THIẾT KẾ MỒI NHẬN BIẾT GEN ỨNG VIÊN (CANDIDATE GENE) KHÁNG ĐẠO ÔN *Pik-p* Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA ĐỊA PHƯƠNG CỦA VIỆT NAM VÀ ỨNG DỤNG TRONG LAI TẠO GIỐNG

Trần Thị Thúy[1], Nguyễn Thúy Điệp[1], Nguyễn Trường Khoa[1],
Nguyễn Thị Phương Đoài[1], Kiều Thị Dung[1], Nguyễn Thị Ly[1],
Nguyễn Thị Trang[1], Nguyễn Thái Dương[1],
Trần Đăng Khánh[1], Khuất Hữu Trung[1]

TÓM TẮT

Bệnh đạo ôn gây ra bởi nấm *Magnaporthe oryzae* gây thiệt hại đến năng suất của nhiều giống lúa ở Việt Nam và trên thế giới. Chiến lược phát triển giống lúa kháng đạo ôn là rất cần thiết trong công tác bảo vệ cây trồng. Trong nghiên cứu này, đã tầm soát trình tự gen *Pik*-p của 36 giống lúa địa phương và xác định được giống OM5629 có trình tự, thành phần nucleotide, amino acid ở vùng CDS (Coding DNA Sequence) tương tự như gen tham chiếu đã công bố. Cặp mồi Pikpdel16 đã được thiết kế có thể khuếch đại đoạn gen với kích thước 174 bp (ở các giống có gen ứng viên *Pikp*) và 190 bp (ở các giống có trình tự sai khác với trình tự gen *Pikp* đã công bố). Kiểm tra 36 giống địa phương với mồi Pikpdel16 cho thấy giống OM5629 mang gen *Pik-p* ở trạng thái đồng hợp. Sử dụng phương pháp lai hồi giao, nghiên cứu đã tiến hành tích hợp gen ứng viên *Pik-p* vào giống BC15-giống có năng suất cao nhưng nhiễm đạo ôn và sử dụng giống OM5629 là thể cho gen. Kết quả chọn lọc được 3 cá thể BC_3F_2 (U6-7, U6-27, U6-31) mang gen *Pik-p* ở trạng thái đồng hợp, có cùng nền di truyền của giống lúa BC15. Kết quả trong nghiên cứu này rất có ý nghĩa trong công tác chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn

Từ khóa: Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử, gen *Pik-p,* gen ứng viên, gen kháng đạo ôn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra, làm thiệt hại năng suất của nhiều giống lúa ở Việt Nam và trên thế giới. Cho đến nay, đã có hơn 100 gen kháng bệnh đạo ôn được xác định có trong các giống lúa (Sharma *et al.*, 2012). 20 gen kháng chính và hai gen kháng một phần *(pi21* và *Pb1)* đã được tách dòng và lập bản đồ (Hayashi *et al.*, 2010). Gen *Pik-p* là 1 trong 6 alen ở locus *Pik* định vị trên nhiễm sắc thể số 11 và có phổ kháng rộng. Gen *Pik-p* đã được xác định là kháng ổn định với chủng *M. oryzae* phân lập từ Nhật Bản và Trung Quốc (Li *et al.*, 2007).

Hiện nay, việc tích hợp các gen kháng vào các giống lúa đã và đang là phương pháp hiệu quả cả về chi phí và lợi ích với môi trường, với mục đích tạo nền nông nghiệp bền vững, đảm bảo an ninh, lương thực thế giới. Từ các gen đã phân lập được, các nhà nghiên cứu đã tạo ra các dòng đẳng gen (NILs) và sử dụng là những nguồn cho gen trong các chương trình chọn giống (Mary Jeanie *et al.* 2010). Tuy nhiên, tính kháng bệnh đạo ôn của các dòng/giống lúa phụ thuộc vào nền di truyền và từng chủng gây bệnh ở từng vùng sinh thái. Chính vì vậy, việc khai thác, tìm kiếm các gen kháng ở các giống lúa bản địa và sử dụng là nguồn cho gen trong các chương trình chọn giống đang được các nhà khoa học hướng đến. Gần đây, dự án giải trình tự genome gắn liền với các đơn hình nucleotide (SNPs) và các đoạn thêm/bớt (InDels) ở hệ gen lúa đã được nghiên cứu (Yu *et al.*, 2005). Hệ thống các marker SNP và InDel để xác định các gen *Pik-p*, *Pik*, *Pik-m*, *Pita* và *Pib* đã được phát triển và sử dụng trong chương trình chọn tạo giống đạo ôn (Hayashi *et al.*, 2006).

Dựa vào trình tự genome của 36 giống lúa địa phương đã giải mã của Việt Nam, chúng tôi cũng đã tiến hành tầm soát và thiết kế mồi SSLP dựa vào các đoạn thêm/bớt và ứng dụng trong chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Cơ sở dữ liệu của 36 giống lúa bản địa của Việt Nam (www.riceagi.org.vn).

- Giống lúa BC15 dùng làm thể nhận. Dòng kháng chuẩn gen kháng *Pik-p:* IRBLkp-K60, được sử dụng làm đối chứng dương. Giống Lijiangxintuanheigu (LTH) là giống chuẩn nhiễm, được sử dụng làm đối chứng âm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp thiết kế mồi đặc hiệu dựa trên trình tự genomes: Trình tự các nucleotide được so sánh và phân tích sử dụng phần mềm ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/); Cặp mồi đặc hiệu được thiết kế bằng phần mềm Primer 3,0 (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm).

[1] Viện Di truyền Nông nghiệp

- Sử dụng phương pháp lai hồi giao (backcross) và phương pháp chọn lọc cá thể (pedigree) để chọn lọc dòng mang gen ứng viên *Pik-p*. Bố trí thí nghiệm đồng ruộng như chọn dòng, so sánh dòng… theo phương pháp của Nguyễn Thị Lan (2005). Các chỉ tiêu theo dõi trên đồng ruộng được đánh giá theo tiêu chuẩn đánh giá nguồn gen cây lúa của IRRI (2002).

- Phương pháp kiểm tra gen ứng viên:

+ Mẫu lá được thu thập và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của Doyle JJ at el., (1990) 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; 0,15 µM mồi; 0,2 mM dNTPs; 1X Buffer PCR; 2,5 mM $MgCl_2$ và 0,25 đơn vị Taq polymerase.

+ Sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide 6,0%. Gel được nhuộm ethidium bromide 0,5 mg/ml và soi trên máy Alpha Imager 1220 (Alpha Innotech, CA, USA).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian thực hiện: Từ tháng 1/2014 đến tháng 12/2016

- Địa điểm nghiên cứu: Bộ môn Kỹ thuật Di truyền, Viện Di truyền Nông nghiệp

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tầm soát, phân tích thành phần nucleotide vùng CDS (Coding DNA Sequence) và thành phần amino acid của các candidate gen *Pik-p*

Locus gen kháng đạo ôn *Pikp* đã được các nhà khoa học xây dựng mô hình gen với mã hiệu là LOC_Os11g46210 (http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin=LOC_Os11g46210) với 4438 nucleotide, vùng CDS (Coding DNA Sequence) có 3135 nucleotide mã hóa 1043 amino acid.

Kết quả so sánh vùng CDS và thành phần amino acid của các candidate gen *Pik-p* thu nhận được 36 đoạn trình tự của 36 giống lúa tương đồng với gen *Pik-p* đã công bố. Kết quả thống kê cho thấy duy nhất giống OM5629 có số lượng nucleotide, tỷ lệ A, T, G, C và thành phần amino acid bằng với gen tham chiếu, 7 trình tự của 7 giống (Ba cho Kte, Ble te lo, Nếp lùn, Xương gà, Chấn thơm, Blào sinh sái và Khấu giáng) có số lượng nucleotide ít hơn 1-10 nucleotide. Các trình tự của 28 giống còn lại có sự sai khác về tỷ lệ nucleotide và số lượng nucleotide nhiều hơn từ 31-198 nucleotide (Bảng 1).

3.2. Thiết kế mồi, nhận dạng candidate gen kháng đạo ôn *Pik-p* dựa trên dữ liệu trình tự genome của các giống lúa địa phương đã được giải mã

Kết quả tầm soát và so sánh trình tự locus *Pik-p* của 36 giống lúa địa phương với gen tham chiếu 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 là khá cao. Đặc biệt có một đoạn trình tự bị khuyết 16 cặp nucleotide tương tự như đoạn gen kháng đạo ôn *Pik-p* đã công bố (Hình 1).

Dựa vào sự sai khác về trình tự đoạn gen kháng đạo ôn giữa các giống lúa, sử dụng phần mềm thiết kế mồi Primer 3.0 đã thiết kế được cặp mồi đặt tên là Pikpdel16 có trình tự: Pikp del16F: ATAGACCACTCTGTTTGTTAATGC và Pikp del16R: TCAGGTCACTCGCATGAGGA. Theo thiết kế thì cặp mồi này có thể khuếch đại đoạn gen với kích thước 174 bp (ở các giống có gen ứng viên kháng) và 190 bp (ở các giống có trình tự sai khác với trình tự gen *Pik-p* đã công bố).

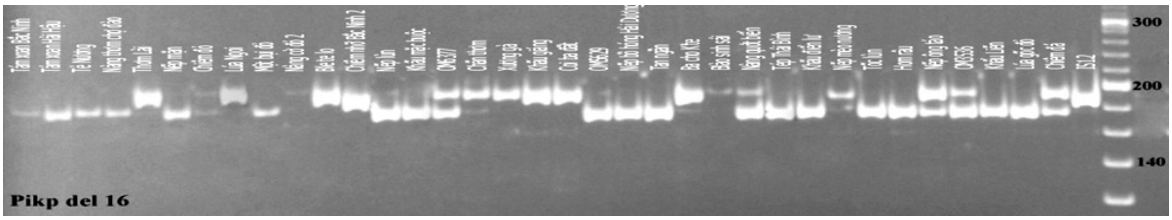
Sử dụng cặp mồi thiết kế Pikpdel16 để kiểm tra sự đa hình của locus gen kháng *Pik-p* ở 36 giống lúa đã giải mã, đã xác định được 17 giống mang gen ứng viên *Pik-p* ở trạng thái đồng hợp (Tám xoan Bắc Ninh, Tám xoan Hải Hậu, Tẻ Nương, Nàng thơm chợ đào, Nếp mặn, Một bụi đỏ, Nếp lùn, Kháu mặc buộc, OM5629, Nếp bò hóng Hải Dương, Tan Ngần, Kháu điển lư, Tốc lùn, Hom râu, Tép Thái Bình, Khẩu Liến, Lúa gốc đỏ). Các giống địa phương này có thể sử dụng làm thể cho gen để lai tạo giống lúa kháng đạo ôn mang gen ứng viên *Pik-p*.

LOC_Os11g46210-Pikp	T	T	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	G	A	C	A	A	T	T	T	A	T	T	T
Tám xoan Bắc Ninh	T	T	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	G	A	C	A	A	T	T	T	A	T	T	T
Xương gà	T	T	C	T	A	C	C	T	A	C	G	C	C	G	G	C	W	G	A	C	A	A	T	T	T	A	_	T	T
OM5629	T	T	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	G	A	C	A	A	T	T	T	A	T	T	T
Chấn thơm	T	T	C	T	A	C	C	T	A	C	G	C	C	G	G	C	W	G	A	C	A	A	T	T	T	A	_	T	T
Kháu điển lư	T	T	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	G	A	C	A	A	T	T	T	A	T	T	T
Tẻ tép	T	T	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	G	A	C	A	A	T	T	T	A	T	T	T
Khẩu giáng	T	T	C	T	A	C	C	T	A	C	G	C	C	G	G	C	W	G	A	C	A	A	T	T	T	A	_	T	T

Hình 1. Ảnh dóng hàng, dóng cột so sánh trình tự một đoạn gen kháng đạo ôn *Pik-p* của một số giống lúa địa phương

Bảng 1. Bảng thống kê số lượng và tỷ lệ nucleotide vùng CDS của gen ứng viên (candidate gene) *Pik-p* ở các giống lúa đã giải mã

TT	Tên giống lúa/ gen tham chiếu	Nucleotide (%)				Tổng số nucleotide
		T(U)	C	A	G	
1	LOC Os11g 46210(CDS)	23,6	21,7	30,0	24,7	3135
2	OM5629	23,6	21,7	30,0	24,7	3135
3	Nếp lùn	23,6	21,7	30,0	24,7	3134
4	Chấn thơm	23,6	21,7	30,0	24,6	3133
5	Xương gà	23,6	21,7	30,1	24,6	3132
6	Ba cho Kte	23,6	21,7	30,0	24,7	3132
7	Ble te lo	23,6	21,7	30,1	24,7	3131
8	Blào sinh sái	23,6	21,7	30,1	24,7	3129
9	Khấu giáng	23,6	21,7	30,1	24,7	3125
10	Tép Thái Bình	23,6	21,7	30,1	24,6	3104
11	OM6377	23,7	21,7	30,2	24,4	3096
12	Lúa Ngoi	23,8	21,6	30,2	24,4	3086
13	IS1.2	23,8	21,7	29,8	24,7	3070
14	Chiêm đá	23,7	21,8	30,0	24,6	3066
15	Nàng cờ đỏ 2	23,9	21,6	30,0	24,5	3058
16	Tốc lùn	23,8	21,7	30,3	24,1	3032
17	Thơm Lài	23,9	21,7	30,0	24,5	3018
18	Lúa gốc đỏ	23,9	21,5	30,5	24,1	3016
19	Nếp mèo nương	23,7	21,5	30,5	24,3	3015
20	OM3536	24,1	21,8	29,8	24,3	3008
21	Một bụi đỏ	23,8	21,5	30,5	24,1	3005
22	Tan Ngần	23,8	21,7	30,4	24,2	3004
23	Tám xoan Hải Hậu	24,0	21,6	30,4	24,1	3002
24	Coi ba đất	23,8	21,6	30,4	24,2	3001
25	Khấu điển lư	23,9	21,6	30,5	24,1	3000
26	Nàng quớt biển	23,9	21,5	30,5	24,1	2999
27	Hom râu	23,9	21,5	30,4	24,2	2997
28	Tẻ Nương	24,0	21,5	30,4	24,1	2997
29	Khấu mặc buộc	23,9	21,5	30,4	24,2	2997
30	Nếp bồ hóng Hải Dương	24,0	21,4	30,5	24,1	2996
31	Khẩu Liến	23,8	21,6	30,3	24,3	2993
32	Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2	24,0	21,7	29,9	24,5	2983
33	Tám xoan Bắc Ninh	24,0	21,4	30,5	24,0	2983
34	Nếp mặn	23,8	21,6	30,4	24,2	2974
35	Chiêm đỏ	24,0	21,5	30,2	24,3	2963
36	Nếp ông táo	23,9	21,5	30,5	24,2	2947
37	Nàng thơm chợ đào	24,0	21,6	30,3	24,1	2937



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR đối với cặp mồi Pikpdel16 nhận biết gen ứng viên Pik-p ở các giống lúa địa phương của Việt Nam
Giống 1-36: Các giống lúa đã giải mã; Giống 37: MarkerO'Rangeruler 20 bp

3.3. Kết quả lai tạo giống lúa mang gen ứng viên kháng đạo ôn *Pik-p*

Dựa vào sự chênh lệch thời gian sinh trưởng của các giống bố, mẹ sao cho cây bố và cây mẹ nở hoa trùng khớp và mức độ cảm quang của các giống địa phương, chúng tôi đã lựa chọn giống OM5629 trong tập đoàn 36 giống làm thể cho gen *Pik-p* và BC15 làm thể nhận gen *Pik-p*. Cặp mồi thiết kế Pikpdel16 được sử dụng để kiểm tra và chọn lọc cá thể mang gen ở các thế hệ lai hồi giao cho đến thế hệ BC_3F_2.

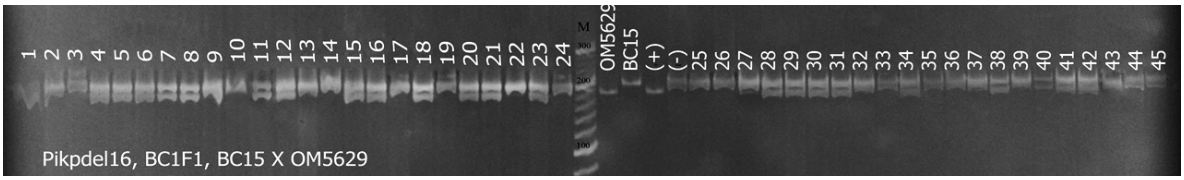
3.3.1. Kết quả xác định gen ứng viên Pik-p ở các thế hệ lai hồi giao

Vụ Xuân 2014, tiến hành phép lai BC15/OM5629 thu được hạt F1. Tổng số 20 cây F1 được trồng ở vụ mùa 2014 và sử dụng cặp mồi thiết kế Pikpdel16 kiểm tra gen ứng viên gen *Pik-p*, tất cả con lai đều mang gen *Pik-p* ở trạng thái dị hợp. Chọn 5 cây F1 lai hồi giao lần một với BC15 để tạo con lai thế hệ BC_1F_1. Kết quả kiểm tra 45 cây BC_1F_1, trong đó 22 cây mang gen *Pik-p* ở trạng thái dị hợp (xuất hiện hai băng DNA với kích thước 174 bp và 190 bp) và 23 cây không mang gen (xuất hiện một băng DNA với kích thước 190 bp) (Hình 3).

6 cây BC_1F_1 mang gen ứng viên *Pikp* dị hợp có kiểu hình ưu việt (sạch bệnh, để nhánh tốt) được chọn để lai hồi giao lần hai với giống BC15 ở vụ Xuân 2015, tạo con lai BC_2F_1. Kết quả xác định được 6/13 cây BC_2F_1 mang gen *Pik-p* ở trạng thái dị hợp (Hình 4). Dựa vào kiểu hình, chọn lọc 3 cây BC_2F_1 mang gen *Pik-p* dị hợp để tiếp tục lai hồi giao lần ba với giống BC15, tạo hạt BC_3F_1 (vụ Mùa 2015). Kết quả xác định được 11/20 cây BC_3F_1 mang gen *Pik-p* ở trạng thái dị hợp (Hình 5) ở vụ Xuân 2016. 11 cá thể trên được tự thụ và dựa vào kiểu hình đã chọn lọc được 7 cá thể BC_3F_2 để tiếp tục chọn lọc cây mang gen ứng viên ở vụ mùa 2016. Kết quả trên cũng cho thấy, tỷ lệ phân ly kiểu gen giữa các cá thể mang gen ứng viên và không mang gen ở các thế hệ lai hồi giao BC_1F_1, BC_2F_1, BC_3F_1 có tỷ lệ phân ly tương đương là 1:1 (Bảng 2).

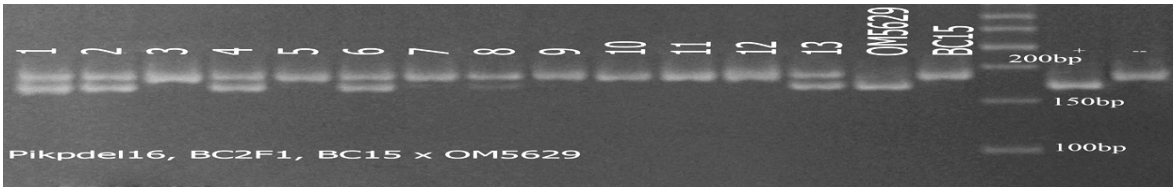
Bảng 2. Tỷ lệ phân ly kiểu gen của các thế hệ lai hồi giao của tổ hợp lai BC15/OM5629

Tên cặp mồi	Thế hệ	Số lượng cá thể		Tỷ lệ phân ly	Số lượng cá thể được chọn sử dụng lai trở lại/tự thụ
		Gen ứng viên (dị hợp)	Nhiễm		
Pikpdel16	BC_1F_1	22	23	1:1	6
	BC_2F_1	6	7	1:1	3
	BC_3F_1	11	10	1:1	7



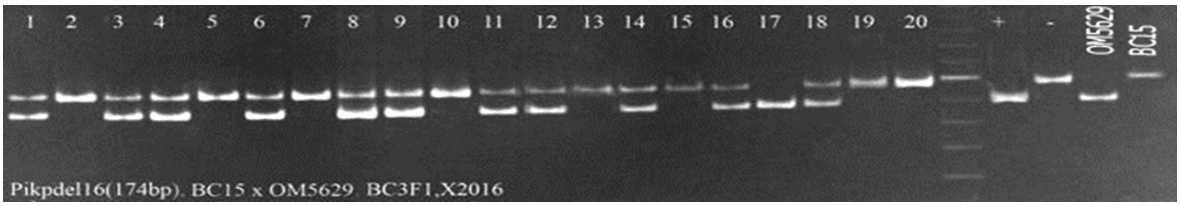
Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm PCR đối với cặp mồi Pikpdel16 nhận biết gen ứng viên Pik-p ở thế hệ BC_1F_1 của tổ hợp lai BC15/OM5629

Ghi chú: Số 1-45: con lai BC_1F_1; Đối chứng dương: IRBLkp-K60; Đối chứng âm: LTH; DNA Ladde: O'RangeRuler 20 bp (Thermo Scientific)



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm PCR đối với cặp mồi Pikpdel16 nhận biết gen ứng viên Pik-p ở thế hệ BC_2F_1 của tổ hợp lai BC15/OM5629

Ghi chú: Số 1-13: con lai BC_2F_1; Đối chứng dương: IRBLkp-K60; Đối chứng âm: LTH; DNA Ladde: O'RangeRuler 20 bp (Thermo Scientific)

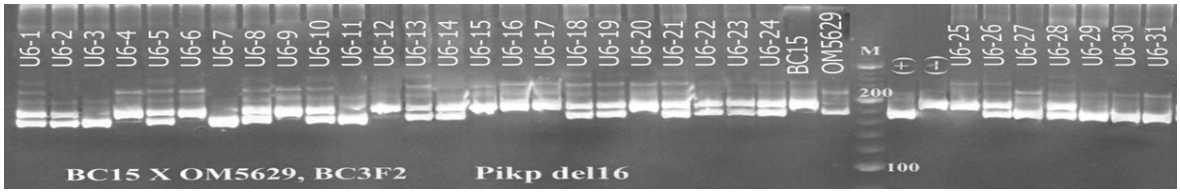


Hình 5. Ảnh điện di sản phẩm PCR đối với cặp mồi Pikpdel16 nhận biết gen ứng viên Pik-p ở thế hệ BC_3F_1 của tổ hợp lai BC15/OM5629

Ghi chú: Số 1-20: con lai BC_3F_1; Đối chứng dương: IRBLkp-K60; Đối chứng âm: LTH; DNA Ladde: O'RangeRuler 20 bp (Thermo Scientific)

3.3.2. Kết quả chọn lọc các dòng mang gen ứng viên Pik-p ở thế hệ tự thụ BC_3F_2, tạo BC_3F_3

Ở vụ Mùa 2016, dựa vào đặc điểm hình thái, thời gian sinh trưởng, chúng tôi đã chọn lọc 31 cá thể BC_3F_2 ở giai đoạn vào chắc có kiểu hình tốt (cứng cây, thoát cổ bông, đẻ nhánh tốt). Sử dụng cặp mồi Pikpdel16 kiểm tra 31 cá thể BC_3F_2 (hình 6), tỷ lệ phân ly kiểu gen *Pik-p* như sau: 7 cá thể mang gen *Pik-p* ở trạng thái đồng hợp (U6-3, U6-7, U6-11, U6-27, U6-29, U6-30, U6-31), 15 cá thể mang gen *Pik-p* ở trạng thái dị hợp tử, 9 cá thể không mang gen. Tỷ lệ phân ly gen *Pik-p* ở quần thể BC_3F_2 của tổ hợp lai BC15/OM5629 tương đương với tỷ lệ phân ly 1:2:1.



Hình 6. Ảnh điện di sản phẩm PCR đối với cặp mồi Pikpdel16 nhận biết gen ứng viên Pik-p ở thế hệ BC_3F_2 của tổ hợp lai BC15/OM5629

Ghi chú: U6-1 đến U6-31: cá thể BC_3F_2; Đối chứng dương: IRBLkp-K60; Đối chứng âm: LTH; DNA Ladde: O'RangeRuler 20 bp (Thermo Scientific)

Các cá thể BC_3F_2 mang gen *Pik-p* ở trạng thái đồng hợp được theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu, thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số bông/khóm, số hạt/bông... để chọn lọc các cá thể ưu việt nhất. Kết quả bảng 3 cho thấy ba cá thể (U6-7, U6-27, U6-31) có các chỉ tiêu theo dõi vượt trội so với các cá thể còn lại và được chọn lọc để tiếp tục làm thuần. Thời gian sinh trưởng của ba cá thể trên dao động 110 -115 ngày đều thuộc nhóm có thời gian sinh trưởng ngắn. Chiều cao cây biến động từ 100-120 cm. Theo thang điểm đánh giá chiều cao cây của IRRI, các cá thể có chiều cao cây thuộc loại trung bình. Số hạt/bông của ba cá thể lần lượt là 181,3 ; 190,3; 210,0 hạt thấp hơn so với giống đối chứng BC15 (220,2 hạt). Tuy nhiên, tỷ lệ hạt chắc của cá thể U6-31 (89,6%) cao hơn so với giống đối chứng (85,20%). Cá thể U6-7 có chiều dài bông dài nhất là 29,1 cm, giống đối chứng có chiều dài bông là 29,59 cm. Hình dạng và kích thước hạt, màu vỏ trấu của ba cá thể U6-7, U6-27, U6-31 có kích thước, màu sắc tương đương với giống đối chứng BC15.

Bảng 3. Chỉ tiêu theo dõi của các cá thể BC_3F_2 (hạt BC_3F_3) của tổ hợp lai BC15/OM5629

TT	Kí hiệu cá thể BC_3F_2	Gen *Pik-p* đồng hợp	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số bông / khóm	Số hạt /bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	Chiều dài bông (cm)	Chiều dài hạt thóc (mm)	Chiều rộng hạt thóc (mm)	Màu vỏ trấu
1	U6-3	X	110	115	6	126,50	81,50	25,50	8,60	2,50	Vàng rơm
2	*U6-7*	*X*	*115*	*117*	*9*	181,30	89,80	29,10	9,00	2,60	Vàng rơm
3	U6-11	X	110	120	5	148,80	75,00	23,30	8,40	2,40	Vàng rơm
4	*U6-27*	*X*	*113*	*120*	*8*	190,30	84,70	26,70	9,00	2,60	Vàng rơm
5	U6-29	X	117	114	5	185,40	74,80	26,10	8,60	2,60	Vàng rơm
6	U6-30	X	112	110	5	148,80	85,00	23,10	8,40	2,40	Vàng rơm
7	*U6-31*	*X*	*110*	*112*	*7*	210,00	89,60	28,20	8,90	2,70	Vàng rơm
	BC15 (Đ/C)		115	116,3	7,5	220,20	85,20	29,59	9,10	2,70	Vàng rơm

Ghi chú: X- cá thể BC_3F_2 mang gen; Đ/C: Đối chứng

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã tầm soát gen ứng viên *Pik-p* của 36 trình tự của 36 giống lúa địa phương. Xác định được gen ứng viên *Pik-p* từ trình tự genome của giống lúa OM5629. Trình tự nucleotide và thành phần amino acid ở vùng CDS của giống lúa OM5629 tương tự như gen tham chiếu.

Đã thiết kế được mồi SSLP (Pikpdel16*)* đặc hiệu để nhận biết gen ứng viên *Pik-p* phục vụ công tác chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn.

Tích hợp thành công gen ứng viên *Pik-p* vào giống lúa BC15 từ tổ hợp lai BC15/OM5629 và chọn lọc được ba cá thể BC_3F_2 (U6-7, U6-27, U6-31) mang gen *Pik-p* ở trạng thái đồng hợp, có cùng nền di truyền của giống lúa BC15.

4.2. Đề nghị

- Tiếp tục tự thụ ba cá thể mang gen *Pik-p* đồng hợp (U6-7, U6-27, U6-31) để làm thuần và phát triển thành dòng ở vụ tiếp theo.

- Lây nhiễm nhân tạo để đánh giá khả năng kháng đạo ôn của ba cá thể trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Lan, Phạm Tiến Dũng, 2005. *Giáo trình phương pháp thí nghiệm*, Nhà xuất bản Nông nghiệp 2005..

Doyle JJ, Doyle JL, 1990 . Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Hayashi K, Yoshida H, Ashikawa I., 2006. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theor Appl Genet 113*:251-260.

Hayashi N, Inoue H, Kato T, Funao T, Shirota M, Shimizu T, Kanamori H, Yamane H, Hayano-Saito Y, Matsumoto T, Yano M, Takatsuji H., 2010. Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *Plant J.64*: 498-510.

International Rice Research Institute, 2002. *Standard Evaluation System for Rice* (SES), 4 Edn. Los Banos: International Rice Research Institute (IRRI),15–16.

Mary JTY, Yohei K, Yoshimichi F, Tokio I, Hiroshi K, Hiroshi T and Nobuya K., 2010. Development of near-isogenic lines of Japonica-type rice variety Lijiangxintuanheigu as differentials for blast resistance. *Breeding Science* 60: 629–638.

Li L, Wang L, Jing J, Li Z, Lin F, Huang L, Pan Q., 2007. The *Pikm* gene, conferring stable resistance to isolates of *Magnaporthe oryzae*, was finely mapped in a cross over cold region on rice chromosome 11. *Mol Breed* 20:179-188.

Sharma TR, Rai AK, Gupta SK, Vijayan J, Devanna BN, Ray S., 2012. Rice blast management through host-plant resistance: retrospect and prospects. *Agric Res* 1: 37-52.

Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H, Zhou J, Ni P, Dong W, Hu S, Zeng C, Zhang J, Zhang Y., 2005. The genomes of Oryza sativa: a history of duplications. *PLoS Biol* 3:266-281.

Designing primers for identification of *Pik-p* in Vietnamese local rice varieties and their application in rice breeding

Tran Thi Thuy, Nguyen Thuy Diep, Nguyen Truong Khoa,
Thi Phuong Doai[1], Kieu Thi Dung, Nguyen Thi Ly,
Nguyen Thi Trang, Nguyen Thai Duong,
Tran Dang Khanh, Khuat Huu Trung

Abstract

Rice blast caused by fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*, is one of the most devastating rice diseases. Developing the blast resistant varieties is the main strategy to protect the crop. In this study, the sequence of blast resistant gene LOC_Os11g46210 was used as reference gene to identify the candidate genes from genome sequences of 36 Vietnamese local rice varieties. The nucleotide sequence in CDS (Coding DNA Sequence) and amino acid contents of candidate gene from OM5629 variety were found similar with that of the *Pik-p* reference gene. Based on the difference in nucleotide sequence of *Pik-p* reference gene and the candidate genes, primer pair Pikpdel16F/Pikpdel16R was designed to amplify the DNA segments of 174 bp (the candidate genes which were similar to the reference gene) and/or 190 bp (the genes which were different from the reference gene). The study aimed to introgress candidate blast resistant gene *Pik-p* by using local resistant genotypes OM5629 into BC15, a high-yielding rice variety that is blast susceptible. By marker assisted selection, three lines (U6-7, U6-27, U6-31) from BC_3F_2 were determined to contain homozygous *Pik-p* and genetic background of recurrent parent BC15. These results may be useful for breeding rice blast resistant varieties.

Key words: Marker-assisted selection, *Pik-p*, candidate genes, blast resistant gene

Ngày nhận bài: 10/4/2017 Ngày phản biện: 15/4/2017
Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu Ngày duyệt đăng: 24/4/2017

SÀNG LỌC CHỈ THỊ PHÂN TỬ LIÊN KẾT GEN QUY ĐỊNH MÙI THƠM *fgr* ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA THƠM TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Nhài[1], Nguyễn Thị Minh Nguyệt[1],
Nguyễn Thị Thanh Thủy[2], Lê Hùng Lĩnh[1]

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 3 chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen mùi thơm *fgr* trên nhiễm sắc thể số 8 được tìm kiếm từ các bản đồ liên kết và các công trình nghiên cứu trên thế giới. Các chỉ thị này đã được sử dụng để sàng lọc đa hình ADN giữa giống lúa Basmati mang gen *fgr* quy định mùi thơm với các giống lúa đang trồng tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu đã xác định ba chỉ thị phân tử BAD2, RM23120 và Aro7 liên kết chặt với gen mùi thơm và cho đa hình giữa các mẫu giống lúa thơm và mẫu giống không thơm. Đây là những chỉ thị rất thích hợp cho việc chọn lọc các cá thể mang gen quy định mùi thơm *fgr* trong các chương trình chọn giống lúa thơm sử dụng chỉ thị phân tử (MAS).

Từ khóa: BAD2, chỉ thị phân tử, gen *fgr*, lúa, mùi thơm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lúa *(Oryza sativa* L.) là một trong những loại cây lương thực chính, có vai trò quan trọng trong lĩnh vực kinh tế và an ninh lương thực. Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu gạo hàng đầu thế giới. Tuy nhiên, giá xuất khẩu còn khá chênh lệch với các nước khác do chất lượng gạo còn thấp. Ở một số nước, gạo thơm có giá trị cao hơn gạo thường 1,5 - 2,5 lần. Vì vậy, yêu cầu nâng cao chất lượng lúa gạo đặt ra cho nhà chọn giống nhiều thử thách phải giải quyết nhằm đáp ứng với mục tiêu xuất khẩu. Theo Nguyễn Văn Bộ (2004), để có thể đáp ứng được yêu cầu xuất khẩu gạo, việc chọn lọc các giống lúa thơm chất lượng cao là một trong những nhu cầu cấp bách hiện nay ở nước ta. Chiến lược tạo giống lúa thơm cũng cần được quan tâm hơn trong phương hướng cải tiến giống lúa ở những vùng trồng lúa chất lượng cao (Bùi Chí Bửu, 2004). Do vậy, để đáp ứng nhu cầu an linh lương thực và nâng cao giá trị hàng hóa của sản phẩm lúa gạo thì cần tạo ra những giống lúa vừa có năng suất cao, đồng thời có chất lượng tốt, trong đó mùi thơm

[1] Viện Di truyền Nông nghiệp; [2] Bộ Nông nghiệp và PTNT