

Hình 7: Ảnh điện di sản phẩm PCR với mồi Bph14add27 đối với các con lai BC2F1 (OM5629 × BC15); Thang marker 20bp; U20: OM5629; M13: BC15, 2137-2156; Con lai của cá thể BC2F1 3009; 2157-2169; Con lai của cá thể BC2F1 3020

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

- Đã tầm soát, xác định được 3 candidate gen *Bph14* của 3 giống (Lúa ngoi, Tẻ nương và OM5629) có số lượng Nucleotid và số lượng amino acid bằng với số lượng Nucleotid và số lượng amino acid của gen kháng rầy nâu LOC_Os03g63150 đã công bố trên thế giới. Trong đó, candidate gen *Bph14* ở giống Lúa ngoi có số lượng và thành phần Nucleotid và amino acid giống hệt gen kháng rầy nâu LOC_Os03g63150.

- Đã thiết kế được cặp mồi Bph14add27 đặc hiệu để nhận biết candidate gen kháng rầy nâu thuộc locus *Bph14* ở một số giống lúa địa phương của Việt Nam. Kết quả lai tạo đã thu được 21 con lai BC2F1 của cặp lai Lúa ngoi × Bắc thom số 7 và 15 con lai BC2F1 của cặp lai OM5629 × BC15 mang các candidate gen *Bph14* ở trạng thái dị hợp.

2. Đề nghị

Tiếp tục sử dụng các con lai BC2F1 cho các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá khả năng kháng rầy nâu của các candidate gen *Bph14* có trong các giống lúa địa phương của Việt Nam và ứng dụng trong chọn tạo giống

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Lan, Phạm Tiến Dũng, 2005. *Giáo trình phương pháp thí nghiệm*, NXB Nông nghiệp 2005.
2. Phạm Văn Lâm (2000). *Rầy nâu hại lúa và biện pháp phòng trừ*. NXB Nông nghiệp Hà Nội.
3. Du B., Zhang W., Liu B., Hu J., Wei Z., Shi Z., et al. (2009). Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc Natl Acad Sci*.106, pp. 22163-8
4. Gallagher K.D., Kenmore P.E. and Sogawa K. (1994). *Judicial use of insecticides deter planthopper outbreaks and extend the life of resistant varieties in Sounthest Asian rice*. In R. F. Demo and J. T. Perfect (eds.). *Planthopper: Their ecology and Management*. Chapman & Hall, New York, pp. 599-614.
5. Huang Z., He G., Shu L., Li X., Zhang Q. (2001). Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice *Theor Appl Genet* 102, pp.929-934.
6. Yamazaki Y., Sakaniwa S., Tsuchiya R., Nonomura K.I., Kurata N. (2010) *Oryza* base: An integrated information resource for rice science. *Breed Sci*. 60, pp. 544-548.

Ngày nhận bài: 11/9/2015

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày phản biện: 12/10/2015

Ngày duyệt đăng: 16/10/2015

THIẾT KẾ MARKER CHỨC NĂNG NHẪM XÁC ĐỊNH CANDIDATE GEN KHÁNG BẠC LÁ (*xa13*) Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA ĐỊA PHƯƠNG CỦA VIỆT NAM

Nguyễn Thúy Diệp¹, Nguyễn Trường Khoa¹,
Khuất Hữu Trung¹

Design of functional markers to determine bacterial blight resistance genes in Vietnamese local rice varieties

Abstract

Bacterial blight is one of the most serious threats to many rice production regions, including Vietnam. In this study, based on the sequence data of 36 local rice varieties, candidate gene *xa13* was identified in eight Vietnamese local rice varieties. The nucleotide numbers of Coding DNA Sequence of this candidate gene were similar with the published sequences in Genbank. Especially, Hom rau and Chan Thom varieties have nucleotide and amino acid ingredient similar with the published *xa13* LOC Os08g42350 gene. *Xa13add4* marker was designed to determine *xa13* candidate genes in 36 sequenced rice varieties. The *xa13add4R/xa13add4F*

primer pair was used to amplify the estimate 97bp DNA fragment which was similar with the published resistant rice varieties and 94bp in others. This result was very important and basis for the application of molecular markers in bacterial blight resistant rice breeding program.

Key words: Bacterial blight, marker design, xa13, local rice variety

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzaepv.oryzae* (Xoo) đã và đang gây thiệt hại lớn đến năng suất của nhiều vùng trồng lúa trên khắp thế giới. Đặc biệt là ở các nước châu Á, bệnh bạc lá lúa rất phổ biến và nghiêm trọng, có thể gây thiệt hại tới trên 50% năng suất lúa (David và cs., 2006; Mueen và cs., 2014; Ali và cs., 2014). Chính vì vậy, việc chọn tạo ra các giống lúa có khả năng kháng bạc lá là rất cần thiết, nhằm hạn chế tới mức thấp nhất việc giảm năng suất, đáp ứng nhu cầu về lúa gạo của thế giới (Latif và cs., 2011).

Để nhanh chóng tạo ra các giống lúa kháng bạc lá, hướng nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật marker phân tử trong chọn tạo giống lúa đang được sử dụng rộng rãi do có thể rút ngắn thời gian chọn tạo, việc chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử hiệu quả hơn và đáng tin cậy hơn chọn lọc kiểu hình (Liu và cs., 2003; Pei và cs., 2011; Miah và cs., 2013).

Một trong các phương pháp hiện đại hiện nay đó là giải mã toàn bộ hệ gen, so sánh, đánh giá sự giống nhau (tương đồng) của chuỗi ADN và

protein, từ đó có thể đưa ra dự đoán về chức năng cũng như cấu trúc của những gen mới phát hiện (Sequence Alignment) ứng dụng trong nghiên cứu chọn tạo giống (Thompson và cs., 2007, Mueen và cs., 2015).

Tiếp cận theo định hướng nghiên cứu mới này, dựa trên trình tự 36 giống lúa bản địa của Việt Nam đã được giải mã, chúng tôi tiến hành tầm soát, thiết kế các marker chức năng (functional marker) để xác định chính xác các candidiate gen kháng bạc lá có trong các giống lúa bản địa của Việt Nam phục vụ công tác nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn vật liệu nghiên cứu là trình tự hệ gen của 36 giống lúa bản địa của Việt Nam đã được giải mã (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách 36 giống lúa bản địa đã giải mã

TT	Tên giống	TT	Tên giống
1	Tám xoan Bắc Ninh	19	Coi ba đất
2	Tám xoan Hải Hậu	20	OM5629
3	Tẻ Nương	21	Nếp bồ hóng Hải Dương
4	Nàng thơm chợ đào	22	Tan ngân
5	Thơm Lài	23	Ba cho K'te
6	Nếp mặn	24	Blào sinh sái
7	Chiêm đỏ	25	Nàng quớt biển
8	Lúa Ngoi	26	Tép Thái Bình
9	Một bụi đỏ	27	Khẩu điển lư
10	Nàng cờ đỏ 2	28	Nếp mèo nương
11	Ble te lo	29	Tóc lùn
12	Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2	30	Hom râu
13	Nếp lùn	31	Nếp ông táo
14	Khẩu mặc buộc	32	OM3536
15	OM6377	33	Khẩu Liên
16	Chấn thơm	34	Lúa gốc đỏ
17	Xương gà	35	Chiêm đá
18	Khẩu giáng	36	IS1.2

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp tầm soát, phân tích thành phần nucleotide: sử dụng phần mềm NextGENe_V2.3 để dò tìm các SNPs/InDel cùng với sự hỗ trợ của phần mềm xây dựng cây phả hệ và so sánh trình tự các nucleotide MEGA6.0 cho hệ điều hành Windows.

- Phương pháp thiết kế môi đặc hiệu: dựa trên sự sai khác trình tự của các giống lúa đã được giải mã, sử dụng các phần mềm Primer 3.0 để thiết kế các trình tự môi..

- Phương pháp kiểm tra candidate gen kháng:

+ Mẫu lá của từng giống được thu thập và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của Obara và Kako (1998) có cải tiến.

+ Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96 well Thermal cyclers. Tổng thể tích phản ứng là 15 μ l, bao gồm: 5 μ l ADN; 0,15 μ M môi; 0,2 mM dNTPs; 1X Buffer PCR; 2,5mM MgCl₂ và 0,25 đơn vị Taq polymerase.

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

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả tầm soát, phân tích thành phần nucleotide vùng CDS (Coding DNA Sequence) và thành phần amino acid của candidate gen *xa13*

Kết quả tầm soát trình tự vùng CDS (Coding DNA Sequence) và thành phần amino acid của candidate gen *xa13* và so sánh với locus gen kháng bạc lá *xa13* với mã hiệu là LOC_Os08g42350 (*Xanthomonas oryzae* PV. *Oryzae* Resistance 13) (Rice Genome Annotation Project release 5.6; http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/ORF_infopage.cgi?orf=LOC_Os08g42350) đã thu nhận được 8 giống có số lượng nucleotide vùng CDS đúng bằng với số lượng nucleotide của gen kháng bạc lá *xa13* LOC Os08g42350 đã công bố (924 nucleotide) (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả tầm soát và thống kê nucleotide vùng CDS (Coding DNA Sequence) gen/candidate gen *xa13*

TT	Tên giống lúa và gen tham chiếu	Nucleotide vùng CDS (%)				Nucleotide vùng CDS
		T(U)	C	A	G	
1	LOC Os08g42350	20,0	37,2	14,9	27,8	924
2	Xương gà	20,1	37,1	14,9	27,8	924
3	Nếp bồ hồng Hải Dương	20,1	37,1	14,9	27,8	924
4	Nàng quýt biển	20,1	37,1	14,9	27,8	924
5	Chiêm đỏ	20,1	37,1	14,9	27,8	924
6	Một bụi đỏ	20,1	37,1	14,9	27,8	924
7	Chấn thơm	20,0	37,2	14,9	27,8	924
8	OM5629	20,1	37,1	14,9	27,8	924
9	Hom râu	20,0	37,2	14,9	27,8	924

Kết quả phân tích thành phần amino acid cho thấy: các vùng CDS của 8 giống đều đúng mã và mã hóa các amino acid, số lượng amino acid đúng bằng với số lượng amino acid của gen kháng bạc lá *xa13* LOC Os08g42350 đã công bố (307 amino acid).

Đặc biệt, trong số 8 giống trên thì có 2 giống là Chấn thơm và Hom râu có thành phần nucleotide và thành phần amino acid giống hệt với gen kháng bạc lá *xa13* LOC Os08g42350 đã công bố (Bảng 2, 3).

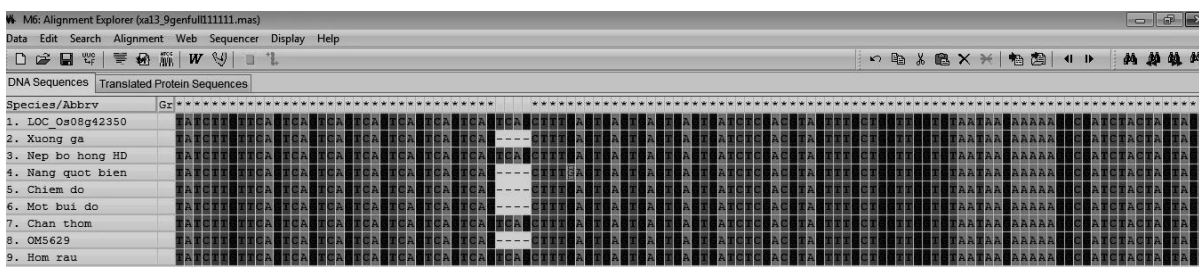
Bảng 3. Thống kê tỉ lệ (%) amino acid của gen/candidate gen xa13

Gen xa13/giống	LOC Os08g 42350	Xương gà	Nếp bỏ hồng HD	Nàng quýt biến	Chiêm đỏ	Một bụi đỏ	Chấn thơm	OM 5629	Hom râu
Ala	13,68	13,68	13,68	13,68	13,68	13,68	13,68	13,68	13,68
Cys	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63
Asp	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63
Glu	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61
Phe	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17
Gly	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54
His	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Ile	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54	5,54
Lys	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56
Leu	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07
Met	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28
Asn	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28	2,28
Pro	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86
Gln	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
Arg	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61	2,61
Ser	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17
Thr	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86
Val	12,38	12,38	12,38	12,38	12,38	12,38	12,38	12,38	12,38
Trp	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Tyr	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23

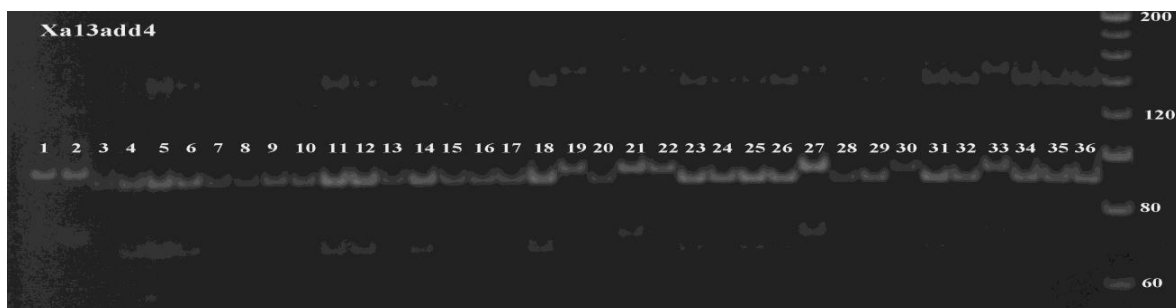
2. Thiết kế marker xác định candidate gen kháng bạc lá xa13

Kết quả tầm soát và so sánh trình tự locus *xa13* các 36 giống lúa bản địa đã được giải mã với gen kháng bạc lá LOC_Os08g42350 bằng các phần mềm chuyên dụng cho thấy: xuất hiện các đa hình đơn nucleotit (SNP) và các đoạn thêm, bớt (InDels) giữa các giống với gen kháng bạc lá LOC_Os08g42350 và giữa các giống với nhau. Dựa vào sự sai khác ở đoạn trình tự nằm trong gen (mắt

4 nucleotit) đã được tìm thấy ở một số giống lúa bản địa của Việt Nam so với trình tự gen *xa13* đã công bố (Hình 1), sử dụng phần mềm thiết kế mỗi Primer 3,0 chúng tôi đã thiết kế được cặp mỗi chức năng (functional marker) đặt tên là *xa13_add4* có trình tự: *xa13add4R*: cattagcagctagtaacttac và *xa13add4F*: tcactcactcactcaaa có thể khuếch đại đoạn gen với kích thước khác nhau ở các giống khác nhau.



Hình 1. Ảnh dòng hàng, dòng cột so sánh trình tự một đoạn gen kháng bạc lá xa13 của một số giống lúa bản địa (đoạn mắt 4 nucleotide)



Hình 2. Kết quả kiểm tra PCR đối với mỗi xa13add4F/xa13add4R nhận biết gen xa13 ở các giống lúa bản địa của Việt Nam

Theo tính toán thiết kế và so sánh với gen tham chiếu của thể giới đã công bố, cặp mồi xa13_add4 sẽ nhân lên băng kích thước 97 bp (ở các giống mang candidate gen *xa13* giống với trình tự thể giới công bố) và băng 94bp (ở các giống mang candidate gen *xa13* khác với trình tự gen *xa13* thể giới công bố).

Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi xa13_add4 của cả 36 giống lúa nghiên cứu cho thấy có 8 giống lúa: Tám xoan Bắc Ninh, Tám xoan Hải Hậu, Coi ba đất, Nếp bồ hóng Hải Dương, Tan ngàn, Khẩu điền lư, Hom râu, Khẩu liên có sự xuất hiện của băng kích thước 97bp ở trạng thái đồng hợp, các giống còn lại xuất hiện băng có kích thước là 93bp đúng với các tính toán ban đầu. Trong đó, 2 giống là Hom râu và Nếp bồ hóng Hải Dương xuất hiện băng kích thước 97bp giống với gen kháng bạc lá *xa13 LOC Os08g42350* đã công bố. Sáu 6 giống (Xương gà, Nàng quýt biển, Chiêm đỏ, Một bụi đỏ, Chấn thơm, OM5629) có số lượng nucleotide vùng CDS tương đồng với gen kháng bạc lá *xa13 LOC Os08g42350* đã công bố nhưng khi kiểm tra bằng cặp mồi xa13_add4-R/xa13_add4-F thì không có sự xuất hiện của băng kích thước 97bp, điều này có thể giải thích là do sự sai khác ở vùng không dịch mã (non-coding region). Ngược lại, một số giống mặc dù không có đủ số nucleotide vùng CDS so với gen kháng bạc lá *xa13 LOC Os08g42350* (924 Nucleotide) nhưng lại có đoạn trình tự 97bp tương ứng bổ sung với cặp mồi xa13_add4-R/xa13_add4-F đã thiết kế.

Như vậy, cặp mồi này có thể xác định được sự đa hình của candidate gen *xa13* và có thể sử dụng để xác định sự có mặt của các candidate gen *xa13* ở các thể hệ bố, mẹ và con lai phục vụ công tác nghiên cứu đánh giá khả năng kháng bạc lá của các candidate gen *xa13* có trong các giống lúa bản địa

của Việt Nam và phục vụ cho công tác chọn tạo giống lúa kháng bạc lá.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

- Đã tầm soát, xác định được candidate gen *xa13* của 8 giống lúa (Xương gà, Nếp bồ hóng Hải Dương, Nàng quýt biển, Chiêm đỏ, Một bụi đỏ, Chấn thơm, OM5629 và Hom râu) có có số lượng nucleotide vùng dịch mã (CDS-Coding DNA Sequence) và số lượng amino acid đúng bằng với số lượng nucleotide và amino acid của gen kháng bạc lá *xa13 LOC Os08g42350* đã công bố (924 nucleotide dịch mã 307 amino acid). Trong đó, có 2 giống là Chấn thơm và Hom râu có thành phần nucleotide và thành phần amino acid giống hệt với gen kháng bạc lá *xa13 LOC Os08g42350* đã công bố.

- Đã thiết kế được cặp mồi chức năng nhận biết được candidate gen *xa13* ở một số giống bản địa của Việt Nam phục vụ cho công tác nghiên cứu đánh giá gen kháng và lai tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá.

2. Đề nghị

Tiếp tục sử dụng các cặp mồi chức năng đã thiết kế để nghiên cứu chuyên các candidate gen *xa13* có trong các giống lúa địa phương của Việt Nam vào các giống nền ưu tú nhằm đánh giá khả năng kháng bạc lá của các candidate gen *xa13* và ứng dụng trong chọn tạo giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ali S., Baratali F., Noroozi M. and Moazami K.G. (2014). Leaf blight resistance in rice: a review of breeding and biotechnology. *IJFAS Journal* 3-8, p. 895-902.
2. David O. N., Pamela C.R., Adam J.B. (2006). *Xanthomonas oryzaepathovars*: model pathogens of

- a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7(5), p. 303-324.
- Latif M.A., Badsha M.A., Tajul M.I., Kabir M.S., Rafii M.Y., Mia M.A.T. (2011). Identification of genotypes resistant to blast, bacterial leaf blight, sheath blight and tungro and efficacy of seed treating fungicides against blast disease of rice. *Sci Res Essays* 6 (13), p. 2804-2811.
 - Liu S.P., Li X., Wang C.Y., Li X.H., He Y.Q. (2003). Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan 97 by molecular marker-aided selection. *Acta Bot Sin* 45, p.1346-1350.
 - Miah G., Rafii M.Y., Ismail M. R., Puteh A.B., Rahim H.A., Asfaliza R., Latif M.A. (2013). Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. *Mol Biol Rep* (2013) 40, p. 2369-2388.
 - Mueen A. K, Muhammad N. and Muhammad I. (2014). Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), current status and future directions. *Eur J Plant Pathol* (2014) 139, p. 27-37.
 - Mueen A.K. (2015). Molecular breeding of rice for improved disease, resistance a review. *DOI 10.1007/s13313-015-0354-7*.
 - Obara O.P. and Kako S. (1998). Genetic diversity and identification of cymbidium cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 99, p. 95-1001.
 - Pei Q.L., Wang C.L., Liu P.Q., Wang J., and Zhao K.J. (2011). Marker-assisted selection for pyramiding disease and insect resistance genes in rice, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 25(2), p. 119-129.
 - Thompson S.M. (2007). *Multiple Sequence Alignment & Analysis*. Florida State University School of Computational Science and Information Technology (CSIT).
 - http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm
 - <http://www.softgenetics.com/NextGENe.html>
 - <http://www.megasoftware.net/mega.php>
 - http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/ORF_infopage.cgi?orf=LOC_Os08g42350
- Ngày nhận bài: 11/9/2015
Người phân biện: TS. Phạm Xuân Hội
Ngày phân biện: 9/10/2015
Ngày duyệt đăng: 16/10/2015

KẾT QUẢ KHẢO NGHIỆM GIỐNG LÚA KHANG DÂN 18-SUB1 CHỊU NGẬP TẠI MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC

Đào Văn Khởi², Lê Huy Hàm¹, Lê Hùng Lĩnh¹

Results of testing the submerged rice variety Khang Dan 18-Sub1 in Northern Vietnam

Abstract

Vietnam is one of the most vulnerable countries affected by submergence stress in Asia. Submergence caused by typhoons and floods is one of the major reasons for rice production losses in this country. Improving rice tolerance with submergence is vital to minimize the risks from submergence stress. Using marker-assisted backcrossing (MABC) method to successfully transferred positive alleles of *Sub1* from PSB-Rc68 into Khang Dan18. In this study, we reported a result of testing SHPT2 (Khang dan 18-Sub1) for agronomic, yield component traits at several provinces. SHPT2 has some good characters such as: short duration (less than 110 days), high yield (6,3 tons/ha in spring season). This variety also expressed resistance to some major pests and diseases in the field, such as brown plant hopper, blast, sheath blight, steam borer, and bacterial blight. Especially, results obtained from the experiments conducted in 2014 showed that SHPT2 could become a new rice variety with submergence tolerance, and replace original Khang Dan 18 variety.

Key words: Rice, Khang Dan 18, Marker-assisted backcrossing, submergence tolerance.

1. Viện Di truyền Nông nghiệp

2. Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống, sản phẩm cây trồng và phân bón Quốc gia

I. ĐẶT VẤN ĐỀ