

CHỨNG MINH BAC CLONE NHẪM DÒNG HÓA VÙNG CHỨA GEN QUY ĐỊNH MÙI THƠM TRÊN GIỐNG LÚA *Oryza sativa* L.

Châu Tấn Phát, Nguyễn Thị Lang,
Trịnh Thị Lũy, Bùi Chí Bửu

SUMMARY

Prove BAC clone in order to cloning “*fgr*” gene in *Oryza sativa* L.

Genetic analysis indicated that the aroma was controlled by a single recessive gene named *fgr* (fragrant rice). In our previous studies based on an BC₂F₂ population from the cross between OM2517/OM3536 was mapped on chromosome 8. Recently, a BC₂F₂ population from the same cross was developed and used for the fine mapping of the aroma gene. Molecular marker techniques combined with BAC cloning were used. As a result, two SSR markers (RM223 and SP6), one STS marker (RG28FL-RB) and two BAC (Bacterial Artificial Chromosome) clone: were found to be closely linked to aroma. Finally, the aroma gene was mapped between two markers from BAC cloning at a distance of 1.1 cM from SP6 and 8.5cM from RM223 in population BC₂F₂ (OM2517/OM3536). Markers for almost all of the aroma have now been analysis in improved varieties and are gradually incorporated into genetic backgrounds of elite cultivars by molecular marker-assisted selection or transformation. It is anticipated that such strategies and efforts would eventually lead to the development of aroma rice.

Keywords: BAC (Bacterial Artificial Chromosome), *fgr* rice, aroma, Fine mapping, CAPs.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mùi thơm có nguồn gốc từ resine, dầu và balsams. Thành phần của mùi thơm được ghi nhận bằng chỉ thị mùi. Mùi thơm khi nấu cơm bốc hơi do hợp phần formaldehyde, ammonia và hydrogen sulfide tạo ra. Một số nhà nghiên cứu cho rằng có sự gia tăng chất propanol, pentanol và hexanol trong thời gian tồn trữ. Hơn 100 thành phần có trong tinh bột như carbohydrate, alcohol, aldehyde, ketone, acid, ester, phenol, pyridine, pyrazine và thành phần khác khi nấu cơm. Người ta đã tìm thấy 2-acetyl-1-pyrroline có trong giống Basmati 370 và Jasmine quyết định sự thể hiện mùi thơm. Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2005) đã thông qua kết quả phân tích HPLC trên mẫu gạo IR64, Azucena và Basmati: chứng minh có pentanol, hexanol, benzaldehyde và 2-acetyl-1 pyrroline; trong đó 2-acetyl-1 pyrroline là thành phần chính trong mùi thơm của gạo. Nghiên cứu di truyền mùi thơm trên lúa cho thấy gen điều khiển tính trạng mùi thơm là một gen lặn. Phân tích bản đồ RFLP cho thấy sự liên kết đơn gen lặn *fgr*

với RG28 trên nhiễm sắc thể số 8, có khoảng cách di truyền 4,5cM. Nghiên cứu ứng dụng microsatellite (Lang và ctv, 2002) đã thiết kế bản đồ mùi thơm trên nhiễm sắc thể số 8 và kết luận RM223 liên kết với *fgr* khá chặt, giá trị khoảng cách di truyền 1,6cM. Dựa trên cơ sở này đề tài tiếp tục khai thác BAC DNA trên giống lúa IR64 để tìm sự chồng lấp các gen, trong đó đã thành công trên gen bệnh đạo ôn (Suh J.P và ctv, 2009), gen chống chịu ngập (Mackill D.J và ctv, 2006), gen rầy nâu (Lang và ctv, 2003), gen chịu khô hạn (Lang và ctv, 2009).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sàng lọc gen thơm của cây lúa thông qua BAC DNA

Chọn ngẫu nhiên 11 đĩa (plate) từ thư viện BAC của IR64 trong ngân hàng gen của Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long. Số thứ tự của 11 đĩa bao gồm: 1; 5; 7; 24; 25; 30; 31; 34; 35; 36; 47.

Trong mỗi đĩa chọn ngẫu nhiên 20 dòng BAC chất lượng tốt, tổng cộng là $11 \times 20 = 220$ dòng BAC. Ly trích DNA BAC từ 220 dòng BAC này thu được 220 mẫu DNA BAC (một mẫu thực hiện 3 lần) theo Lang (2002).

Phân tích số liệu bằng phần mềm GGT theo Van Berloo R (1999) và cải tiến 2007.

<http://www.dpw.wau.nl/pv/pub/ggt/>

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thanh lọc thư viện BAC với chỉ thị liên kết với mùi thơm

Ba chỉ thị RM223, RG28FL-RB và SP6 liên kết với gen mùi thơm được sử dụng để thanh lọc thư viện. Kết quả cho thấy trong tổng số 220 mẫu BAC DNA thì có 26 mẫu cho sản phẩm khuếch đại đối với chỉ thị RM223, tương ứng với 26 dòng BAC. Các dòng BAC này nằm rải rác ở các đĩa khác nhau (đĩa 1: 4 clone, đĩa 5: 4 clone, đĩa 7: 8 clone, đĩa 25: 7 clone, đĩa 30: 1 clone và đĩa 31: 2 clone). Hai mươi sáu (26) clone được xác định một cách đồng thời nhờ vào chỉ thị RM223. Những kết quả này cho thấy rằng các clone có thể chồng lấp và phủ trên vùng giữa gen mùi thơm và RM223 trên nhiễm sắc thể số 8. Kích thước đoạn DNA được khuếch đại là 200bp và kiểm tra trên Gramene chỉ thị để xác định xem sản phẩm khuếch đại có phải là sản phẩm khuếch đại của chỉ thị RM223 hay không (<http://www.gramene.org>). Do thư viện BAC được xây dựng từ giống lúa IR64, do đó sẽ kiểm tra sản phẩm PCR với môi RM223 của IR64. Kiểm tra trên Gramene thì kích thước 200bp chính là kích thước của sản phẩm PCR với môi RM223. Chỉ thị RG28FL-RB, kết quả phát hiện được 25 dòng BAC và các dòng BAC cũng nằm trên các đĩa khác nhau (đĩa 5: 4 clone, đĩa 7: 8 clone, đĩa 25: 7 clone, đĩa 30: 2 clone, đĩa 31: 4 clone). Sản phẩm khuếch đại bao gồm 2 kích thước phân tử 160bp và 180bp. Chỉ thị SP6 sàng lọc được 20 dòng BAC và các dòng BAC cũng nằm trên các đĩa khác nhau

(đĩa 7: 1 clone, đĩa 24: 1 clone, đĩa 25: 6 clone, đĩa 30: 2 clone, đĩa 31: 5 clone, đĩa 34: 1 clone, đĩa 35: 3 clone, đĩa 36: 1 clone). Sản phẩm khuếch đại bao gồm 2 kích thước phân tử 150bp và 180bp. Đây là những dòng BAC dự tuyển có khả năng chứa gen quy định mùi thơm được phát hiện bởi việc sử dụng môi liên kết chặt với gen mục tiêu.

Kết quả có tổng cộng 36 mẫu DNA khuếch đại được với 3 môi, tương ứng với 36 dòng BAC. Khi kiểm tra trên trình tự của vector BAC (pBeloBAC) và genome *E.coli* (dòng DH10B) không có trình tự bắt cặp bổ sung với 3 môi trên. Do đó, sản phẩm khuếch đại là trình tự đoạn xen hoặc một phần của đoạn xen. Như vậy, thông qua 3 chỉ thị RM223, RG28FL-RB, SP6 đã sàng lọc được 36 dòng BAC trong tổng số 220 dòng BAC được nghiên cứu; 36 dòng BAC này phân bố ở 10 plate (đĩa) và nhiều nhất ở đĩa số 7 (có 8 dòng BAC).

2. Xác định những dòng BAC dự tuyển ở locus mùi thơm

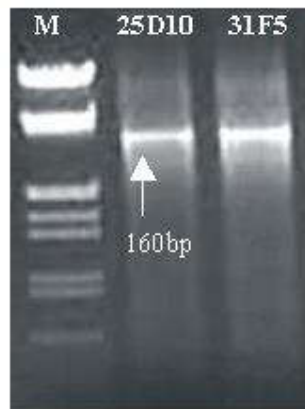
Khó có thể xử lý hết tất cả các dòng BAC được nhặt ra bởi 3 chỉ thị liên kết với mùi thơm. Từ kết quả tổng hợp tập trung vào 36 dòng BAC được nhận biết bởi phương pháp PCR với ba chỉ thị RM223, RG28FL-RB và SP6. Dựa vào marker chuẩn các kích thước đoạn chèn trong các dòng BAC này được xác định trong khoảng 1.000bp - 4000bp sau khi phân cắt bằng enzym giới hạn *HindIII* và chạy điện di phân tích PFGE. Dựa trên kết quả điện di và sự hiện diện vị trí cắt của enzym đã chứng minh độ đa dạng của 36 dòng BAC trong đó 30 dòng BAC có băng hình. Trong 36 dòng BAC được đánh giá kích thước sau khi phân cắt bằng enzym *HindIII* và chạy điện di phân tích PFGE có 3 dòng BAC được xem là bao phủ locus mùi thơm là: 31F5, 25D10 và 25F21. Các dòng BAC này có số băng được phân cắt nhiều nhất (9 - 10 băng) trong 36 dòng BAC được đánh giá. Điều này nói lên rằng các dòng BAC này

bao gồm tất cả các dòng BAC còn lại sau khi chạy điện di tách bằng nên được chọn để phân tích về sau. Bên cạnh đó, có sáu dòng BAC không ghi nhận bằng hình là dòng BAC: 1C10, 1D19, 1D21, 34C1, 35A7 và 35A2 các dòng BAC này không được chọn cho phân tích. Giữa 2 dòng BAC 25D10 và 25F21 đều thể hiện 9 băng sau khi chạy điện di nhưng dòng BAC 25D10 được nhận biết bởi 3 môi RM223, RG28FL-RB và SP6 còn dòng BAC 25F21 chỉ được nhận biết bởi 2 môi RM223 và SP6, nên chỉ chọn 25D10 và 31F5 cho phân tích Southern để khẳng định lại sự sắp xếp của 2 dòng BAC này trên vùng gen *fgf*.

3. Xây dựng BAC contig (các chuỗi DNA nhân bản nằm liền kề) trên vùng gen mùi thơm

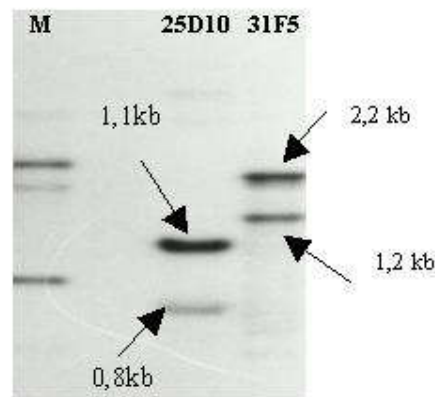
Trong số 30 dòng BAC ứng cử viên chỉ chọn ra 2 dòng BAC trên cơ sở phải có số băng hình nhiều nhất và rõ ràng sau khi chạy

điện di phân tích PFGE. Kết quả chọn được 2 dòng BAC 25D10 và 31F5 là 2 dòng có băng hình rõ và bị phân cắt nhiều nhất. Sau khi đánh giá kích thước phân tử bằng phương pháp PCR, 2 dòng BAC này có sản phẩm PCR trùng nhau điều này chứng tỏ 2 dòng BAC chồng lấp nhau. Sau khi được phân cắt bằng enzym *HindIII*, 2 dòng BAC 25D10 và 31F5 được kiểm tra sự chồng lấp thông qua phương pháp Southern Blot. Kết quả ghi nhận đoạn chèn của 25D10 và 31F5 bằng Southern Blot với con dò RG28FL-RB sau khi được phân cắt bởi *HindIII* được ghi nhận trên Hình 2. Dòng BAC 25D10 ghi nhận có 2 băng ở kích thước phân tử là 1,1kb và 0,8kb; dòng BAC 31F5 cũng ghi nhận có 2 băng ở kích thước phân tử là 2,2kb và 1,2kb. Vì vậy, chỉ thị RG28FL-RB coi như nằm trên phần trùng lấp của những dòng BAC này và 2 dòng BAC này nằm chồng lên nhau tạo thành một BAC contig trên vùng gen mùi thơm.



M: Φ 174 phân cắt với *HindIII*

Hình 1: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của 2 dòng BAC chồng lấp sử dụng chỉ thị *RG28FL-RB*



M: λ DNA phân cắt với *HindIII*

Hình 2: Lai Southern Blot của 2 dòng BAC chồng lấp được phân cắt với *HindIII* sử dụng *RG28FL-RB* làm con dò

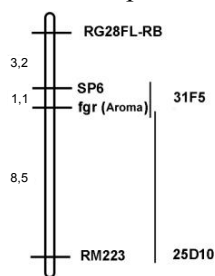
4. Xác định BAC DNA chứa alen mùi thơm

Để xác định alen mùi thơm trên BAC chồng lấp, một quần thể BC₂F₂ chứa 1008 cá thể thu được từ một quá trình lai hồi giao giữa OM2517/OM3536. Tỷ lệ phân ly

của thế hệ BC₂F₂ giữa các cá thể thơm và không thơm chứa gen đơn mong muốn phân li theo tỷ lệ 1:3 (243 thơm trên 765 cây không thơm, $X^2=0,428$, $P=0,5-0,9$). Thực hiện bản đồ với 111 cây BC₂F₂. Thí

nghiệm sử dụng các chỉ thị SSR đã được định vị trên bản đồ để kiểm tra mối tương quan với gen mùi thơm và đã tìm thấy được các chỉ thị RM223, RG28FL-RB và SP6 (hình 3) liên kết với gen mùi thơm với khoảng cách 8,5cM đối với chỉ thị RM233; 1,1cM với chỉ thị SP6 và 4,3cM đối với chỉ thị RG28FL-RB. Đối với 2 dòng BAC 25D10 và 31F5 được thiết kế thành 2 chỉ thị phân tử 25D10 và 31F5. Hai chỉ thị phân tử này được thử nghiệm trên quần thể BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM2517/OM3536. Kết quả cho thấy hai chỉ thị phân tử 25D10 và 31F5 được đánh giá có liên kết với gen quy định mùi thơm trên quần thể hồi giao BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM2517/OM3536.

cM chỉ thị phân tử



Hình 3: Bản đồ liên kết gen tại locus mùi thơm trên quần thể BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM2517/OM3536

5. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn lọc dòng mang gen mùi thơm

Kết quả xét nghiệm PCR sàng lọc cây mang gen mùi thơm: Tiến hành lấy ngẫu nhiên cá thể trên mỗi dòng để xét nghiệm PCR. Sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết với các dòng BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM2517/OM3536. Đối với đoạn mồi 25D10 sự khuếch đại DNA cho sản phẩm đạt 98,19% với kích thước phân tử của sản phẩm PCR là 1,1kb (không thơm) và 0,8kb (thơm). Phân tích tần số alen trên các dòng lai BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM2517/OM3536 cho đa hình khác nhau. Kết quả cho thấy cây mang gen kiểu băng

hình không thơm chiếm tới 78/111 cây (70,27%) và kiểu băng hình thơm chiếm 20/111 cây (18,01%); các cây dị hợp tử không nhiều có 11/111 cây gồm cây số 5, 27, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 72, 96 và 109 chiếm tỷ lệ 9,90%. Đối với đoạn mồi 31F5 sự khuếch đại DNA cho sản phẩm đạt 90,09% với kích thước phân tử của sản phẩm PCR là 2,2kb (không thơm) và 1,2kb (thơm). Phân tích tần số alen trên các dòng lai BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM2517/OM3536 cho đa hình ghi nhận trên kết quả cho thấy cây mang kiểu băng hình không thơm chiếm tới 78/111 cây (70,27%) và kiểu băng hình thơm chiếm 20/111 cây (18,01%); các cây dị hợp tử không nhiều có 2/111 cây gồm cây số 67 và 105 chiếm tỷ lệ 1,80%. Như vậy, qua đánh giá trên đồng ruộng kết hợp với sàng lọc PCR với hai chỉ thị 25D10 và 31F5 trên quần thể hồi giao BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM2517/OM3536, đã chọn được 31 cá thể mang gen mùi thơm. Các cá thể này đều biểu hiện gen thơm khi được khuếch đại bằng 2 chỉ thị khác nhau là 25D10 và 31F5. Điều này chứng tỏ các cá thể trên có khả năng mang gen mùi thơm.

6. So sánh kiểu gen và kiểu hình trên 2 chỉ thị phân tử 25D10 và 31F5 trên quần thể hồi giao BC₂F₂ của tổ hợp lai OM2517/OM3536

Qua đánh giá các chỉ thị phân tử 25D10 và 31F5, kết quả cho thấy các chỉ thị phân tử này khuếch đại tốt các gen không thơm và gen thơm ghi nhận được từ quần thể con lai đạt 98,19% đối với chỉ thị 25D10 và 90,09% đối với chỉ thị 31F5. So sánh kiểu gen và kiểu hình trên 2 chỉ thị phân tử 25D10 và 31F5 trên quần thể hồi giao BC₂F₂ của tổ hợp lai OM2517/OM3536 kết quả trùng nhau khá cao ước đoán thơm đạt 75%.

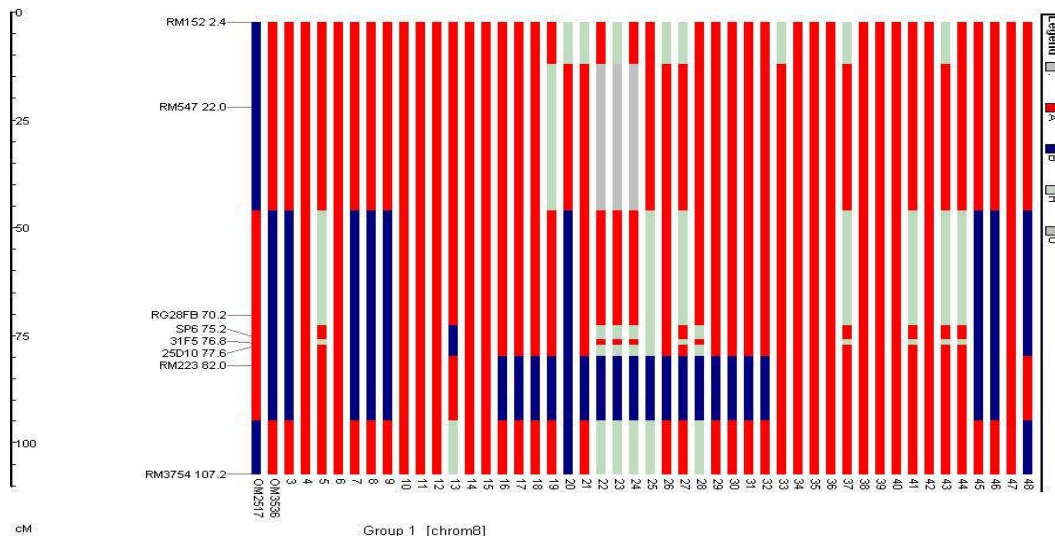
Bảng 1. So sánh kiểu gen và kiểu hình trên quần thể BC₂F₂ của tổ hợp lai OM2517/OM3536 sau khi đánh giá bằng 2 chỉ thị phân tử 25D10 và 31F5

Chỉ thị phân tử	Số cá thể mang kiểu hình mùi thơm lúa	Số cá thể mang kiểu gen mùi thơm lúa				Ước đoán thơm (%)
		Mùi thơm	Không thơm	Dị hợp	Chưa xác định	
25D10	15	20	78	11	2	75
31F5	15	20	78	2	11	75

Như vậy 2 chỉ thị 25D10 và 31F5 có khả năng nhận biết gen mùi thơm tốt và sẽ là những chỉ thị mới bổ sung vào bộ sưu tập các chỉ thị đã có trước đây được sử dụng trong các chương trình chọn giống lúa có mùi thơm.

Tiếp tục đánh giá với 8 chỉ thị mang gen thơm dọc trên nhiễm sắc thể số 8 (RM15224, RM547220, RG28FL-RB, SP6, 31F5, 25D10, RM223, RM3754) tiếp tục chọn lọc ghi nhận với phần mềm GGT 2.0

7. Sự liên kết mùi thơm với dòng BC₃F₂ với 48 cây mang gen mùi thơm trên tổ hợp lai hồi giao OM2517/OM3536



Hình 4: Tần số alen các cây thơm và không thơm của BC₃F₂ phân tích bằng kiểu gen (GGT): Màu đỏ (thể hiện alen không thơm), màu xanh (alen thơm) và màu xanh ngọc (alen dị hợp tử).

Nghiên cứu này cho thấy có thể gắn một gen chính với mùi thơm giữa các flanking marker. Ngoài ra, 1 QTLs được xác định có ảnh hưởng nhiều đến độ mạnh của hương thơm trên giống lúa. Mặc dù

những bản đồ QTL có ý nghĩa không cao đối với RM223, được thể hiện bằng sự phân ly biến dị ảnh hưởng mạnh đến sự phát hiện QTL nhưng không đưa đến những phát hiện sai. Điều đó cũng được

khẳng định rằng 2-acetyl-1-pyrroline (AcPy) là thành phần chính của mùi thơm ở gạo. Khi đó AcPy và Aroma đã tương quan hoàn toàn với nhau và lập bản đồ ở cùng locus. Chiều dài bản đồ của chromosome số 8 được điều chỉnh về sự phân biệt biến dị (110cM) thì phù hợp tốt với tìm thấy trong bản đồ di truyền trên nhiễm sắc thể số 8 là 124,8cM. Một số dòng gặp nhiều khó khăn để đánh giá hương thơm bởi phương pháp kiểu hình rất nhạy cảm. Điều này có thể là do các thông số khác nhau ảnh hưởng đến số lượng của AcPy trong lá hoặc hạt. Một yếu tố quan trọng là nhiệt độ trong nhà kính (do tính chất dễ bay hơi của AcPy), độ tuổi của các lá trên cây (lá non thơm hơn những lá già), một số hợp chất dễ bay hơi được biết đến có thể hình thành các hương liệu khác ảnh hưởng tới AcPy làm cho phân tích nhạy cảm khó khăn hơn (Petrov và ctv, 1995).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Khai thác thành công thư viện BAC nhằm dòng hóa vùng chứa gen quy định mùi thơm, ba chỉ thị phân tử RM223, RG28FL-RB, SP6 đã thanh lọc được 36 dòng BAC trong tổng số 220 dòng BAC chạy phân tích cho mỗi chỉ thị. Kiểm tra mối tương quan với gen mùi thơm các chỉ thị RM223, RG28FL-RB và SP6 liên kết với gen mùi thơm với khoảng cách di truyền 8,5cM ở chỉ thị RM233, 1,1cM với SP6 và 4,3cM đối với RG28FL-RB.

Ứng dụng 2 chỉ thị phân tử 25D10 và 31F5 trong chọn lọc dòng mang gen mùi thơm đã chọn được 31 cá thể mang gen mùi thơm từ quần thể hồi giao BC₂F₂ của tổ hợp lai OM2517/OM3536.

2. Đề nghị

Khai thác nguồn vật liệu trong ngân hàng gen cây lúa để tạo được giống lúa cao sản có gạo thơm nhờ kết hợp phương pháp chọn giống truyền thống và chọn giống nhờ chỉ thị phân tử. Tiếp tục phát triển và đánh giá mùi thơm của các cá thể con lai từ tổ hợp lai OM2517/OM3536 và tổ hợp khác làm cơ sở cho việc tạo giống mới sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <http://www.dpw.wau.nl/pv/pub/ggt/>
2. <http://www.gramene.org>
3. Mackill D.J., Collard B.C.Y, Neeraja C.N., Rodriguez R.M., Heuer S., Ismail A.M. (2006), "*QTLs in rice breeding: examples for abiotic stresses*", *Rice genetics V*, Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute and Toh Tuck Link (Singapore): World Scientific Publishing, p 155-167.
4. Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2002), "*Chọn giống lúa có gen kháng bệnh đạo ôn nhờ marker phân tử*", *Cơ sở di truyền tính kháng sâu bệnh hại cây trồng*, NXB Nông nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh, tr.183-195.
5. Nguyen Thi Lang, Bui Chi Bui (2003), "*Genetic and physical maps of gene Bph-10 controlling brown plant hopper resistance in rice (O. Sativa L.)*", *O Mon Rice*, (11), p 35-41
6. Suh J.P., J.H. Roh, Y.C. Cho, S.S. Han, Y. G. Kim, K. K. Jena (2009), "*The Pi40 gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of Pi40-advanced backcross breeding lines*", *Phytopathology (USA)*, (99), p 243-250.

Ngày nhận bài: 22/4/2014

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,
ngày 28/4/2014

Ngày duyệt đăng: 18/6/2014