

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

CÁN THỊ KHÁNH HUYỀN

**XÁC ĐỊNH GEN ỨNG VIÊN (CANDIDATE GENE)
KHÁNG BỆNH BẠC LÁ TRONG CÁC GIỐNG LÚA BẢN
ĐỊA CỦA VIỆT NAM ĐÃ ĐƯỢC GIẢI MÃ PHỤC VỤ
CÔNG TÁC CHỌN TẠO GIỐNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – Năm 2015

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

CÁN THỊ KHÁNH HUYỀN

**XÁC ĐỊNH CANDIDATE GENE KHÁNG BỆNH
BẠC LÁ TRONG CÁC GIỐNG LÚA BẢN ĐỊA CỦA
VIỆT NAM ĐÃ ĐƯỢC GIẢI MÃ PHỤC VỤ CÔNG TÁC
CHỌN TẠO GIỐNG**

Chuyên ngành: **SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Mã số : **60420114**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: **TS. Khuất Hữu Trung**

Hà Nội – Năm 2015

LỜI CẢM ƠN

Em xin chân thành cảm ơn các anh chị, cô chú trong bộ môn Kỹ thuật di truyền, Viện Di truyền Nông nghiệp đã tạo điều kiện học tập và nghiên cứu trong một môi trường học tập khoa học, cũng như các thầy cô giáo của Viện Sinh Thái và Tài Nguyên Sinh Vật đã trực tiếp giảng dạy, giúp em có những kiến thức vững vàng khi bước vào đời. Đặc biệt em xin chân thành cảm ơn sự chỉ bảo tận tình của thầy giáo TS. Khuất Hữu Trung đã trực tiếp hướng dẫn, chỉ bảo cho em trong suốt quá trình em làm luận văn tốt nghiệp này.

Đề tài luận văn tốt nghiệp của em là: ***“Xác định candidate gen kháng bệnh bạc lá trong các giống lúa bản địa của Việt Nam phục vụ công tác chọn tạo giống”***. Đây là đề tài có khối lượng công việc tương đối lớn, nhưng do thời gian thực hiện còn hạn chế nên không tránh khỏi thiếu sót. Vì vậy em rất mong được sự đóng góp ý kiến của các thầy cô giáo và bạn bè để bản đồ án tốt nghiệp của em được hoàn thiện hơn.

Em xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 30 tháng 11 năm 2015

Sinh viên

Cần Thị Khánh Huyền

LỜI CAM ĐOAN

Luận văn này được thực hiện dưới sự hỗ trợ của Phòng Kỹ Thuật Di Truyền, viện Di Truyền Nông Nghiệp. Em xin cam đoan các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Học viên

Cán Thị Khánh Huyền

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	ii
LỜI CAM ĐOAN.....	iii
MỤC LỤC.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	viii
DANH MỤC HÌNH.....	ix
MỞ ĐẦU.....	1
1. Lí do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	3
2.1. Mục tiêu tổng quát.....	3
2.2. Mục tiêu cụ thể.....	3
3. Cơ sở khoa học và cơ sở thực tiễn.....	3
3.1. Cơ sở khoa học.....	3
3.2. Cơ sở thực tiễn.....	4
4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	4
4.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.....	4
4.1. Phạm vi nghiên cứu.....	4
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	5
1.1. Tổng quan về nghiên cứu bệnh bạc lá ở cây lúa.....	5
1.1.1. Bệnh Bạc lá lúa (<i>Xanthomonas oryzae. pv.oryzae</i>).....	5
1.1.2. Tình hình nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá trên thế giới.....	6
1.1.3. Tình hình nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá ở Việt Nam.....	9
1.2. Tổng quan về gen ứng viên (candidate gene).....	10
1.2.1. Candidate gene là gì?.....	10

1.2.2. Các bước xác định candidate gene.....	11
1.2.2.1. Chọn CG chức năng.....	11
1.2.2.2. Chọn CG vị trí.....	11
1.2.2.3. Sàng lọc CG	12
1.2.2.4. Xác nhận CG.....	12
1.2.3. Tổng quan các phương pháp xác định candidate gene	13
1.2.3.1. Phương pháp truyền thống.....	13
1.2.3.2. Phương pháp NBS-LRR (Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat).....	13
1.2.3.4. Ứng dụng candidate gene trong chọn tạo giống kháng bệnh bạc lá	15
1.3. Tổng quan về thiết kế maker.....	16
1.3.1. Thiết kế môi chung (degenerate primer).....	16
1.3.2. Thiết kế marker dựa trên BlastDigester	17
1.4. Tổng quan về chọn tạo giống nhờ ứng dụng của chỉ thị phân tử.....	23
1.4.1. Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống cây trồng ..	23
1.4.1.1. Ứng dụng MAS trong các chương trình chọn giống[4].....	23
1.4.1.2. Ứng dụng chọn giống nhờ chỉ thị phân tử và lai trở lại (MABC)[4]	25
1.4.2. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa kháng bạc lá....	27
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.1. Vật liệu nghiên cứu	33
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	33
2.1.2. Hoá chất.....	34
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	35
2.2.1. Phương pháp xác định candidate gene.....	35
2.2.2. Phương pháp thiết kế các marker.....	35

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu để lai tạo nguồn vật liệu mang candidate gen	38
2.2.4. Phương pháp nghiên cứu để kiểm tra sự có mặt các candidate gen kháng bạc lá.....	39
2.2.4.1. Tách chiết ADN tổng số	39
2.2.4.2. Kỹ thuật PCR	39
2.2.4.3. Phương pháp điện di trên gel agarose.....	40
2.2.4.4. Phương pháp điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel poly-acrylamide	40
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	42
3.1. Kết quả xác định gen ứng viên (candidate gene) kháng bạc lá.....	42
3.1.1. Kết quả phân tích thành phần nucleotide vùng CDS (Coding DNA Sequence) và thành phần amino acid của các gen ứng viên (candidate gene) xa5	42
3.1.2. Kết quả tầm soát và thiết kế môi nhận dạng candidate gen xa5 kháng bạc lá.....	47
3.2. Thiết kế marker xác định gen ứng viên kháng bạc lá xa5	51
3.3 Kết quả lai tạo nguồn vật liệu mang candidate gene xa5 kháng bạc lá	56
3.3.1 Đặc điểm nông sinh học của các dòng bố và mẹ	56
3.3.2. Kết quả lai tạo F1 vụ 1 (Xuân 2014).....	57
3.3.3 Kết quả lai tạo BC1F1 vụ 2 (mùa 2014).....	61
3.4. Kết quả kiểm tra sự có mặt của các candidate gene kháng bạc lá ở thế hệ con lai (BC1F1).	63
3.4.1. Cặp lai An dân 11 x Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2.....	63
3.4.2. Cặp lai DT39- Quế Lâm x OM6377	64
3.4.3. Cặp lai Q1-8-1 x Chấn thom.....	64

3.4.4. Cặp lai OM6976 x Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2.....	65
3.4.5. Cặp lai Thủ đô 1 x Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2.....	66
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	68
4.1. Kết luận	68
4.2. Đề nghị.....	68
TÀI LIỆU THAM KHẢO	70

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Các giống lúa mang gen kháng bạc lá được chọn tạo nhờ sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử (MAS) và đã thương mại hóa ở Châu Á.....	8
Bảng 1.2: Mã suy biến trong thiết kế môi chung	16
Bảng 2.1. Danh sách các giống lúa bản địa đã được giải mã genome.....	33
Bảng 2.2. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu	34
Bảng 2.3. Điều kiện phản ứng PCR	40
Bảng 3.1. Thống kê nucleotide vùng CDS (Coding DNA Sequence) gen/candidate gen <i>xa5</i>	42
Bảng 3.2. Thống kê tỉ lệ (%) amino acid của gen/candidate gen <i>xa5</i>	45
Bảng 3.3. Bảng thống kê số lượng và tỉ lệ nucleotide của các candidate gen <i>xa5</i> ở các giống lúa đã giải mã.....	47
Bảng 3.4. Đặc điểm nông sinh học của dòng bố.....	56
Bảng 3.5. Đặc điểm nông sinh học của dòng mẹ.....	57
Bảng 3.6. Các tổ hợp lai tạo dòng F1.....	58
Bảng 3.7. Các tổ hợp lai tạo dòng BC1F1	61
Bảng 3.8. Kết quả kiểm tra candidate gen <i>xa5</i>	66

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các bước tạo marker CAPS với BlastDigester	19
Hình 2.1. Thiết kế mỗi PCR trong một khu vực được lựa chọn	37
Hình 2.2. Kết quả phân tích PCR được liệt kê trong Vector NTI Explorer.....	37
Hình 3.1. Ảnh đóng hàng, đóng cột so sánh trình tự một đoạn gen kháng bạc lá xa5 của một số giống lúa bản địa (đoạn mất 35nu)	50
Hình 3.2. Sơ đồ thiết kế mỗi xa5_add35.....	54
Hình 3.3. Kết quả kiểm tra PCR đối với mỗi xa5add35F/xa5add35R nhận biết gen xa5 ở các giống lúa bản địa của Việt Nam.....	55
Hình 3.4. Ruộng gieo mạ và ruộng cấy các nguồn vật liệu bố mẹ phục vụ lai tạo F1	59
Hình 3.5. Ghép cặp cho các tổ hợp lai	60
Hình 3.6. Bao cách ly sau khi khử nhị	60
Hình 3.7. Hạt lai sau khi thụ phấn 7 ngày.....	60
Hình 3.8. Cặp lai Q1-8-1x Chấn Thơm và An Dân x CNBN2 thế hệ BC1F1....	62
Hình 3.9. Hạt lai BC1F1(D8 x OM6876) sau khi thu hoạch	62
Hình 3.10. Kết quả điện di sản phẩm PCR các con lai BC1F1 của tổ hợp lai An dân 11 x Chiêm nhỡ Bắc Ninh 2 với cặp mỗi xa5add35	63
Hình 3.11. Ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR các con lai BC1F1 của tổ hợp lai OM6377 x DT39- Quế Lâm với cặp mỗi xa5add35	64
Hình 3.12. Ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR các con lai BC1F1 của tổ hợp lai Q1-8-1 x Chấn thơm với cặp mỗi xa5add35	65