

## ỨNG DỤNG SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEATS) ĐỂ CẢI THIỆN TÍNH KHÁNG ĐẠO ÔN TRÊN LÚA

Trần Vũ Hải<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Phong Lan<sup>1</sup>, Phạm Ngọc Tú<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Viện Lúa ĐBSCL

### TÓM TẮT

Bệnh đạo ôn trên lúa là một trong những bệnh rất nghiêm trọng và thiệt hại lớn đến năng suất trên thế giới. Nhiều tài liệu đã chứng minh việc sử dụng các giống lúa kháng sẽ là cách hiệu quả nhất để kiểm soát bệnh này. Do đó, việc khai thác hiệu quả các gen kháng là nền tảng quan trọng trong chọn tạo giống lúa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định sự hiện diện của gen *Piz* và *Pik-m* bằng cách sử dụng phương pháp SSR (simple sequence repeat) với marker liên kết với gen *Piz* và *Pik-m* là RM3431 và RM1144. Kết quả thu được 5 cá thể có nguồn gốc từ OM6976 đã được kiểm chứng với sự hiện diện của hai gen *Piz* + *Pik-m*

**Từ khóa:** Bệnh đạo ôn, gen *Piz*, gen *Pik-m*, OM6976

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn hại lúa là một trong những dịch hại quan trọng ở hầu hết các vùng trồng lúa trên thế giới. Nấm có khả năng gây hại ở hầu hết các giai đoạn của cây lúa từ giai đoạn mạ đến chín và là một trong những bệnh gây thiệt hại trực tiếp đến năng suất và chất lượng lúa. Năm 2003, với sự trợ giúp của kỹ thuật sinh học phân tử (RFLP, AFLP, CAP, RGA, SSR,...) các nhà khoa học đã xác định được khoảng 40 gen chủ lực kháng bệnh đạo ôn đã được định vị trên bản đồ gen (Sallaud và *ctv.*, 2003). Hiện nay, có 100 gen chủ lực kháng bệnh đạo ôn và khoảng 500 QTLs được xác định trong bộ gen cây lúa (Ashkani và *ctv.*, 2016).

Ở Việt Nam, nghiên cứu của Lã Tuấn Nghĩa và *ctv.* (2009) đã lai quy tụ gen kháng bệnh đạo ôn *Pi-1* và *Pi-5* vào dòng lúa được tạo ra bằng phương pháp đột biến phóng xạ bằng tia gamma - (<sup>60</sup>Co) giống lúa Bắc thơm 7. Qua nhiều thế hệ chọn lọc đánh giá, dòng NB-01 có tiềm năng năng suất cao hơn giống Bắc thơm 7, chống chịu tốt, kháng đạo ôn và chống chịu sâu. Nguyễn Thị Lang và *ctv.* (2009) đã tạo ra 6 tổ hợp lai: OM 24/IR 64, IR 24/OM 2514, C 53/IR 64, C53/OM 2514, OM 1308/TeTep và IR 36/C53. Trong số đó, có 4 tổ hợp lai đã được lập bản đồ bằng cách sử dụng marker phân tử. Các gen kháng là di truyền trội và nằm trên nhiễm sắc thể 6, 8 và 11. Marker SSR (RM 483) đã được sử dụng để phát hiện khả năng kháng đạo ôn của 100 giống địa phương ở Đồng bằng sông Cửu Long. Ngoài ra, một số giống lúa kháng đạo ôn như

P(OM1), OMP2, OMP4, OMP5 và OMP6 đã được báo cáo bởi nhiều nhà khoa học. Đây được coi là nguồn vật liệu có giá trị cho gen kháng để tạo ra các giống kháng bền vững. Tính đa hình ADN của 181 isolates nấm gây bệnh đạo ôn ở ĐBSCL được ghi nhận, với 181 kiểu gen tương ứng với 181 haplotype nấm (Dư và Loan, 2009). Trong đó, hai gen *Piz*, *Pik-m* có tỷ lệ isolates nấm gây bệnh đạo ôn tần công thấp nhất (Dư và Loan, 2009). Những kết quả nghiên cứu nói trên là nguồn tư liệu và vật liệu quý cho công tác nghiên cứu và chọn tạo giống kháng bệnh đạo ôn. Tuy nhiên, để có đủ cơ sở dữ liệu và vật liệu phục vụ chọn tạo các giống lúa kháng bệnh đạo ôn đáp ứng yêu cầu của thực tế thì cần phải có một nghiên cứu toàn diện hơn nữa.

Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu xác định sự hiện diện của gen *Piz* và *Pik-m* bằng cách sử dụng phương pháp SSR (simple sequence repeat) với marker liên kết *Piz* và *Pik-m* từ giống lúa IRBL 9 và IRBL 25 để cải thiện tính kháng đạo ôn cho giống lúa OM6976.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống nhận gen: Giống lúa OM6976 có năng suất cao, phẩm chất gạo tốt, nhiễm bệnh đạo ôn

- Vật liệu cho gen kháng: là dòng đẳng gen (NIL) mang gen kháng tương ứng với gen *Piz* và *Pik-m* là IRBL 9 và IRBL 25.

- Chỉ thị liên kết *Piz*, kích thước 195 (bp)

- Chỉ thị liên kết *Pik-m*, kích thước 245

(bp)

Bảng 1. Các môi sử dụng trong phản ứng PCR.

Primers	Sequences (5'-3')	Sản phẩm khuếch đại (bp)
RM3431 (F)	AGGGAACATTCTGGAAGACACG	195
RM3431 (R)	ACACATTGCGTGTAGTGTGAAGC	
RM 144 (F)	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	245
RM 144 (R)	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG	

- Một số môi trường nuôi cấy, hóa chất, vật dụng thí nghiệm cần thiết khác

2.2.1. Lai hồi giao (backcross) và sử dụng chỉ thị phân tử để chọn cá thể lúa mang gen (*Pi*) kháng bệnh đạo ôn

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Bảng 2. Sơ đồ lai hồi giao và dùng chỉ thị phân tử chọn gen kháng bệnh đạo ôn

Thế hệ	Nội dung thực hiện	Sơ đồ lai	Sơ đồ lai
<b>P</b>	Lai đơn giữa vật liệu nhận gen kháng (vật liệu hồi giao) <b>P1</b> và vật liệu cho gen kháng <b>P2</b> - mang gen <i>Piz</i> và <b>P3</b> mang gen <i>Pik-m</i>	$P_1 \times P_2$	$P_1 \times P_3$
<b>F1</b>		$F_1 \times P_1$	$F_1 \times P_1$
<b>BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub></b>	Chọn 5 cá thể mang gen kháng <i>Piz</i> và <i>Pi k-m</i>	BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> mang gen <i>Piz</i>	BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> mang gen <i>Pik-m</i>
		$\times P_1$	$\times P_1$
<b>BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub></b>	Lai mỗi bông của mỗi cá thể được chọn với $P_1$ thu hạt BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> . Chọn 5 cá thể mang gen kháng <i>Piz</i> và <i>Pik-m</i>	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> mang gen <i>Piz</i>	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> mang gen <i>Pik-m</i>
		$\times P_1$	$\times P_1$
<b>BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub></b>	Lai mỗi bông của mỗi cá thể được chọn với $P_1$ thu hạt BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> . Chọn 5 cá thể mang gen kháng <i>Piz</i> và <i>Pik-m</i>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> mang gen <i>Piz</i>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> mang gen <i>Pik-m</i>
	Lai hai cá thể BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> mang gen kháng <i>Piz</i> và <i>Pik-m</i> với nhau để được hạt F1	$BC_3F_1 (Piz) \times BC_3F_1 (Pik-m)$	
	Chọn các cá thể mang hai gen đồng hợp tử <i>Piz+Pik-m</i> qua đánh giá kiểu gen	$F_1$	
	Chọn cá thể thuần kháng bệnh đạo ôn và có dạng hình đẹp	$F_2$	
		$F_3$	

### 2.2.2. Ly trích DNA

DNA được ly trích theo phương pháp CTAB (Murray và Thompson, 1980) có cải tiến.

### 2.2.3. Chạy PCR bằng phương pháp nối liên kết với chỉ thị SSR

Theo phương pháp của Zheng và *ctv.* (1995).

### 2.2.4. Chạy PCR bằng phương pháp nối liên kết với chỉ thị STS

Theo phương pháp của Li và *ctv.* (2007).

### 2.2.5. Chọn các dòng lúa mang gen kháng bệnh đạo ôn dựa vào chỉ thị phân tử

Chọn các dòng lúa mang một gen và hai gen kháng bệnh đạo ôn dựa vào chỉ thị RM3431 liên kết với gen *Piz* và RM144 liên

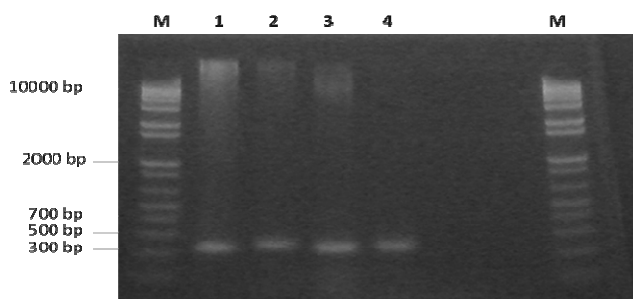
kết với gen *Pi km* để xác định các cá thể BCnF<sub>1</sub> mang gen kháng *Piz* và *Pik-m* dị hợp tử.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Đánh giá tính đa hình của các chỉ thị phân tử giữa bố và mẹ

Chỉ thị phân tử được xem như cho tính đa hình khi có sự khác nhau rõ rệt về kích thước của 2 băng bố mẹ, sự khác nhau này được đánh giá dựa trên kết quả chạy điện di.

Kết quả chạy điện di cho thấy ở chỉ thị RM 3431 cho tính đa hình giữa 2 bố mẹ OM6976 x IRBL9. Ở chỉ thị RM144 cũng cho tính đa hình giữa 2 bố mẹ OM6976 và IRBL25 (Hình 1).

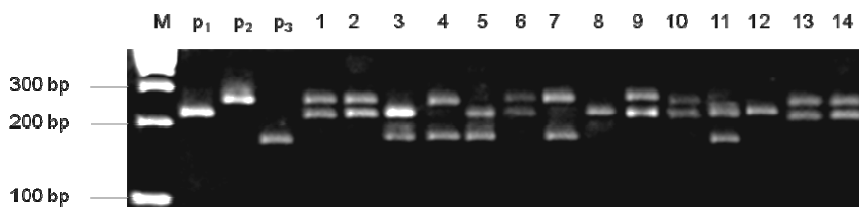


Hình 1. Tính đa hình giữa bố và mẹ cặp primer RM144 (1, 3:OM6976; 2,4: IRBL25)

### Chọn lọc các dòng hồi giao dựa vào chỉ thị phân tử với các dòng lúa mang một gen kháng bệnh đạo ôn

Kết quả lai tạo trong quần thể hồi giao BCnF<sub>1</sub> xuất hiện hai dạng kiểu gen là kiểu gen dị hợp tử kháng (hai băng) và kiểu gen đồng

hợp tử nhiễm (một băng), kiểu gen dị hợp tử kháng ở quần thể BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> sẽ được chọn và chọn cá thể càng giống dạng hình của OM 6976 càng tốt để sử dụng trong chương trình lai hồi giao tiếp theo. Ở thế hệ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> và BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> cũng làm tương tự thế hệ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>.

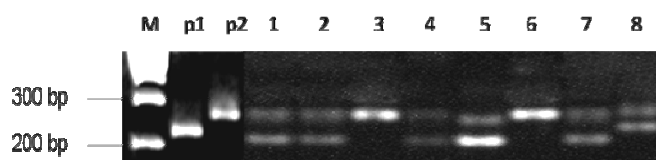


Hình 2. Kiểu gen của bố mẹ và các cá thể BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> mang gen kháng bệnh đạo ôn *Pik-m* và *Piz*

(M: 100bp DNA ladder, p<sub>1</sub>: OM6976, p<sub>2</sub>: IRBL25, p<sub>3</sub>: IRBL9, land 1,2, 6, 9, 10, 13, 14 các cá thể BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> mang gen kháng bệnh đạo ôn *Pik-m*, cá thể số 3, 5 và 11 các cá thể BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> mang gen kháng bệnh đạo ôn *Piz*).

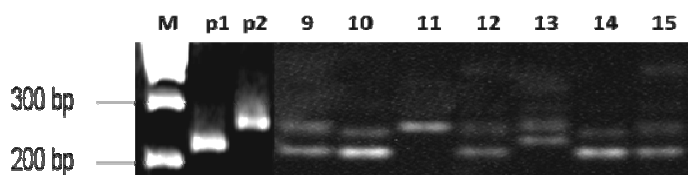
Kết quả giữa cặp lai OM6976 x IRBL25 ở thế hệ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> đã chọn được 7 cá thể dị hợp tử số 1, 2, 6, 9, 10, 13, 14 mang gen *Pik-m* (Hình 2). Thế hệ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> chọn được 6 cá thể dị hợp số

1, 2, 4, 5, 7, 8 (Hình 3). Thế hệ BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> chọn được 6 cá thể dị hợp số 9, 10, 12, 13, 14, 15 (Hình 4).



Hình 3. Kiểu gen các cá thể  $BC_2F_1$  của tổ hợp lai OM6976 x IRBL25 mang gen kháng bệnh đạo ôn *Pik-m*

(M: 100bp DNA ladder, p<sub>1</sub>: OM6976, p<sub>2</sub>: IRBL25, 1-8 các cá thể  $BC_2F_1$ )

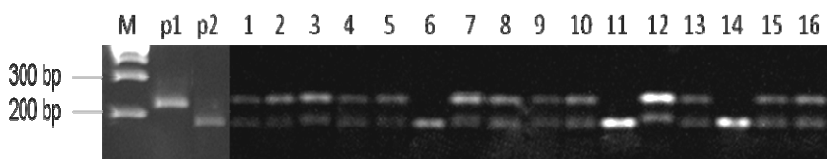


Hình 4. Kiểu gen các cá thể  $BC_3F_1$  của tổ hợp lai OM6976 x IRBL25 mang gen kháng bệnh đạo ôn *Pik-m*

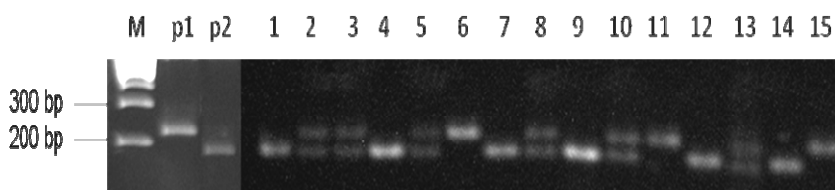
(M: 100bp DNA ladder, p<sub>1</sub>: OM6976, p<sub>2</sub>: IRBL25, 9-15 các cá thể  $BC_3F_1$ )

Kết quả giữa cặp lai OM6976 x IRBL9 ở thế hệ  $BC_1F_1$  đã chọn được 3 cá thể dị hợp tử số 3, 5, 11 mang gen *Piz* (Hình 2). Thế hệ  $BC_2F_1$  chọn được 13 cá thể dị hợp tử số 1, 2, 3,

4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16 (Hình 5). Thế hệ  $BC_3F_1$  chọn được 6 cá thể dị hợp tử số 2, 3, 5, 8, 10, 13 (Hình 6).



Hình 5. Kiểu gen các cá thể  $BC_2F_1$  của tổ hợp lai OM6976 x IRBL9 mang gen kháng bệnh đạo ôn *Piz* (M: 100bp DNA ladder, p<sub>1</sub>: OM6976, P<sub>2</sub>: IRBL9, 1-16 các cá thể  $BC_2F_1$ )



Hình 6. Kiểu gen các cá thể  $BC_3F_1$  của tổ hợp lai OM6976 x IRBL9 mang gen kháng bệnh đạo ôn *Piz* (M: 100bp DNA ladder, p<sub>1</sub>: OM6976, P<sub>2</sub>: IRBL9, 1-15 các cá thể  $BC_3F_1$ )

Kết quả sử dụng chỉ thị phân tử trong chọn lọc các dòng dị hợp tử mang gen kháng *Piz* và *Pik-m* cho thấy đối với thế hệ  $BC_1F_1$ ,  $BC_2F_1$  và  $BC_3F_1$  của cặp lai OM 6976 x IRBL9 mang gen kháng *Piz* ở 3 thế hệ này đã thực hiện thành công và chọn được tổng số cá thể dị hợp tử để thực hiện cho mục đích tiếp theo với số cá thể lần lượt là 3, 13 và 6 cá thể. Đối với thế hệ  $BC_1F_1$ ,  $BC_2F_1$  và  $BC_3F_1$  của cặp lai OM6976 x IRBL25 mang gen kháng *Pik-m* ở 3 thế hệ này cũng đã chọn được tổng số cá thể dị

hợp tử để thực hiện cho mục đích tiếp theo với số cá thể lần lượt là 7, 6 và 6 cá thể.

Kết quả từ  $BC_1F_1$  cho đến thế hệ  $BC_3F_1$  có tất cả 22 cá thể mang gen *Piz* và 19 cá thể mang gen *Pik-m*.

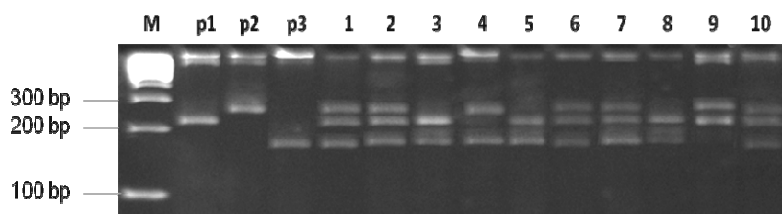
### 3.2. Chọn lọc các dòng hồi giao dựa vào chỉ thị phân tử với các dòng lúa mang hai gen kháng bệnh đạo ôn

Sau khi lai cá thể  $BC_3F_1$  có mang gen

kháng *Piz* với cá thể BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> mang gen *Pik-m*, thu được F<sub>1</sub> mang 2 gen kháng *Piz* + *Pik-m*. Cho F<sub>1</sub> tự thụ và thu được hạt F<sub>2</sub> của từng cá thể. Dùng chỉ thị phân tử RM3431 liên kết với *Piz* và RM144 liên kết với *Pik-m* để xác định cá thể F<sub>2</sub> mang 2 gen kháng *Piz* + *Pik-m* đồng hợp tử. Tiếp theo cho các cá thể đã được chọn lọc kiểu gen mang hai gen kháng này tự thụ và thu hạt F<sub>3</sub>. Chọn các dòng F<sub>3</sub> có dạng hình tốt

đưa vào so sánh năng suất phục vụ cho mục đích tiếp theo.

Kết quả chọn lọc các cá thể mang 2 gen kháng dựa vào chỉ thị phân tử RM3431 cho gen *Piz* và RM144 cho gen kháng *Pik-m*, 5 cá thể *Piz* + *Pik-m* đã được chọn cho cặp lai OM6976/IRBL9//3\*OM6976///OM6976/IRBL25//3\*OM6976 (Hình 7)



Hình 7. Ảnh điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ cá thể F<sub>2</sub> có từ cặp lai OM6976/IRBL9//3\*OM6976///OM6976/IRBL25//3\*OM6976 sử dụng 2 môi RM3431 và RM144

M: 100bp DNA ladder, p1: OM6976, p2: IRBL25, p3: IRBL 9, 1-10 các cá thể F<sub>2</sub>, cá thể số 1, 2, 6, 7 và 10 mang 2 gen kháng *Piz* + *Pik-m* được chọn lọc qua sự hiện diện của 2 băng ở vị trí khoảng 195bp và 245bp.

## IV. KẾT LUẬN

### 4.1. Kết luận

- Đã chọn lọc và lai tạo thành công 5 cá thể mang 2 gen *Piz* + *Pik-m* của cặp lai OM6976/IRBL9//3\*OM6976///OM6976/IRBL25//3\*OM6976.

### 4.2. Đề nghị

- Tiếp tục nhân, đánh giá các cá thể mang 2 gen kháng ở các vụ sau.

## LỜI CẢM ƠN

Tác giả chân thành cảm ơn:

- Bộ Khoa học và Công nghệ, Chương trình trọng điểm cấp nhà nước KC.06/11-15 đã cấp kinh phí thực hiện Đề tài “Nghiên cứu chọn tạo và phát triển giống lúa thơm, năng suất, chất lượng cao”.

- Cảm ơn cán bộ của Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Lúa ĐBSCL, Viện Khoa học Nông Nghiệp Việt Nam tạo điều kiện để thực hiện đề tài này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ashkani S, Rafii MY, Shabanimofrad M, Ghasemzadeh A, Ravanfar SA, Latif MA.,

2016. Molecular progress on the mapping and cloning of functional genes for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.): current status and future considerations. *Crit Rev Biotechnol.*, 36(2): 353-67.

2. Dư Phạm Văn và Lê Cẩm Loan, 2009. Nghiên cứu một số gen kháng bệnh đạo ôn có hiệu quả đối với các nòi nấm *Pyricularia grisea* ở Đồng bằng sông Cửu Long. Trong *Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 8*. Ninh Thuận, 25-26/7/2009: 7-14.

3. Lang Nguyen Thi, Trinh Thi Luy, Pham Thi Thu Ha and Bui Chi Bui, 2009. Monogenic lines resistance to blast disease in rice (*Oryza sativa* L.) in Vietnam. *International Journal of Genetict and Molecular Biology*, 1: 127-136.

4. Li HJ, Conner RL, Liu ZY, Zhou YL, Duan XY, Shen TM, Chen Q, Graf RJ, Li YW, Chen Y, Jia X., 2007. *Characterization of wheat-triticale lines resistant to powdery mildew, stem rust, stripe rust, wheat curl mite, and limitation on spread of WSMV*. *Plant Disease*, 91(4):368-374.

5. Murray WF and Thompson MG, 1980. Rapid isolation of high molecular weight

- plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
6. Nghĩa Lã Tuấn, Nguyễn Kiên Quốc, Nguyễn Văn Bích, 2009. Ứng dụng công nghệ chỉ thị phân tử để chọn tạo dòng/giống lúa kháng đạo ôn. Trong *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2009*.
7. Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau E, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A and Notteghem JL., 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theoretical Applied Genetics*, 106: 794-803.
8. Zheng K, Huang N, Bennett J and Khush GS., 1995. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. *IRRI Discussion Paper Series*, 12:24.

### ABSTRACT

#### Applications SSR (Simple Sequence Repeats) for improvement of resistance to rice blast

Rice blast is one of the most serious rice diseases and caused great yield losses every year in the world. It had been proved that using resistant rice varieties would be the most effective way to control this disease; therefore, mining the resistant genes might be important foundational work in the breeding program. In the present study, we identified the existence of the Piz and Pik-m gene by using the SSR marker RM3431 and RM1144 linked with gene of IRBL9 and IRBL25 rice variety. A simple sequence repeat (SSR) based on molecular marker-aided selection system for the Piz and Pik-m segment was established. Five lines derived from the recurrent parent OM6976 was obtained with Piz and Pik-m gene.

**Keywords:** Rice blast; SSR marker; *Piz* gene; *Pik-m* gene, OM6976

**Người phản biện:** TS. Khuất Hữu Trung