

NHỮNG BIẾN ĐỔI PHÂN TỬ Ở CÁC ĐỒNG LÚA KHÁNG DỊCH NẤM GÂY BỆNH ĐẠO ÔN PYRICULARIA ORYZAE

PHAN THỊ BÀY, LÊ THỊ MUỘI, NGUYỄN ĐỨC THÀI

Viện Công nghệ sinh học

Ngày nay với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học đã có nhiều kỹ thuật mới hiện đại phục vụ trong nghiên cứu di truyền và phát triển các giống lúa [3, 6]. Nhiều bản đồ phân tử ở lúa đã được thiết lập nhờ các dấu phân tử RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats), STS (Sequence Tagged Sites) [1, 2, 7, 8, 10, 11]. Một số kết quả đã xác định sự có mặt của một số gen quan tâm và các đoạn ADN liên kết với các đặc điểm mong muốn cũng đã được thông báo [5].

Việc sử dụng các dấu phân tử STS (đoạn các vị trí liên kết) để xác định gen kháng đạo ôn pi-2(t) trong một quần thể phân ly ở lúa đã được Hittalmani và CS, 1995 công bố [4]. Tương tự bằng phân tích các dấu phân tử STS từ 2 môi OP F6A và OP H18A đã giúp các nhà nghiên cứu xác định sự có mặt của gen kháng đạo ôn pi-10 ở giống lúa Tongil tại Viện Nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI) [12]. Với kết quả phân tích bằng các môi ngẫu nhiên (RAPD) ở quần thể đơn bội kép, Naqvi và CS, 1995 đã định vị được gen pi-2h nằm trên nhiễm sắc thể số 8 [9]. v.v..

Trong bài này chúng tôi công bố những kết quả ứng dụng các dấu phân tử STS và RAPD khi nghiên cứu phân tử các đồng lúa kháng dịch nấm (DN) gây bệnh đạo ôn đã được công bố trước đây [13, 14].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng 2 giống lúa nguyên chủng là CR203 nhiễm đạo ôn nặng (đối chứng nhiễm-ĐC2), và C101A51 giống mang gen kháng đạo ôn Pi-2(t) (đối chứng kháng-ĐC3). Các đồng lúa mới chọn lọc gồm: hai đồng chọn từ mô sẹo giống lúa CR203 xử lý 40% dịch nấm (BR41,

BR77), năm đồng chọn từ mô sẹo lúa CR203 lý 50% dịch nấm BR3, BR12, BR16, BR BR30. Một đồng cây tái sinh từ mô sẹo CR203 qua nuôi cấy in vitro nhưng không xử lý nấm cũng được sử dụng như một chứng (ĐC1).

Cây tái sinh từ mô sẹo trồng ra vườn nghiệm là cây R₀, cây từ hạt của cây R₀ là cây từ hạt R₁ là R₂ v.v..

Các môi cho phản ứng PCR bao gồm: 2 RAPD (OPB1-GTTTCGCTCC; OPB5-TGC CCTTC) mua của hãng Operon, Mỹ. Các STS bao gồm: Môi RG64A liên kết với kháng đạo ôn Pi-2(t), môi OPF6A và OPH18A liên kết với gen kháng đạo ôn P. Trình tự của các môi như sau:

RG64A 431
5'-GTTGTTGAGCTCTTCCAATG CCTGTT
RG64A 432
5'-CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG
OPF6A F
5'-GGGAATTCGGTITTTACAACCACCC
OPF6A F
5'-GGGAATTCGGATCTCCGGGGGTA
OPH18A F
5'-GAATCGGCCAAGTCATATTAGTC
OPH18A R
5'-GAATCGGCCAACATCGACTACGT

Các cặp môi STS được tổng hợp bởi Keystone Labs (Mỹ), trình tự của các môi thiết kế dựa vào trình tự đầu cuối của cả phân tử tương ứng (Hittalmani và CS, Naqvi và CS, 1995).

Tách ADN genôm từ các đồng/giới theo phương pháp dùng CTAB của S

Maroof và CS (1984) có cải tiến. Kiểm tra nồng độ ADN bằng máy quang phổ Hp8452A-Diode array UV-visible Spectrophotometer ở bước sóng 260 nm và 280 nm. Kiểm tra chất lượng ADN bằng máy điện di trên gel agarose 1%, trong 60 phút, 80 V; bản gel được nhuộm với ethidium bromide (EtBr) 0,1%; soi gien trên Mini-Transilluminator (Bio-Rad) và chụp ảnh bằng máy Image Master® VDS (Pharmacia Biotech). Phản ứng PCR của ADN genôm lúa với các môi đặc trưng được thực hiện trên máy PCR PTC 100 (MJ. Research Inc., Mỹ).

- Hỗn hợp phản ứng PCR (RAPD): Hỗn hợp phản ứng (20 µl) chứa trong ống Eppendorf (0,5 ml) bao gồm: nước vô trùng 12,6 µl; dung dịch đệm 10X PCR 2 µl; dNTP (5 mM) 0,8 µl; MgCl₂ (50 mM) 0,6 µl; môi (Primer) 1 µl; Taq polymerase 0,5 µl; ADN mẫu 2,5 µl (0,02 µg/µl).

- Chương trình chạy PCR cho môi RAPD. 1) 94°C 3 phút; 2) 94°C 1 phút; 3) 35°C 1 phút; 4) 72°C 2 phút; 5) 35 chu kỳ (2+3+4+); 6) 72°C 7 phút.

- Hỗn hợp phản ứng PCR cho các môi STS: Hỗn hợp phản ứng (25 µl) chứa trong ống Eppendorf (0,5 ml) bao gồm: nước vô trùng 17,4 µl; dung dịch đệm 10 X PCR 2,5 µl; dNTP (5 mM) 0,6 µl; MgCl₂ (50 mM) 0,5 µl; môi (Primer) 1 µl; Taq polymerase 0,5 µl; ADN mẫu 2,5 µl (0,02 µg/µl).

- Chương trình chạy PCR cho các môi STS: 1) 94°C 4 phút; 2) 94°C 1 phút; 3) 58°C 1 phút 30 giây; 4) 72°C 2 phút; 5) 40 chu kỳ (2+3+4); 6) 72°C 5 phút.

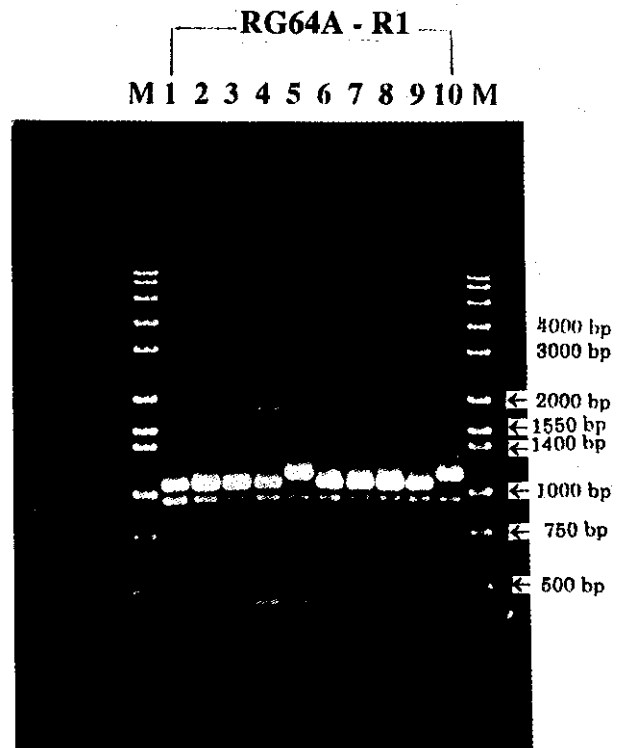
- Điện di và đọc kết quả PCR: Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Mẫu ADN (sản phẩm PCR) được trộn đều với đệm nạp mẫu 3X trước khi nạp mẫu vào giếng. Thời gian điện di khoảng 2 giờ ở điện thế 80 V. Nhuộm ADN bằng EtBr, trong thời gian 30

phút. Rửa gel bằng nước cất trong 30 phút. Sau đó bản gel được quan sát và chụp ảnh dưới đèn tử ngoại.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phản ứng PCR của ADN genôm các dòng cây R₁ với cặp môi RG64A:

Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm các dòng cây thế hệ R₁ với cặp môi RG64A (ảnh 1) cho thấy có sự đa hình tương đối cao ở các dòng lúa mới chọn lọc. Có thể phân các dòng lúa nghiên cứu thành 5 nhóm dựa vào vị trí và số lượng các băng có điện di đồ như sau:



Ảnh 1. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thế hệ R₁ với cặp môi RG64A

Chú thích (ảnh 1, 2, 4, 5)

- Dòng cây tái sinh từ mô nuôi cấy in vitro không xử lý dịch nấm: số 1 (ĐC1)
- Hai dòng chọn từ mô xử lý 40% dịch nấm: số 2 = BR41 số 3 = BR77
- Năm dòng chọn từ mô xử lý 50% dịch nấm số 4 = BR3 số 5 = BR12 số 6 = BR16 số 7 = BR18 số 8 = BR30
- Giống lúa CR203 nguyên chủng số 9 (ĐC2)
- Cây lúa C101 A51 mang gien kháng Pt-2(t)-số 10 (ĐC3)
- M-Market (thang chuẩn)

Dòng BR3 có 4 băng: 1800, 1.100, 900 và 450 bp, giống như CR203 nguyên chủng (ĐC2) và dòng từ mô không xử lý dịch nấm (ĐC1) nhưng khác với C101A51 (ĐC3) và khác với các dòng khác có xử lý DN.

Dòng BR41 chọn từ mô sẹo xử lý 40% dịch nấm, có ba băng: 1.100 900 và 450 bp giống như dòng BR77, nhưng khác với dòng không qua xử lý DN (ĐC1), khác với hai cây kháng/nhiễm (ĐC3 và ĐC2) và khác với các dòng khác có xử lý dịch nấm.

Ba dòng BR16, BR18, BR30 giống nhau có hai băng là 1100 và 900 bp, nhưng khác với hai cây kháng và nhiễm, khác với dòng không qua xử lý DN, và khác với các dòng khác có dòng xử lý DN.

Dòng BR 12 có 3 băng là 1200, 900 và 450 bp, khác với dòng không qua xử lý DN, khác với hai cây kháng và nhiễm, và khác với tất cả các dòng còn lại. Còn giống C101A51 giống mang gen kháng Pi-2(t) có 2 băng là 1200 và 900 bp, khác biệt với cây nhiễm CR203, và khác với các dòng mới chọn lọc. C101A51 có 2 băng 1200 và 900 giống BR12.

Kết quả nhận được trên đây đã cho thấy điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thể hệ R₁ có sự khác nhau tương đối lớn giữa các dòng, xét ở mức độ từng băng riêng biệt thì có dòng BR12 có 2 băng 1200 và 900 bp giống với cây kháng C101A51, đặc biệt băng 1200 bp là băng đặc thù cho gen Pi-2(t).

Dòng qua nuôi cấy in vitro nhưng không qua xử lý dịch nấm (ĐC1), và dòng qua xử lý 50% DN (BR3) có các băng tương tự cây nhiễm CR203.

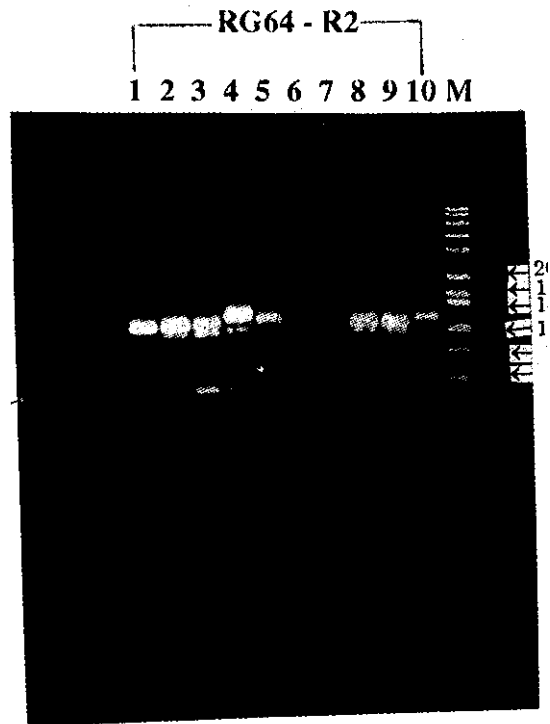
Bảy dòng khác qua xử lý DN có sự sai khác ở các phân đoạn ADN so với cây nhiễm CR203, và giữa chúng cũng có sự khác nhau.

Những kết quả nhận được trên đây chứng tỏ rằng các dòng mô sẹo lúa sau

khí xử lý dịch nấm có những biến đổi lớn về cấu trúc phân tử ADN.

2. Kết quả phản ứng PCR của ADN genôm lúa th R₂ với cặp mồi RG64A:

Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa th R₂ với cặp mồi RG64A (ảnh 2) cho thấy ba dòng có : DN (BR41, BR77, BR30) có các băng 1100, 1000 và bp giống như ĐC1 và ĐC2.



Ảnh 2. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thể hệ R₂ với cặp mồi RG-64A

Dòng BR3 có 3 băng là 1300 bp, 1000 và 450 bp với các dòng khác, và khác với hai cây kháng/nhiễm (ĐC3 và ĐC2).

Hai dòng BR12 và BR16 giống nhau có 1 băng nhất là 1200 bp giống với cây kháng C101A51, nl dòng BR16 băng mờ, có thể do lượng copy nhỏ dòng BR12.

Như vậy ở thể hệ R₂ có hai dòng qua xử lý dịch (BR12 và BR16) có các băng giống với cây C101A51 (ĐC3).

Dòng không qua xử lý dịch nấm (ĐC1) giống r nhiễm CR203 (ĐC2).

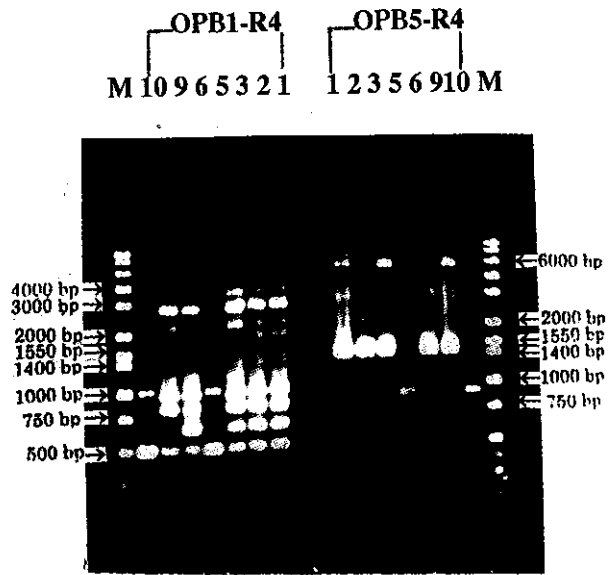
5. Kết quả điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thể hệ R₄ với 2 cặp mồi OPF6A và OPH18A:

Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thể hệ R₄ với mồi OPF6A và OPH18A (ảnh 5) mỗi mồi chỉ có một băng nhìn thấy rõ và không cho sự đa hình giữa các dòng/giống lúa thí nghiệm. Đây là sự giống nhau về độ dài các băng có trên điện di đồ, nhưng có thể các băng này có sự khác nhau về trình tự nucleotit. Để phân biệt sự khác nhau giữa các băng này có thể phải sử dụng các kỹ thuật cắt hạn chế bằng enzym giới hạn, và kỹ thuật xác định trình tự của các đoạn băng trên.

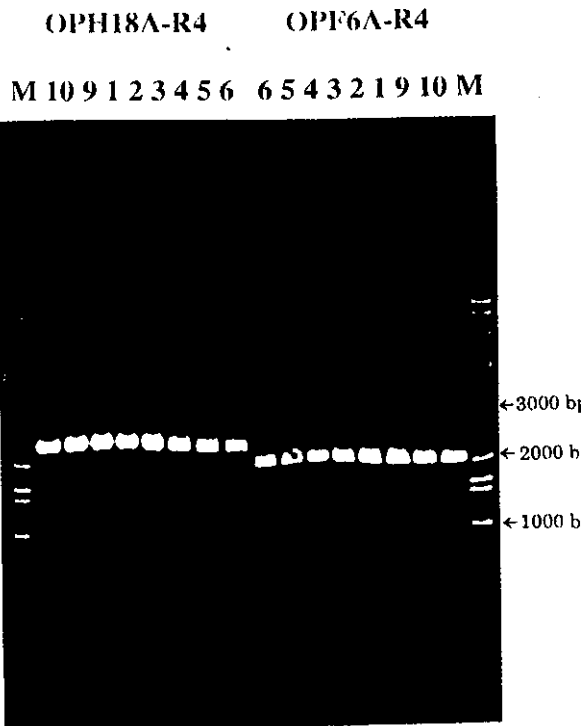
Các kết quả nhận được từ các điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thể hệ R₁, R₂, R₃, R₄ với các mồi STS và RAPD đã cho thấy sự đa hình phân tử ở các dòng lúa lớn nhất ở thế hệ R₁, đến thế hệ R₂ các băng cho sự đa hình ít hơn thế hệ R₁, và ổn định dần ở thế hệ R₃ và R₄. Sự biến động về phân tử trên đây của các dòng lúa mới chọn lọc ở các thế hệ cũng tương tự như sự biến đổi một số đặc điểm hình thái và mức độ kháng bệnh đạo ôn ở các dòng lúa này trong công bố trước đây [13, 14].

Các dòng lúa mới chọn lọc BR1, BR18, BR30, BR77, BR41, BR12 đã được triển khai ra sản xuất ở một số vùng thường xảy ra dịch bệnh như Hà Tây, Bắc Giang, Thái Bình, Yên Bái, Hà Nội, kết quả cho thấy chúng không bị nhiễm bệnh đạo ôn trên đồng ruộng, hạt chín đều, năng suất cao hơn hoặc bằng CR203 nguyên chủng. Các dòng lúa trên cũng đã được kiểm tra tính kháng bệnh đạo ôn bằng các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo trong nhà kính, kết quả có 5 dòng BR16, BR18, BR30, BR77, BR41 đạt tỉ lệ cây kháng cao (trên 50% cây kháng trên tổng số các cây lây nhiễm), đặc biệt có dòng BR12 là dòng có 100% cây kháng với nấm bệnh lây nhiễm *P. oryzae* và được đánh giá là dòng kháng bệnh đạo ôn ở

mức quần thể, các kết quả trên đã được công bố [13, 14]



Ảnh 4. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thể hệ R₄ với mồi OPB1 và OPB5



Ảnh 5. Điện di đồ sản phẩm PCR của ADN genôm lúa thể hệ R₄ với mồi OPH18A, OPF6A

III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nhận được trên đây, và một số kết quả đã công bố [13, 14], chúng tôi có một số nhận xét và kết luận như sau:

1. Dòng cây tái sinh từ mô sẹo qua nuôi cấy in vitro của giống lúa CR203 nhưng không qua xử lý dịch nấm không có sự biến đổi về phân tử so với cây nhiễm bệnh đạo ôn CR203 nguyên chủng.

2. Các dòng lúa tái sinh từ mô sẹo nuôi cấy in vitro của giống lúa CR203 có xử lý với dịch nấm gây bệnh đạo ôn có những biến đổi về phân tử ADN.

3. Di truyền phân tử ở các dòng lúa tái sinh từ mô kháng dịch nấm tương đối ổn định ở thế hệ R_1 và R_4 . Những biến đổi và ổn định về phân tử tương tự với những biến đổi và ổn định về hình thái và khả năng kháng bệnh đạo ôn ở các cây lúa tái sinh từ mô xử lý dịch nấm trong các thế hệ R_1 , R_2 , R_3 , R_4 . Sự ổn định được thể hiện ở mức độ như sau: $R_1 < R_2 < R_3 < R_4$.

5. Kết quả phân tích phân tử của các dòng lúa đã cho thấy có dòng BR12 mang băng 1200 bp, băng ADN liên kết với gen kháng đạo ôn Pi-2(t) và đã duy trì qua 4 thế hệ. Để khẳng định chắc chắn dòng BR12 mang gen kháng đạo ôn Pi-2(t), cần có những nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chen D. H., Delavitra M., Inukai T., Mackill D. J., Ronald R. C., Nelson R. J.**, 1999: Molecular mapping of the blast resistance gene, Pi-44(t), in a line derived from a durably resistant rice cultivar. *Theor Appl. Genet.* Vol. 98: 1046-1053.
2. **Chen X., Temnykh, S. Xu, Y. Cho, Y. G. McCouch S. R.**, 1997: Development of a microsatellite fram work map providing genome-wide coverage in vitro rice (*Oryza sativa*. L.) *Theor Appl. Genet.* Vol. 95: 553-567.
3. **Henry T. Nguyen**, 1998: Application of Molecular Markers to rice improvement. In the First National Meeting of Rice Biotechnology Network in Hue 5-6/5/1998. Abstract.
4. **Hittalmani S., Foolab M. R., New T., Rodriguez R. L., Huang N.**, 1995: Development of a PCR-based marker to identified rice blast resistance gene, Pi-2(t), in a segregating population. *Theor Appl. Genet.* Vol. 91: 9-14.
5. **Inoue T., Zhong H. S., Miyao A., Ashikaw I., Monna L., Fuluoka S., Miadera N., Nagamura Y., Kurata N., Sasaki T., Minobe Y.**: Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 89: 728-734.
6. **Mackill D. J., and Bonman J. M.**, 1992: Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology* 82: 746-749.
7. **Mackill D., Zhang Z., Redona E., Colowit P.**, 1996: Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome.* Vol. 39: 969-977.
8. **McCouch S. R., Chen X., Xu Y., Cho Y. G., Hoang N., Ishu T., Lair M.**, 1997: Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. *Plant Mol Biol.* Vol.35: 89-99.
9. **Naqvi N. I., Bonman M., Mackill D. J., Nelson R. J., Chattoo B.B.**, 1995: Identification of RAPD markers linked to a major blast resistance gene in rice. *Mol. Breed.* Vol. :341-348.
10. **Tragoonrung S., Kanazin V., Hayes P. M., and Blake T. K.**, 1992: Sequence-tagged-site facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 84: 1002-1008.
11. **Wang G. L., Mackill D. J., Bonman J. M., McCouch S. R., Champoux M. C., and Nelson R. J.**, 1994: RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics*, 136: 1421-1434.
12. **Zhu L., Chen Y., Ling Z., Xu Y., Xu J.**, 1993: Identification of molecular markers

- linked to a blast resistance gene in rice in: You CB, Chen ZL Agric Biotechnol. China Science and Technology Press, Beijing, China. P: 213.
13. **Phan Thị Bẩy, Lê Thị Muội, Nguyễn Đức Thành**, 1997: Kết quả kiểm tra tính kháng đạo ôn ở một số dòng lúa tái sinh từ các mô
- kháng dịch nấm *P. oryzae*. Kỷ yếu Viện CNSH 1998: 253-258.
14. **Phan Thị Bẩy, Lê Thị Muội, Nguyễn Đức Thành**, 1999: Sự biến động một số đặc điểm nông sinh học và khả năng kháng bệnh đạo ôn của các dòng lúa chọn lọc từ mô kháng dịch nấm đạo ôn. Hội nghị CNS toàn quốc tháng 12 năm 1999: 827-836.

MOLECULAR VARIATIONS OF LINES RESISTED TO RICE BLAST FUNGI

PHAN THI BAY, et al

SUMMARY

In an attempt to produce rice cultivars resisted to blast disease, we have applied the method of in vit treatment of the tissue and the cells from CR203 cultivar with culture filtrate of *P.oryzae*. The results on t selection of culluscs resisted to *P. oryzae* fungal filtrate, and the results on the test for blast resistance and t variation in agro-biological traits in R₁, R₂, R₃ and R₄ plants have been reported in previous papers (Bay et 1999; Bay et al., 2000).

In this paper, the results on molecular variations of previous obtained rice lines are presented. Molecu analyses of rice lines were performed by PCR amplificatioin technique using STS-specific primers (RG6⁺ linked to pi-2(r) gene, OPF6A and OPH18A linked to Pi-10(t) gene) and RAPD primers (OPB1 and OPB PCR products were run on 1% agarose gel to detect genetic polymorphisms in rice lines.

The obtained results in this study showed that moleculaer variations in R₁, R₂ rice lines were very hi and were stablized in R₃, R₄. Finally, one selected line showed the same DNA patterns as C101A51 (resist: cultivar), especially, the same DNA patters in this line and C101A51 obtained using STS primer RG6⁺ linked to Pi-2(t) indicated that this line and C101A51 obtained using STS primer GR64A linked to Pi-2 indicated that this line may contain Pi-2(t) gene for blast resistance.

Ngày nhận bài: 22-11-20