thể hiện trong Hình 4.

Ví dụ 5. Phân tích kết quả

Thực hiện so sánh kết quả điện di với các giống đã có trong thư viện “dấu chuẩn di truyền ADN giống” trong phần mềm DUS-DFP. Kết quả so sánh với dữ liệu trong thư viện cho thấy giống khảo nghiệm có độ đồng nhất, độ ổn định và độ khác biệt và có phổ ADN tương đồng dưới 90% với các giống có trong thư viện. Điều đó đưa ra kết luận giống được khảo nghiệm là giống mới.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép xác định được độ đồng nhất, độ ổn định và độ khác biệt của giống lúa trong công tác khảo nghiệm giống lúa (quy trình DUS) bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Tổng số các alen của bộ chỉ thị tham chiếu chính thức là 120 alen. Nếu sử dụng 20 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu chính thức, ta sẽ phân biệt được $1,32434 \times 10^{15}$ mẫu giống khác nhau bởi ít nhất 1 cặp alen. Nếu tính thêm cả bộ chỉ thị mở rộng ta sẽ có 172 alen, kích thước từ 80-253 bp. Khi đó nếu sử dụng cả 30 chỉ thị theo giải pháp hữu ích thì sẽ phân biệt được $1,40169 \times 10^{22}$ mẫu giống khác nhau bởi ít nhất 1 cặp alen.

Quy trình theo giải pháp hữu ích có khả năng xác định được chính xác giống lúa và đây là cơ sở chính xác nhất để xử lý các tranh chấp liên quan đến bản quyền về giống lúa.

Quy trình theo giải pháp nói chung đem lại hiệu quả về kinh tế và khoa học rõ rệt, tránh khỏi chi phí cho những tranh cãi vô ích, chi phí đánh giá trên đồng ruộng lặp lại nhiều lần, là phương tiện khoa học và chính xác để phục vụ cho công tác quản lý giống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình khảo nghiệm giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Xác định độ đồng nhất của giống từ 50 đến 100 cây lúa của giống đánh giá bằng cách chạy PCR với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm: RM11, RM21, RA163, RM481 và RM3412 và xác định độ đồng nhất trên cơ sở so sánh kết quả điện di sản phẩm PCR với từng bộ chỉ thị này;

b) Kiểm tra độ ổn định của giống trên 30 cây trong ba thế hệ liên tiếp của giống cần đánh giá bằng cách chạy PCR với 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm: RM11, RM21, RM163, RM481 và RM3412 và xác định độ ổn định bằng cách so sánh kết quả điện di sản phẩm PCR với từng bộ chỉ thị này;

c) Kiểm tra độ khác biệt của giống cần đánh giá bằng cách chạy PCR với 15 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu bao gồm: RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033 và xác định độ khác biệt bằng cách so sánh kết quả điện di sản phẩm PCR với từng bộ chỉ thị này; và

d) Đánh giá kết quả phân tích dựa trên điện di sản phẩm phản ứng PCR trên gel polyacrylamit 4,5-10% và so sánh với cơ sở dữ liệu để đưa ra kết luận khảo nghiệm về giống lúa;

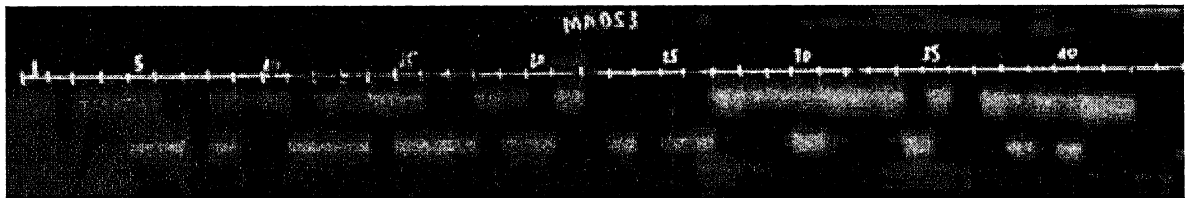
khác biệt ở chỗ giải pháp sử dụng 5 chỉ thị của bộ chỉ thị sơ bộ bao gồm: RM11, RM21, RA163, RM481 và RM3412 để kiểm tra độ đồng nhất và độ ổn định của giống, sử dụng 15 chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu bao gồm: RM1, RM5, RM6, RM17, RM25, RM206, RM215, RM333, RM3252, RM3843, RM7097, R4M13, MADS3, SO1160 và S11033 để xác định độ khác biệt của giống.

1899

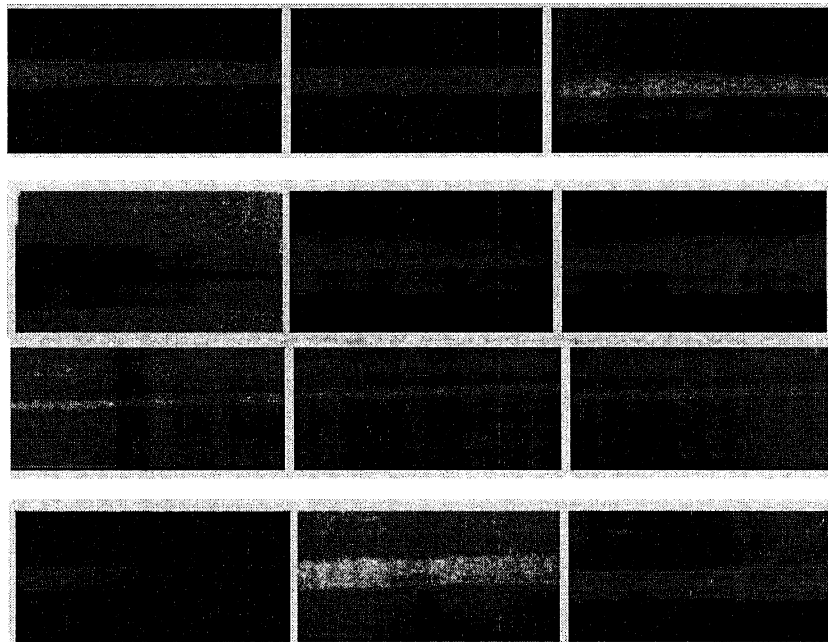
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

