

PHÂN TÍCH GEN *Pi-ta* KHÁNG BỆNH ĐẠO ÔN Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA (*ORYZA SATIVA* L.)

Nguyễn Hoàng Lộc¹, Trương Thị Bích Phượng^{1,2}, Nguyễn Văn Song¹, Phan Thị Phương Nhi³, Trương Thị Trâm Chi¹, Dương Thị Thảo Trang¹

¹Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia grisea* gây ra ảnh hưởng rất lớn đến năng suất lúa. Khả năng kháng bệnh đạo ôn ở lúa do một họ các gen khác nhau điều khiển, và gen *Pi-ta* là một trong những gen kháng chính của các giống lúa nhóm indica. Protein *Pi-ta* là một receptor nội bào liên kết với một phân tử protein AVR-Pita của nấm và sau đó hoạt hóa hệ thống bảo vệ của nó nhờ cơ chế "gene-for-gene", đây là phản ứng bảo vệ nhờ một gen trung gian. Mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là tìm hiểu mối liên quan giữa sự hiện diện của gen *Pi-ta* đến khả năng kháng bệnh đạo ôn của một số giống lúa (*Oryza sativa* L.) thuộc nhóm indica đang được trồng ở khu vực miền Trung là HT1, X21, KD18, TH5, IR38, 4B và 212. Bằng cách sử dụng ba cặp môi đặc hiệu là YL153/YL154, YL155/YL87 và YL100/YL102 để khuếch đại ba đoạn DNA khác nhau đặc hiệu của gen *Pi-ta* nhờ kỹ thuật PCR. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, chỉ có bốn giống TH5, IR38, 4B và 212 là có sản phẩm PCR ở cả ba vùng khuếch đại. Các sản phẩm PCR sau đó được tạo dòng trong vector pCR[®]2.1 để phân tích trình tự nucleotide, kết quả cho thấy chúng tương đồng 100% (chưa tính bộ ba tương ứng với amino acid 918) so với ba trình tự tương ứng của gen *Pi-ta* đã được công bố trong Genbank. Tuy nhiên, trong bốn giống lúa có gen *Pi-ta* chỉ có hai giống 4B và 212 là có khả năng kháng bệnh đạo ôn do có allele *Pi-ta* trội (*Pi-ta*⁺) với amino acid 918 là alanine trong vùng giàu leucine của protein *Pi-ta*, hai giống còn lại là TH5 và IR38 mang allele *Pi-ta* lặn (*Pi-ta*⁻) do amino acid 918 là serine.

Từ khóa: Cây lúa, chỉ thị phân tử, kháng bệnh đạo ôn, gen *Pi-ta*, giống lúa khu vực miền Trung Việt Nam

MỞ ĐẦU

Bệnh đạo ôn là một trong những bệnh ảnh hưởng rất lớn đến năng suất lúa do nhiễm loại nấm *Pyricularia grisea* hoặc *P. oryzae* (teleomorph: *Magnaporthe grisea*) (Fjellstrom *et al.*, 2004). Mỗi năm bệnh này gây thiệt hại khoảng 55 triệu USD ở khu vực Nam Á và Đông Nam Á, và có thể còn cao hơn thế ở khu vực Đông Á và những vùng chuyên canh lúa ôn đới khác trên thế giới. Hiện nay, bệnh này đã có mặt trên 85 quốc gia khác nhau. Có hơn 20 gen kháng bệnh đạo ôn đã được tìm thấy ở cây lúa, chẳng hạn như: *Pi-a*, *Pi-b*, *Pi-k*, *Pi-t*, *Pi-ta*, *Pi-z* trong đó gen *Pi-ta* là một trong những gen kháng chính của các giống lúa nhóm indica (Silue *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Jia *et al.*, 2002; Fukuta *et al.*, 2004).

Gen *Pi-ta* mã hóa một protein của tế bào chất giả định mang một vị trí liên kết nucleotide (nucleotide binding site-NBS) và một vùng giàu leucine (leucine rich domain-LRD) ở đầu tận cùng C (C-terminus).

Gen *AVR-Pita* được giả thiết mã hóa cho metalloprotease mang tín hiệu kích thích bài tiết có đầu tận cùng N (N-terminal) và các chuỗi pro-protein. Protein AVR-Pita liên kết đặc hiệu với LRD của protein *Pi-ta* trong hệ thống hai tế bào lai của nấm men (yeast two-hybrid system) và các thử nghiệm liên kết *in vitro*. Điều này gợi ý rằng protein *Pi-ta* là một receptor nội bào liên kết với một phân tử protein của nấm và sau đó hoạt hóa hệ thống bảo vệ của nó, và amino acid vị trí 918 trong LRD của protein *Pi-ta* là yếu tố quyết định cho sự liên kết đó (Bryan *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2000). Trên cơ sở này Jia và đồng tác giả (2002) đã thiết kế ba cặp môi đặc hiệu gen để phân biệt allele *Pi-ta* trội ở các giống lúa nhóm indica và làm chỉ thị phân tử (molecular marker) dùng trong chọn lọc tính kháng bệnh đạo ôn ở giai đoạn cây mạ non bằng kỹ thuật PCR. Phương pháp này rất tiện lợi do các chỉ thị phân tử nói trên sẽ khuếch đại một phần của gen *Pi-ta*, và là đơn giản, rẻ tiền và có thể sử dụng để phân tích một lượng lớn mẫu vật.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả xác định gen kháng bệnh đạo ôn *Pi-ta*, dựa vào ba cặp mồi đặc trưng gen YL153/YL154, YL155/YL87 và YL100/YL102 (Jia *et al.*, 2002), ở một số giống lúa trồng phổ biến tại khu vực miền Trung nước ta.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Sử dụng một số giống lúa (*Oryza sativa* L.) thuộc nhóm indica đang được trồng tại khu vực miền Trung như: HT1, X21, KD18 (Khang dân 18), TH5, IR38, 4B (hoặc NN4B) và 212. Cây mạ non trồng trong chậu đạt kích thước khoảng 15 cm được dùng để tách chiết DNA tổng số từ lá.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

Lá mạ được nghiền nhỏ trong nitrogen lỏng bằng cối chày sứ thành bột mịn sau đó cho vào ống eppendorf. Bổ sung 0,5 ml đệm chiết (100 mM Tris.HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 7,5) vào ống và trộn đều bằng lắc rung. Bổ sung tiếp 45 µl SDS 20% vào mẫu, ủ ở 65°C trong 10 phút. Chiết

DNA ba lần với một thể tích tương đương của phenol, phenol:chloroform (1:1) và cuối cùng là chloroform. Kết tủa DNA với hai thể tích EtOH 100% bằng cách ly tâm 12.000 rpm trong 15 phút ở 4°C, rửa kết tủa DNA bằng EtOH lạnh 70% sau đó cô mẫu trong điều kiện chân không 2 phút. DNA kết tủa được hòa tan bằng đệm TE và bảo quản ở -20°C để dùng cho khuếch đại PCR (Kang, Fawley, 1997).

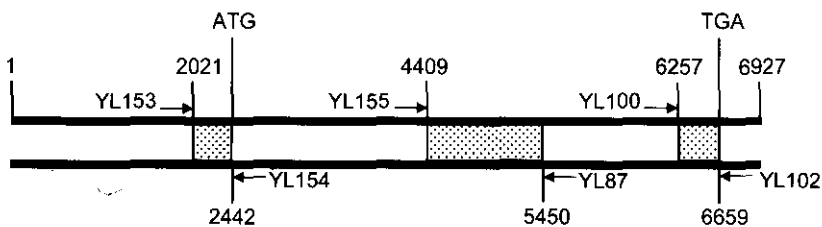
Khuếch đại PCR

Sử dụng ba cặp mồi (Integrated DNA Technology, Inc., USA) đặc hiệu cho gen *Pi-ta* kháng bệnh đạo ôn (Bảng 1).

DNA tổng số của lá lúa được dùng làm khuôn mẫu cho PCR. Hỗn hợp PCR bao gồm 100 ng DNA khuôn mẫu; 200 µM dNTP; 10 pmol mỗi loại mồi; 2 mM MgCl₂; 1× đệm enzyme Taq và 1 đơn vị Taq DNA polymerase (Promega); bổ sung H₂O đến thể tích cuối cùng là 25 µl. Khuếch đại PCR (iCycler, Bio-Rad) theo điều kiện sau: 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ: 95°C trong 1 phút, 55°C (đối với hai cặp mồi *Pi-ta*₄₄₀ và *Pi-ta*₁₀₄₂) hoặc 64,5°C (đối với cặp mồi *Pi-ta*₄₀₃) trong 1 phút, và 72°C trong 1 phút; cuối cùng 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel 0,8% và nhuộm bằng EtBr.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của ba cặp mồi đặc hiệu cho gen *Pi-ta* kháng bệnh đạo ôn.

Các mồi	Trình tự nucleotide	Nhiệt độ ủ trong PCR
<i>Pi-ta</i> ₄₄₀	YL153: 5'- CAACAATTTAATCATACACG -3'	55°C
	YL154: 5'- ATGACACCTGCGATGCAA -3'	
<i>Pi-ta</i> ₁₀₄₂	YL155: 5'- AGCAGGTTATAAGCTAGGCC -3'	55°C
	YL87: 5'- CTACCAACAAGTTCATCAAA -3'	
<i>Pi-ta</i> ₄₀₃	YL100: 5'- CAATGCCGAGTGTGCAAAGG -3',	64,5°C
	YL102: 5'- TCAGGTTGAAGATGCATAGC -3'	



Hình 1. Sơ đồ minh họa gen *Pi-ta* hoàn chỉnh dài 6927 bp.

Tạo dòng và phân tích trình tự các sản phẩm PCR

Các băng DNA của sản phẩm PCR có kích thước mong đợi được cắt ra khỏi agarose gel 0,8% để tinh sạch bằng MEGA-bead[®] Agarose Gel Extraction Kit (Intron Biotechnology) và gắn vào vector pCR[®]2.1 (TA cloning Kit, Invitrogen). Thành phần phản ứng gắn bao gồm: sản phẩm PCR đã tinh sạch (khoảng 10 ng); 1× đệm T4 ligation; 4 đơn vị T4 DNA ligase và 50 ng của vector pCR[®]2.1; thêm nước đến thể tích cuối cùng là 10 μ l. Phản ứng gắn được ủ qua đêm ở 14°C rồi biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng TOP 10. Chọn lọc thể tái tổ hợp theo phương thức khuẩn lạc xanh/trắng. Nuôi cấy tế bào *E. coli* tái tổ hợp trong môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin khoảng 15 h. Sau đó, ly tâm thu sinh khối để tách chiết DNA của vector tái tổ hợp bằng Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System Kit (Promega). Trình tự nucleotide của các sản phẩm PCR được phân tích theo phương pháp đánh dấu đầu tận cùng bằng các chất phát huỳnh quang màu (dideoxy terminator) trên máy CEQ (Ver. 7.0.55).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

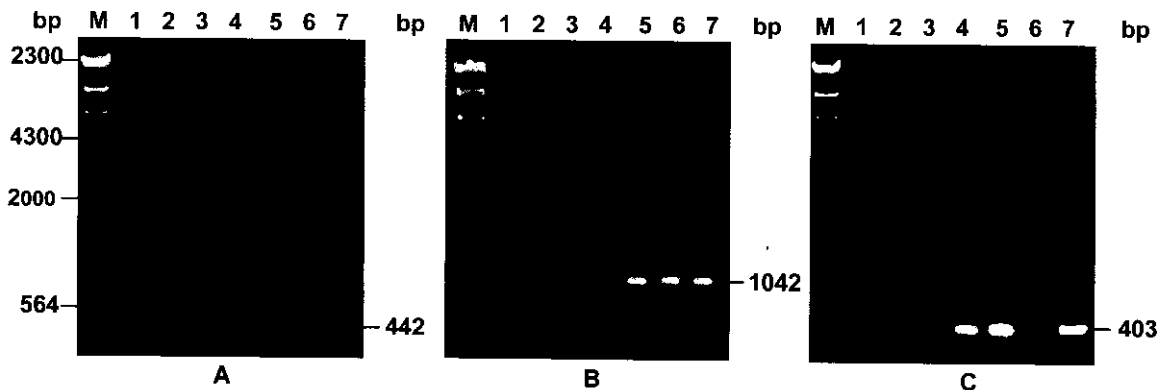
Phân tích PCR

Kết quả PCR trình bày ở hình 2 cho thấy bốn giống lúa TH5, IR38, 4B và 212 có các băng DNA

khuyết đại với cả ba cặp mồi YL153/YL154, YL155/YL87 và YL100/YL102. Các băng DNA rất rõ đã chứng tỏ tính đặc hiệu cao của mồi. Hai cặp mồi YL153/YL154 và YL100/YL102 được thiết kế để khuếch đại các đoạn đặc hiệu của gen *Pi-ta* mã hóa vị trí khởi đầu phiên mã (YL153/YL154) và đầu tận cùng carboxyl (YL100/YL102), trong đó cặp mồi YL100/YL102 được dùng để khuếch đại đoạn có trình tự nucleotide từ 6257-6659 chứa bộ ba mã hóa cho amino acid vị trí 918. Ngoài ra, một cặp mồi khác là YL155/YL87 được thiết kế để khuếch đại sản phẩm PCR tương ứng cho đoạn ở giữa của gen *Pi-ta* (đoạn có trình tự nucleotide từ 4409-5450) (Hình 1). Trong thí nghiệm này, sự có mặt của các sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của ba đoạn được khuếch đại cho phép nghĩ rằng gen *Pi-ta* đã hiện diện trong bốn giống lúa TH5, IR38, 4B và 212. Trong khi, ở ba giống còn lại không có đoạn DNA nào được khuếch đại bởi ba cặp mồi nói trên. Tuy nhiên, ở trường hợp có gen *Pi-ta* xuất hiện cũng cần phải phân tích trình tự nucleotide của đoạn 403 bp (YL100/YL102) để xác định xem amino acid 918 liên quan đến allele *Pi-ta* trội hay *Pi-ta* lặn.

Xác định trình tự nucleotide của các sản phẩm PCR

Kiểm tra sự chính xác của PCR ở các giống lúa thuộc nhóm indica bằng cách tạo dòng các sản phẩm khuếch đại trong vector pCR[®]2.1 và phân tích trình tự nucleotide của chúng. Kết quả như sau:



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR được khuếch đại bằng ba cặp mồi YL153/YL154 (A), YL155/YL87 (B), và YL100/YL102 (C) trên agarose gel 0,8%. M: Chuẩn kích thước DNA (λ /HindIII), 1: giống HT1, 2: giống X21, 3: giống KD18, 4: giống TH5, 5: giống IR38, 6: giống 4B, 7: giống 212.

Sản phẩm PCR của cặp mồi YL153/YL154 có chiều dài 442 bp (Pi-ta₄₄₂):

241 TCAACAATTT AATCATACAC AGTAAAACGA AAAGAGACTC TCTTCATTTA AGGCTCGGAT
 301 GCATGGAGAC TATATGAATA AGCTCATCTC ATTTGGAAAA AAATAATCAA AACAAATGAAA
 361 TATGCTTAAT ACATTTGGAT TTGGATGGAG TATCTCCCTA TGACGAAAGA GACGAGGGAT
 421 TGCCACTTTC TTTCCACATC AACCTTTGAA GGCTATGGCA GAGCTACATT TGCAGCGCAG
 481 CCTCTCTGCA TGATTTCTTA CTAGATAGGA TTAAGTTTCA AGAGTTAATT TCTTGTACTC
 541 TTGGGCGATC CATGCTGTCA AATCAGCAAC TAACGAGGCA TAATCTCGAT CACTAGCTCT
 601 GATCTGATCT TCAGCTAGCG CCG

Sản phẩm PCR của mồi YL155/YL87 có chiều dài 1042 bp (Pi-ta₁₀₄₂):

4409 AG CAGGTTATAA GCTAGGCCAA ACATATTTTA
 4441 AAGAGATATA GGAAGAGAGA GAAGAGCAGC AGCCTACAGA TCTGTAGCCA GCTGCAGCAC
 4501 GGA CTCTAAG ACGTAATGTG TGTATGACAG GTAGGACCAA GTATTAATAG TATAGTAAGC
 4561 AACTATTGTA TGAATTGGCT ATTTGGCTCT AGATGATTTG GAGCTAGTAG TCGGCTATAC
 4621 TATTAACCTT GCTCTTAGAT ATGTGGTTAA ATTTAATTTT TGAATTTTAC AAGATATAGA
 4681 ACATGTCTTC ACCATGTTTG CAAAGTTGAT AAAATGAAAT TGCACTCAAC TTTTAAATT
 4741 CAGCATGCTA TCCCACGTAT AGCTTTTTAA ATATGATTTA TTTTTCGTA CATTAGAAGT
 4801 TTAATGTTTA CGAAGTACTA AATGTTCTGC AGGTACTTCA TCATAATTGA AGATTTATGG
 4861 GCTTCATCAA TGTGGGATAT TGTTAGCCGT GGTTCGCTG ATAATAATAG TTGCAGTAGA
 4921 ATACTAATAA CAACAGAAAT TGAACCTGTA GCTTTGGCAT GCTGTGGATA TAACTCAGAG
 4981 CACATTATTA AGATTGATCC ACTGGGTGAT GATGTCTCAA GTC AATTGTT TTTCACTGGA
 5041 GTTGTGGCC AAGGAAATGA ATTTCTGGA CATCTACTG AAGTTTCTCA TGACATGATA
 5101 AAAAAATGTG GTGGCTTGCC ACTAGCAATA ACTATAACAG CCAGACATTT TAAAAGCCAG
 5161 CTGTTAGATG GAATGCAGCA ATGGAATCAC ATACAAAAAT CATTGACTAC TTCCAATTTG
 5221 AAGAAAAATC CTACTTTGCA GGGGATGAGG CAAGTACTCA ACCTATTTTA CAATAATCTT
 5281 CCTCATTGTT TGAAAGCATG TCTGTTATAC CTTAGCATCT ACAAGAGGGA CTACATAATT
 5341 AGGAAGGCCA ACTTGGTGAG GCAATGGATG GCTGAAGGTT TCATCAATTC CATAGAAAAT
 5401 AAAGTCATGG AAGAAGTTGC AGGGAACAT TTTGATGAAC TTGTTGGTAG

Sản phẩm PCR của cặp mồi YL100/YL102 có chiều dài 403 bp (Pi-ta₄₀₃):

6257 CAAT GCCGAGTGTG CAAAGGTTAA ATCTAAGGTT CAATGCCAAC
 6301 GAGTTCAAGC AGTATGACTC TAAGGAGACA GGGTTGGAAC ACTTGGTCGC CCTTCAGAG
 6361 ATCTCTGCAA GAATTGGGGG CACTGATGAT GATGAATCAA ACAAACCTGA AGTGGAGTCT
 6421 GCCTTGAGGA CTGCAATTCG CAAGCATCCG ACGCCGAGCA CTCTTATGGT TGATATACAA
 6481 TGGGTGGATT GGATCTTTGG TGCTGAAGGG AGAGACTTGG ATGAAGATTT GGCACAACAA
 6541 GATGATCAGG GGTATGGATT TTTTATTCTA TTCCAGGTT ACAACTTACA AGGATTATTG
 6601 AGCTTCTTTC TTTCTCTGCC GTGGCTTCTA TCTTTACCTG CTATGCATCT TCAACCTGA

Hình 3. Trình tự nucleotide của 03 sản phẩm PCR khuếch đại thông qua 03 cặp mồi đặc hiệu. Chú thích: TGC (GCA ở sợi bổ sung) là bộ ba mã hóa cho alanine ở vị trí 918 trong phân tử protein Pi-ta của allele *Pi-ta* trội (*Pi-ta*⁺) ở hai giống 4B và 212.

Trình tự nucleotide của ba đoạn khuếch đại ở hai giống 4B và 212 đã được so sánh với ba đoạn tương ứng của gen *Pi-ta* trong cơ sở dữ liệu của GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; accession number:

AF207842) cho thấy chúng tương đồng 100% và amino acid 918 là alanine. Gen *Pi-ta* định vị trên nhiễm sắc thể số 12 và có thể biểu hiện trong cả giống lúa kháng bệnh lùn giống lúa mắn cảm. Tuy

nhiên, khi nghiên cứu trình tự của các amino acid ở các protein được mã hóa bởi allele *Pi-ta⁻* (*Pi-ta* lặn) trên giống lúa mẫn cảm và allele *Pi-ta⁺* (*Pi-ta* trội) trên giống lúa kháng bệnh đạo ôn thì thấy có sự sai khác một amino acid ở vị trí 918: alanine ở *Pi-ta⁺* thay vì serine ở *Pi-ta⁻*. Do đó, có thể xem rằng amino acid 918 chính là yếu tố quyết định tính kháng bệnh đạo ôn của gen *Pi-ta* (Bryan *et al.*, 2000). Kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy chỉ hai giống lúa 4B và 212 là chứa allele trội của gen *Pi-ta*. Hai giống khác có mang gen *Pi-ta* là TH5 và IR38 chỉ chứa allele lặn.

Gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa là một họ đa gen. Khả năng kháng bệnh của cây có thể được quyết định bởi sự có mặt của gen này hay gen khác trong họ gen. Theo Wang và đồng tác giả (1999) gen *Pi-b* cũng là một gen kháng bệnh đạo ôn chủ yếu của nhóm lúa indica. Vì vậy, ngoài việc khảo sát gen *Pi-ta* chúng tôi đang tiếp tục kiểm tra sự có mặt của gen

Pi-b trong genome của một số giống lúa khác.

KẾT LUẬN

1. Khuếch đại PCR bằng ba cặp mồi YL153/YL154, YL155/YL87 và YL100/YL102, chúng tôi đã thu được ba đoạn DNA đặc trưng tương đồng 100% với ba vùng tương ứng của gen *Pi-ta* ở bốn giống lúa TH5, IR38, 4B và 212. Ba giống lúa khác là HT1, X21 và KD18 không có sản phẩm khuếch đại ở cả ba vùng của gen *Pi-ta*.

2. Trong bốn giống lúa có hiện diện gen *Pi-ta*, chỉ có hai giống 4B và 212 có mang allele *Pi-ta* trội (*Pi-ta⁺*), trong khi hai giống kia là TH5 và IR38 lại mang allele *Pi-ta* lặn (*Pi-ta⁻*).

Lời cảm ơn: Công trình có sự hỗ trợ của Chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Tự nhiên 2006 - 2007.

Bảng 2. Sự hiện diện của gen *Pi-ta* và khả năng kháng bệnh đạo ôn của các giống lúa được khảo sát.

STT	Giống lúa	Hiện diện của gen <i>Pi-ta</i>	Kiểu allele <i>Pi-ta</i>	Phản ứng với bệnh đạo ôn
1	HT1	Không	-	(1)
2	X21	Không	-	Nhiễm nhẹ hoặc trung bình ⁽²⁾
3	KD18	Không	-	Nhiễm vừa ⁽³⁾
4	TH5	Có	Lặn	Nhiễm nhẹ ⁽⁴⁾
5	IR38	Có	Lặn	Nhiễm hoặc nhiễm nặng ⁽¹⁾⁽²⁾
6	4B	Có	Trội	Kháng ⁽²⁾
7	212	Có	Trội	Kháng ⁽⁵⁾

Chú thích: (1) Theo tài liệu "Đánh giá mức độ nhiễm bệnh đạo ôn, khô vằn, rầy nâu, sâu cuốn lá nhỏ trên các giống lúa ở vùng khu 4 năm 2003" của Trung tâm Bảo vệ thực vật vùng khu 4, 2003. (2) Theo tài liệu "Giới thiệu một số giống lúa đang gieo cấy ở Thừa Thiên Huế" của Công ty Giống cây trồng Thừa Thiên Huế, 2001. (3) Theo trang tin điện tử "Ngân hàng kiến thức trồng lúa" của Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. (4) Theo tài liệu "Hướng dẫn kỹ thuật canh tác giống TH5" của Công ty Giống cây trồng Thừa Thiên Huế. (5) Theo tài liệu của Bộ môn Di truyền tế bào và Lai xa, Viện Di truyền Nông nghiệp, Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12: 2033-2045.

Chen DH, Vina M, Inukai T, Mackill DJ, Ronald PC, Nelson RJ (1999) Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi44(t)*, in a line derived from a

durably resistant rice cultivar. *Theor Appl Genet* 98: 1046-1053.

Fjellstrom R, Conaway-Bormans CA, McClung AM, Marchetti MA, Shank AR, Park WD (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.

Fukuta Y, Araki E, Yanoria MJT, Imbe T, Tsunematsu H, Kato H, Ebron LA, Mercado-Escueta D, Khush GS

- (2004) Development of differential varieties for blast resistance in IRRI-Japan Collaborative Research Project. Rice Blast: Interaction with Rice and Control. *Proceeding of the 3rd International Rice Blast Conference*. S Kawasaki (ed), Kluwer Academic, Netherlands: 229-233.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HW, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 19(15): 4004-4014.
- Jia Y, Wang Z, Singh P (2002) Development of dominant rice blast *Pi-ta* resistance gene markers. *Crop Sci* 42: 2145-2149.
- Kang TJ, Fawley MW (1997) Variable (CA/GC)_n simple sequence repeat DNA in the algae *Chamydomonus*. *Plant Mol Biol* 35: 943-948.
- Silue D, Nottenghem JL, Tharreau D (1992) Evidence for a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa*-*Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* 82: 577-580.
- Wang ZX, Yano M, Yomanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999) The *Pi-b* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine rich repeat class of plant resistance genes. *Plant J* 19: 55-64.

ANALYSIS OF BLAST RESISTANCE GENE *Pi-ta* IN SOME RICE (*ORYZA SATIVA* L.) CULTIVARS

Nguyễn Hoàng Lộc^{1,*}, Trương Thị Bích Phương^{1,2}, Nguyễn Văn Song¹, Phan Thị Phương Nhi³, Trương Thị Tram Chi¹, Duong Thị Thảo Trang¹

¹Institute of Resources, Environment and Biotechnology, Hue University

²College of Sciences, Hue University

³College of Agriculture and Forestry, Hue University

SUMMARY

Rice blast disease caused by *Pyricularia grisea* is one of the most devastating diseases worldwide and deeply reduced the productivity. The resistance to the pathogen is a classical gene system and *Pi-ta* is one of major resistance genes introgressed from indica cultivars, have recently been molecularly characterized. *Pi-ta* protein is a putative cytoplasmic receptor binded directly to the AVR *Pi-ta* protein from *Pyricularia grisea* to initiate a *Pi-ta*-mediated defense response. The main objective of our study was to investigate the relationship between the presence of *Pi-ta* gene and the fungal resistance in some indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars which have been grown in the Central of Vietnam such as HT1, X21, KD18, TH5, IR38, 4B and 212. The presence and absence of the *Pi-ta* gene were confirmed by using three specific pairs of primer to the *Pi-ta* gene (YL153/YL154, YL155/YL87 and YL100/YL102) to amplify the respective DNA fragments by polymerase chain reaction (PCR). PCR products were, then, cloned into the vector pCR[®]2.1 for sequencing. The presence of dominant *Pi-ta* allele (*Pi-ta*⁺) will be determined based on the type of amino acid (918) in the leucine rich region of *Pi-ta* protein. Our results showed that only four of seven investigated rice cultivars (TH5, IR38, 4B and 212) contain *Pi-ta* gene. The homology between three specific regions of *Pi-ta* gene (AF207842) and three PCR products is 100%. The analysis also determined the presence of the dominant *Pi-ta* allele with alanine at 918 position in two of four indica rice cultivars containing *Pi-ta* gene. Thus, the PCR-based *Pi-ta* gene markers could be useful for marker-assisted selection breeding since it is the part of resistance gene, and the technique is simple, rapid and inexpensive. In addition, the analysis can be done with a large numbers of samples.

Keywords: Blast disease resistance, molecular marker, *Oryza sativa*, *Pi-ta* gene

* Author for correspondence: Tel: 84-54-3830208; Fax: 84-54-3820438; E-mail: nhloc@hueuni.edu.vn