

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập-Tự do-Hạnh phúc

TRÍCH YẾU LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên luận án: Nghiên cứu giá trị biểu hiện microRNA trong tuyển chọn giống lúa kháng bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*)

Tên tác giả: Nguyễn Bằng Phi

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học; **Mã số:** 9 42 02 01

Cơ sở đào tạo: Trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

1. Mục tiêu và đối tượng nghiên cứu của luận án

Mục tiêu

Xác định sự hiện diện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa *japonica* và *indica*. Phân tích mức độ và giá trị biểu hiện của các phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR160a* và *osa-miR169a* trên nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm trồng tại Việt Nam.

Xác định mối liên hệ giữa phân tử *osa-miR7695* và các biến thể phiên mã của gen đích *OsNramp6*.

Phân tích mức độ và giá trị biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* trên nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm trồng tại Việt Nam.

Dự đoán, tìm kiếm các microRNAs khác ngoài *osa-miR7695* trong việc tác động đến các biến thể phiên mã của gen đích *OsNramp6*.

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là các phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và *OsNramp6* liên quan đến khả năng chống chịu nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *Magnaporthe oryzae*.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu đã tiến hành thu thập các giống lúa thực địa đang được trồng ở các vùng trồng lúa thuộc các tỉnh thành ở miền Nam Việt Nam. Các giống lúa được trồng thành cây con 14 ngày tuổi trong các chậu nhựa kích thước 18-14 cm với mỗi chậu 5 hạt trong điều kiện nhà lưới. Đồng thời, mẫu nấm gây bệnh *M. oryzae* LBT2 được nuôi cấy trên môi trường oatmeal agar trong 2 tuần, chiếu đèn Blacklight tạo UV trong 2-3 ngày ở 25 °C để kích thích bào tử nảy mầm. Bào tử nấm *M. oryzae* LBT2 được pha loãng ở nồng độ 1×10^5 - 5×10^5 bào tử/ml với dung dịch Tween20 0.1% và phun sương dung dịch bào tử lên lá lúa 14 ngày tuổi. Lá lúa sau khi phun bào tử được để qua đêm trong tối, ẩm ở nhiệt độ 25 °C sau đó đưa ra nhà lưới. Vùng lá bị nhiễm của 19 giống lúa được thu thập ở các thời điểm 24h, 48h, và 72h sau khi nhiễm. Các mẫu lá được trữ lạnh và ly trích để thu thập RNA tổng để đánh giá biểu hiện của các phân tử microRNAs và biến thể phiên mã *OsNramp6*. Sau 5-7 ngày trồng ở nhiệt độ 28-32 °C, độ ẩm từ 65% - 80%, các mẫu lá lúa nhiễm nấm *M. oryzae* LBT2 được thu thập 3 lá cho một cây lúa (lặp lại 5 cây cho mỗi nghiệm thức). Đánh giá mức độ nhiễm nấm *M. oryzae* LBT2 bằng phần mềm Assess 2.0 (APS Press, USA), từ đó phân hạng các giống lúa đối với tính kháng nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* LBT2.

RNA tổng (bao gồm miRNA) của mẫu lá nhiễm bệnh chiết xuất bằng Trizol theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Fisher Scientific, USA). Tất cả các mẫu RNA được xử lý với DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, USA) để loại bỏ các phân tử DNA tồn dư. Sự hiện diện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa được xác định bằng kỹ thuật nested RT-PCR với các đoạn primer đặc hiệu và được nhân dòng vào trong vector *pJET1.2*, chuyển vào tế bào *E.coli DH5a* bằng phương pháp sốc nhiệt (Thermo Fisher Scientific, USA). Những dòng dương tính (positive clones) được chọn lựa, kiểm tra bằng phương pháp PCR với đoạn primer *LpJET1.2F* và *LpJET1.2R* sau đó giải trình tự tại công ty First Base, Malaysia, sau đó so sánh trình tự của các đoạn chèn bằng phần mềm BLAST với cơ sở dữ liệu miRBase.

Mức độ biểu hiện của phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và các biến thể phiên mã của phân tử *OsNramp6.4* được đánh giá bằng phương pháp real-time PCR (qPCR) với kit SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline, UK), các primer đặc hiệu cùng gen *OsUbi1* làm đối chứng. Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và *OsNramp6* được định lượng tương đối bằng phương pháp $2^{-\Delta Ct}$. Mỗi phản ứng được lặp lại 3 lần và ghi nhận dữ liệu bằng công thức : trung bình \pm độ lệch chuẩn. Các microRNAs tiềm năng tương tác với các biến thể phiên mã của *OsNramp6* được xác định bằng công cụ psRNATarget V2.

3. Các kết quả chính

- Nghiên cứu đã xác định phân tử *osa-miR7695* là một microRNA chỉ có ở trên lúa, có vai trò điều hòa tăng khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen đích *OsNramp6*. Phân tử *osa-miR7695* này hiện diện trên cả giống lúa *japonica* và *indica*.

- Nghiên cứu cho thấy mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* có sự khác biệt giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở các thời điểm 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi (hpi – giờ sau nhiễm). Khuynh hướng biểu hiện của phân tử này gia tăng và đạt cao nhất ở 72 hpi so với các thời điểm khác. Kết quả phân tích giá trị AUC đạt 0,899 với độ tin cậy là 95% cho thấy mô hình nhận diện, phân biệt giống lúa chống chịu và mẫn cảm dựa trên *osa-miR7695* là hiệu quả cao có thể trở thành chỉ thị phân tử tiềm năng cho tính kháng trên các giống lúa tại Việt Nam.

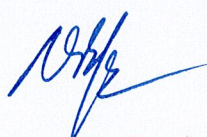
- Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* và *osa-miR160a* trên nhóm lúa chống chịu cao gấp 25 lần và 2,6 lần so với nhóm lúa mẫn cảm ở thời điểm 72 hpi và 24 hpi cũng có thể trở thành các chỉ thị phân tử tiềm năng cho tính kháng nấm gây bệnh đạo ôn trên các giống lúa.


- Trong số 8 biến thể phiên mã của gen *OsNramp6*, hai phân tử *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* có mức độ biểu hiện tăng cao ở thời điểm 24 hpi khi so sánh giữa nhóm lúa mẫn cảm và nhóm lúa chống chịu. Kết quả đánh giá hiệu quả mô hình chẩn đoán dựa trên đường cong ROC của hai phân tử đạt 100% và 93,7%.

- Phân tích in silico xác định được 6 microRNAs có thể liên quan đến việc điều hòa các biến thể phiên mã *OsNramp6* bao gồm *osa-miR159a*, *osa-miR444b*, *osa-miR535*, *osa-miR1847*, *osa-miR5816* và *osa-miR1852*. Trong đó, có 2 microRNAs đã được mô tả chức năng trong việc điều hòa lúa chống lại nấm *M. oryzae* là *osa-miR159a* và *osa-miR444b*.


- Phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a*, *OsNramp6.1*, và *OsNramp6.4* là các phân tử chỉ thị tiềm năng cho việc xác định các giống lúa có khả năng kháng với nấm gây bệnh đạo ôn, góp phần hỗ trợ cho công tác, chương trình lai tạo giống lúa tại Việt Nam.

Giáo viên hướng dẫn


PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc


Nguyễn Ngọc Bích Châu

Nghiên cứu sinh


Nguyễn Bàng Phư