

ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁC GIỐNG LÚA ĐỊA PHƯƠNG (*Oryza sativa* L.) BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR

Nguyễn Phạm Anh Thi¹, La Hoàng Trúc Ngân¹,

Trương Thị Bích Vân¹, Nguyễn Thị Pha¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá sự đa dạng di truyền trên 30 giống lúa địa phương được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Phát triển đồng bằng sông Cửu Long bằng việc sử dụng 25 cặp mồi SSR. Kết quả cho thấy trong tổng số 25 cặp mồi SSR, có 22 cặp mồi có tính đa hình (88%). Các cặp mồi SSR phát hiện locus số 62 bằng đa hình trong tổng số 70 băng được khuếch đại. Hệ số đa dạng di truyền (PIC) trên các locus dao động trong khoảng từ 0.0605 đến 0.7010. Dựa vào phương pháp UPGMA có thể phân nhóm 30 giống lúa địa phương thành 3 nhóm chính. Mức tương đồng di truyền của chúng dao động từ 56% đến 94%. Những dữ liệu trong nghiên cứu này góp phần cung cấp thông tin di truyền làm cơ sở cho lai tạo giống trong tương lai.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, lúa miền, SSR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa miền địa phương có lịch sử canh tác lâu đời, được trồng với sản lượng lớn ở các tỉnh Cà Mau, Bạc Liêu, Trà Vinh và Kiên Giang (Tổng cục Thống kê, 2017). Lúa địa phương có nguồn gen đa dạng, mang tính ứng dụng cao trong công tác lai tạo các giống lúa mới bởi nhiều đặc tính nổi bật như có khả năng thích nghi tốt trong các khu vực thổ nhưỡng bị nhiễm phèn, nhiễm mặn, chống chịu với nhiều loài sâu bệnh, cho phẩm chất gạo ngon, có giá trị kinh tế cao (Nguyễn Văn Tú và ctv, 2011; Trần Hữu Phúc và ctv, 2012). Tuy nhiên, các giống lúa địa phương thường có thân cao, dễ đổ ngã, chịu tác động của quang kỳ, vụ mùa đặc trưng và phụ thuộc nhiều vào thời tiết, do đó sản lượng và năng suất lúa địa phương hương dổi thấp so với các giống lúa lai mới. Trong những năm gần đây, dưới tác động của cuộc Cách mạng xanh nằm cùng với những tác động từ biến đổi khí hậu, diện tích canh tác lúa địa phương ngày càng bị thu hẹp, thay thế bằng những giống lúa mới có thời gian sinh trưởng ngắn, canh tác được 3 vụ lúa/năm, mang lại hiệu quả kinh tế cao (Trần Văn Đạt, 2010). Điều này dẫn đến sự thu hẹp về mặt đa dạng di truyền, nhiều giống lúa chất lượng địa phương đã không còn trong sản xuất, đe dọa sự giảm sút số lượng và thành phần loài của tập đoàn lúa miền địa phương (Khuyết Hữu Trung và ctv, 2012).

Để tiếp cận và đánh giá với nguồn vật liệu lúa địa phương, kỹ thuật SSR được đánh giá có tầm quan trọng trong nghiên cứu về di truyền và chọn giống, cho hiệu quả vượt trội so với các kỹ thuật dựa vào hình thái học truyền thống bởi tính đa hình cao, bản chất đồng trội, có tính lặp lại cao, phạm vi bao phủ khắp bộ gen và có vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể, dễ dàng phát hiện bằng kỹ thuật PCR (Kalia và ctv, 2011; Lê Ý Phụng và ctv, 2018). Hiện nay, hơn 20.000 chỉ thị phân tử SSR đã được tạo ra và ứng dụng trong phân tích kiểu gen của các giống lúa (International Rice Genome Sequencing Project và Sasaki, 2005; Miah và ctv, 2013). Nhiều nghiên cứu sử dụng kỹ thuật SSR để nghiên cứu đa hình gen như Ngô Thị Hồng Tươi và ctv (2014) đã sử dụng kỹ thuật SSR để phân tích đa dạng di truyền của 46 giống lúa cảm địa phương, Phạm Quang Nghĩa và ctv (2015) dùng 4 mồi SSR để nghiên cứu đa hình trên 6 giống lúa thơm, Trần Thị Lương và ctv (2013) sử dụng 40 dấu SSR để phân tích mối quan hệ di truyền của 60 giống lúa đặc sản,... cho những kết quả đáng tin cậy. Vì những lý do trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của các giống lúa địa phương, từ đó phân nhóm được nguồn vật liệu lúa địa phương, làm dẫn liệu cho quá trình lai giống trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Thí nghiệm được thực hiện trên 30 giống lúa địa phương được thu thập và lưu trữ tại Viện Nghiên cứu Phát triển đồng bằng sông Cửu Long, Trường Đại học Cần Thơ (Bảng 1).

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học.

Trường Đại học Cần Thơ

Email: npahthi@ctu.edu.vn

Đã sử dụng 25 chỉ thị phân tử SSR định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 5, 6, 9, 10 và 11 của cây lúa. Theo các nghiên cứu trước đây về đa dạng di truyền cho thấy phần lớn các cặp mới trong nghiên cứu này cho chỉ số đa hình cao trên cây lúa trồng ở nhiều vùng khác nhau như Ấn Độ, Việt Nam, châu Phi (Davila và

ctv, 2013; Khuất Hữu Trung và ctv, 2012; Ngô Thị Hồng Tươi và ctv 2014; Trần Thị Lương và ctv, 2013; Dao và ctv, 2018). Thông tin chi tiết về các marker SSR được thu thập từ cơ sở dữ liệu Gramene (www.gramene.org) (Bảng 2).

Bảng 1. Danh sách 30 giống lúa địa phương nghiên cứu

STT	Tên giống	STT	Tên giống
1	Lùn cần đỏ	16	Tai nguyên Thanh Tr
2	Lùn cần trắng	17	Tai nguyên
3	Lùn phèn	18	Lùn phèn
4	Một bụi lùn	19	Tet rần
5	Một bụi lùn Ca Mau	20	Thơm mần
6	Một bụi trắng	21	Thơm lùn mần
7	Nàng quýt biển	22	Pokkah
8	Nếp sữa	23	IR28
9	Soi lùn	24	Lùn cao sản đỏ
10	Ngọc nữ	25	Trắng bó câu
11	Tra long	26	Trắng tròn
12	Ba bụi	27	Nàng thơm
13	Nàng quýt biển 1	28	Một bụi cao
14	Bơ liếp	29	Lùn phồng
15	Cao sản	30	Lùn phèn hạt nhỏ

Bảng 2. Các cặp mới SSR được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên mới	NST	Trình tự mới 5' - 3'	Nhiệt độ bắt cặp	Motif lặp
1	RM10694	1	F-TTTCCTGGTTTCAAGCTTACG R-AGTACGGTACCTTGATGGTAGAAAGG	58	(AC)18
2	RM243	1	F-GATCTGCAGACTGCAGTTGC R-AGCTGCAACGATGTTGTCC	55	(CT)18
3	RM10745	1	F-TGACGAATTGACACACCGAGTACG R-ATTTCACCGTCGGCAACATGG	58	(TATG)9
4	RM10748	1	F-CATCGGTGACCACTTCTCC R-CCTGTGATTAATCTCCCTCAAGC	58	(AG)14
5	RM10793	1	F-GACTTGCCAACTCCTTCAATTTCG R-TCGTCGAGTAGCTTCCCTCTCTACC	58	(ATAG)7
6	RM10825	1	F-GGACACAAGTCCATGATCCTATCC R-GTTTCTTTCCATCCCTGTGTC	56	(AAG)10
7	RM10843	1	F-CACCTCTCTGCCTCCTATCATGC R-GTTTCTTCGGAAATCGTGTGG	58	(TC)10
8	RM15461	1	F-GCCTCCCATATAAACCGGC R-AGCGAAGGGAACACGACAG	58	(TC)19
9	RM3412	1	F-AAAGCAGGTTTTCCTCTCC R-CCCATGTGCAATGTGTCTTC	55	(CT)17
10	RM7075	1	F-TATGGACTGGAGCAAACTC R-GGCACAGCACCAATGCTC	55	(ACAT)13
11	RM8046	1	F-AGTACGAATTCTGTACGCGTGTCTAGT	58	(TA)28

TT	Tên motif	NST	Trình tự motif 5' – 3'	Nhiệt độ bắt cặp	Motif lặp
			R-GGATGAAAGTGTGATGGATGATCTACTTGT		(AC)16
12	RM1287	1	F- GTGAAGAAAGCATGGTAAATG R- CTCAGCTTGCTTGTGGTTAG	55	(AG)17
13	RM140	1	F- TGCCTCTTCCCTGGCTCCCTG R- GGCATGCCGAATGAAATGCATG	58	(CT)12
14	RM10864	1	F- GAGGTGAGTGAGACTTGACAGTGC R- GCTCATCATCCAACCACAGTCC	58	(GT)27
15	RM3252	1	F- GGTAACCTTTGTTCCCATGCC R- GGTCATCATGCATGCAAGC	56	(CT)13
16	RM493	1	F- TAGCTCCAACAGGATCGACC R- GTACGTAACCGCGAAGGTG	56	(CTT)9
17	RM562	1	F- CACAACCCACAACAGCAAG R- CTTCCCCAAAGTTTAGCC	60	(AAG)13
18	RM283	1	F- GTCTACATGTACCTTGTGGG R- CGGCATGAGAGTCTGTGATG	56	(GA)18
19	RM302	1	F- TCATGTTCATCTACCATCACAC R- ATGGAGAAGATGGAATACCTGC	55	(GT)30 (AT)8
20	RM413	5	F- GGCGATTCTTGATGAAGAG R- TCCCCACCAATCTTGTCTTC	58	(AG)11
21	RM122	5	F- GAGTCGATGTAATGTCATCAGTGC R- GAAGGAGGTATCGCTTTGTGGAC	56	(GA)11
22	RM253	6	F- TCCTTCAAGAGTGC AAAACC R- GCATTGTTCATGTCGAAGCC	55	(GA)25
23	RM215	9	F- CAAAATGGAGCAGCAAGAGC R- TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG	55	(CT)16
24	RM333	10	F- GTACGACTACGAGTGTACCAA R- GTCTTCGCGATCACCTGC	55	(TAT)19 (CTT)19
25	RM206	11	F- CCATGCGTTTAACATTCT R- CGTTCATCGATCCGTATGG	58	(CT)21

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ly trích DNA

Hạt giống lúa được ủ trong tủ ủ (37°C) đến khi giai đoạn hạt nảy mầm. Hạt lúa này mầm dài từ 1,5 – 2,0 cm sẽ được trồng vào chậu đất, bổ sung nước tưới mỗi ngày đến giai đoạn là non 10 – 12 ngày tuổi thì tiến hành ly trích DNA. Lá non đạt tiêu chuẩn được lau sạch bằng cồn 70° và thực hiện ly trích DNA theo quy trình CTAB được mô tả bởi Roger and Bendich (1988) có hiệu chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. DNA sau khi được ly trích sẽ được kiểm tra chất lượng bằng gel agarose 1%. DNA đủ tiêu chuẩn sẽ được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 15 µL hỗn hợp bao gồm 1 µL DNA mẫu; 9,65 µL

BH₂O; 3 µL Buffer 5X; 0,6 µL mỗi muối (10 pM) và 0,6 µL mỗi ngược (10 pM); 0,15µL Taq Polymerase (5U/µL). Phản ứng được thực hiện theo chương trình nhiệt như sau: 94°C trong 2 phút, 30 chu kỳ lặp lại với 3 bước chính: Biến tính DNA khuôn ở 94°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 50 – 65°C trong 30 giây tùy thuộc vào từng cặp motif SSR, và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 45 giây. Sản phẩm PCR được giữ trong 5 phút ở 72°C và sau đó được trữ lạnh ở 4°C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 2% ở hiệu điện thế 140V bằng kỹ thuật điện di với dung dịch đệm TBE 1X, thời gian điện di phụ thuộc vào kích thước của sản phẩm PCR, dao động từ 40 phút đến 1 giờ. Thang chuẩn Ladder 100 bp của Công ty Thermo Fisher Scientific được sử dụng để ước lượng kích thước các đoạn sản phẩm PCR. Kết

Đã sử dụng 25 chỉ thị phân tử SSR định vị trên nhiễm sắc thể số 1, 5, 6, 9, 10 và 11 của cây lúa. Theo các nghiên cứu trước đây về đa dạng di truyền cho thấy phân loại các cặp môi trong nghiên cứu này cho chỉ số đa hình cao trên các cây lúa trồng ở nhiều vùng khác nhau như: Ấn Độ, Việt Nam, châu Phi (Davla và

ctv, 2013; Khuất Hưn Trung và ctv, 2012; Ngô Thị Hồng Tú và ctv 2014; Trần Thị Lương và ctv, 2013; Đào và ctv, 2018) Thông tin chi tiết về các nơi SSR được thu thập từ cơ sở dữ liệu (Gramene) (www.gramene.org) (Bảng 2).

Bảng 1. Danh sách 30 giống lúa địa phương nghiên cứu

STT	Tên giống	STT	Tên giống
1	Lùn cần đỏ	16	Tai nguyên Thanh Trì
2	Lùn cần trắng	17	Tai nguyên
3	Lùn phều	18	Lùn phèn
4	Một bụi lùn	19	Tet rần
5	Một bụi lùn Cà Mau	20	Thơm mần
6	Một bụi trắng	21	Thơm lùn mần
7	Nàng quýt biển	22	Pokkai
8	Nếp sữa	23	IR28
9	Sỏi lùn	24	Lùn cao san đỏ
10	Ngọc nữ	25	Trang bó cầu
11	Trà long	26	Trang tròn
12	Bà bìn	27	Nàng thơm
13	Nàng quýt biển 1	28	Một bụi cao
14	Bơ liếp	29	Lùn phồng
15	Cao san	30	Lùn phèn hạt nhỏ

Bảng 2. Các cặp môi SSR được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên môi	NST	Trình tự môi 5' - 3'	Nhiệt độ bát cặp	Motif lặp
1	RM10694	1	F- TTTCCTCTGGTTTCAAGCTTACG R- AGTACGGTACCTTGAAGGAGAAAGG	58	(AC)18
2	RM243	1	F- GATCTGTCAGACTGCACTTGC R- AGCTGCAACGATGTTGTCC	55	(CT)18
3	RM10745	1	F- TGACGAATTCACACACCGAGTACG R- ACTTCACCGTCCGGCAACATG	58	(TATG)9
4	RM10748	1	F- CATCGGTGACCACTTGTCC R- CCTGTCAATCTATCTCCCTCAAGC	58	(AG)14
5	RM10793	1	F- GACTTGGCAACCTCTCAATTCG R- TCGTCCGAGTAGCTCCCTCTCTACG	58	(ATAG)7
6	RM10825	1	F- GGACACAAGTCCATGATCCTATCC R- GTTCTCTTCCATCCTTGTTC	56	(AAG)10
7	RM10843	1	F- CACCTCTTCTGCCTCCTATCAGC R- GTTCTCTTCCGGAATCGTGTGG	58	(TC)10
8	RM5461	1	F- GCTTCCCATAAACCAGG R- AGCGAAGGAAACGACAG	58	(TC)19
9	RM3112	1	F- AAGCAGGTTTCTCTCTCC R- CCCATGTGCAATGTGCTTC	55	(CT)17
10	RM7053	1	F- TTGAGATGGAGCAACCTC R- GGCACAGCAACCAATGCTC	55	(ACAT)13
11	RM8046	1	F- AGTACGATTTCTGTCAACGTTGCTTAGT	58	(TA)28

TT	Tên mẫu	NST	Trình tự mã 5' – 3'	Nhiệt độ bắt cặp	Motif lặp
			R-GGATGAAAGTTGATGGATGATCTACTTGT		(AC)16
12	RM1287	1	F- GTGAAGAAAGCATGGTAAATG R- CTCAGCTTGCTTGTGGTTAG	55	(AG)17
13	RM140	1	F- TGCCTCTTCCCTGGCTCCCTG R- GGCATGCCGAATGAAATGCATG	58	(CT)12
14	RM10864	1	F- GAGGTGAGTGAGACTTGACATGCG R- GCTCATCATCCAACCACAGTCC	58	(GT)27
15	RM3252	1	F- GGTAACCTTTGTTCCCATGCC R- GGTCATCATGCATGCAAGC	56	(CT)13
16	RM493	1	F- TAGCTCCACAGGATCGACC R- GTACGTAACCGCGAAGGTG	56	(CT)9
17	RM562	1	F- CACAACCCACAACAGCAAG R- CTTCCTCCCAAAGTTTAGCC	60	(AAG)13
18	RM283	1	F- GTCTACATGTACCTTGTGGG R- CGGCATGAGAGTCTGTGATG	56	(GA)18
19	RM302	1	F- TCATGTCATCTACCATCACAC R- ATGGAGAAGATGGAATACTTGC	55	(GT)30 (AT)8
20	RM413	5	F- GGCGATTCTTGGATGAAGAG R- TCCCCACCAATCTTGTCTTC	58	(AG)11
21	RM122	5	F- GAGTCGATGTAATGTCATCAGTGC R- GAAGGAGGTATCGCTTGTGGAC	56	(GA)11
22	RM253	6	F- TCCCTCAAGAGTGCAAAACC R- GCATTGTCATGTGCAAGCC	55	(GA)25
23	RM215	9	F- CAAAATGGAGCAGCAAGAGC R- TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG	55	(CT)16
24	RM333	10	F- GTACGACTACGAGTGTACCAA R- GTCCTTCGCGATCACTCGC	55	(TAT)19 (CT)19
25	RM206	11	F- CCGATGCGTTAACTATTCT R- CGTTCATCGATCCGTATGG	58	(CT)21

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ly trích DNA

Hạt giống lúa được ủ trong tủ ủ (37°C) đến khi giai đoạn hạt nảy mầm. Hạt lúa nảy mầm dài từ 1,5 – 2,0 cm sẽ được trồng vào chậu đất, bổ sung nước tưới mỗi ngày đến giai đoạn là non 10 – 12 ngày tuổi thì tiến hành ly trích DNA. Lá non đạt tiêu chuẩn được lau sạch bằng cồn 70° và thực hiện ly trích DNA theo quy trình CTAB được mô tả bởi Roger and Bendich (1988) có hiệu chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. DNA sau khi được ly trích sẽ được kiểm tra chất lượng bằng gel agarose 1%. DNA đủ tiêu chuẩn sẽ được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 15 µL hỗn hợp bao gồm 1 µL DNA mẫu; 9,65 µL

BiH₃O; 3 µL Buffer 5X; 0,6 µL mỗi muối (10 pM) và 0,6 µL mỗi ngược (10 pM); 0,15µL Taq Polymerase (5U/µL). Phản ứng được thực hiện theo chương trình nhiệt như sau: 94°C trong 2 phút, 30 chu kỳ lặp lại với 3 bước chính: Biến tính DNA khuôn ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 50 – 65°C trong 30 giây tùy thuộc vào từng cặp mồi SSR, và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 45 giây. Sản phẩm PCR được giữ trong 5 phút ở 72°C và sau đó được trữ lạnh ở 4°C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 2% ở hiệu điện thế 140V bằng kỹ thuật điện di với dung dịch đệm TBE 1X, thời gian điện di phụ thuộc vào kích thước của sản phẩm PCR, dao động từ 40 phút đến 1 giờ. Thang chuẩn Ladder 100 bp của Công ty Thermo Fisher Scientific được sử dụng để ước lượng kích thước các đoạn sản phẩm PCR. Kết

quả điện di được ghi nhận bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000 (USA).

2.2.3. Phân tích số liệu

Dựa vào hình ảnh điện di sản phẩm PCR, sự xuất hiện của các băng điện di được ước lượng kích thước dựa vào thang chuẩn. Các băng được mã hóa dưới dạng nhị phân, 1 (đối với trường hợp xuất hiện băng) và 0 (đối với trường hợp không xuất hiện băng). Số liệu các băng ghi nhận được lưu trữ trong phần mềm Excel. Hệ số tương đồng di truyền Jaccard, phân nhóm di truyền và sơ đồ hình nhánh so sánh mối quan hệ di truyền giữa 30 giống lúa được xác định dựa theo phương pháp UPGMA (Sneath và Sokal, 1973) trong phần mềm thông kê NTSYSpc 2.1

Hàm lượng thông tin đa hình (PIC: Polymorphic Information Content) được tính toán theo phương pháp của Weir (1996).

$$PIC(i) = 1 - \sum p_j^2$$

Trong đó: p_j là tần suất alen thứ j với locus SSR thứ i . Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự đa hình các cặp mới SSR đối với 30 giống lúa địa phương

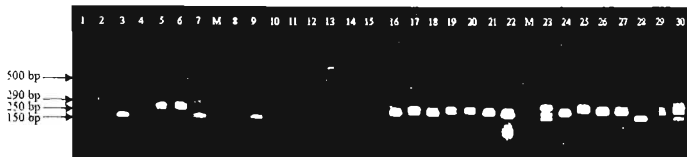
Trong 25 cặp mới SSR được sử dụng cho phân tích PCR trên 30 giống lúa địa phương, có 3 cặp mới RM10748, RM283, RM243 không thể hiện tính đa hình (Hình 3) và 22 cặp mới (88%) cho đa hình. Các cặp mới khuếch đại số lượng alen khá lớn với 67 alen, trong đó có 62 alen đa hình, dao động từ 2 đến 5 alen trên một locus. Số alen trung bình trên một locus là 3,05 alen, kết quả này cao hơn nghiên cứu của Singh và ctv (2015), tuy nhiên tương đối thấp hơn so với nghiên cứu của Vũ Thị Bích Huyền và ctv (2013), Ashraf và ctv (2016) và Dao và ctv (2018). Kích thước sản phẩm PCR dao động từ 70 bp (RM413) đến 600 bp (RM223). Cặp mới RM3252 cho số alen nhiều nhất với 5 alen, có 8 cặp mới cho số alen ít nhất với 2 alen (RM10825, RM10843, RM8046, RM140, RM215, RM5461, RM1287, RM10684). Đa số các cặp mới còn lại khuếch đại từ 3 đến 4 alen (Bảng 3, hình 1 và 2).

Bảng 3. Số alen và hệ số PIC của 22 cặp mới SSR

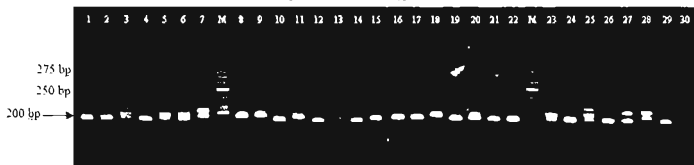
STT	Tên mới	NST	Số alen	Số alen đa hình	Chỉ số PIC	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1	RM3252	1	5	5	0,7010	150 – 500
2	RM10793	1	4	4	0,6682	125 – 250
3	RM3412	1	4	4	0,6425	175 – 275
4	RM10694	1	4	4	0,6374	200 – 275
5	RM493	1	3	3	0,5870	225 – 350
6	RM10745	1	3	3	0,5581	150 – 200
7	RM562	1	4	4	0,5492	100 – 300
8	RM7075	1	3	3	0,4890	150 – 200
9	RM302	1	3	2	0,4607	200 – 350
10	RM10864	1	2	2	0,3581	200 – 350
11	RM140	1	2	2	0,3557	100 – 150
12	RM10825	1	2	1	0,2772	100 – 150
13	RM10843	1	2	1	0,2149	150 – 200
14	RM8046	1	2	2	0,2044	150 – 200
15	RM5461	1	2	2	0,1595	150 – 200
16	RM1287	1	2	1	0,0605	150 – 200
17	RM413	5	4	4	0,6519	70 – 150
18	RM122	5	3	3	0,4377	200 – 275
19	RM253	6	3	3	0,5427	150 – 200
20	RM215	9	2	1	0,0605	150 – 200
21	RM333	10	4	4	0,5562	150 – 600
22	RM206	11	4	4	0,6820	400 – 500
Tổng			67	62		
Trung bình			3,05	2,82	0,4479	

Hệ số đa dạng di truyền PIC của 22 cặp mồi dao động từ 0,0605 (RM1215, RM1287) đến 0,7010 (RM3252); trung bình đạt 0,4479 (Bảng 3). Kết quả cho thấy có 7 cặp mồi SSR cho hệ số đa dạng di truyền lớn hơn 0,5 (RM3252, RM10793, RM3412, RM10694, RM493, RM10745). Hệ số PIC lớn hơn hoặc bằng 0,5 sẽ cho sự khác biệt cao về tỷ lệ đa hình của cặp mồi SSR được sử dụng. Hệ số đa dạng di truyền trong nghiên cứu này thấp hơn so với một số nghiên cứu trước đây như nghiên cứu của Davla

và ctv (2013) sử dụng 39 cặp mồi SSR cho chỉ số PIC là 0,670; hay nghiên cứu của Trần Thị Lương và ctv (2013) sử dụng 40 cặp mồi SSR cho chỉ số PIC trung bình là 0,60. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu khá tương đồng với nghiên cứu của Vũ Thị Bích Huyền và ctv (2013), Ngô Thị Hồng Tươi và ctv (2014), Singh và ctv (2015) với các hệ số PIC lần lượt là 0,427; 0,46 và 0,47 và cao hơn nghiên cứu của Dao và ctv (2018) sử dụng 59 cặp mồi cho hệ số PIC 0,394.



Hình 1. Sản phẩm PCR với cặp mồi RM3512



Hình 2. Sản phẩm PCR với cặp mồi RM3412



Hình 3. Sản phẩm PCR với cặp mồi RM283

(Ghi chú: M- thang chuẩn Ladder 100 bp, số thứ tự điện di theo danh sách giống lúa được trình bày trong bảng 1).

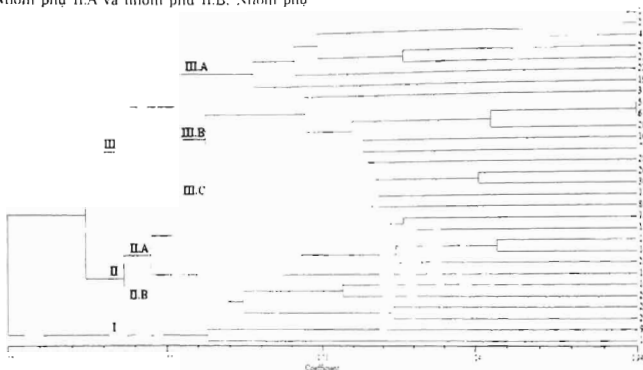
3.2. Quan hệ di truyền giữa các giống lúa địa phương nghiên cứu

Dựa trên sự đa hình của các cặp mồi SSR, mối quan hệ di truyền giữa 30 giống lúa địa phương đã được thiết lập theo phương pháp UPGMA được trình bày trong hình 4.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hệ số tương đồng di truyền giữa 30 giống lúa địa phương dao động từ 0,56 đến 0,94. Từ sơ đồ hình nhánh thể hiện quan hệ di truyền giữa các giống lúa, ở mức tương đồng di truyền 60,9%, tập đoàn 30 giống lúa địa phương có thể phân thành 3 nhóm chính rõ rệt: Nhóm I gồm 2 giống lúa, nhóm II gồm 11 giống lúa và nhóm III gồm 17 giống lúa còn lại.

Nhóm I: Gồm 2 giống Soi lùn và Lùn phen với mức tương đồng di truyền thấp (67,9%). Nhóm I có số lượng giống ít nhất trong ba phân nhóm và cũng có mức tương đồng khá thấp so với hai nhóm còn lại (60,9%). Kết quả này cho thấy hai giống lúa Soi Lùn và Lùn phen có mối quan hệ di truyền khá xa các giống còn lại, có thể sử dụng làm nguồn nguyên liệu tạo chọn giống lúa mới khi kết hợp với các giống lúa nhóm II, III. Nhóm II: Ở mức tương đồng di truyền 64,3%, nhóm II được phân thành hai nhóm phụ: Nhóm phụ II.A và nhóm phụ II.B. Nhóm phụ

II.A ở mức tương đồng 65,1% bao gồm 6 giống lúa (Nếp sữa, Tra long, Nang quýt biển 1, Ba bụi, Bờ hếp, Lùn cao sản đỏ) với hai giống có mức tương đồng cao nhất là Ba bụi và Bờ hếp (85,1%). Giống lúa Cao sản thể hiện mức tương đồng thấp nhất (70,2%) so với 6 giống còn lại trong nhóm. Nhóm phụ II.B gồm 4 giống (Ngọc nữ, Lùn phong, Trảng tròn, Nang thôm) có mức tương đồng 70,7%; trong đó, Trảng tròn và Nang thôm là hai giống có mức tương đồng cao nhất (79,5%).



(Ghi chú: Số thứ tự trong sơ đồ quan hệ di truyền theo danh sách giống lúa được trình bày trong bảng 1).

Hình 4. Sơ đồ hình nhánh thể hiện mối quan hệ di truyền của 30 giống lúa địa phương dựa trên số liệu phân tích DNA với 22 chỉ thị phân tử SSR

Nhóm III: Ở mức tương đồng 66,9%, có số lượng giống nhiều nhất với 17 giống lúa, được phân thành 3 nhóm phụ. Nhóm phụ III.A gồm 7 giống lúa mùa (Lùn cần đỏ, Lùn cần trắng, Một bụi lùn, Thơm lùn mùa, IR28, Pokkah, Tét rần), có mức tương đồng dao động từ 70,8% đến 92,1%. Nhóm phụ III.B gồm 9 giống (Lùn phen, Một bụi lùn Ca Mau, Một bụi trắng, Thơm mắn, Tai nguyên Thanh Tr. Nang quýt biển, Trảng bô cầu, Một bụi cao 1, Lùn phen hạt nhỏ) có hệ số tương đồng dao động từ 0,68 đến 0,94. Nhóm phụ III.C chỉ gồm 1 giống lúa Tai nguyên thấp nhất (66,9%) so với 16 giống lúa còn lại và nằm riêng rẽ một nhánh. Hệ số tương đồng của nhóm III dao động từ 0,67 đến 0,94, chứng tỏ các giống lúa trong này có quan hệ di truyền tương đối gần gũi. Trong nhóm III, cặp giống lúa Một bụi lùn Cà Mau và Một

bụi trắng có mức độ tương đồng cao nhất (94,0%), tiếp đến là cặp giống Lùn cần đỏ và Lùn cần trắng (92,1%). Đồng thời, hai cặp giống này cũng có mức tương đồng cao nhất trong 30 giống lúa nghiên cứu.

Như vậy, sơ đồ quan hệ di truyền của 30 giống lúa nghiên cứu có mức độ tương đồng khá cao. Giống lúa Một bụi lùn và Một bụi trắng Cà Mau có mức tương đồng cao nhất (96%), chứng tỏ hai giống lúa này có nguồn gốc gần nhau hơn các nhóm khác. Trong khi đó, hai giống lúa Lùn cần đỏ và Lùn phen có mức tương đồng thấp nhất (56%).

4. KẾT LUẬN

Trong số 25 chỉ thị SSR sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền của 30 giống lúa mùa thì có 22 chỉ thị cho các băng ADN đa hình, thu được 67 alen khác nhau, số alen dao động từ 2 đến 5 alen/locus,

số alen trung bình đạt 3,05 alen/locus. Hệ số PIC của 22 cặp mồi nằm trong khoảng 0,0605 đến 0,7010, trung bình đạt 0,4479. Tập đoàn 30 giống lúa địa phương có mức tương đồng di truyền tương đối cao (trên 56%). Hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 0,56 đến 0,94. Ở mức tương đồng di truyền 63,3% các giống lúa nghiên cứu được chia thành 3 nhóm chính. Nhóm I gồm 2 giống lúa, nhóm II gồm 11 giống lúa, nhóm III gồm 17 giống lúa.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành gửi lời cảm ơn đến Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện về phòng thí nghiệm và trang thiết bị để nhóm có thể hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ashraf H., Husaini A. M., Ashraf Bhat M., Parray G. A., Khan S. and Ganai N. A., 2016. *SSR based genetic diversity of pigmented and aromatic rice (Oryza sativa L.) genotypes of the western Himalayan region of India*. Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology. 22: 547-555.
2. Dao, S., Timbine, H., Goita, O. and Traore, D., 2018. *Genetic Variability Assessment in Irrigated Rice (Oryza sativa and Oryza glaberrima) by PCR-SSR in Mali*. International Journal of Genetics and Genomics. 6: 22.
3. Davla D., Sasidharan N., Macwana S., Chakraborty S., Trivedi R., Ravikiran R. and Shah G., 2013. *Molecular characterization of rice (Oryza sativa L.) genotypes for salt tolerance using microsatellite markers*. The Bioscan. 8: 499-502.
4. Gramene Markers Database: <http://www.gramene.org/markers/microsat/>, truy cập ngày 15/4/2019.
5. International Rice Genome Sequencing Project and Sasaki T., 2005. *The map-based sequence of the rice genome*. Nature. 436: 793-800.
6. Kalia R., Rai M., Kalia S., Singh R. and Dhawan A., 2011. *Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants*. Euphytica. 177: 309-334.
7. Khuất Hữu Trung, Nguyễn Thị Ly, Đặng Thị Thanh Hà và Nguyễn Minh Anh Tuấn, 2012. *Nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn địa chất lượng bản địa của Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR vi vệ tinh (Microsatellite)*. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT. 17: 26-32.
8. Miah G., Rafiq M. Y., Ismail M. R., Puteh A. B., Rahim H. A., Islam K. N. and Latif M. A., 2013. *A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance*. International Journal of Molecular Sciences. 14: 22499-22528.
9. Ngô Thị Hồng Tươi, Phạm Văn Cường và Nguyễn Văn Hoan, 2014. *Phân tích đa dạng di truyền của các mẫu giống lúa cẩm bằng chỉ thị SSR*. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 4: 485-494.
10. Nguyễn Văn Tú, Trương Trọng Ngón, Trần Nhân Dũng và Nguyễn Vũ Linh, 2011. *Thanh lọc các giống lúa mang gen kháng rầy nâu bằng dấu phân tử DNA*. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. Số 17a: 272-281.
11. Phạm Quang Nghĩa, Lâm Thủy Giang, Đỗ Tấn Khang và Trần Nhân Dũng, 2015. *Chọn lọc dấu phân tử RAPD và SSR để nhận diện đa dạng di truyền của sáu giống lúa thơm ở đồng bằng sông Cửu Long*. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. 40: 1-7.
12. Rogers S. O. and Bendich A. J., 1988. *Extraction of DNA from plant tissues*. In: Gelvin, S.B., R. A. Schilperoort and D. P. S. Verma (Eds.), Plant Molecular Biology Manual, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 73-83.
13. Singh A., Saini R., Singh J., Arya M., Ram M., Pallavi, Mukul and Singh P.K., 2015. *Genetic diversity studies in rice (Oryza sativa L.) using microsatellite markers*. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 8: 143-152.
14. Sneath P. H. A. and Sokal R. R., 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification.
15. Trần Hữu Phúc, Võ Công Thành và Nguyễn Thành Tâm, 2012. *Thanh lọc hai giống lúa mùa chủ lực: Một bụi lùn (Oryza sativa) và Chín tẻo (Oryza sativa) của các tỉnh Bạc Liêu, Kiên Giang và Cà Mau bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE protein*. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. Số 24b: 26-36.

16. Trần Thị Lương, Lưu Minh Cúc và Nguyễn Đức Thành, 2013. *Phân tích quan hệ di truyền một số giống lúa đặc sản, chất lượng, trồng phổ biến ở Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR* Tạp chí Sinh học, 35: 348-356.
17. Vũ Thị Bích Huyền, Lê Thị Bích Thủy, Nguyễn Anh Dũng, Hoàng Bá Tiến và Nguyễn Đức Thanh, 2013. *Đánh giá đa dạng di truyền một số giống lúa bằng kỹ thuật SSR phục vụ cho chọn cặp lai tạo giống chịu hạn*. Tạp chí Sinh học, 35: 80-91.
18. Weir B. S., 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates.

GENETIC DIVERSITY IN SEASONAL RICE (*Oryza sativa* L.) USING SIMPLE SEQUENCE REPEATS (SSR) MARKERS

Nguyễn Phạm Anh Thi, La Hoàng Trúc Ngan,

Trương Thị Bích Vân, Nguyễn Thị Pha

Summary

This research was carried out to evaluate the genetic diversity among the 30 seasonal rice genotypes from Cửu Long delta Rice Research using 25 simple sequence repeat (SSR) markers. The results revealed that out of 25 SSR primers, 22 primers showed distinct polymorphism (88%), indicating the robust nature of microsatellites in revealing polymorphism. SSR markers produced 62 polymorphic bands out of 70 amplification products. The polymorphism information content (PIC) value for the SSR loci ranged from 0.0605 to 0.7010. The dendrogram based on UPGMA classified the 30 rice accessions into 3 main clusters. Similarity coefficients ranged from 56% to 94%. The data obtained in this study provides genetic information for background selections during backcross breeding programs.

Keywords: *Genetic diversity, seasonal rice, SSR*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 9/8/2019

Ngày thông qua phản biện: 10/9/2019

Ngày duyệt đăng: 17/9/2019