

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

CHÂU TẤN PHÁT

**ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ PCR
VÀ DÒNG BAC ĐỂ XÁC ĐỊNH GEN
MÙI THƠM TRÊN CÂY LÚA
(*Oryza sativa* L.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

Cần Thơ - 2012

Cộng Hòa Xã Hội Chủ Nghĩa Việt Nam

Độc lập – Tự Do – Hạnh Phúc

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu:”**Ứng dụng chỉ thị phân tử PCR và dòng BAC để xác định gen mùi thơm trên cây lúa (*Oryza sativa* L.)**” này là của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Châu Tấn Phát

LỜI CẢM TẠ

Xin chân thành biết ơn các Thầy, các Cô hướng dẫn khoa học:

- GS.TS. Nguyễn Thị Lang, đã hết lòng chỉ dẫn những nội dung cần thiết thực hiện các môn học, các thí nghiệm và nội dung nghiên cứu để hoàn thành luận án.
- GS.TS. Bùi Chí Bửu, đã tận tình chỉ bảo và hướng dẫn các nội dung, phương pháp và kế hoạch triển khai thành công các môn học, thực hiện các thí nghiệm.
- Các thầy cô tham gia giảng dạy lớp nghiên cứu sinh khóa 1 của cơ sở đào tạo Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long.

Không thể hoàn thành luận án nếu không có sự giúp đỡ hướng dẫn khoa học và động viên của Cô và Thầy.

Xin chân thành biết ơn Hội đồng đánh giá luận án cấp Cơ Sở: đã dành nhiều thời gian để đọc và đóng góp nhiều ý kiến quý báu cho luận án được hoàn thiện.

Xin chân thành cảm ơn:

- Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- Ban giám đốc Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, đã giúp đỡ tạo điều kiện cho tôi trong học tập và thực hiện đề tài.
- Ban giám hiệu Trường Đại Học Cần Thơ.
- Ban giám hiệu và tập thể thầy cô giáo trường đại học Nông Nghiệp I - Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi rất nhiều trong suốt thời gian tôi theo học chương trình cao học tại đây.
- Phòng Khoa học và Hợp tác quốc tế - Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, đã theo dõi, động viên tôi trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện đề tài tốt nghiệp.
- Bộ môn Di Truyền và Chọn Giống – Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, đã giúp đỡ về trang thiết bị cũng như hướng dẫn chuyên môn trong suốt quá trình thực hiện đề tài tốt nghiệp.

- Bộ môn Công Nghệ Hạt Giống - Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, đã động viên và tạo điều kiện về thời gian giúp tôi có thể hoàn thành luận án trong thời gian qui định.
- TS. Bùi Thị Thanh Tâm, TS. Phạm Trung Nghĩa đã đóng góp nhiều ý kiến quý báu để hoàn thiện cho các môn học chuyên đề và luận án.
- Sau cùng, xin cảm thông sự hy sinh, chia sẻ và động viên của cha mẹ, em gái, vợ và người thân trong gia đình, bạn bè, đồng nghiệp góp phần không nhỏ vào sự thành công của luận án.

Tác giả luận án

Châu Tấn Phát

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những loại cây lương thực chính nuôi sống hơn 50 % dân số thế giới [62]. Trước đây, với điều kiện vật chất còn thiếu thốn, lương thực không đủ ăn người ta chỉ có nhu cầu là ăn no. Nhưng ngày nay do mức sống của người dân ngày càng nâng cao thì nhu cầu ăn no đã thay đổi, việc ăn ngon, có dinh dưỡng cao dần dần trở thành nhu cầu quan trọng không thể thiếu đối với con người. Mặt khác, ngày nay nước ta đã qua thời kỳ thiếu lương thực chuyển sang thời kỳ sản xuất phải có lời và đang xuất hiện những mô hình sản xuất vừa có lời, vừa bền vững trong môi trường sinh thái trong lành. Một trong những mô hình này là làm lúa thơm đặc sản, do đó chất lượng gạo được xem như là một trong những mục tiêu hàng đầu, trong đó mùi thơm được đánh giá rất cao trên thị trường xuất khẩu gạo của thế giới. Sản lượng gạo thơm từ các giống lúa thơm cổ truyền như: Tám Thơm, Nàng Thơm Chợ Đào, Sếng Cù, Nếp Cái Hoa Vàng, Khao Dawk Mali, Basmati,... thì có rất ít không đủ đáp ứng nhu cầu thị trường và khó mở rộng diện tích. Do đó các nhà chọn giống đã liên tục nghiên cứu và lai tạo ra những giống lúa mới có chất lượng cao và giữ được mùi thơm đặc trưng của giống.

Trong những năm gần đây, với sự tiến bộ của ngành công nghệ sinh học đã ứng dụng những kỹ thuật trong sinh học phân tử như tái tổ hợp DNA, giải mã chuỗi trình tự gen. Ứng dụng thư viện nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC - Bacterial Artificial Chromosome) như là một công cụ có sức thuyết phục mạnh mẽ nhất để xây dựng thư viện bộ gen cho cây lúa, thành lập bản đồ vật lý có chất lượng cao và dùng để hợp nhất bản đồ vật lý với bản đồ di truyền. Bên cạnh đó, việc sử dụng chỉ thị phân tử PCR và dòng BAC để xác định gen mùi thơm trên cây lúa cũng là một trong những ứng dụng từ thư viện BAC.

Xuất phát từ những cấp thiết trên, đề tài: "**Ứng dụng chỉ thị phân tử PCR và dòng BAC để xác định gen mùi thơm trên cây lúa (*Oryza sativa* L.)**" được thực hiện.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Ứng dụng chỉ thị phân tử DNA liên kết chặt với gen qui định mùi thơm “*fgr*” trên các dòng giống làm bố mẹ và quần thể con lai nhằm xác định những dòng con lai có chứa gen mùi thơm.
- Khai thác thư viện BAC để hỗ trợ tìm kiếm những chỉ thị liên kết với tính trạng mùi thơm trên cây lúa.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

3.1 Ý nghĩa khoa học

- Xác định những dấu chuẩn phân tử riêng biệt liên kết với gen “*fgr*” trên cây lúa giúp cho việc chọn dòng con lai hiệu quả hơn.
- Xác định những dòng BAC DNA để tạo các chỉ thị mới liên kết với gen qui định mùi thơm khai thác từ nguồn dòng BAC để hiểu rõ hơn về kỹ thuật dòng hóa gen mục tiêu, phục vụ nghiên cứu sâu hơn về chức năng gen này.

3.2 Ý nghĩa thực tiễn

- Đề tài đã góp phần bổ sung những dòng lúa có triển vọng biểu thị mùi thơm thông qua ứng dụng những dấu chuẩn phân tử riêng biệt liên kết chặt với gen “*fgr*” phục vụ cho việc phát triển những giống lúa thơm cao sản ở ĐBSCL.
- Với những kết quả đạt được từ việc khai thác thư viện BAC, đề tài đã tìm và phân tích chỉ thị mới từ đó chuyển sang chỉ thị chứa đoạn gen mùi thơm phục vụ cho chọn giống lúa.

4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Nghiên cứu trên các đối tượng là các giống lúa mùa và các giống lúa cao sản hiện đang được duy trì và nhân giống.
- Khai thác thư viện BAC DNA để xác định những dòng BAC chứa gen mùi thơm.
- Phạm vi nghiên cứu:
 - + Chỉ xác định nội dung có liên quan đến các chỉ thị phân tử liên kết với gen “*fgr*” trên nhiễm sắc thể số 8 và ứng dụng kết quả trên để chọn giống lúa cao sản có gen mục tiêu.

- + Phân lập được đoạn phân tử mang gen mục tiêu.
- + Chưa phân tích phổ chức năng (gene profile).
- + Chưa nghiên cứu được điều kiện để gen thể hiện (gene expression)

ở các qui mô khác nhau.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

1.1 Cơ sở khoa học của đề tài

1.1.1 Hợp chất tạo mùi thơm, gen thơm và một số yếu tố môi trường ảnh hưởng đến việc hình thành mùi thơm trên lúa

1.1.1.1 Hợp chất tạo mùi thơm và sự thể hiện của chúng trên các bộ phận của cây lúa

Mùi thơm của hạt gạo được xác định do nhóm formaldehyde, ammonia và hydrogen sulfide tạo nên. Một vài nghiên cứu còn ghi nhận mùi thơm là do sự tăng của propanol, pentanol và hexanol trong quá trình tồn trữ. Ngày nay bằng phương pháp hiện đại đã xác định mùi thơm được tạo thành bởi hàng trăm loại hydrocacbon, alcohol, aldehyde, keton, acid, phenol, pyridine và những hợp chất khác đã được ghi nhận trong cơm [3], [70].

Tác giả Kim [64] báo cáo rằng các hợp phần hydrocacbon không khác nhau có ý nghĩa giữa lúa thơm và không thơm, tuy nhiên lúa thơm có mức độ cao hơn về alcohol, aldehyde, keton, acid; trong đó lúa thơm có nồng độ 2-acetyl-1-pyrroline cao gấp 15 lần so với lúa không thơm.

Lorieux và ctv [76] đã phân tích mẫu gạo của 2 giống lúa Azucena (thơm) và IR64 (không thơm), kết quả không tìm thấy chất 2-acetyl-1-pyrroline ở IR64 (không thơm), trong khi đó giống lúa thơm Azucena có hàm lượng cao về chất này. Trong số 89 hợp chất phân tích, xử lý thống kê cho thấy các chất sau có sự khác biệt giữa giống lúa thơm và không thơm đó là: pentanol, 2-acetyl-1-pyrroline, benzaldehyde, octanol, pentadecan-2-1,6,10,14-imethylpentadecan-2-1 và hexanol.

Tác giả Buttery và ctv [39] đề nghị rằng sự khác nhau giữa lúa thơm và không thơm không chỉ ở sự hiện diện hay vắng mặt của chất 2-acetyl-1-pyrroline mà còn trong sự khác nhau về số lượng của hoạt chất có trong lúa gạo. Nhiều alen

của một gen thơm có thể tạo ra sự biến đổi nhỏ trong cùng một enzyme kết quả là dẫn đến tính thơm khác nhau.

Tác giả Buttery và ctv [40] đã phân tích và xác định 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) như là một thành phần quan trọng đóng góp vào mùi thơm của các giống lúa thơm. Theo đánh giá về chất lượng mùi thơm của 2-acetyl-1-pyrroline được mô tả giống như mùi của ngô nổ. Xác định nồng độ mùi thơm của 10 giống lúa, khoảng nồng độ từ 6 ppb đến 90ppb với lúa chà trắng. Lúa chưa chà trắng nồng độ 2-acetyl-1-pyrroline là 100-200ppb. Vì thế có thể nghĩ rằng bề mặt lớp aloron của hạt gạo giữ một vai trò quan trọng trong việc hình thành mùi thơm của cơm khi nấu. Mũi của người có thể phát hiện được hợp chất thơm 2-acetyl-1-pyrroline ở nồng độ 0,007ppm. Do đó, đánh giá bằng cảm quan trong điều kiện nhất định và với những người có khứu giác bình thường kết quả có thể tin tưởng được.[47]

Các tác giả Ahmed và ctv [31], Lin và ctv [74] đã khẳng định lại báo cáo của Buttery và ctv [40], Paule và ctv [84] rằng 2-acetyl-1-pyrroline là hợp chất chính tạo nên mùi đặc trưng cho các giống lúa thơm.

Bên cạnh đó, Buttery và ctv [38] đã phân tích lá của cây lá dứa (*Pandanus amaryllifolius*) nhận thấy rằng thành phần bay hơi chính cũng là 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) và có một sự liên hệ rất mật thiết giữa chất 2-acetyl-1-pyrroline trong lá của cây lá dứa và lúa thơm. Nồng độ của chất 2-acetyl-1-pyrroline trong lá của cây lá dứa cao hơn gấp 10 lần trong lúa thơm và cao hơn gấp 100 lần trong lúa không thơm.

Tóm lại, hiện nay có hai quan điểm về thành phần chất thơm của lúa gạo. Quan điểm thứ nhất cho rằng chất thơm được tạo ra từ các hợp chất aldehyde (CHO) và keton (C=O) và các hợp chất với lưu huỳnh. Quan điểm thứ hai cho rằng chất thơm lúa gạo, do vòng pyrrol kiểm soát tính thơm của chất 2-acetyl-1-pyrroline [34]. Tác giả Kader và Delseny [59] cho rằng có sự khác nhau trong việc thể hiện mùi thơm trên các bộ phận của cây lúa, hợp chất 2AP được thể hiện một cách tự nhiên từ giai đoạn mạ cho đến khi chín và đặc biệt là trong giai đoạn hạt trưởng thành trên các bộ phận của cây lúa ngoại trừ rễ, mùi thơm được tích lũy nhiều nhất

trên bộ phận hạt lúa. Bên cạnh đó, các tác giả Chen và ctv [42], Vanavichit và ctv [102] cũng khẳng định mùi thơm không thể hiện hoặc thể hiện rất thấp không đáng kể trên bộ phận rể lúa.

1.1.1.2 Gen thơm

Li và Gu [71] cũng nghiên cứu về sự di truyền và vị trí của gen thơm trên lúa. Sự lai thuận nghịch giữa các giống lúa thơm đã cho thấy rằng các gen của chúng có alen với nhau.

Tác giả Bradbury và ctv [78] đã phân tích mùi thơm của lúa Basmati và Jasmine với sự thể hiện của 2-acetyl-1-pyrroline. Một gen lặn *fgr* trên NST số 8 của lúa qui định sự thể hiện tính trạng quan trọng này và có một gen tương ứng mã hóa protein có tên gọi là Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BAD) thể hiện sự đa hình có ý nghĩa trong vùng chứa gen thơm. Gen *fgr* có sự tương đồng với gen mã hóa BAD2 trong lúa và có thể xem gen *fgr* là một dạng đột biến của gen mã hóa BAD2. Ngược lại, gen mã hóa BAD1 định vị trên nhiễm sắc thể số 4. Gen mã hóa BAD liên kết với gen kháng stress trong cây trồng.

Tác giả Shi và ctv [107] cũng kết luận gen *fgr* là gen lặn nằm trên NST số 8 liên quan đến mùi thơm của lúa. Gen này có một alen lặn mất chức năng *bad2* và alen trội *BAD2* mã hóa protein BAD2 làm cho lúa không thơm. Tổng số 34 giống lúa thơm và không thơm đã được nghiên cứu và giải trình tự đoạn phân tử *BAD2/bad2*. Trong số 24 giống lúa thơm có 12 giống chứa alen *bad2* (*bad2-E7*), với sự kiện mất đi 8 cặp bazơ và 3 SNPs trên exon số 7, số còn lại có một alen *bad2* mới (*bad2-E2*) - chuỗi trình tự tương đồng với *bad2-E7* nhưng đã mất đi 7 cặp bazơ trên exon số 2. Cả hai alen này đều qui định mùi thơm của lúa. Dựa trên chuỗi trình tự khác nhau giữa *BAD2* và 2 alen lặn *bad2* đã phát triển những chỉ thị phân tử giúp cho việc xác định dòng lúa thơm, phân biệt rõ dòng không thơm và thơm xét về kiểu gen. Tuy nhiên, kiểu hình biểu thị ra bên ngoài vô cùng phức tạp điều này có thể do điều kiện môi trường qui định sự ức chế hoặc kích hoạt promoter để gen thể hiện mùi thơm.