

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ADN TRONG CHỌN TẠO GIỐNG CÀ CHUA CHÍN CHẬM CHỨA GEN *RIN*

Nguyễn Thị Vân¹, Nghiêm Thị Hương²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này sử dụng chỉ thị phân tử ADN để chọn lọc các cá thể ưu tú trong quần thể phân ly F2 có chứa gen rin (ripening inhibitor) kiểm soát đặc tính chín chậm, có năng suất cao và chất lượng tốt ở cà chua. Thí nghiệm thực hiện trên quần thể phân ly có nguồn gốc từ giống cà chua lai có mã số 159 nhập nội từ Mỹ bởi Trung tâm Bảo tồn và Phát triển nguồn gen cây trồng.

Từ khóa: Gen chín chậm, cà chua chín chậm, gen rin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill) là loại rau ăn quả có giá trị dinh dưỡng cao, được trồng với diện tích lớn nhất trong các cây rau. Sản xuất cà chua ở miền Bắc nước ta chủ yếu ở vụ Đông Xuân, thời điểm có nhiều yếu tố môi trường thuận lợi cho cà chua sinh trưởng, phát triển và ít bị sâu bệnh phá hại nên năng suất và chất lượng khá cao. Tuy nhiên do thu hoạch tập trung nên giá tương đối thấp, ảnh hưởng đến thu nhập của người sản xuất. Trong khi đó, từ tháng 6 - 9 không có đủ cà chua cung cấp cho thị trường. Vì thế, đã có nhiều biện pháp kỹ thuật nhằm rải vụ cà chua nhưng các giống mới chọn tạo của ta hiện nay chưa có giống nào có đặc tính chín chậm của quả.

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu chọn tạo thành công các giống cà chua chín chậm có đặc điểm quả đạt đủ kích thước và tích lũy đủ chất khô nhưng chín rất chậm do mất hoặc hạn chế khả năng tổng hợp ethylene - là một hormone tín hiệu hoạt hóa một số enzyme liên quan đến quá trình chín của quả. Các giống cà chua này có chứa các gen đột biến tự nhiên liên quan đến đặc tính chín chậm. Trong đó, *rin* là một đột biến lặn tìm thấy ở cây cà chua trồng tự nhiên đã được sử dụng trong nhiều chương trình chọn tạo giống cà chua chín chậm. Chỉ thị phân tử ADN liên kết chặt với gen này cũng đã được phát triển và sử dụng (Xiaoli, 2010). Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam vẫn chưa tạo được giống cà chua nào có đặc tính chín chậm. Vì vậy ứng dụng chỉ thị phân tử nhằm phát hiện gen chín chậm - *rin* nhằm tạo nguồn vật liệu cho công tác chọn tạo giống cà chua chín chậm là việc làm cần thiết.

2. NỘI DUNG

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu, thời gian và địa điểm nghiên cứu

^{1,2} Giảng viên khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức

Vật liệu: Quần thể phân ly của giống cà chua chín chậm F1 được nhập nội từ Mỹ bởi Trung tâm Bảo tồn và Phát triển nguồn gen cây trồng, có mã số là 159; Giống đối chứng HT152. Sử dụng cặp mồi PCR dùng để phát hiện các cá thể mang gen chín chậm *rin* (Xiaoli, 2010):

Fw: 5' -TTAAGTTGCGAAGAAGTCTGGTGTTACCTT-3'

Rv: 5' -GCCAAAACACTTCAATTTCTTTAAAAGTT-3'.

Địa điểm nghiên cứu: thực hiện tại phòng thí nghiệm bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ sinh học ứng dụng - khoa Công nghệ sinh học - Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam, Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội.

Thời gian thực hiện: từ ngày 08/2015 - 08/2016.

2.1.2. Nội dung nghiên cứu

Đánh giá và chọn lọc các cá thể ưu tú có năng suất cao, chất lượng tốt, có đặc tính chín chậm trong quần thể phân ly của giống cà chua lai chín chậm 159.

Sử dụng chỉ thị phân tử ADN dựa trên kỹ thuật PCR phát hiện các cá thể mang gen chín chậm *rin* trong quần thể phân ly giống cà chua lai chín chậm 159.

2.1.3. Phương pháp nghiên cứu

2.1.3.1. Đánh giá đặc tính chín chậm của quả

Theo dõi mỗi cây 5 quả về các chỉ tiêu sau:

Thời gian từ khi quả đạt kích thước tối đa đến khi chuyển màu;

Thời gian từ khi quả chuyển màu đến khi chín hoàn toàn;

Thời gian từ khi quả chuyển màu đến khi hỏng (thời gian bảo quản).

2.1.3.2. Sử dụng chỉ thị phân tử ADN (PCR) phát hiện gen chín chậm *rin*

Hóa chất và đệm chiết

DEB (DNA Extraction Buffer): 2% CTAB (w/v), 1,5 M NaCl, 100mM Tris- HCl, 20 mM EDTA, 2% PVP (w/v), 2% β - Mercaptoethanol. Hòa tan CTAB và các hóa chất khác trong nước cất 2 lần bằng cách ủ trong waterbath ở 65°C đến khi CTAB tan hoàn toàn. Thêm 2% β - Mercaptoethanol ngay trước khi sử dụng.

TE buffer: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0.

Hóa chất khác: Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1), Chloroform: isoamyl alcohol (24:1), 100% ethanol, 76% ethanol.

Quy trình tách chiết ADN từ lá cà chua

Quy trình tách chiết ADN từ lá cà chua được tiến hành theo phương pháp CTAB (Doyle và Doyle, 1990).

Kỹ thuật PCR dùng để phát hiện gen chín chậm

Trình tự mồi dùng để phát hiện gen chín chậm *rin* (Xiaoli, 2010)

Fw: 5' -TTAAGTTGCGAAGAAGTCTGGTGTTACCTT-3'

Rv: 5' -GCCAAAACACTTCAATTTCTTTAAAAGTT- 3'

Thành phần phản ứng PCR: Theo hướng dẫn của công ty KAPA BIOSYSTEMS cho tổng thể tích 25 μ l gồm: PCR buffer (5X) 5 μ l, MgCl₂ (25mM) 3 μ l, dNTPs (10mM) 0.2 μ l, Forward primer (10 μ M) 1.25 μ l, Reverse primer (10 μ M) 1.25 μ l, KAPATaq HotStart DNA Polymerase (5U/ μ l) 0.1 μ l, DNA khuôn 1 μ l.

Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR phát hiện gen *rin*: 94°C trong 4 phút; 35 chu kỳ: 94°C trong 30 giây, 53°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút và kết thúc là 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được phân tách trong bể điện di sử dụng gel agarose 1% trong đệm TAE (1X), nhuộm bằng ethidium bromide và quan sát và chụp ảnh dưới đèn UV.

2.1.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2007.

2.3. Kết quả và thảo luận

2.3.1. Đánh giá thời gian bảo quản của quả cà chua chín chậm

Kết quả đánh giá thời gian bảo quản quả cà chua thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Đánh giá đặc tính chín chậm với quả của các cá thể nghiên cứu

Cá thể	Thời gian từ khi quả		
	Đạt kích thước tối đa đến khi chuyển màu (ngày)	Chuyển màu đến khi chín hoàn toàn (ngày)	Chuyển màu đến khi bị hỏng (ngày)
1	14,6 $\pm$ 1,3	12,2 $\pm$ 1,3	46,0
2	12,8 $\pm$ 0,8	12,4 $\pm$ 1,9	35,0
3	12,6 $\pm$ 0,9	12,4 $\pm$ 0,5	31,0
4	13,2 $\pm$ 1,1	10,0 $\pm$ 0,7	32,0
5	13,4 $\pm$ 0,9	15,2 $\pm$ 0,8	36,0
6	12,4 $\pm$ 0,9	8,6 $\pm$ 1,9	30,0
7	12,6 $\pm$ 0,5	8,6 $\pm$ 1,3	29,0
8	12,8 $\pm$ 1,8	13,2 $\pm$ 2,6	54,0
9	11,2 $\pm$ 0,8	9,8 $\pm$ 0,8	28,0
10	13,4 $\pm$ 1,5	15,2 $\pm$ 1,3	40,0
11	12,2 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 0,7	31,0
12	12,4 $\pm$ 0,9	13,2 $\pm$ 2,8	28,0
13	12,0 $\pm$ 1,0	11,8 $\pm$ 1,6	31,0
14	12,0 $\pm$ 0,7	12,2 $\pm$ 1,8	33,0
15	11,8 $\pm$ 0,8	12,0 $\pm$ 2,5	32,0

16	11,8±0,8	6,6±0,5	25,0
17	12,8±0,8	12,0±1,0	33,0
18	12,8±1,1	12,4±2,7	31,0
19	12,8±0,8	8,6±0,5	28,0
20	13,4±0,5	12,0±1,4	27,0
HT152	11,8±0,5	8,8±0,6	27,0

2.3.1.1. Thời gian từ lúc quả đạt kích thước tối đa đến khi chuyển màu

Thời gian từ lúc quả đạt kích thước tối đa đến khi chuyển màu là thời kỳ quả không tăng trưởng về kích thước mà chủ yếu là quá trình tích lũy chất dinh dưỡng vào quả. Thu hoạch quả khi còn xanh giúp việc vận chuyển và bảo quản được lâu hơn nhưng chất lượng quả không đảm bảo, trong khi thu hoạch quả khi chín hoàn toàn đảm bảo được chất lượng quả nhưng quả nhanh thối hỏng do dễ dập nát trong khi vận chuyển. Thời điểm quả chuyển màu là thời điểm thu hái vừa đảm bảo chất lượng quả khi chín, đồng thời quả vẫn đủ độ cứng đảm bảo không dập nát trong vận chuyển. Vì thế theo dõi thời điểm quả chuyển màu giúp xác định thời điểm thu hái quả hợp lý. Kết quả theo dõi ở bảng 1 cho thấy, những cây có thời gian quả đạt kích thước tối đa đến khi chuyển màu dài nhất 13,4 ngày ở cây số 10 và 14,6 ngày ở cây 1.

2.3.1.2. Thời gian từ khi quả chuyển màu đến khi chín hoàn toàn

Thời gian từ khi quả chuyển màu đến chín hoàn toàn cho biết thời gian chín của quả nhanh hay chậm, đặc trưng cho tính chín chậm của quả. Số liệu từ bảng 1, giúp chúng ta nhận thấy nhóm quả có thời gian chín ngắn (8,6 - 10,8 ngày) ở những cây 6, 7, 9, 16, 11, 19; nhóm quả có thời gian chín trung bình (10,8 - 13,0 ngày) gồm những quả ở cây 1, 3, 2, 13, 14, 15, 17, 18, 20; nhóm quả có thời gian chín chậm hơn (từ 13,0 - 15,2 ngày) gồm những quả ở cây 5, 8, 10, 12.

3.1.3. Thời gian từ khi quả chuyển màu đến khi bị hỏng

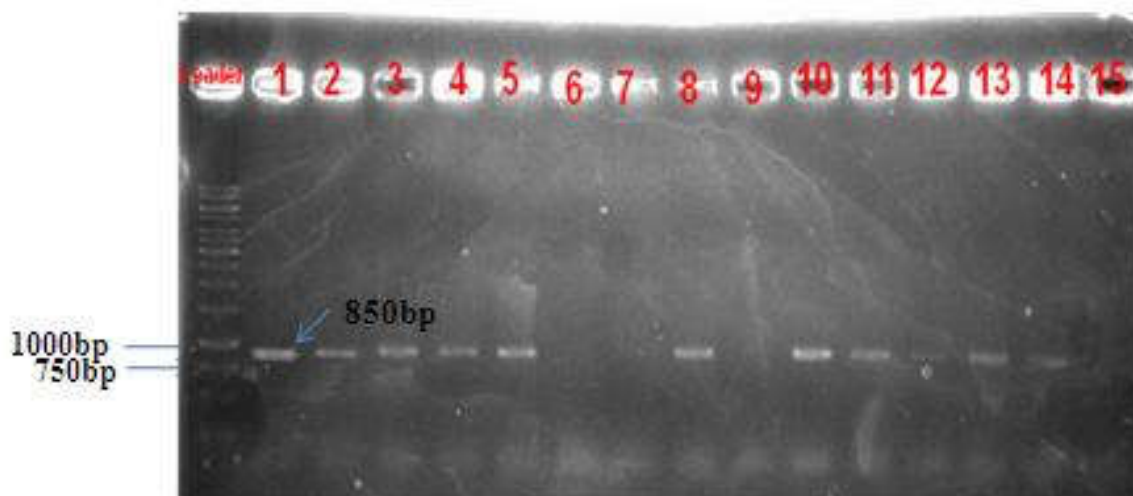
Thời gian tồn trữ quả đặc trưng cho khả năng bảo quản của cà chua sau khi thu hái. Quả càng bảo quản được lâu thì càng có ý nghĩa về kinh tế. Qua bảng 1, quả thu được từ các cá thể trong quần thể phân ly có thời gian từ khi quả chuyển màu đến khi hỏng (thời gian tồn trữ) biến động từ 25,0 ngày (cây 16) đến 54,0 ngày (cây 8), mẫu quả ở cây đối chứng có thời gian bảo quản 27,0 ngày. Khi phân ra 3 nhóm khác nhau dựa vào thời gian tồn trữ (thời gian tồn trữ ngắn, trung bình và dài) thì nhóm cây có quả tồn trữ được trong thời gian trung bình (34,7 - 44,3 ngày) gồm các cây số 2, 5, 10; nhóm cây có quả tồn trữ được trong thời gian dài nhất (44,3 - 54 ngày) gồm cây 1 (46 ngày); cây 8 (54 ngày); nhóm còn lại gồm những cây có quả tồn trữ được trong thời gian ngắn hơn (25,0 - 34,7 ngày). Đối với những cây có thời gian quả tồn trữ trung bình và dài, cây 1, cây 5 và cây 10 có quả khi chín màu vàng; còn quả của cây 2 và cây 8 khi chín hoàn toàn có màu đỏ.

Khi tiến hành so sánh thời gian bảo quản trong phòng đối với 2 mẫu quả: mẫu quả thu được từ cá thể số 8 (quả có thời gian bảo quản lâu nhất) và mẫu quả thu được từ giống đối chứng HT152 (xem hình 1), chúng tôi nhận thấy quả thu được ở cây số 8 có thời gian bảo quản dài hơn rất nhiều so với đối chứng. Cùng trong một điều kiện và thời gian tồn trữ, mẫu quả HT152 đã thối rữa, trong khi mẫu quả ở cây số 8 chỉ có một số dấu hiệu bắt đầu bị hỏng.



Hình 1. So sánh thời gian bảo quản trong phòng ở thời điểm 54 ngày theo dõi giữa 1 mẫu quả ở cá thể số 8 và mẫu quả ở giống HT152 trong cùng điều kiện bảo quản

2.3.2. Kết quả PCR sử dụng cặp mồi phát hiện gen chín chậm



Hình 2. Kết quả điện di sử dụng cặp mồi phát hiện cá thể mang gen chín chậm *rin*

Các giếng 1-14: các cây được chọn lọc từ quần thể phân ly của giống 159, 15 là giống đối chứng HT152 không chứa gen.

Kết quả PCR sử dụng cặp mồi phát hiện gen chín chậm *rin* cho thấy các cá thể số 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19 có chứa gen với kích thước sản phẩm là 850 bp. Kết hợp với những nhận xét ở phần 2.2.1.3 đối với bảng số liệu 1, những cá thể này khi theo dõi thời gian bảo quản quả trong phòng đều có thời gian bảo quản được trên 31 ngày, lâu hơn so với những quả không chứa gen (từ 25,0 đến 30,0 ngày) (bảng 1).

4. KẾT LUẬN

Đã phát hiện được các cá thể số 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20 có chứa gen *rin*.

Trong số các cá thể mang gen chín chậm *rin*, cá thể số 8 có thời gian bảo quản dài nhất (hơn 27 ngày so với đối chứng), quả có màu đỏ, 2 ngăn, khối lượng trung bình 52,2g, có khả năng ứng dụng trong sản xuất cà chua tại Việt Nam.

Đề xuất một số cá thể ưu tú có tiềm năng cho năng suất cao, chất lượng tốt, chứa gen chín chậm *rin* và thời gian bảo quản dài (hơn 34 ngày) gồm cá thể số 1,2,5,8,10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2006), *Giống cây cà chua*, Quy phạm khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng, 10TCN219: 2006 .
- [2] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2002), *Quy phạm khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định của giống cà chua*, 10TCN557-2002.
- [3] Lin, Z., Zhong, S., Grierson, D (2009), *Recent advances in ethylene research. Journal of Experimental Botany*, 60(12), 3311-3336
- [4] Liu, Y., Roof, S., Ye, Z., Barry, C., van Tuinen, A., Vrebalov, J., Bowler, C., Giovannoni, J (2004), *Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. Proc Natl Acad Sci USA*, 101(26), 9897-9902.
- [5] Manning, Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J., Seymour, G. B. (2006), *A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening*, Nat Genet, 38(8), 948-952.
- [6] Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J. J (2011), *The Tomato MADS-Box Transcription Factor RIPENING INHIBITOR Interacts with Promoters Involved in Numerous Ripening Processes in a COLORLESS NONRIPENING-Dependent Manner. Plant Physiology*, 157(3), 1568-1579.
- [7] Xiaoli (2010), *The development of longer shelf-life gene marker and assisted selection of tomato inbred lines*. Huazhong Agricultural University, 46.
- [8] <http://www.esalq.usp.br/tomato>

APPLICATION OF DNA MOLECULAR MARKER IN SLOW RIPENING TOMATO CONTAINING *RIN* GENE VARIETY SELECTION

Nguyen Thi Van, Nghiem Thi Huong

ABSTRACT

This study uses DNA molecular marker to select elite individuals in rin gene containing F2 divided population (ripening inhibitor) which controls slow ripening characteristic, high yield, good quality in tomatoes. The experiment was conducted on a divided population derived from the hybrid tomato variety coded 159 imported from the United States by the Center for Plant Genetic Resources Conservation and Development.

Keywords: *Slow ripening gene, slow ripening tomatos, rin gene.*