

## CHỌN GIỐNG LÚA CÓ MÙI THƠM VÀ HÀM LƯỢNG AMYLOSE THẤP BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Nguyễn Thị Lang, Trịnh Thị Lũy,  
Phạm Thị Thu Hà, Nguyễn Ngọc Hương,  
Trần Thị Nhiên, Nguyễn Trọng Phước,  
Trần Thị Thanh Xà, Bùi Chí Bửu

### SUMMARY

#### Breeding fragrant and lowamylose content rice variety using molecular marker

Developing the advanced backcross population (BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>), with participation of molecular markers to select individuals carrying resistant gene, in order to cross back with mother lines (renewal lines), aim to stabilize gene of the low amylose content in homozygosity comparing rapidly with traditional methods. The molecular markers expressed clearly polymorphism, associated with resistant genes have been recorded on this backcross populations.

Genotypic evaluation of promising lines of hybrid populations using SSR, which including: RM105, RM23662, RM24103, RM23877 (on chromosome 9), RM547 (on chromosome 8), RM249 (on chromosome 5), RM11125 (on chromosome 1), RM25181 (on chromosome 10), RM210 (on chromosome 9), RM511 (on chromosome 12), RM1125 (on chromosome 10), RM10713, RM10115, RM3252 (on chromosome 1), RG28FL, RM223 (on chromosome 8).

Through evaluation of the quality of the populations recorded amylose and fragrant contents: only have line 6, and line 7 displayed the most markedly fragrant gene, among of 9 detective markers have 6 markers good for polymorphism such as RM105, RM219, RM23662, RM24103, with two markers RG28FL, RM223 providing good diagnostic gene (accounting for 85.6%), and especially the markers located all on chromosome 8 The lines continue to develop in the future.

**Keywords:** Aroma, amylose, advanced backcross, molecular markers

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hương vị và vị ngon của gạo thơm được ưa thích bởi người tiêu dùng trên toàn thế giới. Đây là loại gạo cao cấp, có mức giá cao trong thị trường nội địa và quốc tế. Mặc dù hầu hết các trao đổi thương mại là từ Ấn Độ, Iran, Pakistan, Thái Lan và Việt Nam, nhưng gạo thơm được trồng và đánh giá cao tại nhiều quốc gia khác trên thế giới. Hạt gạo thơm là kết quả của việc sản sinh ra nhiều hợp chất sinh hóa và hợp chất quan trọng nhất là 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), được xem là một thành phần hương thơm hấp dẫn (Buttery et al. 1983). Một gen lặn nằm trên nhiễm sắc thể số 8 đã được xác định là gen chịu trách nhiệm cho tính trạng hương thơm bởi vì nó có một vai trò quan trọng

trong việc tổng hợp 2AP (Bradbury et al. 2005a). Nghiên cứu di truyền của mùi thơm trên lúa cho thấy gen điều khiển tính trạng mùi thơm là một gen lặn (Lang và ctv 2004) đã phân tích DNA marker liên kết với gen mùi thơm *fgl* nằm trên đoạn nhiễm sắc thể số 8 t. Nghiên cứu ứng dụng microsatellite (Lang và ctv. 2002) đã thiết kế bản đồ mùi thơm trên nhiễm sắc thể và kết luận RM223 liên kết với *fgl* khá chặt, giá trị khoảng cách di truyền 1,6 cM. Dựa trên cơ sở này đề tài tiếp tục khai thác chỉ thị phân tử để đánh giá trên các cặp lai để tìm gen mùi thơm. Bên cạnh gen mùi thơm, hàm lượng amylose cũng cần thực hiện để chọn lọc giống vừa có mùi thơm và hàm lượng amylose thấp.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG NGHIÊN CỨU

### **1. Vật liệu nghiên cứu**

Trong nghiên cứu này đã được sử dụng hai mẫu gạo WWAN XIAN 7777 và ZGY1 làm bố mẹ. Đầu tiên là thiết lập một nhóm của 30 dòng lúa từ quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> lai tạo từ tổ hợp WWAN XIAN 7777/ZGY1 (Lang và ctv 2013).

### **2. Phương pháp nghiên cứu**

Xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR:

- Thử nghiệm đánh giá độ nhạy cảm Aroma theo phương pháp Sood và Siddiq (1978).

- Hàm lượng amylose được phân tích trên máy so màu, theo phương pháp của Sadavisam và Manikam (1992).

- Xác định, đánh giá mùi thơm, độ trở hồ.

Đánh giá kiểu gen DNA và Phân tích PCR theo Lang 2002.

## **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **1. Gen quy định tính trạng mùi thơm**

Mùi thơm là một yếu tố quyết định đến thị hiếu của người tiêu dùng, đặc biệt là một số nước như Ai Cập, Iran, Thái Lan, Việt Nam. Một số gen điều hòa tính trạng mùi thơm, gần đây đã được cloning. Nó được lập bản đồ trên nhiễm sắc thể 8 và mã hóa cho việc hình thành tế bào cần thiết ở phân vùng tích lũy mùi thơm trên lá, thân và hạt. Một đột biến mất chức năng cho thấy làm chậm hơn do mất mùi thơm trên giống lúa OM4900 do phát triển bất thường làm mất mùi thơm.

### **2. Khai thác chọn bằng MAB (Marker assisted backcrossing)**

Phân tích di truyền dựa trên marker phân tử trong thập kỷ qua đã xác định được các tính trạng chất lượng chủ yếu do một

locus chính. Ví dụ, locus *Wx* trên nhiễm sắc thể số 6 đóng vai trò chính quy định AC và GC cùng với một vai trò thứ yếu trong GT và locus *Alk*, liên kết chặt với *Wx*, có ảnh hưởng chủ yếu đến GT. Đối với sự xuất hiện các tính trạng chất lượng, hạt dài là hầu hết được kiểm soát bởi locus *GS3* trên nhiễm sắc thể số 3, và chiều rộng hạt được kiểm soát bởi locus *GS5* nằm trên nhiễm sắc thể số 5 (Xiao và ctv 1998). Một locus chính quy định độ bạc bụng (*Chk5*) cũng đã được xác định trên nhiễm sắc thể số 5 (100). Một vài gen có những tính trạng này đã được clone (Zeng Z. B. 1994).

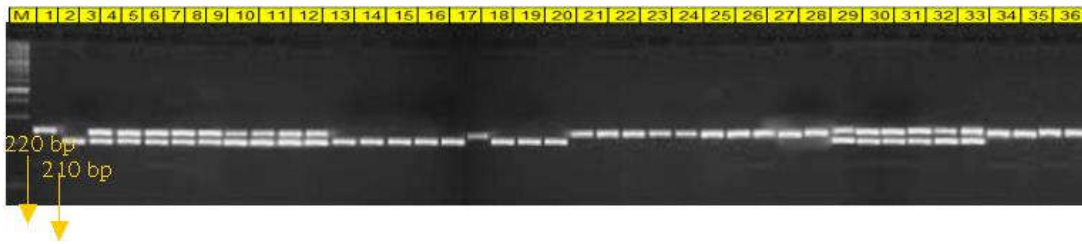
Phân tích bằng marker phân tử: Dùng chỉ thị MAB (Chỉ thị phân tử-assisted backcrossing) để chọn giống.

### **3. Kết quả đánh giá và sàng lọc PCR trên BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> của tổ hợp WWAN XIAN 7777/ZGY1.**

Xét nghiệm PCR sàng lọc các cây hồi giao mang gen hàm lượng amylose cần chuyển, được tiến hành qua hai thế hệ tự thụ chọn lọc liên tiếp (từ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> đến BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>). Kết quả xét nghiệm PCR (thế hệ BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>) được ghi nhận theo đánh giá liên tục hai gen trên quần thể WWAN XIAN 7777/ZGY1. Đây là hai giống đại diện cho gen ngăn ngừa và mùi thơm.

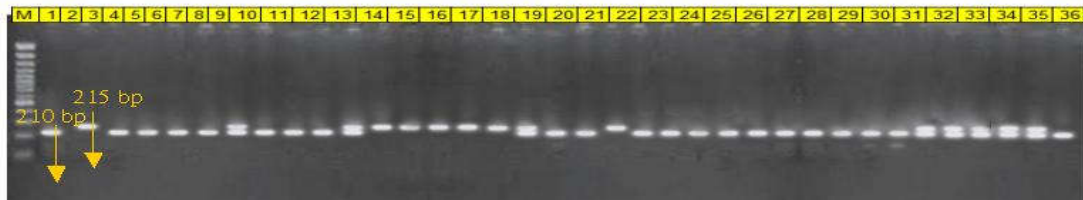
### **4. Phân tích chỉ thị phân tử trên thế hệ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> của WWAN XIAN 7777/ZGY1 trên quần thể BC ghi nhận**

Thử nghiệm với 36 mẫu DNA trên quần thể WWAN XIAN 7777/ZGY1 với primer RM223 ghi nhận hai alen với kích thước 210 - 220 bp. Đối với chỉ thị này ghi nhận hầu hết các cá thể mang dị hợp tử ở thế hệ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. Các giống cho gen waxy được ghi nhận với alen 210 bp mang bằng hình gen ZGY1 và alen 220 bp cho genome của WWAN XIAN 7777...



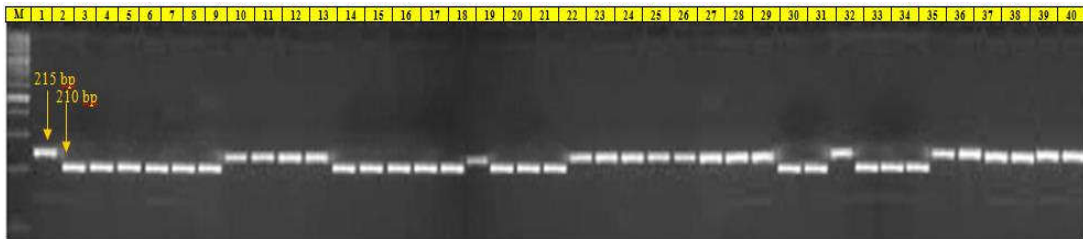
Hình 1: Sản phẩm PCR của RM223 trên quần thể WWAN XIAN 7777/ZGY1

Tuy nhiên khi phân tích với chỉ thị phân tử RM219 ghi nhận hai alen với kích thước 210 - 215 bp. Đối với chỉ thị này ghi nhận hầu hết các cá thể mang đồng hợp tử ở thế hệ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>. Ghi nhận với alen 215 bp mang băng hình giống ZGY1 và alen 210 bp cho genome được đánh giá trên WWAN XIAN 7777.



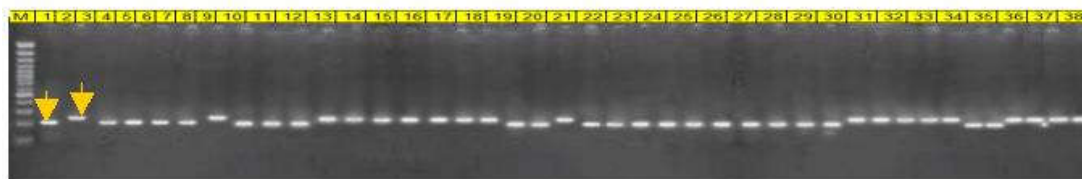
Hình 2: Sản phẩm PCR của RM219 trên quần thể WWAN XIAN 7777/ZGY1

Trong thế hệ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> tiếp tục chọn ra 5 cây đồng hợp tử cho lai tiếp để chọn ra BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. Kết quả ghi nhận tỷ lệ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> được thể hiện trên hình 3.



Hình 3: Sản phẩm PCR của RM201 trên quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> WWAN XIAN 7777/ZGY1

Từ kết quả phân tích của chỉ thị phân tử RM201 cho thấy có hai alen, alen có kích thước 215 bp tương ứng với giống ZGY1, alen có kích thước 210 bp tương ứng với giống WWAN XIAN 7777. Qua băng hình ghi nhận có 20 giống thể hiện gen tương ứng với các vị trí 10, 11, 12, 13, 17, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 35, 36, 37, 38, 39 và 40.



Hình 4: Sản phẩm PCR của RM209 trên quần thể BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> WWAN XIAN 7777/ZGY1

Với RM209 ghi nhận alen có kích thước 215 bp tương ứng với giống ZGY1 giống mang gen *Wx*, alen có kích thước 210 bp tương ứng với giống WWAN XIAN 7777. Qua kết quả băng hình cho thấy 18 dòng thể hiện đa hình.

Qua đánh giá bằng chỉ thị phân tử ghi nhận được các dòng mang gen đồng hợp tử và cả dị hợp tử. Do đó cần sử dụng nhiều chỉ thị phân tử để tìm ra nhiều dòng mang hàm lượng amylose nhanh hơn.

Đánh giá kiểu gen các dòng triển vọng bằng các chỉ thị SSR, trong đó các chỉ thị bao gồm: RM105, RM219, RM23662, RM24103, RM23877 (trên nhiễm sắc thể số 9), RM547 (trên nhiễm sắc thể số 8), RM249 (trên nhiễm sắc thể số 5), RM11125 (trên nhiễm sắc thể số 1), RM25181 (trên nhiễm sắc thể số 10). Chỉ thị sử dụng bao gồm: RM210 (trên nhiễm sắc thể số 8), RM511 (trên nhiễm sắc thể số 12), RM1125 (trên nhiễm sắc thể số 10), RM10713, RM10115, RM3252 (trên nhiễm sắc thể số 1), RG28FL, RM223 (trên nhiễm sắc thể số 8).

Qua đánh giá tính chất của quần thể gen có hàm lượng amylose và mùi thơm ghi nhận: Chỉ có dòng 6 và dòng 7 thể hiện

mang gen mùi thơm rõ nhất, trong số 9 chỉ thị phân tử dò tìm có 5 chỉ thị là RM105, RM219, RM23662, RM24103 cho gen chuẩn đoán tốt (chiếm tỷ lệ 55,6%), và điều đặc biệt là các chỉ thị này đều nằm trên nhiễm sắc thể số 9. Hai chỉ thị RG 28 và RM223 cho chuẩn đoán chiếm 85,6%

Tương tự, đánh giá gen *Wx* trên quần thể lai, các chỉ thị SSR tìm gen *Wx* cho thấy các dòng 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 thể hiện gen *Wx* (chiếm tỷ lệ trên 90% trong tổng số các chỉ thị sử dụng).

Các dòng qua đánh giá kiểu gen cho thấy: Biểu hiện tính hàm lượng amylose cao rất nhiều, trong khi mùi thơm thì rất ít. Các dòng cho gen amylose thấp thì lại không cho gen thơm và ngược lại, một số ít dòng có biểu hiện chông các gen. Điều này cũng cho thấy việc lai tạo để chuyển các gen một tính trạng mong muốn vào cây lúa khó khăn hơn rất nhiều.

Phân tích 20 dòng thu từ lai hồi giao được phân tích hàm lượng amylose ghi nhận có 5 dòng 2, 3, 4, 12, 13 cho hàm lượng amylose thấp, hai dòng có gen mùi thơm là dòng số 6 và số 7.

Bảng 1. Đánh giá phẩm chất của 20 dòng triển vọng từ lai hồi giao trong vụ Hè Thu 2013

STT	Hàm lượng amylose (%)	Độ bền gel (mm)	Độ trở hồ (cấp)	Mùi thơm (cấp)	Bạc bụng (%)	Hàm lượng phytic acid (Cấp)	Protein (%)
Dòng 1	22,15	77,58	5	0	0	2	7,95
Dòng 2	18,14	79,48	5	0	1	2	8,25
Dòng 3	19,55	78,88	5	0	1	2	8,69
Dòng 4	20,14	74,25	5	0	1	2	8,44
Dòng 5	23,12	70,15	5	0	1	2	8,37
Dòng 6	25,18	48,25	3	1	0	2	8,50
Dòng 7	24,15	65,24	3	2	1	2	8,14
Dòng 8	24,19	66,77	3	0	0	2	8,25
Dòng 9	25,17	46,25	3	0	0	2	6,90
Dòng 10	24,95	62,17	3	0	0	2	7,90
Dòng 11	25,19	49,78	3	0	0	2	7,89
Dòng 12	19,22	74,18	5	0	0	2	7,50
Dòng 13	20,25	72,47	5	0	0	2	8,50
Dòng 14	21,27	70,55	5	0	0	2	8,66

STT	Hàm lượng amylose (%)	Độ bền gel (mm)	Độ trở hồ (cấp)	Mùi thơm (cấp)	Bạc bụng (%)	Hàm lượng phytic acid (Cấp)	Protein (%)
Dòng 15	23,24	70,22	5	0	0	2	8,25
Dòng 16	21,50	71,25	5	0	0	2	8,22
Dòng 17	22,45	71,02	5	0	1	2	8,15
Dòng 18	23,15	70,68	5	0	1	2	8,27
Dòng 19	24,15	65,57	3	0	1	2	8,45
Dòng 20	24,25	68,99	3	0	1	2	8,19
IR64	24,15	67,14	3	0	0	2	8,50
Khaodawmali 105	18,27	77,20	5	2	0	2	8,35

Một marker có chức năng phát hiện ra alen này đã được phát triển và kiểm tra trong quần thể BC2F2 được phân ly. Kiểu hình và kiểu gen thơm cho thấy sự đa hình trên quần thể này. Marker cũng được sử dụng cho việc sàng lọc trong một bộ sưu tập các giống lúa thơm được thu thập từ các vị trí địa lý khác nhau của Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long. Hương thơm cao gấp đôi giống lúa đối chứng là Khaodawmali 105.

#### IV. KẾT LUẬN

##### Đối với mùi thơm

- Mùi thơm được điều khiển bởi 1 gen lặn *fgr*, định vị trên nhiễm sắc thể số 8, hiện tượng biểu hiện kiểu hình rất phức tạp do ảnh hưởng của ngoại cảnh.

- Hai marker được khuyến cáo theo kết quả nghiên cứu này là RG28F-R và RM223

- Kết quả chọn giống bước đầu đã khuyến cáo được 2 dòng có triển vọng đưa vào bộ giống quan sát và khảo nghiệm.

##### Đối với hàm lượng amylose

- Áp dụng MAS để tìm cá thể có hàm lượng amylose từ thấp trung bình trong mẫu giống của quần thể lai WWAN XIAN 7777/ ZGY1.

- Kết quả bước đầu đã ghi nhận được có 5 dòng có hàm lượng amylose thấp đó là các dòng số: 2, 3, 4, 12, 13. Các dòng này cần chọn lọc và tiếp tục khảo nghiệm để đưa vào sản xuất.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Buttery R.G., B.O. Juliano and L.C. Ling (1983), "Identification of rice aroma compound 2-acetyl-1-pyrroline in Padan leaves", Chem. Ind., (23), pp. 478.
2. Lang N.T. and B.C. Buu (2002), "Identification and fine mapping of SSR marker linked to *fgr* gene of rice", O Mon Rice - Cuu Long Delta Rice Research Institute, (10), pp.16-22.
3. Nguyễn Thị Lang (2002), *Những phương pháp cơ bản trong công nghệ sinh học*. NXB Nông nghiệp, TP. HCM.
4. Sadavisam vai Manikam 1992, *Biochemical method for agricultural sciences Wiley Eastern*, New Delhi, India.
5. Sood BG, EA Siddiq (1978), *A rapid technique for scent determination in rice*. Indian J. Genet. Plant Breed. 38:268-271.
6. Xiao J, J. Li, S. Grandillo, S.N. Ahn, L. Yuan, S.D. Tanksley, and S.R. Mc Couch (1998), *Identification of traitimproving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative Oryza rufipogon*. Genetic 150: 1053-1068.

Ngày nhận bài: 20/3/2014

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,  
ngày 26/3/2014

Ngày duyệt đăng: 18/6/2014