

Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant endolysin from Staphylococcal bacteriophages NA6

Nguyen Thi Hong Hai, Khuat Huu Trung, Tran Dang Khanh, Le Thi Hang, Pham Thi Ly Thu and Dang Tat Thanh

Abstract

Endolysins (or lysins) are bacteriophage-encoded lytic enzymes that break down the peptidoglycan of the bacterial cell wall during the terminal stage of the bacteriophage reproduction cycle. Bacteriophage NA6 was isolated from raw milk showed good capacity against bacteria *Staphylococcus aureus*. The endolysin gene (*LysSA*) from genome of *Staphylococcus aureus* NA6 was cloned, codon-usage optimized for expression in *E.coli* and characterized. Then optimized sequence *LysSA* was moved on vector pET21b (+) in order to get enzyme expression induction in *E.coli* BL21 with protein molecular mass of 50 kDa. Testing enzyme lytic activity showed that recombinant endolysin had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Escherichia coli*, Endolysin, *Staphylococcus aureus*

Ngày nhận bài: 22/9/2018

Ngày phản biện: 27/9/2018

Người phản biện: TS. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

TẦM SOÁT VÀ THIẾT KẾ MARKER CHỨC NĂNG XÁC ĐỊNH CANDIDATE GEN KHÁNG ĐẠO ÔN *PIT* Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA BẢN ĐỊA CỦA VIỆT NAM

Nguyễn Trường Khoa¹, Nguyễn Thúy Diệp¹, Nguyễn Thái Dương¹, Nguyễn Như Toàn², Phương Hữu Pha³, Đặng Thị Thanh Hà¹, Kiều Thị Dung¹, Trần Thị Thúy¹, Trần Đăng Khánh¹, Khuất Hữu Trung¹

TÓM TẮT

Gen kháng đạo ôn *Pit* đã được xác định có trong giống lúa *Indica* (Tjahaja) của Indonesia, có phổ kháng rộng (Kiyosawa *et al.*, 1972). Gen *Pit* được phân lập và xác định thuộc họ CC-NBS-LRR (Hayashi *et al.*, 2009). Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng chỉ thị phân tử cho phép xác định các gen kháng trong nguồn gen lúa và có nhiều ưu thế trong chọn tạo giống lúa kháng do nó có thể đánh giá được sự tồn tại của các gen mà không cần lấy nhiễm nhân tạo. Các marker chức năng được thiết kế từ các đa hình trong trình tự gen và không bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi alen phi chức năng, đặc biệt có thể xác định các gen riêng lẻ. Dựa vào trình tự hệ gen của 17 giống lúa bản địa được giải mã, trong nghiên cứu này đã tầm soát và xác định được các candidate gen *Pit* ở 17 giống lúa nghiên cứu. Trong đó, có 9 giống có tổng số nucleotide ít hơn 3 nucleotide và 8 giống có tổng số nucleotide ít hơn 20 nucleotide so với gen tham chiếu LOC_Os01g05620. Đồng thời, đã thiết kế được marker *Ins_Pit_17* dựa trên sự thêm/bớt đoạn ADN của các candidate gen *Pit* trong các giống lúa bản địa. Kết quả cho thấy: Có thể sử dụng marker chức năng đã thiết kế để nghiên cứu dự đoán chức năng gen *Pit* và ứng dụng trong các chương trình chọn tạo giống lúa.

Từ khóa: Candidate gen, *Pit*, kháng đạo ôn, lúa, marker

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra là một trong những bệnh phổ biến nhất và tàn phá ảnh hưởng lớn đến năng suất lúa gạo. Quản lý bệnh đạo ôn lúa thông qua sức đề kháng của vật chủ là một hướng đầy hứa hẹn của chương trình Quản lý bệnh hại tổng hợp (IDM). Cho đến nay có khoảng 102 gen kháng đạo ôn đã được xác định (Wu *et al.*, 2016; Vasudevan *et al.*, 2015). Trong số đó 27 gen đã được nhân bản (cloning) đó là: *Pib*, *Pb1*, *Pita*, *Pi9*, *Pi2*, *Pizt*, *Pid2*, *Pi33*, *Pii*, *Pi36*, *Pi37*, *Pikm*, *Pit*, *Pi5*, *Pid3*, *Pid3-A4*, *Pi54*, *Pish*, *Pik*, *Pikp*, *Pia*, *PiCO39*,

Pi25, *Pi1*, *Pi21*, *P50* và *Pi65* (t) (Sharma *et al.*, 2012; Devanna *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2016). Nhiều gen kháng được xác định và đã được phân loại thành 8 nhóm khác nhau (Sharma *et al.*, 2012). Đa số locus liên quan đến khả năng kháng bệnh đạo ôn đã được tìm thấy nằm trên nhiễm sắc thể số 11 của cây lúa dựa trên các nghiên cứu tương quan toàn bộ nhiễm sắc thể (Wang *et al.*, 2013). Mặc dù một số locus kháng bệnh đạo ôn đã được xác định nhưng chỉ có một vài trong số chúng được ứng dụng trong lai tạo giống để quản lý bệnh đạo ôn ở một số quốc gia (Singh *et al.*, 2014).

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp; ² Đại học Thủ đô; ³ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Hiện nay, các nghiên cứu khám phá các biến thể di truyền từ các nguồn gen kháng (lúa hoang dại và giống lúa canh tác) ở nhiều loài cây trồng để tìm ra điểm chung nhất đang được các nhà khoa học chú trọng. Một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất để xác định các biến thể là sử dụng kỹ thuật dựa trên phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại các alen khả thi (homolog) từ nhóm gen được gọi là khai thác alen. Gần đây dựa vào các alen có tính kháng bệnh đạo ôn được báo cáo, phân lập tách dòng từ các giống lúa hoang dại và giống lúa trồng đã giúp các nhà chọn giống chọn tạo các giống lúa mới có khả năng kháng bệnh đạo ôn cao. (Geng *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008).

Gen *Pit* kháng đạo ôn ở lúa được xác định trong giống lúa Tjahaja của Indonesian, giống lúa *indica* này có phổ kháng bệnh rộng (Kiyosawa *et al.*, 1972). Trong 1 nghiên cứu trước đây, nhóm tác giả đã phân lập *Pit* và chỉ ra rằng gen *Pit* thuộc họ CC-NBS-LRR (Hayashi *et al.*, 2009). So sánh trình tự của alen *Pit* giữa giống kháng K59 và giống mẫn cảm Nipponbare cho thấy alen liên quan đến tính kháng đạo ôn có chứa 4 amino acid thay thế, 1 DNA nhảy dDart và 1 đoạn lặp dài cuối (LTR)-retrotransposon, tên là Renovator, chèn vào vùng promoter.

Trong nghiên cứu này, dựa vào kết quả tầm soát candidate gen *Pit* có trong một số giống lúa bản địa của Việt Nam từ đó phát triển marker chức năng để xác định candidate gen *Pit*. Sử dụng kết quả này trong nghiên cứu chức năng gen và để sàng lọc các dòng/giống lúa phục vụ cho công tác chọn tạo giống kháng bệnh đạo ôn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cơ sở dữ liệu trình tự genome 17 giống lúa bản địa của Việt Nam đã được giải mã.

Bảng 1. Bảng vật liệu nghiên cứu

TT	Tên giống	TT	Tên giống
1	Khẩu điển lư	10	Lúa gốc đỏ
2	Thơm Lài	11	Tám xoan Hải Hậu
3	OM6377	12	Hom râu
4	Nếp mặn	13	Khẩu Liễn
5	Tốc lùn	14	Tám xoan Bắc Ninh
6	Ble te lo	15	Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2
7	Khẩu mặc buộc	16	Nếp lùn
8	Nếp mèo nương	17	Nàng quýt biển
9	Tép Thái Bình		

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tầm soát gen *Pit* và thiết kế môi đặc hiệu dựa trên trình tự genome

- Lắp ráp và gọi SNP sử dụng phần mềm NextGENe_V2.4.1.1.

- Trình tự các nucleotide được so sánh và phân tích sử dụng phần mềm ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); Cặp môi đặc hiệu được thiết kế bằng phần mềm Primer 3,0 (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) và phần mềm xây dựng cây phả hệ MEGA6.0 cho hệ điều hành Windows (<http://www.megasoftware.net/mega.php>).

2.2.2. Phương pháp kiểm tra candidate gen kháng *Pit*

- Mẫu lá lúa được thu thập và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của (Obara *et al.*, 1998) có cải tiến.

- Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96 well Thermal cycler. Tổng thể tích phản ứng là 15 µl, bao gồm: 5 µl ADN (nồng độ 10 ng); 0,15 µM mỗi; 0,2 mM dNTPs; 1X Buffer PCR; 2,5 mM MgCl₂ và 0,25 đơn vị Taq polymerase.

- Sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide 6,0% hoặc trên gel agarose và được phát hiện dưới tia cực tím bằng phương pháp nhuộm ethidium bromide.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 đến tháng 8/2018 tại Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tầm soát gen *Pit* kháng đạo ôn dựa trên dữ liệu trình tự genome của các giống lúa bản địa đã được giải mã

Trình tự gen của gen *Pit* được lấy từ cơ sở dữ liệu của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) và chuỗi tham chiếu được lấy từ cơ sở dữ liệu công bố (http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/sequence_display.cgi?orf=LOC_Os01g05620) là LOC_Os01g05620, vùng CDS (Coding DNA Sequence) có 2970 nucleotide mã hóa cho 989 amino acid. Dựa vào trình tự genome của 17 giống lúa bản địa đã giải mã, tiến hành tìm trình tự tương đồng của 17 giống lúa đã giải mã và so sánh với locus gen *Pit* đã được công bố.

Bảng 2. Bảng thống kê số lượng và tỉ lệ nucleotide của các candidate gen *Pit* ở các giống lúa đã giải mã

Tên giống lúa và gen tham chiếu	Tỷ lệ nucleotide (%)						Tổng số nucleotide
	T(U)	C	A	G	CG	AT	
LOC_Os01g05620 (<i>PIT</i>)	27,6	19,1	30,2	23,1	42,2	57,8	2.970
Khẩu điển lư	27,0	19,1	31,0	22,9	42,0	58,0	2.967
Thơm Lài	26,7	19,2	31,5	22,6	41,8	58,2	2.967
OM6377	27,0	19,1	31,4	22,5	41,7	58,3	2.967
Tép Thái Bình	26,4	19,4	31,9	22,3	41,7	58,3	2.967
Tám xoan Hải Hậu	26,8	19,3	31,1	22,8	42,1	57,9	2.967
Hom râu	26,9	19,2	31,0	22,9	42,1	57,9	2.967
Khẩu Liễn	26,9	19,2	30,9	23,0	42,2	57,8	2.967
Tám xoan Bắc Ninh	26,3	19,4	31,6	22,7	42,1	57,9	2.967
Nàng quýt biển	26,7	19,4	31,1	22,8	42,2	57,8	2.967
Nếp mặn	26,6	19,2	31,4	22,8	42,0	58,0	2.950
Tốc lùn	27,2	18,9	30,8	23,1	42,0	58,0	2.950
Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2	27,1	19,1	30,8	23,0	42,1	57,9	2.950
Nếp lùn	26,7	19,2	31,4	22,7	41,9	58,1	2.950
Ble te lo	26,6	19,4	31,2	22,8	42,2	57,8	2.950
Khẩu mặc buộc	26,8	19,2	31,1	23,0	42,2	57,8	2.950
Nếp mèo nương	26,7	19,2	31,2	22,9	42,1	57,9	2.950
Lúa gốc đỏ	26,8	19,2	31,2	22,8	42,0	58,0	2.950

Kết quả (Bảng 2) đã thu nhận được 9 đoạn trình tự tương đồng có độ dài ít hơn 3 nucleotide (nu) so với gen tham chiếu *Pit*, đó là các giống: Khẩu điển lư, Thơm Lài, OM6377, Tép Thái Bình, Tám xoan Hải Hậu, Hom râu, Khẩu Liễn, Tám xoan Bắc Ninh và Nàng quýt biển. Tuy nhiên, đoạn trình tự tương đồng với candidate gen *Pit* của 9 giống lúa trên có tỉ lệ phần trăm các loại C, A, G và T(U) không giống nhau và không giống với gen tham chiếu. Tám đoạn trình tự của tám giống còn lại có tổng số nucleotide ít hơn 20 nu và tỷ lệ A, T(U), G, C sai khác so với gen tham chiếu. Kết quả thống kê trình tự nucleotide cho thấy tất cả 19 giống lúa bản địa mất 3 nu ở vị trí số 543, 544 và 545, ngoài ra 8 giống (Nếp mặn, Lúa gốc đỏ, Ble te lo, Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2, Nếp lùn, Khẩu mặc buộc, Nếp mèo nương và Tốc lùn) mất 17 nu ở vị trí từ số 2647 đến 2664.

Kết quả phân tích tổng số amino acid và dịch mã sang protein cho thấy 9 giống lúa có chiều dài tương đương với gen tham chiếu (ít hơn 3 nucleotide) nhưng lại có số lượng các amino acid khác nhau và có sự sai khác về trình tự protein (Bảng 3).

3.2. Kết quả thiết kế marker xác định candidate gen *Pit* có khả năng kháng đạo ôn

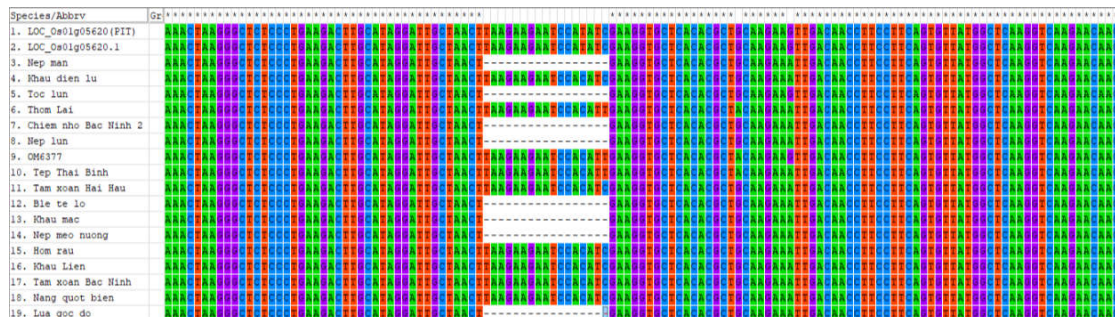
Các marker phân tử liên kết với các gen kháng

chính là một công cụ quan trọng cho việc chọn tạo giống bằng phương pháp MAS (Costanzo *et al.*, 2009). Các biến thể về đơn đa hình Nucleotide (SNPs) và thêm, bớt (InDels) trong toàn bộ phân đoạn gen có thể được so sánh giữa các kiểu gen, xác định các dấu hiệu sai khác trong quá trình hỗ trợ lựa chọn gen cho chính xác. Các dấu hiệu liên kết với hai gen kháng (*Pib* và *Pita*) cũng như các dấu SNP dựa trên PCR cho locus *Piz* và *Pik* (Hayashi *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2011) đã đề cập đến. Do đó, việc chọn tạo giống bằng phương pháp MAS sẽ được hưởng lợi từ sự phát triển của các marker đặc hiệu gen kháng mới, cho phép tích hợp nhiều gen để thực hiện khả năng kháng bệnh phổ rộng hơn.

Kết quả tầm soát và so sánh trình tự locus gen *Pit* của 17 giống lúa bản địa với gen kháng đạo ôn bằng các phần mềm chuyên dụng cho thấy: tần số xuất hiện các đa hình đơn nucleotide (SNP) và các đoạn thêm, bớt (InDels) giữa các giống khá cao. Đặc biệt, có đoạn trình tự được chèn vào với 17 nucleotide đối với 9 giống lúa bản địa của Việt Nam giống như gen tham chiếu đã được công bố, đó là: Khẩu điển lư, Thơm Lài, OM6377, Tép Thái Bình, Tám xoan Hải Hậu, Hom râu, Khẩu Liễn, Tám xoan Bắc Ninh và Nàng quýt biển (Hình 1).

Bảng 3. Bảng thống kê số lượng amino acid của các gen ứng viên *Pit* ở các giống lúa đã giải mã

Tên giống/ gen tham chiếu	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Tổng
LOC Os-01g05620(PIT)	41	24	55	67	38	54	28	67	61	143	29	49	40	38	52	65	35	64	16	23	989
Khẩu điển lư	40	23	55	68	37	56	29	66	63	143	30	51	40	40	52	62	35	59	16	22	987
Thơm Lài	46	23	54	67	37	53	27	70	64	143	30	56	40	38	54	58	36	55	15	21	987
OM6377	45	24	54	67	38	51	28	69	65	143	31	55	40	38	53	58	35	57	15	21	987
Tép Thái Bình	43	22	53	68	37	55	29	70	67	144	29	57	41	38	51	57	37	53	15	21	987
Tám xoan Hải Hậu	41	22	55	67	37	57	29	66	64	144	30	51	40	38	53	61	36	59	15	22	987
Hom râu	40	23	54	69	37	56	29	68	62	143	28	52	40	40	52	62	35	59	16	22	987
Khẩu Liễn	41	23	56	67	37	56	29	67	62	143	29	51	41	40	52	61	34	60	16	22	987
Tám xoan Bắc Ninh	42	22	54	69	36	56	29	67	69	142	29	52	41	37	50	63	36	56	15	22	987
Nàng quớt biển	42	23	56	67	36	55	28	67	65	142	31	51	41	39	52	63	34	57	16	22	987
Nếp mặn	40	22	55	69	36	56	28	65	68	141	30	53	41	37	49	63	34	58	15	21	981
Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2	41	23	55	67	37	55	27	64	63	142	30	52	41	39	51	62	34	60	16	22	981
Nếp lùn	41	22	55	66	37	56	27	65	69	142	29	53	41	37	50	62	36	57	15	21	981
Ble te lo	41	23	56	67	36	55	27	64	65	140	30	51	42	38	51	63	35	59	16	22	981
Khẩu mặc buộc	40	22	55	68	37	57	28	64	63	142	30	52	41	39	51	62	34	59	15	22	981
Nếp mèo nướng	41	23	54	70	36	55	27	65	66	140	29	53	41	38	50	64	33	58	16	22	981
Tốc lùn	40	22	56	66	37	55	26	63	64	143	29	52	40	38	52	62	35	63	16	21	980
Lúa gốc đỏ	41	22	55	67	37	55	28	64	66	142	30	52	41	38	49	62	35	59	16	21	980

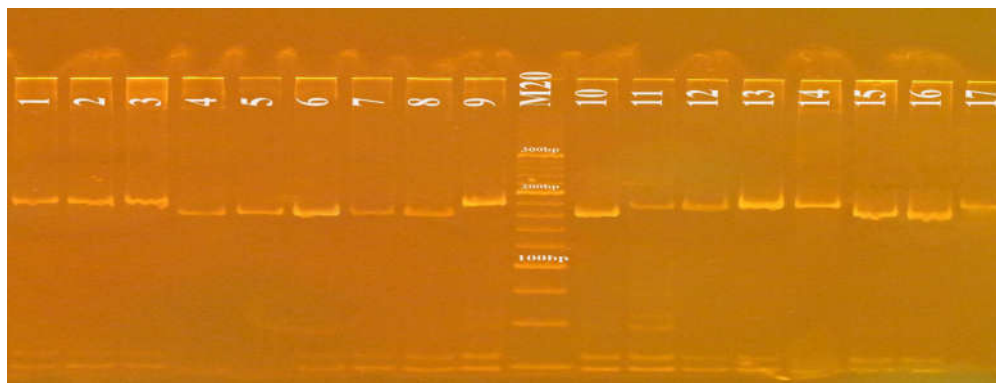


Hình 1. Ảnh đóng hàng, đóng cột so sánh trình tự một đoạn gen kháng đạo ôn của một số giống lúa bản địa

Trong nghiên cứu này nhờ có sự khác biệt của gen *Pit* giữa các giống lúa đã giải trình tự mà đã phát triển được marker SSLP dựa vào sự thêm/bớt ADN của các alen *Pit* với marker thiết kế có tên *Ins_Pit_17* (*Ins_Pit_17F*: TCTTAACGACTGCCCAAACACT/*Ins_Pit_17R*: AGATTA CAGAGATTGGAATTCTC). Theo tính toán thiết kế và so sánh với gen tham chiếu của thế giới đã công bố, cặp mỗi *Ins_Pit_17* sẽ nhân lên bằng kích thước 180 bp (ở các giống mang candidate gen *Pit* giống với trình tự thế giới công bố) và bằng 163 bp (ở các giống mang candidate gen *Pit* khác với trình tự gen *Pit* thế giới công bố).

Sử dụng cặp mỗi thiết kế *Ins_Pit_17* để kiểm tra

sự đa hình của locus gen kháng *Pit* với 17 giống lúa trong tập đoàn lúa bản địa (Hình 2). Kết quả thu nhận được thông qua các số liệu và hình ảnh cho thấy 9/17 giống lúa bản địa đã giải mã có sự xuất hiện của băng kích thước 180 bp, đây là 9 giống có đoạn chèn thêm 17 nu và chiều dài gần tương đương như gen tham chiếu. Tám giống còn lại xuất hiện băng với kích thước 163 bp, là các giống không có đoạn chèn thêm 17 nucleotide. Như vậy, cặp mỗi này có thể xác định được sự đa hình của candidate gen *Pit* và có thể sử dụng để xác định sự có mặt của các candidate gen này ở bố, mẹ và các thế hệ con lai phục vụ cho công tác chọn tạo giống lúa có khả năng kháng đạo ôn.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR đối với cặp mồi Ins_Pit_17 nhận biết candidate gen *Pit* ở các giống lúa bản địa của Việt Nam (thứ tự các mẫu theo bảng 1)

IV. KẾT LUẬN

Đã tầm soát, xác định được candidate gen *Pit* trong 17 giống lúa đã giải mã, thu nhận được 9 đoạn trình tự tương đồng có độ dài ít hơn 3 nucleotide và được 8 đoạn trình tự tương đồng có độ dài ít hơn 20 nucleotide so với gen tham chiếu đã công bố.

Đã thiết kế được cặp mồi Ins_Pit_17 để nhận dạng candidate gen *Pit* có trong 17 giống lúa bản địa của Việt Nam phục vụ cho công tác chọn tạo giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Costanzo, S. and Y. Jia**, 2009. Alternatively spliced transcripts of *Pi-ta* blast resistance gene in *Oryza sativa*. *Plant Sci.*, 177 (5): 468-478.
- Devanna, N.B., Vijayan J. and Sharma T.R.**, 2014. The blast resistance gene *Pi54of* cloned from *Oryza officinalis* interacts with *Avr-Pi54* through its novel non-LRR domains. *PLoS One* 9:e104840.
- Geng X.S., Yang M.Z., Huang X.Q., Cheng Z.Q., Fu J., Sun T. and Li J.**, 2008. Cloning and analyzing of rice blast resistance gene *Pi-ta+* allele from Jinghong erect type of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Yunnan. *Yi Chuan* 30, 109-114. doi: 10.3724/SPJ.1005.2008.00109.
- Hayashi K. and H. Yoshida**, 2009. Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as a promoter. *Plant J.*, 57 (3): 413-425.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen and I. Ashikawa**, 2004. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 1212-1220. doi: 10.1007/s00122-003-1553-0.
- Huang, C.L., S.Y. Hwang, Y.C. Chiang and T.P. Lin**, 2008. Molecular evolution of the *Pi-ta* gene resistant to rice blast in wild rice (*Oryza rufipogon*). *Genetics*, 179, 1527-1538. doi: 10.1534/genetics.108.089805.
- Jia, Y., G. Liu, S. Costanzo, S. Lee and Y. Dai**, 2009. Current progress on genetic interactions of rice with rice blast and sheath blight fungi. *Front. Agric. China* 3 (3): 231-239. doi: 10.1007/s11703-009-0062-6.
- Kiyosawa, S.**, 1972. The inheritance of blast resistance transferred from some *indica* varieties in rice. *Bull. Nat. Inst. Agric. Sci.*, D23:69-96.
- Obara-Okeyo, P. and S. Kako**, 1998. Genetic diversity and identification of Cymbidium cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 99 (2): 95-101
- Sharma T.R., A.K. Rai, S.K. Gupta, J. Vijayan, B.N. Devanna and S. Ray**, 2012. Rice blast management through host-plant resistance: retrospect and prospects. *Agric. Res.*, 1 (1): 37-52.
- Singh P.K., S. Thakur, R. Rathour, M. Variar, S.K. Prashanthi, A.K. Singh, U.D. Singh, V. Sharma, N.K. Singh and T.R. Sharma**, 2014. Transposon-based high sequence diversity in *Avr-Pita* alleles increases the potential for pathogenicity of Magnaporthe oryzae populations. *Funct. Integr. Genom.*, 14 (2): 419-429.
- Vasudevan K., W. Gruissem and N.K. Bhullar**, 2015. Identification of novel alleles of the rice blast resistance gene *Pi54*. *Sci. Rep.* 5:15678.
- Wang, X., Lee, S., Wang, J., Ma, J., Bianco, T., Jia, Y.**, 2013. Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease. In: *Rice - Germplasm, Gene and Improvement*, pages 195-217.
- Wu, Y.Y., He, J.B., Li, A.H., Fang, N.Y., He, W.W., Dang, L.L., Zeng, G.Y., Huang, J., Bao Y.M. and Zhang, H.S.**, 2016. Population structure analysis and association mapping of blast resistance in indicarice (*Oryza sativa* L.) landraces. *Genet. Mol. Res.* Online publication. doi:10.4238/gmr.15038254.
- Xiao N., Y. Wu, C. Pan, L. Yu, Y. Chen, Y. Li, Z. Dai, C. Liang and A. Li**, 2016. Improving of rice blast resistances in japonica by pyramiding major R genes. *Front Plant Sci*, 7:1918.

Predicting, identifying and designing functional marker to identify blast resistance candidate gene (*Pit*) in Vietnamese rice varieties

Nguyen Truong Khoa, Nguyen Thuy Diep, Nguyen Thai Duong,
Nguyen Nhu Toan, Phuong Huu Pha, Dang Thi Thanh Ha,
Kieu Thi Dung, Tran Thi Thuy, Tran Dang Khanh, Khuat Huu Trung

Abstract

The rice blast resistance gene *Pit*, which was identified in an Indonesian indica rice variety, Tjahaja, confers broad-spectrum resistance (Kiyosawa, 1972). *Pit* gene was isolated and revealed that *Pit* belongs to the CC-NBS-LRR family of resistance genes (Hayashi and Yoshida, 2009). DNA markers that allow for identification of resistance genes in rice germplasm have a great advantage in resistance breeding because they can assess the existence of the genes without laborious inoculation tests. Functional markers, which are designed from functional polymorphisms within the sequence of genes, are unaffected by nonfunctional allelic variation and make it possible to identify an individual gene. In this study, based on the genome sequence databases of 17 Vietnamese rice varieties, we have predicted and identified the candidate gene *Pit* that involved in blast resistance ability of 17 local rice varieties. In which, 9 homologous sequences had total nucleotides of less than 3 nucleotides and 8 homologous sequences had total nucleotides of less than 20 nucleotides compared to the reference gene LOC_Os01g05620. Simultaneously, we developed Ins_ *Pit*_17 marker derived from InDels segments of candidate gene *Pit* in local rice varieties. These results indicate that our functional marker should enhance prediction of *Pit* function and be applicable in rice breeding programs.

Keywords: Candidate gene, *Pit*, blast resistance, rice, marker

Ngày nhận bài: 18/9/2018

Ngày phản biện: 23/9/2018

Người phản biện: TS. Phạm Thiên Thành

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

THIẾT LẬP PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU LÚA THEO TIÊU CHUẨN ISO/IEC 17025: 2017 PHỤC VỤ THỬ NGHIỆM XÁC ĐỊNH LOCUS GEN

Chu Đức Hà¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Nguyễn Thị Nhài¹,
Nguyễn Bá Ngọc¹, Khuất Thị Mai Lương¹, Phạm Thị Lý Thu¹, Lê Hùng Lĩnh¹

TÓM TẮT

Tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) là một trong những thước đo quan trọng chứng nhận cho phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn quốc tế. Trong nghiên cứu này, các phương pháp lấy mẫu lúa phục vụ thử nghiệm xác định locus gen mục tiêu đã được thiết lập. Cụ thể, hai phương pháp lấy mẫu thử nghiệm ngoài đồng ruộng và trong phòng thí nghiệm đã được xây dựng thành công. Trong đó, các bước thu, bảo quản mẫu lá lúa trên đồng ruộng và tiếp nhận, bảo quản, chuẩn bị mẫu thử nghiệm từ lô mẫu hạt giống nhận tại phòng thử nghiệm cũng đã được chú ý. Kết quả của nghiên cứu này có ý nghĩa trong đưa ra quy trình lấy mẫu theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017, từ đó thành lập và vận hành phòng sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

Từ khóa: ISO, lúa, thử nghiệm, quy trình, lấy mẫu

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) là tiêu chuẩn về hệ thống quản lý chất lượng, được áp dụng đặc thù cho các lĩnh vực thử nghiệm và hiệu chuẩn do Tổ chức Quốc tế về Tiêu chuẩn hóa thiết lập và ban hành (Honsa and McIntyre, 2003). Được thiết kế nhằm hợp nhất với tiêu chuẩn về hệ thống quản lý chất lượng ISO 9001, tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 đưa ra một cách

nghiêm ngặt các quy định để đảm bảo năng lực kỹ thuật, mang lại kết quả đo lường/thử nghiệm đạt độ tin cậy cao và được quốc tế thừa nhận (Yamamoto *et al.*, 2010). Vì vậy, đạt chuẩn ISO/IEC 17025 được xem là một tiêu chuẩn “cứng” để đánh giá khả năng hoạt động của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn kiểu mẫu.

Hiện nay, nhu cầu xác định sự có mặt của một số locus gen mục tiêu trong các giống lúa (*Oryza sativa*) được xem là quan tâm hàng đầu trong các

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, VAAS