

DU NHẬP GIEN KHÁNG ĐẠO ÔN TỪ LOÀI LÚA HOANG SANG LÚA TRỒNG (*Oryza sativa* L.)

Nguyễn Thị Lang¹, Phạm Thị Thu Hà¹, Y. Fukuta³, Bùi Chí Bửu²

TÓM TẮT

Oryza rufipogon (2n=24), hệ gen AA, phân bố rộng khắp trên các vùng sinh thái Việt Nam. Một dòng dẫn xuất từ *O. rufipogon* có nguồn gốc ở Đồng Tháp Mười được khai thác thành công trong 20 năm qua là AS996 (mẹ là IR64, trong hồi giao nhờ chỉ thị phân tử). Nó là nguồn cho (donor) đối với tính kháng rầy nâu, đạo ôn và các tính trạng phi sinh học (abiotic) trong chương trình cải tiến giống lúa ở miền Nam. Sử dụng 38 chỉ thị SSR có tính đa hình đối với các gen kháng đạo ôn đã công bố để phân tích đa dạng di truyền quần thể vật liệu lúa hoang, lúa bản địa; ở chỉ số tương đồng 0,76, một vài mẫu *O. punctata-1*, *O. latifolia-1*, *O. nivara-1* phân bố trong cùng nhóm di truyền với Tè Tép, nguồn cho gen kháng đạo ôn nổi tiếng của Việt Nam. Dòng dẫn xuất từ loài *Oryza nivara* (Bà Rịa) được khai thác thành công tạo dòng lúa kháng đạo ôn. Số mẫu phân lập (isolate) nấm *Magnaporthe grisea* được thu thập ở ĐBSCL là 13 mẫu, với biểu hiện độc tính khác nhau, được sử dụng để đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh. Hai mẫu của *O. rufipogon* có gen *Pit* và *Pi20* kháng được tất cả các mẫu phân lập này. Có 7 BAC hệ vô tính chồng lấp trên locus LPO111-112 liên kết với gen kháng *Pi2* định vị trên nhiễm sắc thể 6, tại vùng có độ lớn phân tử 90 kb.

Từ khóa: Dòng dẫn xuất, gen kháng đạo ôn, lúa bản địa, lúa hoang, RFLP, SSR và STS.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Việc thu thập nguồn vật liệu giống lúa bản địa và loài lúa hoang được Viện Lúa ĐBSCL thực hiện từ năm 1977. Vùng trọng điểm được xác định để khảo sát là Đồng Tháp Mười (Tràm Chim), bán đảo Cà Mau, Tây Sông Hậu, vùng ven biển Đông và Tứ Giác Long Xuyên. Các vùng nằm ngoài ĐBSCL như Tây Nguyên (lúa cạn), Đông Nam bộ, Duyên hải Nam Trung bộ, vùng Tây Bắc cũng được tiến hành sau đó nhiều năm. Có hơn 160 quần thể của ba loài lúa hoang (*Oryza rufipogon*, *O. nivara*, *O. officinalis*) được thu thập và bảo quản ở miền Nam, ngân hàng gen Viện Lúa ĐBSCL. Mặt khác, *O. granulata* cũng đã được thu thập tại Mường Tè, Lai Châu. Hơn 5.000 mẫu giống lúa trồng được thu thập và bảo quản tại ngân hàng gen của Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. Các loài lúa hoang dại (21-23 loài) cung cấp nguồn gen quan trọng, đặc biệt đối với tính kháng sâu bệnh hại chính, chống chịu điều kiện bất lợi do môi trường, thời tiết và là nguồn cung cấp vật liệu bất dục đực tế bào chất (gen *cms*) cho lúa lai. Việc tạo ra các dòng MAAL (monosomic alien addition lines – dòng thêm ngoài thuộc thể nhiễm sắc lẻ) dòng dẫn xuất (derivatives) từ loài lúa hoang được thực hiện.

Nội dung này mất nhiều thời gian nhất trong lai tạo và chọn giống lúa cải tiến.

Bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe grisea* gây ra nhiều thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều vùng trồng lúa của thế giới và Việt Nam (Liu và ctv, 2010; Khush và Jena, 2009; Lang và ctv, 2009, 2008). Năng suất có thể mất 20-50% nếu không có gen kháng thích ứng ở vùng sản xuất lúa (Savary và ctv, 2000). Người ta quan tâm nhiều nhất về ảnh hưởng tương tác của “gen đối gen” (gene-for-gene) trong các mô phỏng về chiến lược tạo chọn giống lúa (Jia và ctv., 2000). Do tính chuyên biệt rất mạnh mẽ của nòi địa lý, tính kháng của đơn gen thường bị phá vỡ theo thời gian nhanh hay chậm còn tùy thuộc vào điều kiện áp lực chọn lọc của vùng trồng trọt (Hittalmani và ctv., 2000). Đến nay có hơn 86 gen kháng đạo ôn được thông báo (Huang và ctv, 2010; Xiao và ctv, 2010; Liu và ctv, 2005, 2010; Lin và ctv, 2007; Ballini và ctv, 2008; Chen và ctv, 2006; Xu và ctv, 2008; Deng và ctv, 2006). Hầu hết các gen kháng đều là alen trội, trừ gen *pi21* và một vài trường hợp có tính chất kháng số lượng (Fukuoka và Okuno, 2001; Hayashi và ctv, 2004; Zhou và ctv, 2004; Xu và ctv, 2008). Nhiều gen kháng định vị trên một chuỗi nhóm gen (gene clusters) tập trung ở nhiễm sắc thể 6, 9, 11, và 12 (Ballini và ctv, 2008; Qu và ctv, 2006; Lin và ctv, 2007). Cho đến nay, các gen được dòng hóa (cloned) bao gồm 18 gen kháng: *Pi37, Pit, Pish, Pib, Pi9, Pi2, Piz-t, Pi-d2, Pid3, Pi25, Pi36, Pi5, Pikm, Pi54, Pia, Pik-p, Pik*

¹ Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long

² Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

³ JIRCAS, Nhật Bản

và *Pita* (Liu và ctv, 2010; Sharma và ctv, 2010; Okuyama và ctv, 2011; Chen và ctv, 2011; Zhai và ctv, 2011; Yuan và ctv, 2011); 2 QTL, *pi21* và *Pb1* (Fukuoka và ctv, 2009; Hayashi và ctv, 2010).

Thông qua phân tích tái tổ hợp và chuỗi trình tự, Liu và ctv. (2013) đã xác định được một họ gen NBS-LRR như một ứng cử viên đối với vùng có tên là *qBR9.1* với tính kháng phổ rộng và gen *Pi56(t)* trên nhiễm sắc thể 9. Theo phân tích trình tự, gen *Pi56(t)* mã hóa protein NBS-LRR có 743 protein, kháng phổ rộng đối với nấm gây bệnh đạo ôn, gen liên kết chặt chẽ với các chỉ thị phân tử CRG4-1, CRG4-2 và CRG4-3 (Liu và ctv, 2013).

Giống lúa triển vọng ở ĐBSCL thường bị phá vỡ tính kháng trong vòng 2-3 vụ. Gen *Pi-1*, *Pi-5(t)*, *Pi-3*, *Pi-4(t)* kháng tốt với các nòi nấm ở miền Bắc. Ở ĐBSCL, 24 gen thử nghiệm với 158 isolates (thể phân lập) của 3 nhóm nấm gây bệnh hại chính; không có gen nào biểu thị hiệu lực hoàn toàn. Hai gen *Pi-z*, *Pik-m* có tỷ lệ isolates nấm gây bệnh đạo ôn tấn công thấp nhất (Dư và ctv, 2009). Việc khai thác gen đích từ nguồn lúa hoang được khuyến khích.

Mục tiêu nghiên cứu: khai thác gen kháng đạo ôn từ nguồn lúa hoang để chuyển vào giống lúa cao sản nhằm ổn định tính kháng đối với các mẫu phân lập có độc tính cao ở đồng bằng sông Cửu Long.

2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

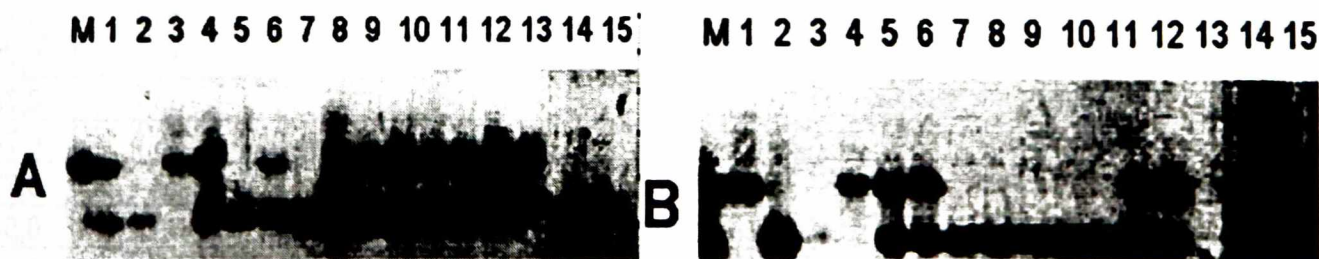
Đánh giá kiểu hình bằng phương pháp nương mạ đạo ôn, cách hai dòng khảo nghiệm là một dòng chuẩn nhiễm (TN1); cách 10 dòng khảo nghiệm là

một dòng chuẩn kháng (Tè Tép). Trên nương mạ có đối chứng kháng (dòng lúa chuẩn kháng "differentials"), phản ứng đối với các nòi chính do IRRI công bố. Mức bón đạm 200 kg N/ ha. Tạo ẩm độ thường xuyên trên nương mạ bằng cách phun sương định kỳ một cách tự động. Cho điểm phản ứng khi TN1 bị cháy rụi. Các mẫu phân lập (isolate) được thu từ 13 tỉnh, thành của đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) được lấy nhiễm trong từng thí nghiệm riêng biệt. Có 102 mẫu lúa hoang được phân tích, sử dụng Tè Tép là đối chứng kháng và LHT đối chứng nhiễm.

Đánh giá kiểu gen bằng chỉ thị STS, SSR và RFLP. Lá lúa ở giai đoạn 3-4 tuổi được sử dụng để tách chiết ADN. Sản phẩm PCR được ghi nhận trên polyacrylamit, sau khi điện di với các chỉ thị SSR. Chỉ số tương đồng, khoảng cách di truyền được tính theo mô phỏng của Nei và Li (1979) trong phần mềm NTSYSpc (Rohlf, 1990) theo thuật toán phân nhóm UPGMA.

Thực hiện dòng hóa vùng mục tiêu nhờ phương pháp sử dụng vector BAC. Thư viện BAC clones có từ quần thể lưỡng bội kép (DH) của cặp lai IR64 x Azucena của IRRI bao gồm 18.432 clones, mỗi tập hợp có 384 giếng bao gồm 16 hàng và 24 cột, hàng được đánh dấu bằng chữ từ A đến P, cột được đánh dấu bằng số từ 1 đến 24. Sử dụng plasmid "pMOSblue" với hai enzym *EcoRI* và *XbaI* trong kỹ thuật subcloning.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN



Hình 1. Đa hình được ghi nhận tại locus RG64 (enzym phân cắt trong Southern là *XbaI*) liên kết với gen *Pi2t* trên nhiễm sắc thể 6. Hình A: cột 1 là giống chuẩn nhiễm, cột 2 là chuẩn kháng Tè Tép. Hình B: cột 1 là giống chuẩn nhiễm, cột 2 là giống Sóc Nâu. Cột 3 đến 15 là các mẫu phân tích trong thí nghiệm

Đánh giá đa hình ADN được thực hiện bằng chỉ thị RFLP (hình 1), STS và SSR cho thấy những chỉ thị đáng tin cậy sau đây: RG64, LPO111-112; RM162 trên nhiễm sắc thể 6; RM483 nhiễm sắc thể 8; RM21 nhiễm sắc thể 11. Gen *Pi-2t* liên kết với RG64, với

khoảng cách di truyền là 3,8 cM trong Sóc Nâu và 1,0 cM trong Tè Tép.

Phân tích đa dạng di truyền lúa hoang xét trên cơ sở tính kháng đạo ôn với 38 chỉ thị SSR và 102 mẫu giống (acc.) cho thấy có hai nhóm di truyền

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

chính (cluster). Nhóm A với 98 mẫu, được phân ra thành 5 nhóm phụ (subcluster). Nhóm phụ A4: có 1 mẫu *Oryza nivara*, nhóm phụ A5 có *Oryza punctata*.

Nhóm B có 3 mẫu *Oryza rufipogon*, 1 mẫu *O. nivara* và giống lúa trồng LTH. Giá trị PIC đạt từ 0,50 đến 0,73 (bảng 2).

Bảng 1. Trung bình số alen trên mỗi chi thị SSR định vị ở 12 nhiễm sắc thể

Nhóm chính	Nhóm phụ	Trung bình số alen / chi thị SSR												Trung bình
		Nhiễm sắc thể												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1	2,80	1,58	1,13	0,08	0,33	0,50	0,88	0,25	1,50	1,33	1,75	1,50	1,14
	2	2,20	2,33	1,25	1,00	2,00	1,00	0,00	0,50	2,50	2,33	2,00	2,25	1,61
	3	1,33	1,30	1,11	0,85	1,74	0,65	0,58	0,52	1,68	1,65	1,95	1,69	1,25
	4	2,00	1,33	1,00	1,33	1,67	1,20	1,00	1,00	2,00	2,33	3,50	1,75	1,68
	5	1,44	1,27	1,15	0,53	2,07	1,76	0,90	1,70	2,50	2,00	1,90	1,25	1,54
	Trung bình	1,95	1,56	1,13	0,76	1,56	1,02	0,67	0,79	2,04	1,93	2,22	1,69	1,44
B		3,00	2,33	1,90	1,67	2,47	2,28	2,00	2,30	4,40	3,27	3,60	3,60	2,74
	Trung bình	3,00	2,33	1,90	1,67	2,47	2,28	2,00	2,30	4,40	3,27	3,60	3,60	2,74
Trung bình		2,48	1,95	1,51	1,21	2,02	1,65	1,34	1,55	3,22	2,60	2,91	2,64	2,09

Ở chỉ số tương đồng 0,76, một vài mẫu *O. punctata-1*, *O. latifolia-1*, *O. nivara-1* phân bố trong cùng nhóm di truyền với Tè Tép. Số alen trung bình trong lúa hoang trên mỗi locus của mỗi nhiễm sắc thể thấp hơn rất nhiều so với giống lúa bản địa và giống lúa cải tiến (Bảng 1).

Bảng 2. Giá trị PIC và số alen ở 38 loci tương ứng với các chi thị SSR

STT	Primer	Nhiễm sắc thể	Số alen	Vị trí bản đồ (cM)	PIC
1	RM495	1	3	0,3	0,573
2	RM3604	1	4	26,8	0,685
3	RM1	1	4	29,7	0,712
4	RM8111	1	3	30,8	0,500
5	RM259	1	5	38,8	0,728
6	RM3865	2	3	21,1	0,508
7	RM1347	2	2	26,6	0,452
8	RM3874	2	3	94,3	0,645
9	RM6959	3	3	65,4	0,561
10	RM8208	3	2	89,0	0,486
11	RM168	3	3	122,8	0,607
12	RM8203	3	2	140,1	0,241
13	RM3317A	4	3	25,4	0,540
14	RM5586	4	2	56,1	0,298
15	RM3524	4	2	68,3	0,278
16	RM267	5	4	25,0	0,703
17	RM413	5	3	26,7	0,575
18	RM1089	5	2	37,2	0,077

19	RM508	6	3	2,3	0,588
20	RM510	6	2	11,5	0,330
21	RM276	6	3	33,5	0,487
22	RM162	6	3	108,3	0,642
23	RM3138	6	3	110,6	0,622
24	RM1134	7	2	25,4	0,147
25	RM11	7	3	67,0	0,525
26	RM408	8	3	0,5	0,603
27	RM152	8	3	3,3	0,503
28	RM7048	9	4	62,4	0,730
29	RM3164	9	6	72,1	0,800
30	RM258	10	4	48,8	0,655
31	RM171	10	4	55,6	0,662
32	RM271	10	5	59,4	0,724
33	RM552	11	4	40,6	0,727
34	RM21	11	5	85,7	0,789
35	RM247	12	5	26,7	0,743
36	RM7619	12	4	38,1	0,715
37	RM7376	12	4	89,5	0,541
38	RM17	12	4	107,4	0,613

Phân tích ở bảng 3 cho thấy *Oryza minuta* biểu thị tính kháng tất cả các nòi phân lập của nấm gây bệnh đạo ôn (trừ ID10), trùng khớp với kết quả của IRRI nhiều năm trước đây. Các mẫu lúa hoang *O. officinalis*, *O. nivara* của Việt Nam trong thí nghiệm này, đều có phản ứng kháng với tất cả các mẫu phân lập này. Trong khi các giống chuẩn kháng có gen *Pit* và *Pi20* có phản ứng nhiễm với một vài mẫu phân lập.

Trong các mẫu lúa hoang thuộc *Oryza rufipogon*, có 39% mẫu biểu hiện gen kháng *Pit* và *Pi20* biểu thị phản ứng cấp 0, 40% biểu thị phản ứng cấp 1; 6% cấp 3; 11% cấp 5; 2% cấp 7 và 2% cấp 9. Như vậy nguồn gen kháng đạo ôn trong *O. rufipogon* có tiềm năng rất lớn.

Marker (đánh dấu) được áp dụng để tìm gen kháng bệnh đạo ôn: RG64 và LPO111-112, RM162 (NST 6), RM483 (NST 8), RM21 (NST 11) đã được xác định (Lang và ctv, 2008, 2009; Chen và ctv, 1999).

Gen *Pi-2t* liên kết với RG64, khoảng cách di truyền là 3,8 cM trong Sóc Nâu và 1,0 cM trong Tè Tép.

Bảng 3. Phản ứng của các mẫu lúa hoang đối với với 13 mẫu phân lập (isolates) nấm *Magnaporthe grisea* ở ĐBSCL

Loài	Mẫu phân lập													Nguồn gốc mẫu lúa hoang
	ID1	ID2	ID3	ID4	ID5	ID6	ID7	ID8	ID9	ID10	ID11	ID12	ID13	
<i>O.minuta</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	Ngân hàng gen
<i>O.officinalis 5</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cần Thơ
<i>O.nivara 10</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Hồ Lắc, Đak Lak
<i>O.ridleyii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ngân hàng gen
<i>O.nivara 71</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Bà Rịa
<i>O.nivara 74</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	Bà Rịa
<i>O.nivara75</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	Bà Rịa
<i>O.nivara 79</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	Bà Rịa
<i>O. rufipogon 11</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	Đồng Tháp
<i>O. rufipogon 72</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	Cần Thơ
LTH	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Chuẩn nhiễm
IRBLt-K59	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	Chuẩn kháng <i>Pit</i>
IRBL20-IR24	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	Chuẩn kháng <i>Pi20</i>

Dòng hóa (cloning) gen *Pi-2* thành công là tiền đề khẳng định cơ sở phân tử và hoá sinh của gen kháng theo hướng bền vững. Có 7 BAC clone chồng lấp trên locus LPO111-112 liên kết với gen kháng *Pi2* định vị trên nhiễm sắc thể 6. Đó là 23D09, 23D06, 23H03, 23I13, 23 D05, 23J13 và 23 H09 (hình 3).

Chỉ thị SSR được nghiên cứu thông qua bản đồ di truyền, xác định được RM162 liên kết với *Pi-2* trên nhiễm sắc thể 6; RM483 liên kết với *Pi-36* trên nhiễm sắc thể 8; RM21 liên kết với gen *Pi-44* trên nhiễm sắc thể 11 (hình 4). Các chỉ thị này đều được sử dụng trong đánh giá kiểu gen các mẫu lúa hoang *O. rufipogon*. Các giống lúa triển vọng kháng ổn định với bệnh đạo ôn là HG1, OM5239, OM3536, OM5625, OM3401, AS996 (dẫn xuất từ *O. rufipogon*).

4. KẾT LUẬN

Xác định được các mẫu *O. punctata-1*, *O. latifolia-1*, *O. nivara*-phân bố trong cùng nhóm di truyền với Tè Tép, nguồn cho gen kháng đạo ôn. Những chỉ thị phân tử có tính đa hình, được sử dụng để tìm gen kháng bệnh đạo ôn là RG64, LPO111-112, RM162

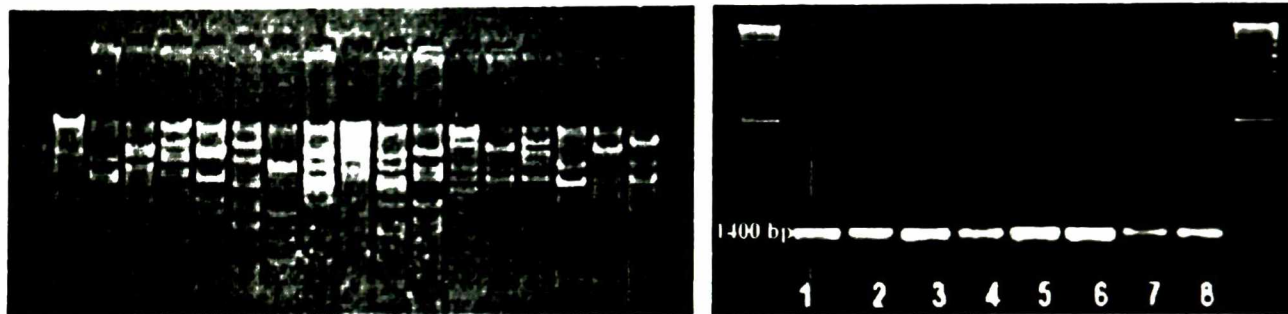
(NST 6), RM483 (NST 8), RM21 (NST 11). Gen *Pi-2* liên kết với RG64, khoảng cách di truyền là 3,8 cM trong giống Sóc Nâu và 1,0 cM trong giống Tè Tép. Cloning gen kháng thành công: tiền đề khẳng định cơ sở phân tử và hoá sinh của gen kháng theo hướng bền vững được thực hiện đối với gen *Pi-2* trên đoạn phân tử 90 kb với 7 BAC clone chồng lấp. Các mẫu lúa hoang *O. rufipogon* có nhiều tiềm năng cung cấp vật liệu cho gen kháng đạo ôn.

S R

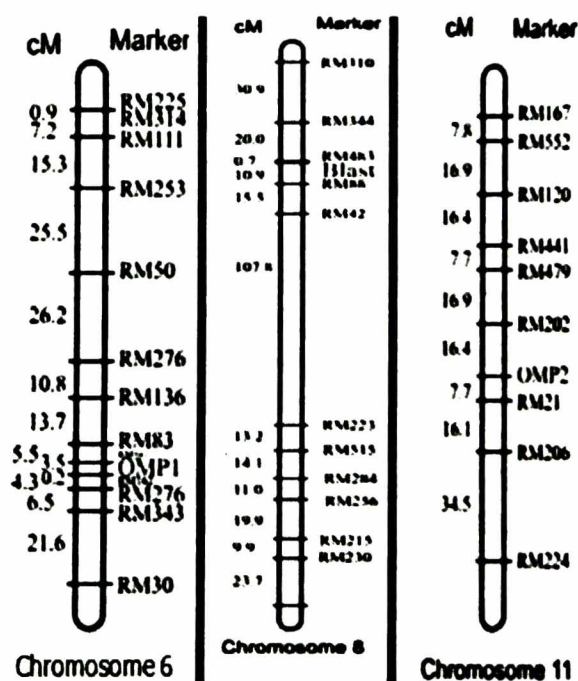


Hình 2. (A) Điều tra đa hình ADN tại locus RG64 liên kết với gen *Pi-2* thông qua chỉ thị STS phân cắt bởi *Hae*III, alen kháng biểu hiện trên băng kháng có kích thước 400 bp, alen nhiễm 750 bp

R: đối chứng kháng, S: đối chứng nhiễm



Hình 3. Thanh lọc thư viện BAC ở locus LPO111-112 liên kết với gen *Pi-2* định vị trên nhiễm sắc thể 6, phân cắt bởi *Hind*III, với 7 clone chồng lấp, ở kích thước 1,4 kb. Đó là 23D09, 23D06, 23H03, 23I13, 23D05, 23J13 và 23H09, theo thứ tự từ trái sang phải, phủ trên một vùng có độ lớn phân tử 90 kb.



Hình 4. Bản đồ di truyền *Pi-2* định vị trên nhiễm sắc thể 6, liên kết với: RM276-RM541; gen *Pi-36* liên kết với RM483 (NST8); gen *Pi-44* liên kết với RM21 (NST11).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ballini E., Morel J. B., Droc G., Price A., Courtois B., Nottoghem J. L., Tharreau D., 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Mol. Plant Microbe Interact* 21:859-868.

2. Chen D. H., dela Vina M., Inukai T., Mackill D. J., Ronald P. C., Nelson R. J., 1999. Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi-44*, in a line delivered from a durably resistant gene cultivar. *Theor. Appl. Genet* 98:1046-1053.

3. Deng Y., Zhu X., Shen Y., He Z., 2006. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. *Theor. Appl. Genet* 113:705-713.

4. Du P. V., Loan L. C., 2009. Nghiên cứu một số gen kháng bệnh đạo ôn có hiệu quả đối với các nòi nấm *Pyricularia grisea* ở ĐBSCL. *Kỷ yếu hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 8* Ninh Thuận 25-26/7/2009, tr. 7-14.

5. Fukuoka S., Okuno K., 2001. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theor. Appl. Genet* 103:185-190.

6. Fukuoka S., Saka N., Koga H., Ono K., Shimizu T., Ebana K., Hayashi N., Takahashi A., Hirochika H., Okuno K., Yano M., 2009. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325(5943):998-1001.

7. Hayashi K., Hashimoto N., Daigen M., Ashikawa I., 2004. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet* 108:1212-1220.

8. 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(3):498-510.

9. Hittalmani S., Parco A., Mew T. V., Zeigler R. S., Huang N., 2000. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for

- blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet* 100:1121-1128.
10. Huang H., Huang L., Feng G., Wang S., Wang Y., Liu J., Jiang N., Yan W., Xu L., Sun P., Liu Z., Pan S., Liu X., Xiao Y., Liu E., Dai L., Wang G., 2010. Molecular mapping of the new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local rice cultivar Xiangzi 3150. *Phytopathology* 101(5):620-626.
 11. Jia Y. L., McAdams S. A., Bryan G. T., Hershey H. P., Valent B., 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19:4004-4014.
 12. Khush G. S., Jena K. K., 2009. Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In: Wang G. L., Valent B. (eds) *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. Springer, Dordrecht*, pp 1-10.
 13. Lang N. T., Luy T. T., Duong Khuyeu B. T., Buu B. C., 2008. Genetics and breeding for blast and bacterial leaf blight resistance of rice (*Oryza sativa* L.). *OMonRice* 16: 41-49.
 14. Lang N. T., Luy T. T., Thu Ha P. T., Buu B. C., 2009. To monogenic lines resistance to blast disease in rice (*Oryza sativa* L.) in Vietnam. *Int. J. of Genetics and Molecular Biology* 1(6):105-114.
 15. Lin F., Chen S., Que Z. Q., Wang L., Liu X. Q., Pan Q. H., 2007. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. *Genetics* 177:1871-1880.
 16. Liu J. L., Wang X. J., Thomas M., Hu Y. J., Liu X. L., Dai L. Y., Wang G. L., 2010. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Mol. Plant Pathol.* 11(3):419-427.
 17. Liu X. Q., Wang L., Chen S., Lin F., Pan Q. H., 2005. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. *Mol. Genet Genomics* 274:394-401.
 18. Liu Y., Liu B., Zhu X., Yang J., Bordeos A., Wang G., Leach J. E., Leung H., 2013. Fine-mapping and molecular marker development for *Pi56(t)*, a NBS-LRR gene conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice. *Theor. Appl. Genet* 126:985-998.
 19. Nei M. and Li W., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
 20. Okuyama Y., Kanzaki H., Abe A., Yoshida K., Tamiru M., Saitoh H., Fujibe T., Matsumura H., Shenton M., Galam D. C., Undan J., Ito A., Sone T., Terauchi R., 2011. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant J.* 66(3):467-479.
 21. Qu S. H., Liu G. F., Zhou B., Bellizzi M., Zeng L. R., Dai L. Y., Han B., Wang G. L., 2006. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics* 172:1901-1914.
 22. Rohlf F. J., 1990. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: *Applied Biostatistics Inc.* 175p.
 23. Sharma T. R., Rai A. K., Gupta G. K., Singh N. K., 2010. Broad spectrum blast resistance gene *Pikh* cloned from the rice line Tetep designated as *Pi54. J. Plant Biochem. Biotechnol.* 19(1):87-89.
 24. Xiao W. M., Yang Q. Y., Wang H., Guo T., Liu Y. Z., Zhu X. Y., Chen Z. Q., 2010. Identification and fine mapping of a resistance gene to *Magnaporthe oryzae* in a space-induced rice mutant. *Mol. Breed* 28:303-312.
 25. Xu X., Chen H., Fujimura T., Kawasaki S., 2008. Fine mapping of a strong QTL of field resistance against rice blast, *Pikahei-1(t)* from upland rice Kahei, utilizing a novel resistance evaluation system in the greenhouse. *Theor. Appl. Genet* 117:997-1008.
 26. Yuan B., Zhai C., Wang W. J., Zeng X. S., Xu X. K., Hu H. Q., Lin F., Wang L., Pan Q. H., 2011. The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes. *Theor. Appl. Genet* 122(5):1017-1028.
 27. Zhai C., Lin F., Dong Z. Q., He X. Y., Yuan B., Zeng X. S., Wang L., Pan Q. H., 2011. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance

gene which emerged after rice domestication. *New Phytol.* 189:321-334.

28. Zhou J. H., Wang J. L., Xu J. C., Lei C. L., Ling Z. Z., 2004. Identification and mapping of a rice blast resistance gene *Pi-g(t)* in the cultivar Guang chang zhan. *Plant. Pathol.* 53:191-196.

INTROGRESSION OF TARGET GENES FROM WILD RICES TO CULTIVARS (*Oryza sativa* L.)
TO IMPROVE BLAST RESISTANCE

Nguyen Thi Lang¹, Pham Thi Thu Ha, Y. Fukuta³, Bui Chi Buu²

¹IAS, ²CLRRI, ³JIRCAS

Oryza rufipogon (2n=24=AA) is widely distributed in tropical and subtropical areas in Vietnam. A derivative from *O. rufipogon* and cultivar (IR64) has been successfully exploited to develop acid sulfate soil tolerance genotype (namely AS996). It became a donor for blast (BI) at CLRRI rice breeding program. Genetic divergence analysis was carried out via 38 SSRs, which linked to many R genes published. At the similarity index of 0.76, some accessions from *O. punctata-1*, *O. latifolia-1*, *O. nivara-1* were classified in the same genetic clusters of Te Tep – a famous donor in the gene bank. A derivative of *Oryza nivara* (Ba Ria) has been successfully exploited to develop blast resistant lines. There were 13 isolates of *Magnaporthe grisea* collected in the Mekong delta, with different viruences to phenotype all treated accessions. Two accessions of *O. rufipogon* exhibited *Pit* and *Pi20* genes to be resistant to all given isolates. Seven BAC clones overlapped at the locus LPO111-112 linked to *Pi2* on chromosome 6 were detected at the DNA fragment of 90 kb.

Key word: Blast resistance, derivative lines, landrace, RFLP, SSR, STS, and wild species.

Người phản biện: GS.TSKH. Trần Duy Quý

Ngày nhận bài: 11/10/2013

Ngày thông qua phản biện: 11/11/2013

Ngày duyệt đăng: 18/11/2013