VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM
VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP

BÁO CÁO HỘI NGHỊ KHOA HỌC

TÊN BÁO CÁO: XÁC ĐỊNH, THIẾT KẾ MỒI NHẬN BIẾT CANDIDATE GEN *XA5* Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA BẢN ĐỊA CỦA VIỆT NAM VÀ ỨNG DỤNG TRONG LAI TẠO GIỐNG

Báo cáo viên: NCS. Nguyễn Thúy Điệp
Nhóm thực hiện: NCS. Nguyễn Thúy Điệp
TS. Khuất Hữu Trung
NCS. Nguyễn Trường Khoa
và cộng sự

NỘI DUNG BÁO CÁO

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

★ **Gen *xa5*** là gen lặn đã được xây dựng bản đồ (mapping) và định vị trên nhiễm sắc thể số 5.

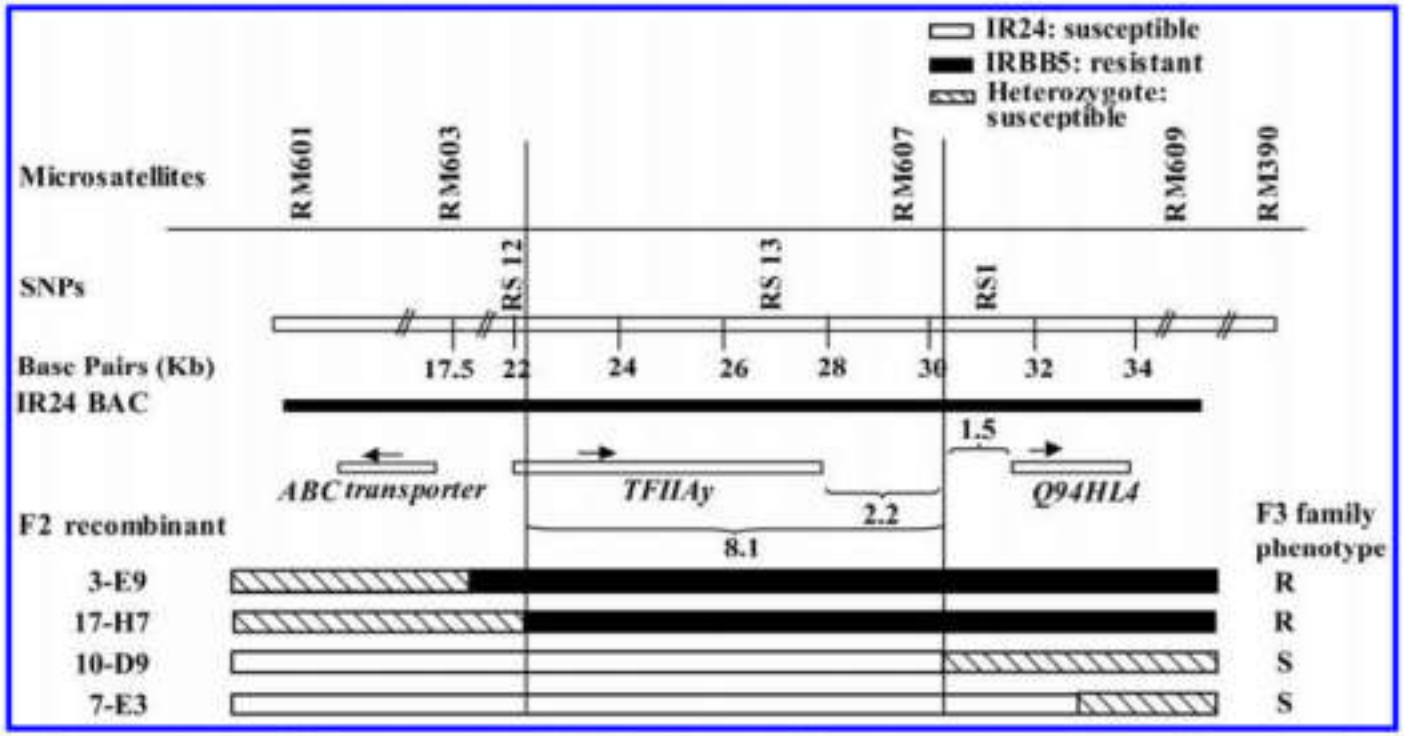


Fig. 1. Relevant recombinants within the region containing *xa5* that allowed narrowing of the region to approximately 8.1 kb containing only *TFIIAγ*. Arrows indicate the direction of transcription. SNPs = single nucleotide polymorphisms, R = resistant, and S = susceptible. Base pairs refer to relative distances along the IR24 bacterial artificial chromosome (BAC).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

- Ở alen kháng *xa5* có sự thay thế 2 bp ở exon thứ 2 dẫn đến sự thay đổi trình tự axít amin từ valine thành glutamiate ở vị trí 39.

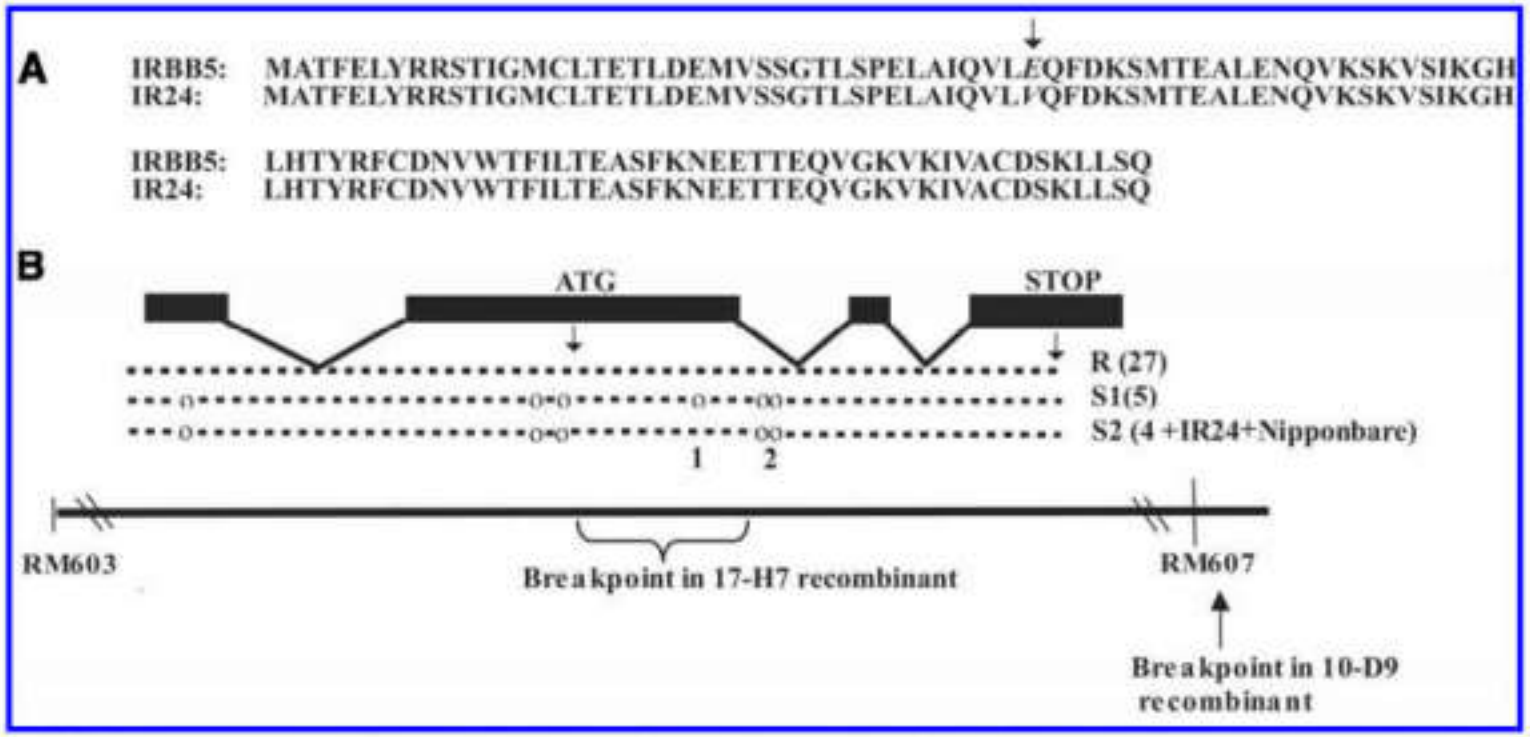


Fig. 3. The protein sequence, gene structure, and resistant and susceptible haplotypes of *TFIIAγ*. **A,** Resistant and susceptible TFIIAγ sequences from isolines IRBB5 and IR24, respectively. All amino acids are identical, except the substitution at position 39 (indicated with an arrow and italicized) in exon 2. **B,** Resistant and susceptible haplotypes in the four exons of rice *TFIIAγ*. Dashes represent stretches of common nucleotides in the cDNA, circles represent the single nucleotide polymorphisms. All nucleotides in this region in isolines IR24 (S) and IRBB5 (R) and in the *japonica* subspecies Nipponbare (S) are identical except the circles. Numbers in parentheses indicate the number of Aus-Boro rice varieties sequenced with this genotype. R = resistant to race 2 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, S1 = first haplotype susceptible to race 2 of *X. oryzae* pv. *oryzae*, S2 = second haplotype susceptible to race 2 of *X. oryzae* pv. *oryzae*. 1 = silent nucleotide substitution: CTT (leucine) changed to CTC (leucine). 2 = functional nucleotide polymorphism: GTC (valine in susceptible varieties) changed to GAG (glutamic acid in resistant varieties).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

★ Sự phát triển của các chỉ thị phân tử nhận biết gen *xa5*:

- Các chỉ thị RG556, RG207, RZ390 (chỉ thị RFLP), RM122 và RM390 (chỉ thị SSR) liên kết chặt với gen *xa5* đã được phát triển và ứng dụng trong chương trình chọn giống lúa (Yoshimura *et al.*, 1995; Blair và McCouch, 1997).

- Marker CAPS (Iyer và McCouch, 2007) và bi-PASA (Siriporn Korinsak et al, 2014) ⟹ Chỉ thị di truyền đồng trội, sử dụng enzyme giới hạn để phát hiện các SNPs trong vùng gen quan tâm.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

- Chỉ thị SSLP là một công cụ mới trong lập bản dồ gen và nhân giống với sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử (MAS); Là chỉ thị đồng trội, thường nhận biết mức độ thay đổi alen cao hơn chỉ thị RFLP và RAPD (Runchun Jing *et al.*, 2001).

⟹ Dựa vào các trình tự genome của 36 giống lúa bản địa đã giải mã, chúng tôi dã tầm soát và thiết kế chỉ thị SSLP dể nhận biết gen/candidate gen *xa5* có trong các giống lúa nghiên cứu và ứng dụng trong chọn tạo giống lúa kháng bạc lá.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Cơ sở dữ liệu trình tự genome của 36 giống lúa bản địa của Việt Nam đã được giải mã (www.riceagi.org.vn).
- Giống cho gen là giống lúa bản địa Chấn Thơm mang candidate gen *xa5* (www.riceagi.org.vn).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

★ Giống lúa nhận gen:

Giống DT39-Quế Lâm
(chọn tạo nhờ chiếu xạ tia gamma nguồn Cobalt 60 liều 200Gy trên đối tượng giống lúa Bắc Thơm 7, Đào Thị Thanh Bằng và cs, 2014)

Giống Thủ Đô 1
(là giống lúa thuần do Viện Di truyền Nông nghiệp nghiên cứu và chọn tạo, http://nongnghicp.vn/danh-gia-giong-lua-thu-do-1-va-hdt-8-post115839.html).

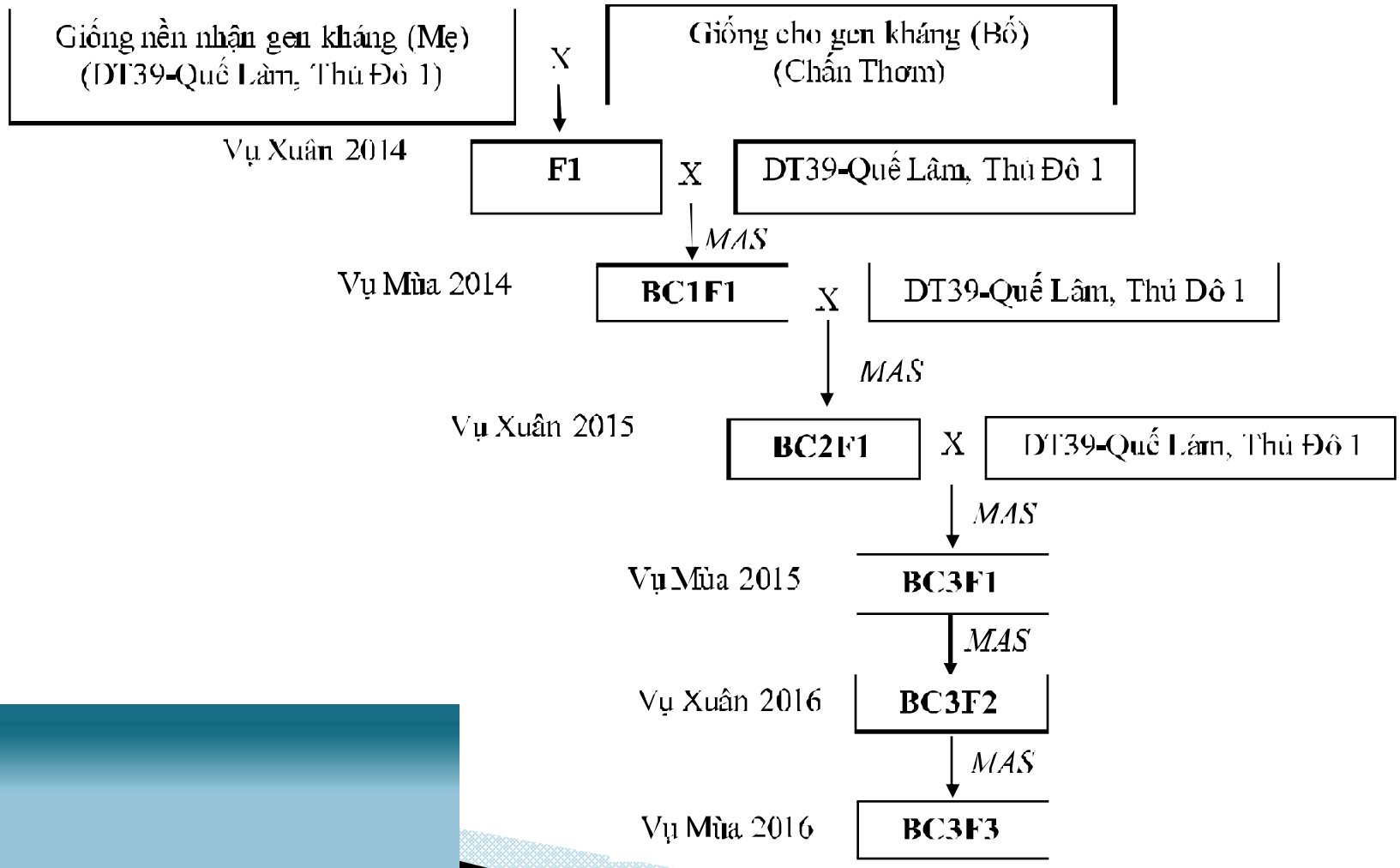
II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Trình tự các nuclcotidc dược so sánh và phân tích nhờ sử dụng phần mềm ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) và phần mềm MEGA6.0 cho hệ diều hành Windows (http://www.megasoftware.net/mega.php);
- Cặp mồi dặc hiệu dược thiết kế bằng phần mềm Primer3,0 (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm)
- Phương pháp kiểm tra candidatc gcn *xa5* ở các giống lúa nghiên cứu và các thế hệ con lai nhờ kỹ thuật PCR;
- Phương pháp thí nghiệm dồng ruộng: Bố trí thí nghiệm dồng ruộng theo phương pháp của Nguyễn Thị Lan (2005);

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

★ Phương pháp lai tạo theo Huang và cộng sự (2012):



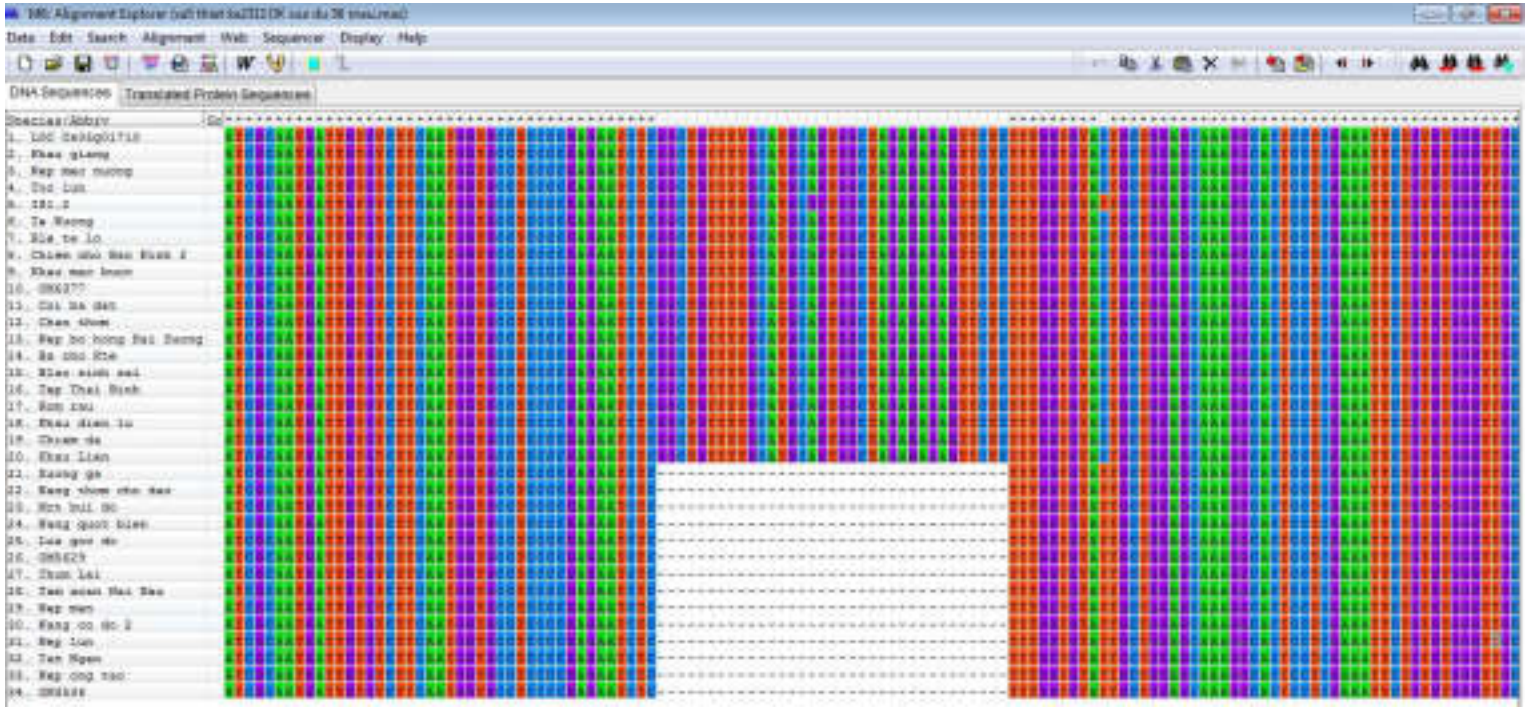
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tầm soát và thiết kế mồi nhận dạng candidate gen *xa5*

- Locus gen kháng bạc lá *xa5*, mã hiệu là LOC_Os05g01710 với 6261 nucleotide, vùng CDS (Coding DNA Sequence) có 321 nucleotide mã hóa 106 amino acid.
- Kết quả tầm soát và so sánh trình tự locus *xa5* của 36 giống lúa bản địa với gen *xa5* (LOC_Os05g01710) đã công bố:
  - 18 trình tự tương đồng của 18 giống lúa có tỉ lệ nucleotide tương tự như gen *xa5* đã công bố (ít hơn 4 nucleotide: Khâu giáng, Nếp mèo nương, Tốc lùn, Tẻ Nương, Ble te lo, CNBN2, Khấu mặc buộc, OM6377, Coi ba đất, Chấn thơm, Nếp bồ hóng Hải Dương, Ba cho K'tc, Blào sinh sái, Tép Thái Bình, Hom râu, Khấu diễn lư, Chiêm đá, Khẩu Liến).
  - Các giống còn lại: có sự khác nhau về tỉ lệ các loại A, T, C, G (ít hơn 12 - 36 nucleotide).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

- Đoạn trình tự với 35 nucleotide chèn thêm đã được tìm thấy ở một số giống lúa bản địa của Việt Nam.



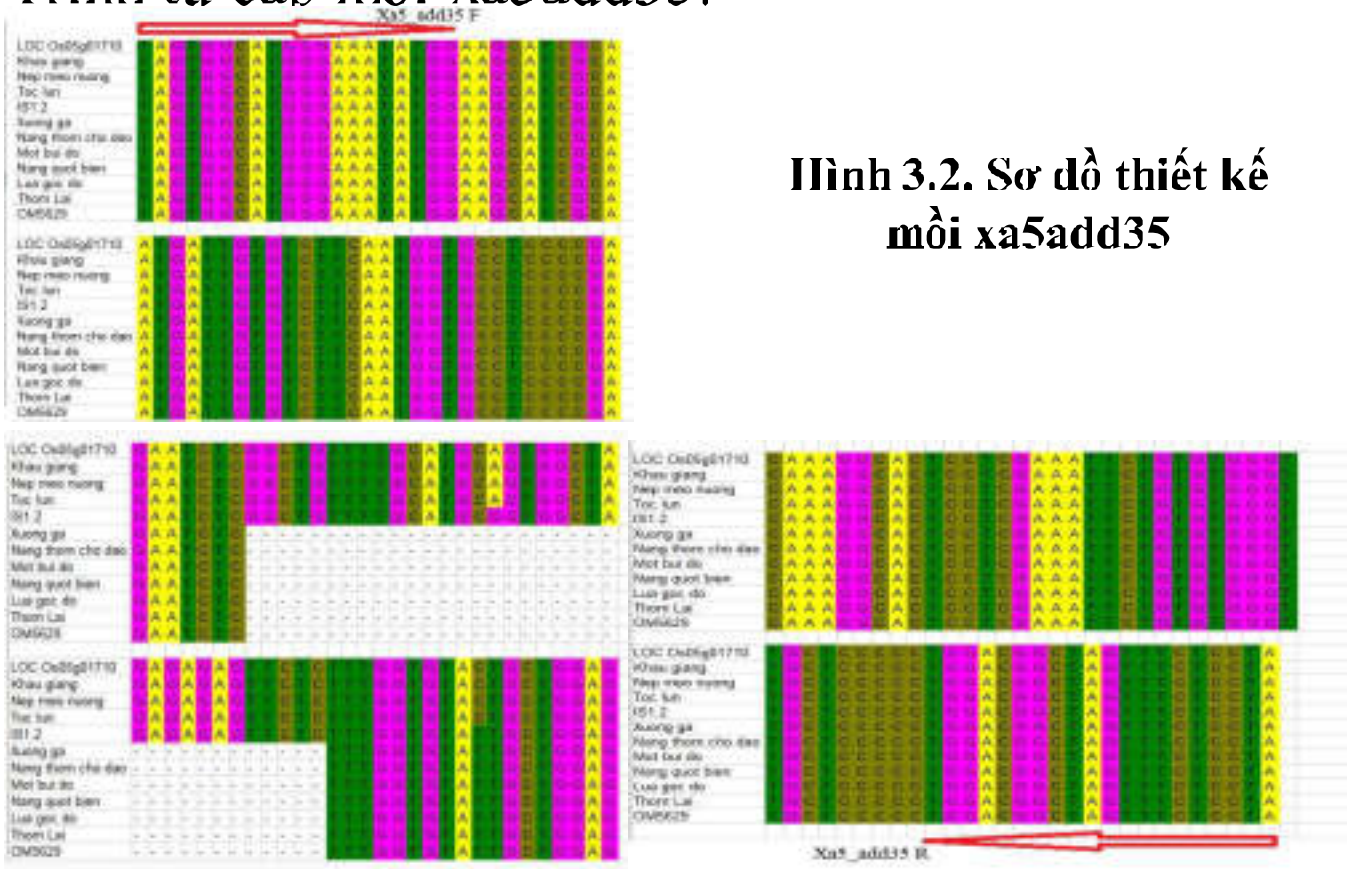
Hình 3.1. Ảnh dóng hàng, dóng cột so sánh trình tự một đoạn gen xa5 của một số giống lúa bản địa

Dựa vào sự sai khác về trình tự đoạn gen *xa5* giữa các giống lúa

→ Thiết kế được cặp mồi xa5add35

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

- Trình tự cặp mồi xa5add35:

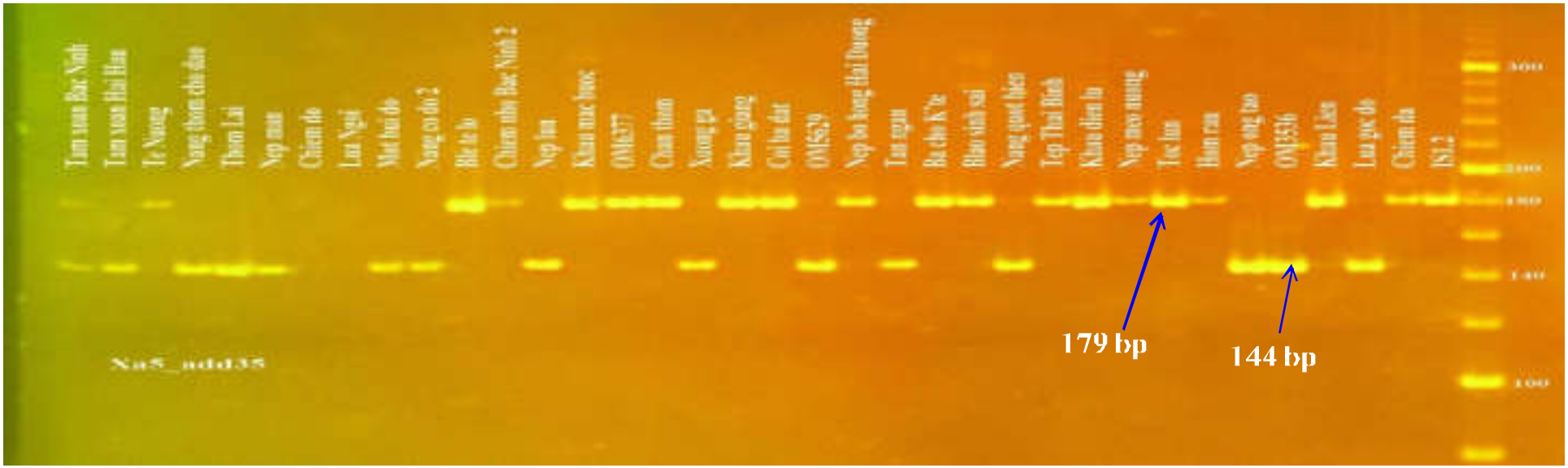


Hình 3.2. Sơ đồ thiết kế mồi xa5add35

TT	Tên mồi	Trình tự	Gen mục tiêu	Kích thước (bp)
1	xa5add35	F: TAGTGGCATGGGAAATATGG R: TAGGAGAAACTAGCCGTCCA	*xa5*	*R=179bp* *S=144 bp*

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.2. Kết quả kiểm tra sự đa hình candidate gen *xa5* bằng cặp mồi xa5add35 ở các giống lúa bản địa



Hình 3.3: Ảnh điện di sản phẩm PCR của 36 giống lúa bản địa với mồi xa5add35

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hình 3.4. Ảnh đánh giá khả năng kháng/nhiễm của các giống bố, mẹ

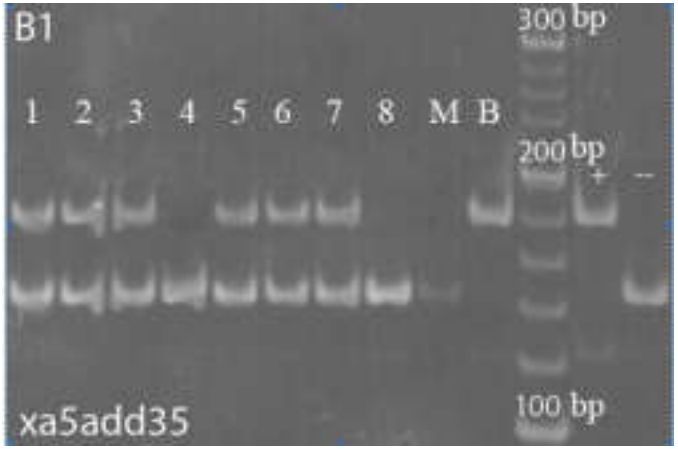
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.3. Kết quả lai tạo giống lúa mang candidate gen *xa5*

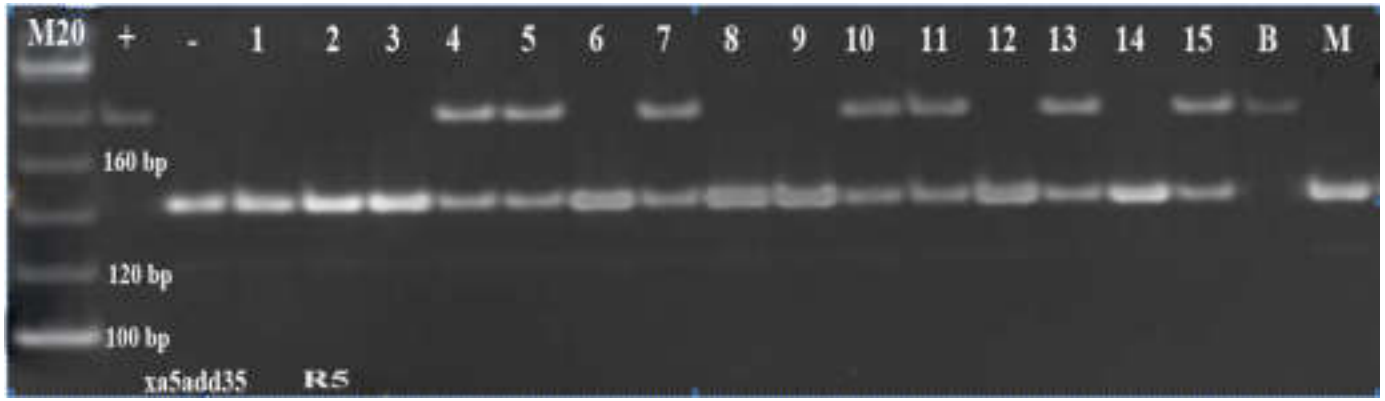
Hình 3.5. Ảnh hạt lai của các cá thể BC1F1, BC2F1, BC3F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn thơm và tổ hợp lai Thủ đô 1 x Chấn Thơm

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả kiểm tra candidate gen *xa5* ở các cá thể BC1F1, BC2F1, BC3F1 và BC3F2:

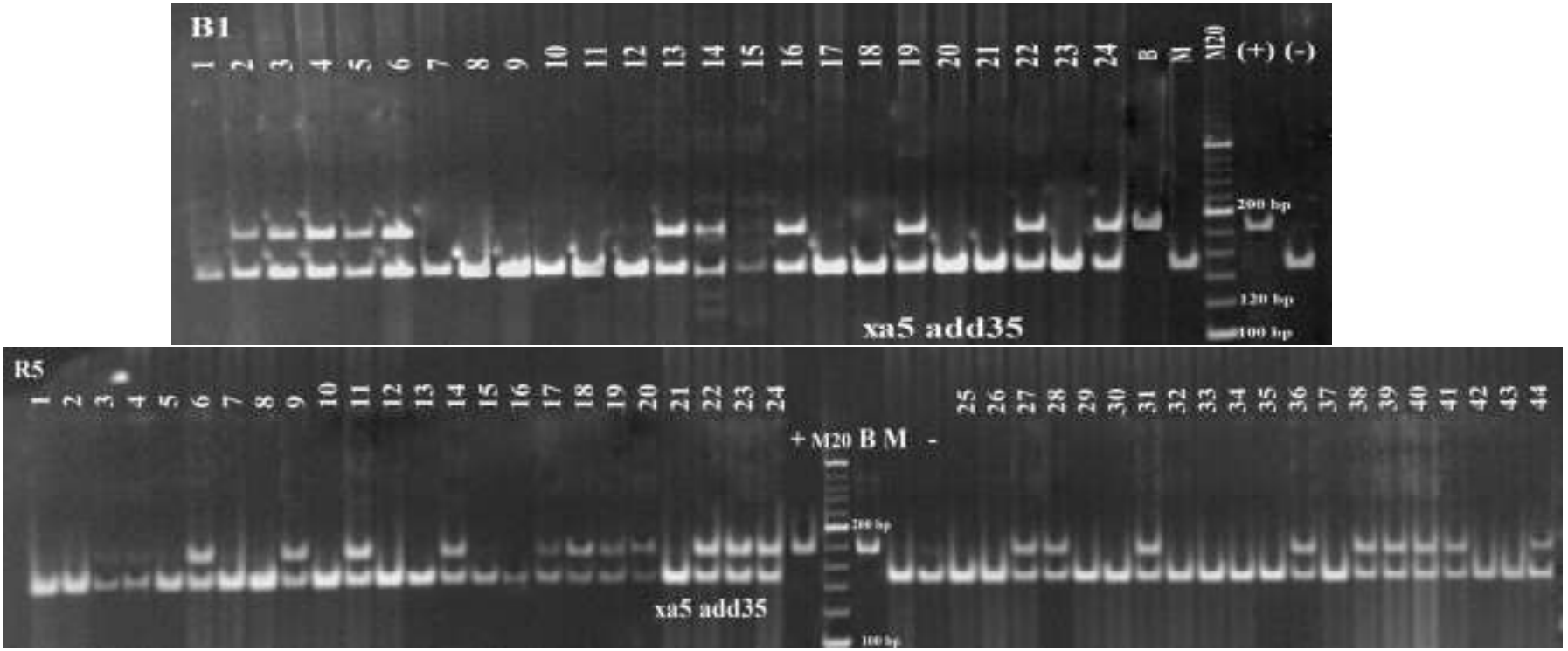


Hình 3.6. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định candidate gen xa5 đối với các con lai BC1F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm (B1) và Thủ đô 1 x Chấn Thơm (R5)



B1) B1.1-B1.8: Các con lai BC1F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm;
R5) R5.1-R5.15: Các con lai BC1F1 của tổ hợp lai Thủ đô 1 x Chấn Thơm;
M20: marker 20 bp; B: giống Chấn Thơm; M: giống DT39-Quế Lâm (B1), Thủ Đô 1 (R5);
(-): giống IR24 (đối chứng âm), (−): giống IRBB5 (đối chứng dương)

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

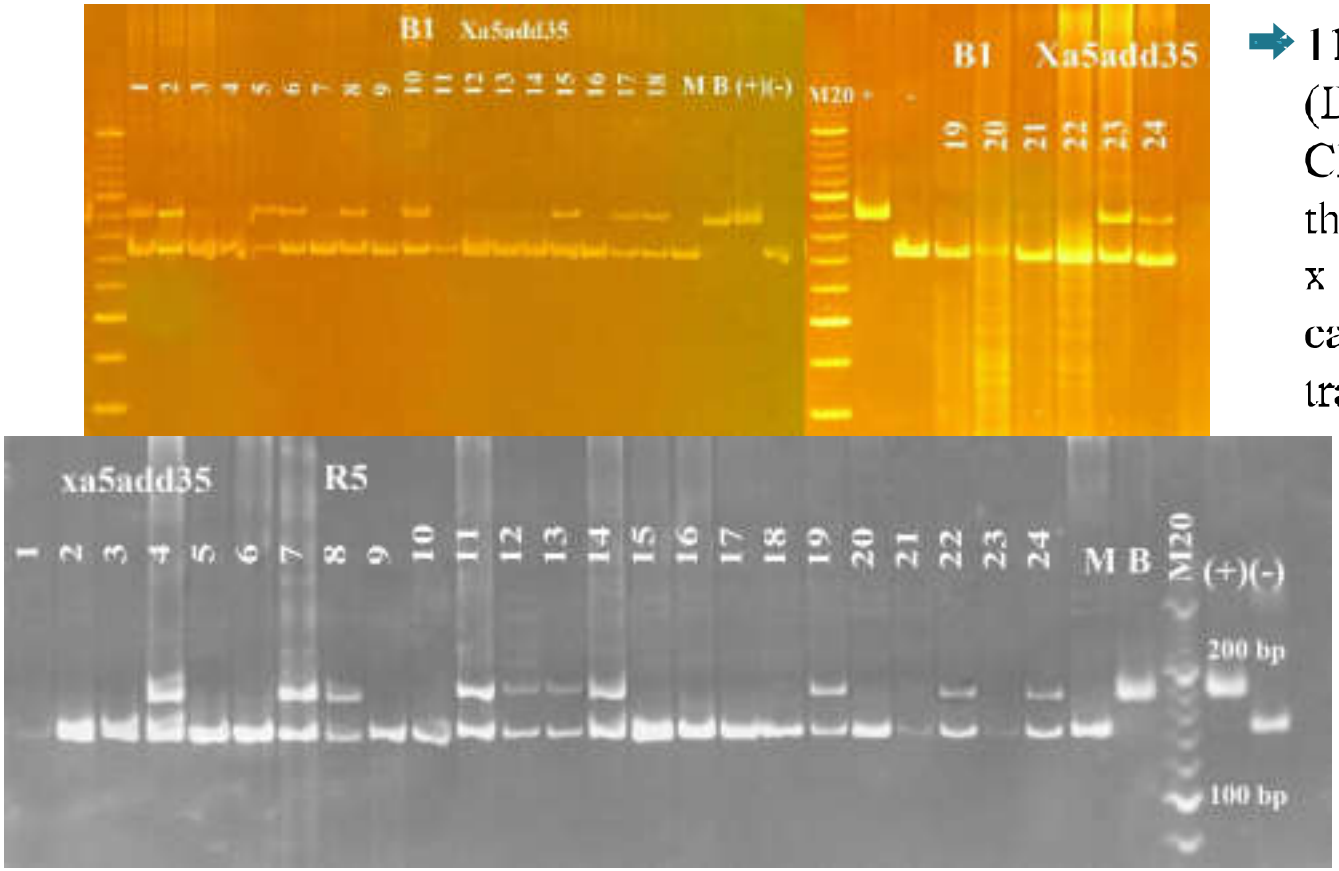


Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định candidate gen xa5 đối với các con lai BC2F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm (B1) và Thủ đô 1 x Chấn Thơm (R5)

B1) B1.1-B1.24: Các con lai BC2F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm;
R5) R5.1-R5.44: Các con lai BC2F1 của tổ hợp lai Thủ đô 1 x Chấn Thơm;
M20: marker 20 bp; B: giống Chấn Thơm; M: giống DT39-Quế Lâm (B1), Thủ Đô 1 (R5);
(-): giống IR24 (đối chứng âm), (−): giống IRBB5 (đối chứng dương)

→ 11 con lai BC2F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm; 20 con lai BC2F1 của tổ hợp lai Thủ đô 1 x Chấn Thơm mang candidate gen *xa5* ở trạng thái dị hợp

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

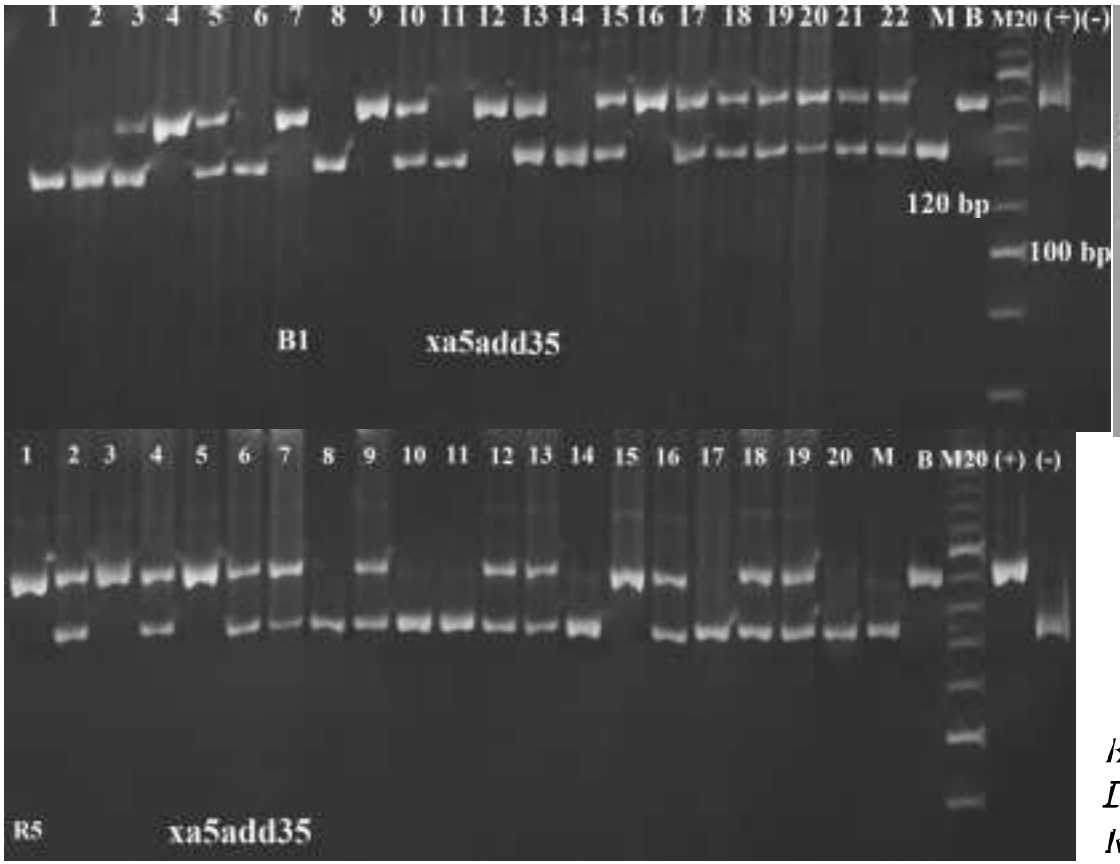


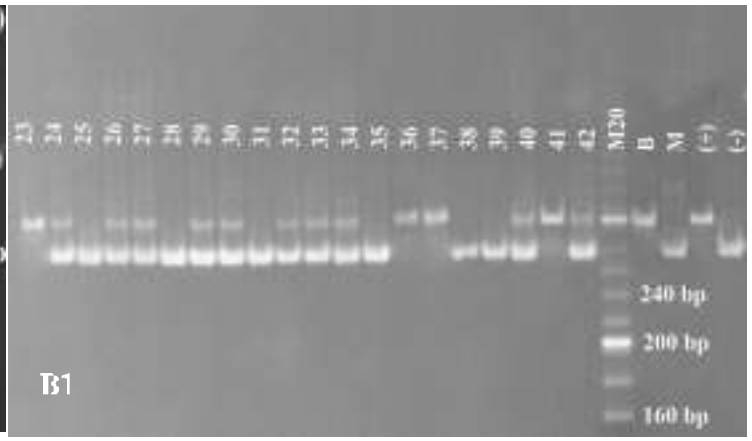
➡ 11 cá thể BC3F1 (DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm); 10 cá thể BC3F1 (Thủ đô 1 x Chấn Thơm) mang candidate gen *xa5* ở trạng thái dị hợp.

Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định candidate gen xa5 đối với các con lai BC3F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm (B1) và Thủ đô 1 x Chấn Thơm (R5)

B1) B1.1-B1.24: Các con lai BC3F1 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm;
R5) R5.1-R5.24: Các con lai BC3F1 của tổ hợp lai Thủ đô 1 x Chấn Thơm;
M20: marker 20 bp; B: giống Chấn Thơm; M: giống DT39-Quế Lâm (B1), Thủ Đô 1 (R5);
(-): giống IR24 (đối chứng âm), (−): giống IRBB5 (đối chứng dương)

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU





Hình 3.9. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định candidate gen xa5 đối với các cá thể BC3F2 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm (B1) và Thủ đô 1 x Chấn Thơm (R5)

B1) B1.1-B1.42: Các cá thể BC3F2 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm;
R5) R5.1-R5.20: Các cá thể BC3F2 của tổ hợp lai Thủ đô 1 x Chấn Thơm;
M20: marker 20 bp; B: giống Chấn Thơm; M: giống DT39-Quế Lâm (B1), Thủ Đô 1 (R5);
(-): giống IR24 (đối chứng âm), (+): giống IRBB5 (đối chứng dương)

- 9 cá thể BC3F2 (DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm); 4 cá thể BC3F2 (Thủ đô 1 x Chấn Thơm) mang candidate gen *xa5* ở trạng thái đồng hợp.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

★ Một số hình ảnh đồng ruộng (vụ xuân 2016 và vụ mùa 2016)

Hình 3.10. Các cá thể BC3F1 và BC3F2 của tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hình 3.11. Hạt tự thụ của các cá thể thuộc thế hệ BC3F2 mang gen kháng bạc lá của Tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm)

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hình 3.12. Cá thể BC3F1 và Kiểu phân ly màu sắc hạt của các cá thể BC3F2 thuộc tổ hợp lai Thủ Đô 1 x Chấn Thơm

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hình 3.13. Hạt tự thụ của các cá thể thuộc thế hệ BC3F2 mang gen kháng bạc lá của tổ hợp lai Thủ Đô 1 x Chấn Thơm

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

3.1. KẾT LUẬN

- Đã tầm soát, xác định được 18 trình tự tương đồng (candidate gen kháng bạc lá *xa5)* của 18 giống lúa có tỉ lệ nucleotide tương tự như gen *xa5* (mã hiệu *LOC_Os05g01710*) đã công bố;
- Đã thiết kế được cặp mồi xa5add35 đặc hiệu để nhận biết candidate gen kháng bạc lá thuộc locus *xa5* ở một số giống lúa bản địa của Việt Nam;
- Đã lai tạo và thu được các cá thể BC3F3 mang gen kháng bạc lá từ 2 tổ hợp lai DT39-Quế Lâm x Chấn Thơm và Thủ đô 1 x Chấn Thơm.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

3.2. ĐỀ NGHỊ

- Tiếp tục đánh giá khả năng kháng/nhiễm bằng lây nhiễm nhân tạo và dánh giá một số đặc diểm nông sinh học chính của các cá thể thu được của 2 tổ hợp lai trên.

XIN TRÂN TRỌNG CẢM ƠN
Nhóm thực hiện: NCS. Nguyễn Thúy Điệp
TS. Khuất Hữu Trung
TS. Hoàng Hoa Long
NCS. Nguyễn Trường Khoa
ThS Nguyễn Thị Phương Đoài
ThS Đặng Thị Thanh Hà
ThS Trần Thị Thúy
ThS Kiều Thị Dung
ThS Trần Duy Cường
và công sự