

TỔNG QUAN DI TRUYỀN CÂY CHUỐI (*Musa spp.*) TIẾP CẬN KỸ NGUYÊN SAU NGS

I. DI TRUYỀN TẾ BÀO



Chuối (*Musa spp.*) được trồng ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới, thuộc khu vực Đông Nam Á, châu Phi, Nam Mỹ, là nguồn cung cấp kali quan trọng, số lượng xuất khẩu ổn định và là thực phẩm quan trọng cho hàng triệu người đang sống ở các nước phát triển.

Họ Musaceae có bộ nhiễm sắc thể rất phức tạp. Kỹ thuật di truyền tế bào có tên là **oligo painting FISH** được phát triển, để xác định tất cả bộ nhiễm sắc thể của cây chuối (*Musa spp.*).

Người ta tiến hành khảo sát loài chuối lưỡng bội *M. acuminata* spp. *malaccensis* (thuộc hệ gen A), *M. balbisiana* (thuộc hệ gen

B), *M. schizocarpa* (thuộc hệ gen S) của Section **Eumusa** trong chi *Musa*.

Chi *Musa* có khoảng 75 loài và nhiều dòng vô tính có thể ăn được; xét theo bộ tiêu chuẩn định dạng của **IPGRI-INIBAP/CIRAD** (1996) và trên cơ sở số lượng nhiễm sắc thể (x). Chi *Musa* được người ta chia làm 4 sections: **Eumusa** ($x = 11$), **Rhodochlamys** ($x = 11$), **Australimusa** ($x = 10$), và **Callimusa** ($x = 9, 10$).

Hầu hết các dòng chuối vô tính được canh tác hiện nay ($3n$) nằm trong section **Eumusa** sau quá trình lai trong loài, lai giữa các loài đối với loài chuối hoang lưỡng bội *M. acuminata* (nguồn cho hệ gen A) và *M. balbisiana* (nguồn cho hệ gen B). Loài lưỡng bội *M. schizocarpa* (hệ gen S) cũng tham gia vào quá trình tiến hóa của dòng chuối vô tính ăn được hôm nay. Các cặp lai tự phát trong loài và giữa các loài thường không có hạt và biểu hiện tam bội (AAA, AAB, hoặc ABB).

Chi *Musa* là genome tương đối nhỏ, kích thước phân tử biến thiên từ **550 đến 750 Mbp** / nhiễm sắc thể. Áp dụng kỹ thuật tế bào **FISH** (fluorescence *in situ* hybridization), cùng với những chỉ thị thăm dò phân tử **DNA repeats** với phân bố rất đặc biệt trên nhiễm sắc thể, kết quả cho thấy đây là phương pháp tiếp cận hữu ích để xác định nhiễm sắc thể trong cây chuối. Phương pháp **chromosome painting** cho phép đánh dấu bằng huỳnh quang trên toàn bộ nhiễm sắc thể.

Oligo painting FISH cho chúng ta cơ hội xác định được từng nhiễm sắc thể riêng biệt, các vùng của nhiễm sắc thể của chi *Musa*, hoàn thiện phân tích so sánh nhiễm sắc thể và định tính nội dung sắp xếp gen trên nhiễm sắc thể. Kết quả xác định có 3 loài: *M. acuminata* spp. *malaccensis*, *M. balbisiana*, và *M. schizocarpa*, đã và đang tham gia tích cực vào sự tiến hóa của giống trồng trọt hiện nay.

II. HỆ GEN CHUỐI VÀ NĂNG SUẤT

Chuối có khả năng tạo ra giống không hạt. Tính trạng này được xem như chìa khóa trong tiến trình thuần hóa chuối hoang dại sang chuối ăn được, đó cũng là kết quả của tiến trình đa bội hóa. Năng suất chuối dựa theo khối lượng quây chuối trên đơn vị diện tích canh tác, thời gian thu hoạch trong 1 năm. Thành phần quyết định khối lượng quây chuối (bunch weight) là số nải chuối và số trái chuối; chiều dài và chu vi trái chuối; đường kính trái và đường kính thịt quả. Tính trạng sự đầy chắc của quả chuối, liên quan đến sức chứa (sink) tương quan trực tiếp đến thịt quả (pulp), hoặc phần ăn được của quả chuối.

Bản chất trinh sản (*parthenocarpy*) của chuối được điều khiển bởi 3 gen **P1**, **P2** và **P3**. Tính trạng trinh sản được liên kết với sự phân ly của một gen trội điều khiển trinh sản (*parthenocarpy*) gen **P1**. Dòng vô tính tam bội thuộc hệ gen AAA có 3 gen trội **P** điều khiển tính trạng trinh sản này. Dòng vô tính lưỡng bội trinh sản có tên là **Pisang Lilin** thuộc hệ gen AA, biểu hiện dị hợp tử đối với 3 gen **P** trong khi đó, biến thiên về số alen trội được ghi nhận ở những cây lưỡng bội khác.

Các gen của *Musa acuminata*: **MCMI-AGAMOUS-DEFENSINS-SRF (MaMADS)**, **MYB** và gen mã hóa yếu tố phiên mã **AP2/ERF** đều có trong nội hàm kiến trúc quả chuối, phát triển quả và sự chín quả.

Kết quả GWAS tính trạng khối lượng quây chuối cho thấy khả năng dự đoán cao đối với tính trạng sự vào chắc của quả (> 0,7), trong sàng lọc di truyền của quần thể training, người ta giả định rằng sự vào chắc của quả được điều khiển bởi một vài QTL chủ lực. Những QTL chủ lực liên quan đến tính trạng khối lượng buồng chuối (bunch weight) và các tính trạng hợp phần của nó của tập đoàn giống chuối vùng cao Đông Phi định vị trên **nhễm sắc thể 3** (Nyine et al. 2019). Người ta biết rất ít những loci nào điều khiển khối lượng buồng chuối và các tính trạng hợp phần của năng suất ấy. Người ta sử dụng quần thể gồm **307 mẫu giống** chuối bản địa có biến thiên độ bội thể; chúng được đánh giá kiểu hình tại 3 địa điểm khảo nghiệm khác nhau về sinh thái canh tác. Người ta thu thập số liệu khối lượng buồng chuối, số nải và số quả; chiều dài quả, chu vi quả; đường kính quả có vỏ và đường kính thịt quả trong 3 vụ chuối liên tục. Tiến hành đánh giá kiểu gen quần thể association này bằng kỹ thuật đọc trình tự DNA và sử dụng **27.178 chỉ thị SNPs**. Giá trị association di truyền giữa những SNPs ấy và thuật toán tuyến tính tốt nhất, đã phân tích chính xác những **predictors** của tính trạng nông học, nhờ phần mềm **TASSEL v5**, sử dụng kết quả tích hợp mô phỏng tuyến tính tham gia vào cấu trúc quần thể và giá trị quan hệ họ hàng (kinship). Hệ số chính xác Bonferroni, xác suất tìm kiếm sai, và giá trị LD (linkage disequilibrium) có tính chất long-range, đã giúp người ta xác định được 25 loci với chỉ thị SNPs có ý nghĩa về thống kê. Kết luận: các loci mục tiêu ấy định vị trên nhiễm sắc thể 3. hầu hết các chỉ thị SNPs đều nằm trong vùng gen đích mã hóa protein chưa định tính và còn là giả thuyết, nhưng một vài QTL được ‘mapped’ biểu thị các yếu tố phiên mã, và là những gen có trong nội dung điều tiết khi phân bào. Giá trị LD có tính chất ‘liên nhiễm sắc thể’ thông qua kết quả phân tích chỉ thị SNPs được quan sát trong quần thể lập bản đồ này, nhưng không có chỉ thị SNPs nào liên kết có ý nghĩa thống kê với các tính trạng nói trên. Cluster di truyền có ý nghĩa của những SNPs trên NST 3 khẳng định giả thuyết của nhóm tác giả rằng: tính trạng vào chắc của quả (fruit filling) trong quần thể này được điều khiển bởi một vài QTL chủ lực.

III. DI TRUYỀN TÍNH KHÁNG BỆNH

III-1. **Bệnh héo vàng lá** do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* gây ra, có bản chất lan truyền từ đất. Bộ assemblies của nấm thuộc race 1 có 35 contigs và race 4 nhiệt đới có 29 contigs. Chiều dài **contig N50** của race 1 là 2,08 Mb, của race 4 là 4,28 Mb. Hai hệ gen tham chiếu mới này biểu thị một sự cải tiến gấp 100 lần hơn dữ liệu thống kê của contig 50 theo kết quả chạy “**short read**” trước đây những assemblies của nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Ahmad et al. (2020) đã tiến hành nghiên cứu mẫu chuối hoang dị hợp tử, tự phối: *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (**Mam**, AA, $2n = 22$) để tạo ra quần thể bản đồ và để nghiên cứu di truyền tính kháng bệnh Race 1 và Race 4 (TR4) nhiệt đới. Đánh giá kiểu gen bằng kỹ thuật đọc trình tự DNA biểu thị 2802 chỉ thị SNP có chất lượng cao dùng làm chỉ thị phân tử trong bản đồ di truyền. Gen điều khiển tính kháng là đơn gen trội đối với Race 1, bản đồ di truyền cho thấy locus này định vị trên **nhễm sắc thể 10**, gần đầu xa nhất của nhiễm sắc thể. Kết quả chạy bản đồ GGT (graphical genotyping), cho thấy những markers kế cận gen đích trong quãng **360 kb** liên quan đến tính kháng Race 1. Vùng này có tất cả **165 gen giả định** trên hệ gen tham chiếu, bao gồm **19** gen mã hóa LRR (leucine-rich repeat receptor-like kinase).

III-2. **Bệnh thối nhũn (Banan Soft Rot)** do vi khuẩn *Dickeya zae* **MS2**. Một chủng nòi có gen đột biến *proline iminopeptidase*, gen đồng dạng với vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng *Xanthomonas* sp, gen đột biến này bị tiết giảm (attenuated) đối với triệu chứng thối nhũn. Nghiên cứu chức năng của *proline iminopeptidase* trở thành nhân tố gây độc tính là đối tượng được xem xét. *Dickeya zae* **MS2** tiết ra độc tố làm cây chuối bị thối nhũn. Do đó, người ta tập trung tìm hiểu vai trò số lượng cần thiết của **quorum sensing** và tìm hiểu nhân tố điều tiết **quorum-sensing** trong mối quan hệ với *D. zae* **MS2**. Feng et al. (2019) đã tiến hành chạy trình tự hệ gen vi khuẩn và cho trình tự query này được giải thích nhờ phần mềm annotation, để xác định trình tự tương đồng của gen mã hóa **LuxR** (homologs). Họ xác định một cặp gen đồng dạng **LuxR-LuxI** rất kinh điển với các thành phần loài khác của chi *Dickeya*. Tín hiệu di truyền **quorum-sensing** đối với cặp gen này là **N-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone**, và chu trình ảnh hưởng đến sự chết, sự kết lại thành khối của tế bào (cell clumping), sự sinh ra sắc tố **indigoidine**, nhưng nó không ảnh hưởng gì đến sự nhiễm bệnh của cây chuối non trong thí nghiệm này. Họ xác định được một gen đồng dạng **luxR** liên kết với một gen khác được chú thích là mã hóa men **proline iminopeptidase**. Gen **luxR** liên kết với một gen khác, mã hóa enzyme **proline iminopeptidase**. Trong khi gen đột biến mất đoạn của gen đích, mã hóa **LuxR homolog**, biểu thị độc tính bình thường.

III-3. **Bệnh sọc nâu lá do siêu vi (banana streak virus: BSV)**: Muốn xác định mẫu bị xâm nhiễm bởi siêu vi BSGFV, Li et al. (2020) tiến hành dòng hóa sản phẩm PCR và phân tích toàn bộ hệ gen của siêu vi này với nguồn vật liệu là mẫu phân lập siêu vi của Vân Nam (BSGFV-YN). Siêu vi BSGFV-YN xâm nhiễm giống chuối thuộc nhóm Cavendish Musa AAA. Hệ gen của siêu vi có độ dài phân tử 7.325 bp, tỷ lệ GC chiếm 42%. Phản ứng siêu vi đối với các giống chuối trồng trọt rất khác nhau. Do đó, sàng lọc di truyền để tìm ra giống kháng hoàn toàn khả thi.

III-4. **Bệnh đốm lá Sigatoka**: Ba loài nấm *Pseudocercospora* sp. có liên quan đến bệnh Sigatoka là *P. fijiensis* (tên trước đây *Mycosphaerella fijiensis*) gây hiện tượng đốm lá đen Sigatoka, *P. musae* (tên trước đây là *M. musicola*) gây hiện tượng đốm lá vàng Sigatoka, và *P. eumusae* (tên trước đây *M. eumusae*) gây hiện tượng đốm lá **eumusae**. Loài nấm *P. eumusae* và *P. fijiensis* có tính chất xâm nhiễm mạnh nhất (Chang et al. 2016). Kết quả kỹ thuật phân tích **pairwise** của gen cho thấy: *P. eumusae* và *P. fijiensis* có độc tính cao hơn liên quan đến cơ chế biến dưỡng và sự suy thoái của enzyme trong thành tế bào nấm, khẳng định sự tiến hóa của độc tố của hai pathogens này. Có tất cả 234 họ gen, bao gồm **7 effectors** giả định, đều hiện diện trong 3 loài nấm gây bệnh Sigatoka, chúng đều có khả năng thích nghi tốt với cây chủ. Giống chuối '**Calcutta-4**' kháng tự nhiên với Black Sigatoka; tuy nhiên, phẩm chất trái của mẫu giống này không đáp ứng yêu cầu thương mại được. Người ta phân lập **7 chuỗi trình tự DNA** có tính chất rất đa dạng và phổ biến; một chuỗi DNA giống với các gen có trong danh mục kháng pathogen này, mã hóa protein **RGA1** được giả định kháng nấm xâm nhiễm. Các gen mã hóa protein **zinc finger domains** đã được xác định, với chức năng quan trọng trong phản ứng kháng, thông qua kích hoạt sự biểu hiện các gen

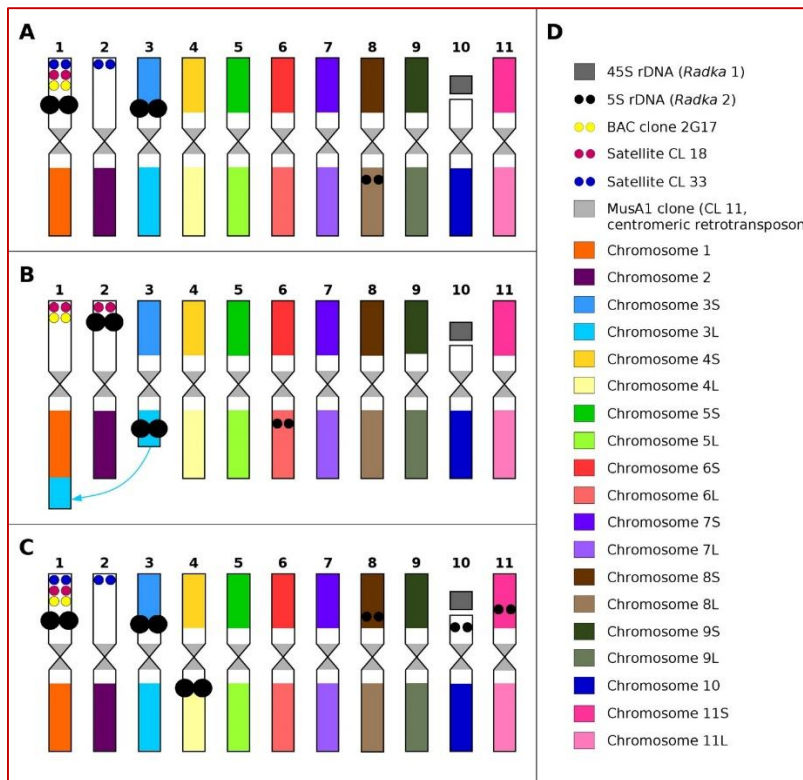
dưới nguồn (downstream genes). Sau đó, **bốn gen đích** được sàng lọc di truyền và được hoàn thiện bằng kỹ thuật RT-qPCR.

IV. CHỐNG CHỊU STRESS PHI SINH HỌC

IV-1. **Chống chịu đất thiếu vi lượng:** Mấy năm gần đây, di truyền biểu sinh (**epigenetics**) đã và đang phát triển tích cực. Phân tử microRNAs (miRNAs) với 20–24 nucleotide (nt) mang bản chất non-coding RNAs, làm câm lặng các gen đích dưới nguồn (downstream target genes) của thực vật và động vật. Chúng được tạo ra thông qua một chu trình vô cùng phức tạp, bắt đầu từ phiên mã **RNA Pol II** của một phân tử RNA dài có thuật ngữ là **pri-miRNA** (primary microRNA) tại một locus nào đó của hệ gen.

Phân tử micro RNAs (miRNAs) điều khiển sự tăng trưởng, phát triển và chống chịu stress phi sinh học của nhiều loài cây trồng. Nó đang được áp dụng để nghiên cứu hệ gen cây chuối, cây đang đứng trước thách thức của biến đổi khí hậu và thiếu dinh dưỡng khá nặng. **Patel et al. (2019)** đã khai thác tiền thân của phân tử **Musa-miR397** mang 11 **motifs** của **GTAC phản ứng với đồng (Cu)** trong promoter của nó, thuộc hệ gen cây chuối. Phân tử **Musa-miR397** được điều tiết đáng kể theo kiểu **up** gấp 8-10 lần trong rễ chuối và lá chuối khi cây bị thiếu đồng, tương quan với những gen marker thiếu đồng trong rễ, đó là **Musa-COPT** và **Musa-FRO2**. Phân tử **Musa-miR397** được điều tiết theo kiểu **up** (>2 lần) trong nghiệm thức xử lý ABA, MV và **xử lý nhiệt độ nóng**, nhưng điều tiết theo kiểu **down** dưới điều kiện **stress mặn**. Kết quả xét nghiệm RNA-seq cây chuối transgenic và cây chuối wild type cho thấy mô đun của sự thể hiện **71 gen** liên quan đến nhiều khía cạnh khác nhau như tăng trưởng và phát triển, tạo sinh khối lớn. Phân tử **Musa-miR397** không những là ứng cử viên làm tăng cường sinh khối mà còn tham gia vào hệ thống tự vệ của cây chống lại stress thiếu dinh dưỡng.

IV-2. **Chống chịu lạnh của trái chuối:** Tồn trữ trong nhiệt độ lạnh là chiến lược phổ biến để bảo quản và vận chuyển chuối. Tuy nhiên, nhiều loài trái cây vô cùng nhạy cảm và bị tổn thương khi lạnh cấp đông, trong đó có chuối. **Song et al. (2019)** đã tiến hành nghiên cứu tồn trữ chuối ở điều kiện nhiệt độ 11⁰C để làm chậm lại quá trình chín quả của giống chuối Fenjiao (*Musa ABB Pisang Awak*), và thịt quả chuối có thể mềm lại sau khi xử lý **ethephon**. Điều kiện tồn trữ 7⁰C ngăn ngừa quả chuối bị chín mềm hoàn toàn, quả chuối sẽ giữ được hàm lượng tinh bột cao hơn có ý nghĩa thống kê và làm giảm thấp hơn hàm lượng đường hòa tan. **Gen MaEBF1** là thành phần quyết định chu trình truyền tín hiệu **ethylene**, bị ức chế trong suốt giai đoạn trái chín, sau khi quả chuối được tồn trữ 12 ngày ở điều kiện 7⁰C. Sự biểu hiện một series các gen có liên quan đến phân giải tinh bột và một gen điển hình như **MaNAC67** cũng bị ức chế rất mạnh mẽ. Cả hai **MaEBF1** và **MaNAC67** đều bị kích hoạt bởi ethylene và định vị trong nhân. Protein **MaNAC67** có khả năng kết gắn với promoter của những gen liên quan đến sự phân giải tinh bột, bao gồm gen **MaBAM6**, **MaSEX4**, và **MaMEX1**. Xét nghiệm sinh học “Yeast two-hybrid, GST-pull down, và BiFC” cho kết quả là **MaEBF1** tương tác với protein **MaNAC67**, dẫn đến kích hoạt promoters của gen **MaBAM6** và **MaSEX4**. Như vậy **MaNAC67** là một phân tử **regulator** trực tiếp trong quá trình phân giải tinh bột và có khả năng điều tiết sự phân giải tinh bột bị ức chế bởi nhiệt độ đông lạnh như tương tác với chu trình truyền tín hiệu **ethylene** trong quả chuối. Đây là kết quả nghiên cứu dựa trên phân tích chức năng của protein **MaEBF1** và **MaNAC67**, sẽ hữu dụng trong cơ chế điều tiết biến dưỡng tinh bột và điều tiết sự chín quả.



Hình 1:

Idiograms của 3 loài lưỡng bội thuộc Section **Eumusa** chi *Musa*. (A) *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* “Pahang” (genome A) ITC 0609. (B) *Musa balbisiana* “Tani” (genome B) ITC 1120. (C) *Musa schizocarpa* “Schizocarpa” (genome S) ITC 0560. (D) multicolored scheme (Šimoníková et al. 2019).

GS BÙI CHÍ BỬU, IAS

(Tổng hợp nguồn trích dẫn từ 161 tư liệu trong PubMed, NCBI)