

SÀNG LỌC NGUỒN GEN LÚA ĐỊA PHƯƠNG CÓ KHẢ NĂNG MANG GEN KHÁNG ĐẠO ÔN, RẦY NÂU, BẠC LÁ BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ LIÊN KẾT VỚI GEN MỤC TIÊU

Hoàng Thị Huệ¹, Hà Minh Loan^{1*}, Lê Thị Thu Trang¹, Đàm Thị Thu Hà¹, Lê Tuấn Nghĩa¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã sử dụng chỉ thị SSR liên kết với gen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá để bước đầu sàng lọc khả năng mang gen kháng của 90 nguồn gen lúa địa phương. Kết quả khảo sát cho thấy, 2 chỉ thị RM1337 và RM7012 liên kết chặt với gen kháng đạo ôn *Pi20(t)* và *Pita* có khả năng phân biệt đa hình giữa các giống lúa sử dụng trong nghiên cứu; hai chỉ thị RM119 và RM6997 liên kết với gen kháng rầy nâu *Bph6* cho băng ADN đa hình, có khả năng phân biệt giữa các mẫu giống và giữa mẫu giống nghiên cứu với giống đối chứng. Chỉ thị RM20590 liên kết chặt với gen kháng bạc lá *Xa7* cho kết quả đa hình rõ rệt giữa các mẫu giống nghiên cứu với giống đối chứng. Trong tổng số 90 mẫu giống, nghiên cứu đã xác định được 27 mẫu giống có khả năng mang gen kháng, trong đó: 11 mẫu giống có khả năng mang gen kháng đạo ôn; 9 mẫu giống có khả năng mang gen kháng rầy nâu; 3 mẫu giống có khả năng mang gen kháng bạc lá và đặc biệt có 3 mẫu giống mang 2 gen kháng như B'le la (SĐK 2629) có khả năng mang gen kháng đạo ôn *Pita* và bạc lá *Xa7*; Bao thai hồng (SĐK 7313), IR 504 mười lù (SĐK 12106) có khả năng mang gen kháng đạo ôn *Pita*, *Pi20(t)* và rầy nâu *Bph6*; riêng mẫu giống Ble mùa chua (SĐK 12383) có khả năng mang cả 3 gen kháng đạo ôn *Pi20(t)*, rầy nâu *Bph6* và bạc lá *Xa7*. Các thí nghiệm đánh giá kiểu hình tính kháng và phân tích kiểu gen sẽ tiếp tục được tiến hành để xác định chính xác sự có mặt của các gen kháng trong các mẫu giống lúa địa phương nghiên cứu.

Từ khóa: Chỉ thị SSR, kháng bạc lá, kháng đạo ôn, kháng rầy nâu, lúa địa phương.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, bệnh hại ngày càng trở nên phổ biến ở hầu hết các loại cây trồng, đặc biệt là bệnh đạo ôn, rầy nâu, bạc lá ở cây lúa - một trong những loại cây trồng chính của nền nông nghiệp Việt Nam. Trong sản xuất lúa, đạo ôn, rầy nâu, bạc lá xuất hiện trên đồng ruộng thường xuyên, ở nhiều giống lúa khác nhau, gây thiệt hại nặng đến năng suất và chất lượng gạo. Nhằm đảm bảo sản xuất, hiện nay nông dân chủ yếu sử dụng biện pháp hóa học để phun phòng trừ các bệnh này định kỳ; chính vì vậy, môi trường bị ô nhiễm, mất cân bằng sinh thái, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người, cũng như làm tăng chi phí sản xuất. Khắc phục tình trạng này, việc

tạo ra các giống kháng bệnh sẽ là một trong những phương pháp hữu hiệu để tiến đến sản xuất lúa an toàn cho người sản xuất và tiêu dùng.

Các nghiên cứu trước đây đều cho thấy, Việt Nam là một trong những trung tâm khởi nguyên của cây lúa, các nguồn gen lúa địa phương mang nhiều đặc tính quý, đặc biệt là tính kháng sâu, bệnh (đạo ôn, rầy nâu, bạc lá,...) là nguồn vật liệu quan trọng cho công tác chọn tạo giống. Mặc dù, nhiều nghiên cứu tiến hành đánh giá, khảo sát khả năng kháng bệnh (đạo ôn, rầy nâu, bạc lá) của các giống lúa địa phương đã được triển khai thực hiện trong nhiều thập kỉ qua, nhưng số lượng nguồn gen lúa cần được đánh giá phát hiện gen kháng còn rất lớn, đồng thời nhiều giống lúa mang gen kháng đã phát hiện vẫn chưa được khai thác và phát triển. Do đó, nghiên cứu và khai thác các giống lúa này còn rất nhiều tiềm năng, nhất là

¹ Trung tâm Tài nguyên thực vật

* Email: loanhm@gmail.com

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

công tác sàng lọc phát hiện nguồn gen kháng, tạo vật liệu khởi đầu cho chọn tạo giống lúa kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

+ 90 mẫu giống lúa đang được lưu giữ trong ngân hàng gen cây trồng quốc gia (Bảng 1) và 3 giống đối chứng gồm: IR24 (kháng đạo ôn) [1], Swanatara (kháng rầy nâu) [2], DV85 (kháng bạc lá) [3].

+ Chỉ thị SSR liên kết với gen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá (Bảng 2).

Bảng 1. Danh sách các mẫu giống lúa địa phương sử dụng trong nghiên cứu

STT	KH mẫu	SDK	Tên giống	Nơi thu (Tỉnh/thành phố)	STT	KH mẫu	SDK	Tên giống	Nơi thu (Tỉnh/thành phố)
1	1	8	Súng lùn Bắc Giang	Bắc Giang	46	48	8609	Plê plậu xá	Nghệ An
2	2	11	Tép Hải Phòng	Hải Phòng	47	49	9412	Kháu trăm	Thanh Hoá
3	3	15	Câu Hải Phòng	Hải Phòng	48	50	9868	Bao thai hồng	Bắc Giang
4	4	25	Châu sớm Hải Phòng	Hải Phòng	49	51	12106	IR 504 mười lù	Kiên Giang
5	5	1376	Hưng sớm Thanh Hoá B	Bắc Kạn	50	52	12108	Plea đơ	Nghệ An
6	6	1380	Hà tàu Hải Ninh B	Bắc Kạn	51	53	12109	Plea châu đỏ	Nghệ An
7	7	1385	Pha phối B	Bắc Kạn	52	54	12112	Plea khí gia	Nghệ An
8	8	1387	Sớm mừng B	Bắc Kạn	53	55	12114	Plea khi gia	Nghệ An
9	9	1388	Mộ trắng Bảo Thắng B	Bắc Kạn	54	56	12117	Plea plậu lia	Nghệ An
10	10	1410	Kén trắng	Yên Bái	55	58	12123	Kháu moòng	Nghệ An
11	11	1421	Đoàn kết	Bắc Kạn	56	59	12124	Kháu sàng	Nghệ An
12	12	1422	Khẩu pe lạnh	Bắc Kạn	57	60	12125	Kháu hin	Nghệ An
13	13	1426	Khẩu cây	Cao Bằng	58	61	12126	Kháu vải	Nghệ An
14	14	1427	Nếp con	Cao Bằng	59	62	12127	Kháu chạo	Nghệ An
15	15	1432	Lốc lạo	Bắc Giang	60	63	12128	Kháu mường lũng	Nghệ An
16	16	1433	Khẩu lải	Bắc Giang	61	64	12129	Ngo chừ ngan	Nghệ An
17	17	1810	Lúa lốc	Yên Bái	62	65	12131	Ngo pòm	Nghệ An
18	18	1846	Lúa mô đỏ	Hà Giang	63	66	12132	Ngo pây	Nghệ An

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

STT	KH mẫu	SĐK	Tên giống	Nơi thu (Tỉnh/thành phố)	STT	KH mẫu	SĐK	Tên giống	Nơi thu (Tỉnh/thành phố)
19	19	1850	Mộ hồng	Hà Giang	64	67	12137	Lúa cẩm	Nghệ An
20	20	1913	Bèo cần cừu	Lạng Sơn	65	69	12313	Khẩu lếch	Sơn La
21	21	1933	Đoàn kết trắng	Cao Bằng	66	71	12341	Khẩu sẻ Thái Lan	Điện Biên
22	23	1980	Nếp nương cẩm	Lào Cai	67	72	12343	Ngọ nia	Điện Biên
23	24	1990	Ne nương	Lào Cai	68	73	12344	Khẩu chin	Điện Biên
24	25	2002	Tan pôm	Lai Châu	69	74	12345	Khẩu đương phồng	Điện Biên
25	26	2044	Má cha	Lào Cai	70	75	12346	Khẩu cđin đen	Điện Biên
26	27	2048	Plau sang	Lào Cai	71	76	12347	Tẻ đỏ	Điện Biên
27	28	2389	IR 1561	Cao Bằng	72	77	12351	Khẩu lớn ngàn	Điện Biên
28	29	2590	Khẩu sen păn	Lai Châu	73	79	12357	Ble sua thái	Điện Biên
29	30	2591	Khẩu đo đeng	Lai Châu	74	80	12360	Ble blẩu xá	Điện Biên
30	31	2598	Hồng cù	Lai Châu	75	81	12361	Ble tấu sua	Điện Biên
31	32	2620	B'lầu mặc	Lai Châu	76	82	12364	Ble tậu	Điện Biên
32	33	2629	B'le la	Lai Châu	77	84	12368	Co ne ne	Điện Biên
33	34	3581	Plẻ hể chủ	Yên Bái	78	87	12372	Ble blẩu sáng	Điện Biên
34	35	3585	Plẻ cha	Yên Bái	79	88	12373	Ble blẩu phủa đỏ	Điện Biên
35	36	3594	Plẩu mù đề	Yên Bái	80	89	12377	Khẩu cái ca	Điện Biên
36	37	3595	Chi chua	Yên Bái	81	90	12378	Khẩu tan	Điện Biên
37	38	4025	Xèo mà làng dạng 2	Lào Cai	82	91	12380	Khẩu chin đăm	Điện Biên
38	39	4113	Khẩu pét	Cao Bằng	83	92	12383	Ble mùa chua	Điện Biên
39	40	5013	Khẩu chằm cẳm	Nghệ An	84	93	12385	Ble blẩu chur ha	Điện Biên
40	41	6380	Nếp riêng	Bắc Giang	85	94	12390	Ble mùa chua	Điện Biên
41	43	7184	Khẩu dảng	Thanh Hoá	86	95	12391	Ble blẩu che	Điện Biên
42	44	7313	Bao thai hồng	Bắc Giang	87	96	12393	Ble chua chur ha	Điện Biên

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

STT	KH mẫu	SĐK	Tên giống	Nơi thu (Tỉnh/thành phố)	STT	KH mẫu	SĐK	Tên giống	Nơi thu (Tỉnh/thành phố)
43	45	7627	Bèo toin dạng 2	Bắc Kạn	88	97	12397	Ngọ pom lái	Điện Biên
44	46	7645	Bao thai lùn	Bắc Giang	89	98	12399	Khẩu pỏm	Điện Biên
45	47	7725	Plẻ đỏ	Thanh Hoá	90	100	12414	Ble blẩu liét	Điện Biên

Ghi chú: KH: Kí hiệu, SDK: Số đăng kí

Bảng 2. Danh sách các chỉ thị SSR liên kết với gen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá sử dụng trong nghiên cứu

STT	Chỉ thị	NST	Gen	Khoảng cách di truyền (cM)	Nhiệt độ gần môi (°C)	Tài liệu tham khảo
Chỉ thị liên kết với gen/QTL kháng đạo ôn						
1	JJ113-T3	9	<i>Pi-5</i>	0	55	[4]
2	RM208	2	<i>Pi-b</i>	1,2	57	[5]
3	RM527	6	<i>Piz-5</i>	0,3	55	[6]
			<i>Pi-d(t)</i>	3,2		[7]
			<i>Pi-z</i>	1,8/0,7		[6]
4	RM7102	12	<i>Pita</i>	0,2	55	[8]
5	RM1337	12	<i>qLS12</i>	0,01	55	[9]
			<i>Pi20(t)</i>	0		[1]
Chỉ thị liên kết gen kháng rầy nâu						
1	RM3134	3	<i>bph19</i>	0,8	50	[10]
2	RM261	4	<i>Bbp12(t)</i>	1,8	55	[11]
3	BYL7	6	<i>bph20(t)</i>	1,3	57	[12]
4	RM6997	6	<i>Bph6</i>	0	50	[2]
5	RM119	6	<i>Bph6</i>	0,93	67	[2]
Chỉ thị liên kết với gen kháng bạc lá						
1	pTA248		<i>Xa21</i>	0		[13]
2	RM20590	6	<i>Xa7</i>	0	55	[3]
3	RM122	5	<i>xa5</i>	0,4	55	[14]
4	RM224	11	<i>Xa26 (t)</i>	0,21	55	[15]
5	RM2136	11	<i>Xa36(t)</i>	3,2	55	[16]

Ghi chú: NST: Nhiễm sắc thể.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN từ lá non của các mẫu giống lúa và tinh sạch theo phương pháp của Doyle J. J. và J. L. Doyle (1990) [17] có cải tiến; kiểm tra nồng độ bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và máy Nanodrop Lite.

Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96 well Thermal cycler. Tổng dung dịch phản ứng là 20 µl bao gồm: 9,9 µl H₂O khử ion; 2 µl PCR buffer 10x; 1,6 µl dNTP 2,5 mM; 1,4 µl primer 25 ng/µl; 0,1 µl green Taq (5U/µl); 5 µl ADN (5 ng/µl). Điều kiện phản ứng: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ của 94°C trong 1 phút, T_a trong 1 phút (T_a là nhiệt độ gắn mỗi SSR sử dụng); 72°C trong 7 phút, bảo quản ở 4°C.

Điện di và phát hiện sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide 8% và máy soi UV

Transilluminator. Hình ảnh điện di sẽ được phân tích để sàng lọc mẫu giống lúa có khả năng mang gen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

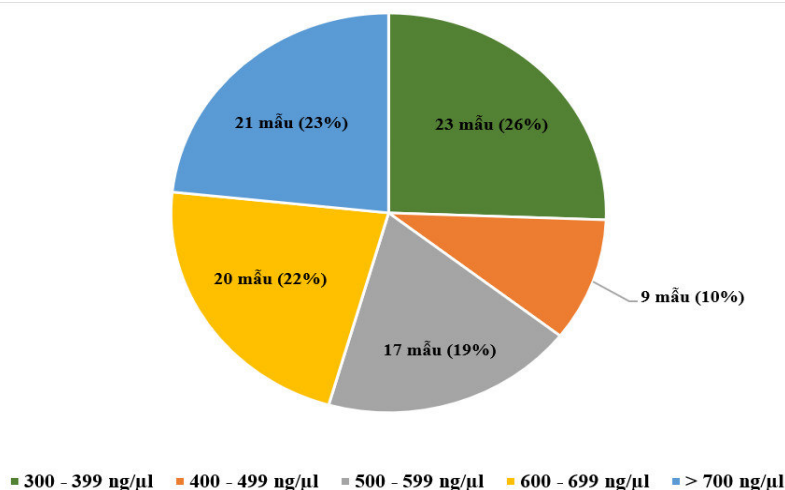
Thời gian nghiên cứu: Năm 2021.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Bộ môn Đa dạng sinh học Nông nghiệp, Trung tâm Tài nguyên thực vật.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số của các mẫu giống lúa nghiên cứu

90 mẫu giống lúa nghiên cứu và 3 giống đối chứng được tiến hành tách chiết ADN, kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng máy quang phổ NanoDrop ở bước sóng OD₂₆₀/OD₂₈₀. Kết quả thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Dữ liệu thống kê mức nồng độ ADN đạt được của các mẫu giống lúa nghiên cứu

Theo kết quả đo nồng độ ADN, các mẫu giống nghiên cứu có nồng độ ADN trong khoảng 304,4 - 794,5 ng/µl, trong đó 23 mẫu có nồng độ ADN từ 300 ng/µl đến dưới 400 ng/µl, chiếm 26%. Số lượng mẫu có nồng độ ADN trong khoảng 400 ng/µl đến dưới 500 ng/µl, chiếm tỉ lệ thấp nhất với 10% tương đương với 9 mẫu.

Các mẫu ADN đã tách chiết thu được đều có tỉ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ nằm trong khoảng 1,8 - 2,0 đảm bảo độ nguyên vẹn và tinh sạch, hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu cho phản ứng PCR để xác định

nguồn gen lúa có khả năng mang gen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá.

3.2. Kết quả sàng lọc nguồn gen lúa địa phương có khả năng mang gen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá bằng chỉ thị phân tử liên kết với gen mục tiêu

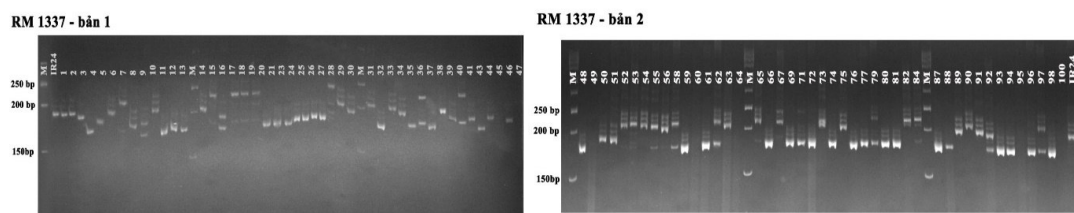
3.2.1. Sàng lọc nguồn gen lúa địa phương có khả năng mang gen kháng bệnh đạo ôn

Để sàng lọc khả năng mang gen kháng đạo ôn của các mẫu giống lúa nghiên cứu, các chỉ thị liên kết chặt với các gen kháng đạo ôn (Bảng 2) được

sử dụng để thực hiện phản ứng PCR. Kết quả đã xác định được 2 chỉ thị nằm trên nhiễm sắc thể số 12 là RM1337 và RM7012 có khả năng phân biệt đa hình giữa các giống lúa trong nghiên cứu. Trong đó, chỉ thị RM1337 liên kết với gen *Pi20(t)* và qLS12 với khoảng cách di truyền tương ứng là 0 và 0,01 cM; chỉ thị RM7102 liên kết với gen *Pi48* và *Pi20(t)* với khoảng cách di truyền tương ứng là 0,2 và 0 cM [18], [1]. Đồng thời, theo nghiên cứu của Hayashi và cs (2006) [19], Fjellstrom và cs (2004) [5], chỉ thị RM1337 liên kết với nhóm gen *Pita* và *Pita2* và chỉ thị RM7102 liên kết với nhóm gen *Pita* và *Pita2*.

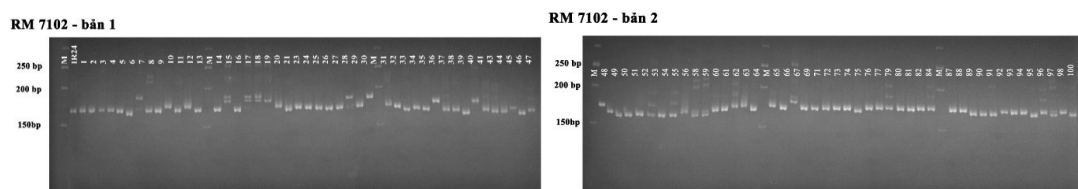
Kết quả so sánh băng ADN của 90 mẫu giống nghiên cứu với giống đối chứng IR24 trên hình 2

và 3 cho thấy, có 15 mẫu giống xuất hiện băng ADN có kích thước tương đương với giống đối chứng IR24 tại locut RM1337. Theo nghiên cứu của Li, W. và cs (2008) [1], giống lúa IR24 mang gen kháng đạo ôn *Pi20(t)*, do vậy kết quả sàng lọc cho thấy, các mẫu giống lúa địa phương như mẫu giống Súng lùn Bắc Giang (SĐK 8), Tép Hải Phòng (SĐK 11), Ne nương (SĐK 11), Ne nương (SĐK 1990),...và 8 mẫu giống xuất hiện alen trùng với IR24 tại locut RM7102 như mẫu giống Đoàn kết trắng (SĐK 1933), B'le la (SĐK 2629), Khẩu đáng (SĐK 7184), Bao thai hồng (SĐK 7313),... (Bảng 3) có khả năng mang các gen kháng đạo ôn tương ứng.



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với chỉ thị RM1337

Ghi chú: M: ladder 50 bp các mẫu được đánh dấu theo số kí hiệu (KH) mẫu - Bảng 1



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với chỉ thị RM7102

Ghi chú: M: ladder 50 bp các mẫu được đánh dấu theo số kí hiệu (KH) mẫu - Bảng 1

3.2.2. Sàng lọc nguồn gen lúa địa phương có khả năng mang gen kháng rầy nâu

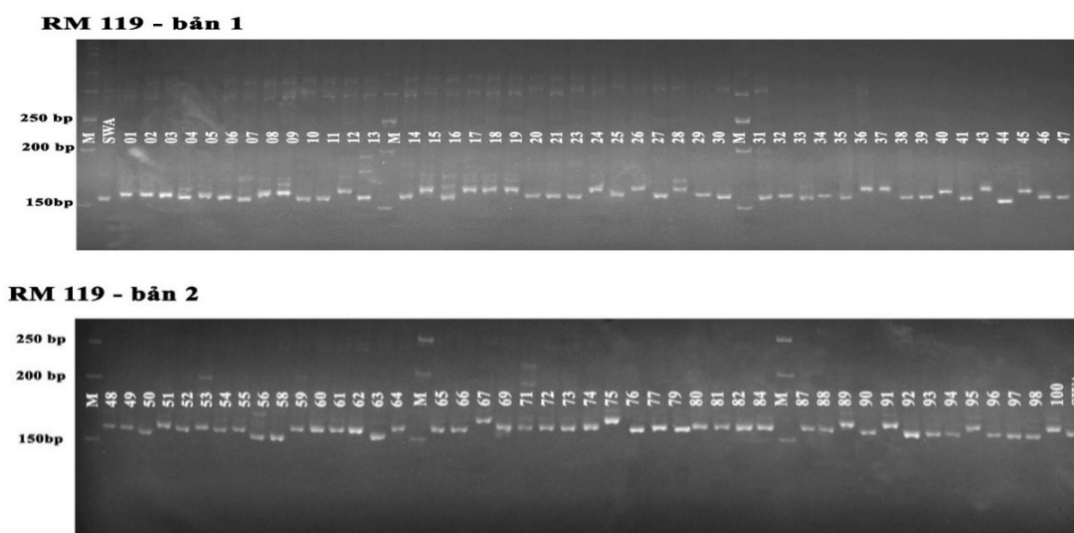
Việc nghiên cứu di truyền tính kháng rầy nâu đã được các nhà khoa học nghiên cứu từ rất sớm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, những giống lúa thuộc loài phụ *Indica* có khả năng kháng rầy nâu tốt hơn *Japonica* và cho tới nay, 37 gen kháng rầy nâu chính đã được xác định từ các giống lúa [20], [21]. Các chỉ thị liên kết chặt với các gen kháng rầy nâu đã có nhiều nghiên cứu công bố như: *Bph1*, *bph2*, *Bph3*, *bph4*, *bph5*, *Bph6*, *bph7*, *Bph8*,

Bph9, *Bph17*, *bph19*, ... Các chỉ thị này có thể sử dụng cho chọn lọc giống, lai tạo giống mới [22], [23], [24], [10].

Trong nghiên cứu này, đã sử dụng 5 chỉ thị liên kết với gen kháng rầy nâu (Bảng 2) để tiến hành khảo sát 90 mẫu giống lúa địa phương, nhằm sàng lọc các mẫu giống có khả năng mang gen kháng. Kết quả cho thấy, chỉ thị RM119 và RM6997 cho băng ADN đa hình có khả năng phân biệt giữa các mẫu giống và giữa mẫu giống nghiên cứu với giống đối chứng (Hình 4, 5). Nghiên cứu

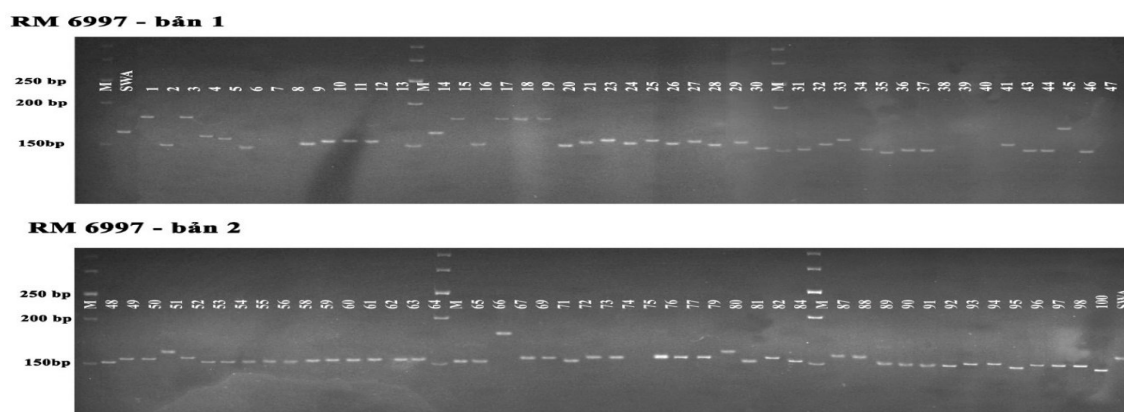
của Qiu Yongfu và cs (2010) [2] cho thấy, gen kháng rầy nâu *Bph6* được xác định vị trí trên vai dài giữa hai chỉ thị phân tử RM6997 và RM5742

trên nhiễm sắc thể số 4, đồng thời cũng chỉ ra chỉ thị RM119 đồng phân li cùng với gen *Bph6*.



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với chỉ thị RM119

Ghi chú: M: ladder 50 bp các mẫu được đánh dấu theo số kí hiệu (KH) mẫu - Bảng 1



Hình 5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với chỉ thị RM6997

Ghi chú: M: ladder 50 bp các mẫu được đánh dấu theo số kí hiệu (KH) mẫu - Bảng 1

90 mẫu giống nghiên cứu được phân tích bằng ADN xuất hiện trên gel và so sánh với băng ADN của giống đối chứng Swarnalata. Theo nghiên cứu của Khush G.S. và Brar D.S. (2001) [25], Liu Y và cs (2009) [26], giống Swarnalata có mang gen kháng rầy nâu *Bph6*. Vì vậy, các mẫu giống có

xuất hiện băng ADN có kích thước tương đương với giống đối chứng Swarnalata có khả năng mang gen kháng rầy nâu *Bph6* ở vị trí 165 bp với chỉ thị RM6997 hoặc 156 bp với chỉ thị RM119. Kết quả phân tích với chỉ thị RM119 đã cho thấy, 9 mẫu giống xuất hiện băng ADN ở vị trí khoảng 156 bp

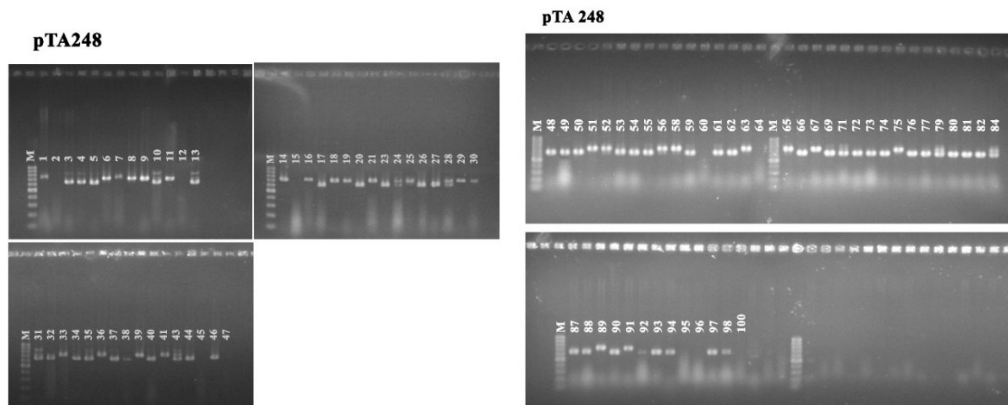
trương đương với đối chứng Swarnalata gồm: Pha phổi B (SDK 1385), Mộ trắng Bảo Thắng B (SDK 1388), Kén trắng (SDK 1410), Bao thai hồng (SDK 1385), Bao thai hồng (SDK 9868), Ble mùa chua (SDK 12383), Ble blâu chur ha (SDK 12385), Ble mùa chua (SDK 12390), Ble chua chur ha (SDK 12393) (Hình 4). Đồng thời, tại locut RM6997, nghiên cứu đã xác định được 3 mẫu giống có xuất hiện băng ADN tương đương với đối chứng Swarnalata ở vị trí khoảng 165 bp gồm: Nếp con (SDK 1427), IR 504 mười lù (SDK 12106), Ble blâu xá (SDK 12360) (Hình 5).

Như vậy, nghiên cứu đã sàng lọc được 12 mẫu giống có khả năng mang gen kháng rầy nâu *Bph6* (Bảng 3). Mặc dù theo thời gian độc tính của rầy nâu đã thay đổi và ngày càng tăng thêm với mức độ nhiễm rầy nâu trên các giống lúa thí nghiệm ngày càng tăng, tuy nhiên 9 gen kháng như: *Bph3/Bph17*, *Bph6*, *Bph9*, *Bph14*, *Bph15*, *Bph18*, *Bph26*, *Bph29* và *Bph32* vẫn là các gen tiềm năng để sử dụng trong nhân giống nhờ chỉ thị phân tử

và sàng lọc các mẫu giống có tính kháng rầy nâu bền vững [27].

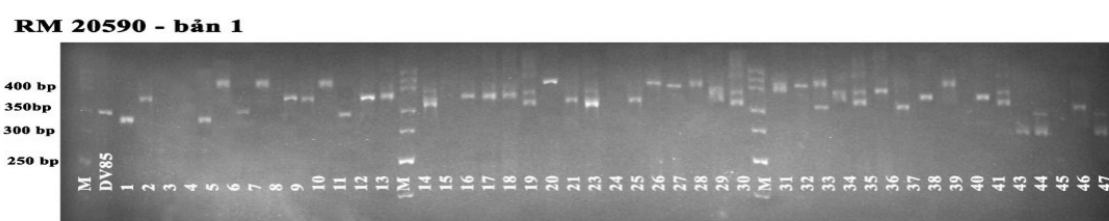
3.2.3. Xác định nguồn gen lúa địa phương có khả năng kháng bệnh bạc lá

Hiện nay, theo các nghiên cứu đã công bố, có khoảng 44 gen kháng bạc lá đã được xác định [28], [29], [30], trong đó có 3 gen là *xa5*, *Xa7* và *Xa21* đã được xác định là các gen kháng hữu hiệu đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá ở miền Bắc Việt Nam [31]. Đây là 3 gen kháng rất có ý nghĩa trong việc sử dụng lai tạo, chọn lọc các giống lúa chống bệnh bạc lá. Đồng thời, từ các kết quả nghiên cứu trong nước, bước đầu có thể khẳng định các gen *Xa3*, *xa5*, *Xa7*, *Xa10*, *Xa13*, *Xa14* là các gen kháng thường có mặt trên các giống lúa địa phương ở Việt Nam [31], [32], [13],... Trong nghiên cứu này, đã sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen/QTL chống chịu bạc lá như: *Xa 21*, *Xa7*, *xa5*, *Xa26(t)*, *xa36(t)* (Bảng 2) để xác định các mẫu giống lúa mang gen kháng bạc lá phục vụ cho sản xuất và các nghiên cứu tiếp theo.

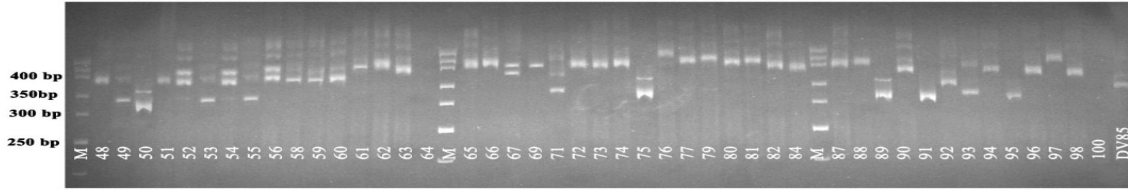


Hình 6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với chỉ thị pTA248

Ghi chú: M: ladder 100 bp các mẫu được đánh dấu theo số kí hiệu (KH) mẫu – Bảng 1



RM 20590 - bản 2



Hình 7. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với chỉ thị RM20590

Ghi chú: M: ladder 50 bp các mẫu được đánh dấu theo số kí hiệu (KH) mẫu - Bảng 1

Kết quả hình ảnh điện di sản phẩm PCR cho thấy, khi phân tích với chỉ thị pTA248 đặc hiệu cho gen kháng *Xa21*, các mẫu giống lúa không xuất hiện băng ADN tương đương với kích thước alen kháng (Hình 6). Trong khi đó, chỉ thị RM20590 liên kết chặt với gen *Xa7* [3] đã cho thấy, 5 mẫu giống xuất hiện băng ADN có kích thước tương đương giống đối chứng DV85 ở vị trí khoảng 347 bp gồm: Hà tàu Hải Ninh B (SDK 1380), B'le la (SDK 2629), Chi chua (SDK 3595), Bao thai lùn

(SDK 7645), Ble mùa chua (SDK 12383) (Hình 7). Nghiên cứu của Shen Chen và cs (2008) [3] cho thấy, giống DV85 mang gen kháng bạc lá *Xa7*. Như vậy, kết quả phân tích đã sàng lọc được 5 mẫu giống lúa có khả năng mang gen kháng bạc lá *Xa7*. Đây là nguồn vật liệu có tiềm năng cho công tác khai thác nguồn gen lúa địa phương kháng bệnh bạc lá trong bối cảnh các chủng nòi sinh thái bạc lá ở miền Bắc Việt Nam rất đa dạng và phong phú.

Bảng 3. Danh sách 27 mẫu giống lúa địa phương có khả năng mang các alen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá khi đánh giá bằng chỉ thị phân tử

SDK	8	11	1380	1385	1388	1410	1427	1933	1990	2002	2048	2629	3595	4113	6380	7184	7313	7645	9868	12106	12360	12383	12385	12390	12393	12397	12414
Tên giống	Súng lùn Bắc Giang	Tép Hải Phòng	Hà tàu Hải Ninh B	Pha phôi B	Mộ trắng Bảo Thắng B	Kén trắng	Nếp con	Đoàn kết trắng	Nè nương	Tan pôm	Pầu sang	B'le la	Chi chua	Khẩu pết	Nếp nặng	Khẩu dăng	Bao thai hồng	Bao thai lùn	Bao thai hồng	IR 504 mười lù	Ble biếu xá	Ble mùa chua	Ble biếu chừ ha	Ble mùa chua	Ble chua chừ ha	Ngo pom lái	Ble biếu liết
Đạo ôn	RM1337																										
	RM7102																										
Rầy nâu	RM119																										
	RM6997																										
Bạc lá	RM20590																										

Ghi chú:

☐ Không có khả năng mang alen kháng
☒ Có khả năng mang alen kháng

SDK: Số đăng ký

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tiến hành sàng lọc nguồn gen lúa địa phương có khả năng mang gen kháng đạo ôn, rầy nâu, bạc lá bằng chỉ thị phân tử. Kết quả sàng lọc 90 mẫu giống đã xác định được 27 mẫu giống mang gen kháng, trong đó: 11 mẫu giống có khả năng mang gen kháng đạo ôn; 9 mẫu giống có khả năng mang gen kháng rầy nâu; 3 mẫu giống có khả năng mang gen kháng bạc lá và đặc biệt có

3 mẫu giống mang 2 gen kháng như B'le la (SDK 2629) có khả năng mang gen kháng đạo ôn *Pita* và bạc lá *Xa7*; Bao thai hồng (SDK 7313), IR504 mười lù (SDK 12106) có khả năng mang gen kháng đạo ôn *Pita* và *Pi20(t)* và rầy nâu *Bph6*, riêng mẫu giống Ble mùa chua (SDK 12383) có khả năng mang gen mang cả 3 gen kháng đạo ôn *Pi20(t)*, rầy nâu *Bph6* và bạc lá *Xa7*. Việc xác định chính xác sự có mặt của các gen kháng trong nguồn gen

lúa bản địa sẽ có tiềm năng để ứng dụng trong chọn tạo giống lúa mang nhiều gen kháng, thích ứng với sự biến đổi nhanh chóng của các chủng gây bệnh tại các vùng sinh thái hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li, W., Lei, C., Cheng, Z. *et al.* (2008). Identification of SSR markers for a broad-spectrum blast resistance gene *Pi20(t)* for marker-assisted breeding. *Mol Breeding*, 22, 141 - 149. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9163-9>.
2. Qiu YF, Guo JP, Jing S. L, Zhu L. L, He GC. (2010). High-resolution mapping of the brown planthopper resistance gene *Bph6* in rice and characterizing its resistance in the 9311 and Nipponbare near isogenic backgrounds. *Theor Appl Genet*, 121: 1601 - 1611.
3. Shen Chen, Z. H., Liexian Zeng, Jianyuan Yang, Qionguang Liu, Xiaoyuan Zhu (2008). High-resolution mapping and gene prediction of anthomonas *Oryzae* pv. *Oryzaeresistance gene* *Xa7*. *Molecular Breeding*, 22 (3), pp. 433 - 441.
4. Yi G., Lee S. K., Hong Y. K., Cho Y. C., Nam M. H., Kim S. C., Jeon J. S (2004). Use of *Pi5(t)* markers in marker - assisted selection to screen for cultivars with resistance to magnaporthe grisea. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (5), pp. 978 - 985.
5. Fjellstrom, R., C. A. Conaway - Bormans, A. M. McClung, M. A. Marchetti, A. R. Shank and W. D. Park (2004). Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three Pi genes conferring resistance to multiple *Pyricularia* grisea pathotypes. *Crop Sci*, 44: 1790 - 1798.
6. Fjellstrom R., McClung A. M. and Shank A. R. (2006). SSR markers closely linked to the *Pi-z* locus are useful for selection of blast resistance in a broad array of rice germplasm. *Molecular Breeding*, 17 (2), pp. 149 - 157.
7. Chu Z., B. Fu, H. Yang, C. Xu, Z. Li, A. Sanchez, Y. J. Park, J. L. Bennetzen, Q. Zhang and S. Wang (2006). Targeting xa13, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theor. Appl. Genet*, 112: 455 - 461.
8. Conaway-Bormans C. A., Marchetti M. A., Johnson C. W., McClung A. M. and Park W. D. (2003). Molecular markers linked to the blast resistance gene *Pi-z* in rice for use in marker assisted selection. *Theor App. Genet*, 107, 1014 - 1020.
9. Wang Y, Wang D, Deng X, Liu J, Sun P, Liu Y, Huang H, Jiang N, Kang H, Ning Y, Wang Z, Xiao Y, Liu X, Liu E, Dai L, Wang G (2012). Molecular mapping of the blast resistance genes *Pi2-1* and *Pi51(t)* in the durably resistant rice 'Tianjingyeshengdao'. *Phytopathology*, 102 (8), pp. 779 - 786.
10. Chen J. W, Wang L, Pang XF, Pan QH (2006). Genetic analysis and fine mapping of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *bph19(t)*. *Mol Genet Genomics*, 275: 321 - 329.
11. Yang H., Ren X., Weng Q., Zhu L. and He G (2002). Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene. *Hereditas*, 136 (1), pp. 39 - 43.
12. L. Yang, R. B. L., Y. R. Li, F. K. Huang, Y. Z. Chen, S. Sh. Huang, L. F. Huang, Ch. Liu, Z. F. Ma, D. H. Huang, J. J. Jiang (2012). Genetic mapping of *bph20(t)* and *bph21(t)* loci conferring brown planthopper resistance to *Nilaparvata lugens* Stål in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 183 (2), pp. 161 - 171.
13. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Bá Ngọc, Khuất Thị Mai Lương, Phạm Thị Lý Thu, Lê Hùng Linh (2019). Xây dựng phương pháp xác định locus gen phục vụ cho công tác thử nghiệm và giám định gen ở cây lúa theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017. *Tạp chí Khoa học công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 3 (100), trang 1 - 6.
14. Siriporn Korinsak (2009). *Marker-Assisted Pyramiding Bacterial Blight Resistance Genes (xa5, Xa21, xa33(t), Xa34(t) and qBB11) in Rice*. Master of Science (Agricultural Research and Development); Major Field: Agricultural Research and Development, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Theerayut Toojinda, Ph.D. 134 pages.

15. Yang Z., Sun X., Wang S., Zhang Q. (2003). Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (8), pp. 1467 - 1472.
16. Miao LL, W. C., Zheng CK, Che JY, Gao Y, Wen YC, Li GQ, Zhao KJ (2010). Molecular mapping of a new gene for resistance to rice bacterial blight. *Sci Agric Sin*, 43, pp. 3051 - 3058.
17. Doyle, J. J. and Doyle J. L. (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*, 12, 13-15.
18. Huang H, Huang L, Feng G, Wang S, Wang Y, Liu J, Jiang N, Yan W, Xu L, Sun P, Li Z, Pan S, Liu X, Xiao Y, Liu E, Dai L, Wang G (2011). Molecular mapping of the new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local rice cultivar *Xiangzi 3150*. *Phytopathology*, 101 (5), pp. 620 – 626
19. Hayashi, K., H. Yoshida and I. Ashikawa (2006). Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Teor Appl Genet*, 113: 251-260.
20. Du B, Chen R Z, Guo J P, He G C (2020). Current understanding of the genomic, genetic, and molecular control of insect resistance in rice. *Mol Breeding*, 40 (2): 24.
21. Haliru B S, Rafii M Y, Mazlan N, Ramlee S I, Muhammad I I, Silas Akos I, Halidu J, Swaray S, Rini Bashir Y. (2020). Recent strategies for detection and improvement of brown planthopper resistance genes in rice: A review. *Plants*, 9 (9): 1202.
22. Rahman M L, Jiang W, Chu SH, Qiao Y, ham TH, woo MK, Lee J, Khanam MS, Chin JH, Jeung JU, Bra DS, Jena KK, Koh HJ (2009). High resolution mapping of two brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)*, *Bph21(t)*, originating from *Oryza minuta*. *Theor. Appl. Genet.* 119, pp. 1237-1246.
23. Yara A, Phi CN, Matsumura M, Yoshimura A, Yasui H (2010). Development of near-isogenic lines for *Bph25(t)* and *Bph26(t)*, which confer resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stall) in Indica rice 'ADR52'. *Breed Sci* 60: 639 - 647.
24. Sun LH, Su CC, Wang CM, Zhai HQ, Wan J. M. (2005). Mapping of a major resistance gene to the brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. *Breed Sci*, 55: 391 - 396.
25. Khush G. S., Brar D. S. (2001). Rice genetics from Mendel to functional genomics. *Rice Genet IV*, pp. 3-25.
26. Liu Y, Su C, Jiang L, He J, Wu H, Peng C, Wan J (2009). The distribution and identification of Brown planthopper resistance gene in rice. *Hereditas*, 146, pp. 67-73.
27. Muduli Lakesh, Kumar Pradhan Sukanta, Mishra Abinash, Nath Bastia Debendra, Chandra Samal Kailash, Kumar Agrawal Pawan, Dash Manasi (2021). Understanding Brown Planthopper Resistance in Rice: Genetics, Biochemical and Molecular Breeding Approaches. *Rice Science*, 28 (6): 532-546.
28. Busungu C., S. Taura, J.I Sakagami, and K. Ichitani (2016). Identification and linkage analysis of a new rice bacterial blight resistance gene from *XM14*, a mutant line from *IR24*. *Breeding Science*, 66 (4): 633-645.
29. Dilla-Ermita C. J, E. Tandayu, V. M. Juanillas, J. Detras, D. N. Lozada, M. S. Dwiyaniti, C. V. Cruz, E. G. Mbanjo, E. Ardales, M. G. Diaz, M. Mendioro (2017). Genome-wide association analysis tracks bacterial leaf blight resistance loci in rice diverse germplasm. *Rice*, 10:8. <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0147-4>.
30. Kim, S. M. (2018). Identification of novel recessive gene *Xa44(t)* conferring resistance to bacterial blight races in rice by QTL linkage analysis using an SNP chip. *Theoretical and Applied Genetics*, 131: 2733-2743.
31. Phan Hữu Tồn, Bùi Trọng Thủy (2004). Phân bố và đặc điểm gây bệnh của các chủng vi khuẩn bạc lá lúa miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 6: 832 - 835.

32. Dương Xuân Tú, Phạm Thiên Thành, Tăng Thị Diệp, Tống Thị Huyền, Lê Thị Thanh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Trí Hoàn (2018). Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60 (2), trang 59-64.

ESTIMATION OF RESISTANCE GENE FOR BLAST, BROWN PLANTHOPPER AND BACTERIAL LEAF BLIGHT IN LOCAL RICE VARIETIES BY USING MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH TARGET GENES

Hoang Thi Hue¹, Ha Minh Loan¹, Le Thi Thu Trang¹,

Dam Thi Thu Ha¹, La Tuan Nghia¹

¹Plant Resources Center

Summary

The study used SSR markers associated with resistance genes for blast, brown planthopper and bacterial leaf blight to initially estimate of resistance genes in 90 local rice varieties. The results indicated two markers named RM1337 and RM7012 closely associated with the blast resistance genes *Pi20(t)* and *Pita* and two markers RM119 and RM6997, linked to brown planthopper resistance genes *Bph6*, which was able to identify polymorphisms among varieties used in the study. RM20590 which closely associated with bacterial leaf blight resistance genes *Xa7* clearly showed polymorphism among the local rice varieties and control varieties. In total of 90 local varieties, the result estimated 27 rice accessions able to contain resistance genes: 11 accessions estimated containing blast resistance genes; 9 accessions estimated containing brown planthopper resistance gene; 3 accessions estimated containing bacterial leaf blight resistance gene. Three accessions estimated containing 2 resistance genes: (i) B'le la (No 2629) able to carry 2 resistance genes for blast *Pita* and bacterial leaf blight *Xa7*; (ii) Bao thai hong (No 7313) and IR 504 muoi lu (No 12106) able to carry resistance genes for blast *Pita* and *Pi20(t)* and brown planthopper *Bph6*; (iii) Ble mua chua (No12383) able to carry three resistance genes for blast *Pi20(t)*, brown planthopper *Bph6* and bacterial leaf blight *Xa7*. The experiments assess reaction patterns to blast, brown plant hopper and bacterial leaf blight and genotyping analyses will be necessary to confirm the presence of estimated resistance genes in these local rice accessions.

Keywords: *Bacterial leaf blight, blast, brown planthopper, local rice, resistance, SSR marker*

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Minh Nguyệt

Ngày nhận bài: 10/8/2023

Ngày thông qua phản biện: 29/10/2023

Ngày duyệt đăng: 30/10/2023