

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN MỘT SỐ GIỐNG LÚA BẰNG KỸ THUẬT SSR PHỤC VỤ CHO CHỌN CẬP LAI TẠO GIỐNG CHỊU HẠN

Vũ Thị Bích Huyền¹, Lê Thị Bích Thủy¹, Nguyễn Anh Dũng²,
Hoàng Bá Tiên², Nguyễn Đức Thành^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *nguyenducthanh_pcg@ibt.ac.vn

²Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm

TÓM TẮT: SSR (simple sequence repeat) là chỉ thị cho tính đa hình cao và ổn định, được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sự đa dạng di truyền của lúa. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả sử dụng 22 cặp mồi SSR để phân tích đa dạng di truyền của 75 giống lúa nhằm phục vụ cho việc xây dựng cặp lai cho chọn tạo lúa chịu hạn. Tất cả 22 cặp mồi đều thể hiện tính đa hình với 90 allen, số allen trên mỗi cặp mồi dao động từ 2-8 allen, trung bình là 4,09. Hàm lượng thông tin đa hình dao động từ 0,026 (RM308) đến 0,776 (RM547). Trong tập đoàn 75 giống lúa, 70 giống có hệ số dị hợp từ 0% đến 9,09%; 5 giống có hệ số dị hợp từ trên 10%, xuất hiện 16 allen hiếm trên 13 cặp mồi. Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,026 đến 0,826 và tập đoàn được chia thành hai nhóm. Từ kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền kết hợp với đặc tính chịu hạn của các giống lúa, đã xác định được 8 cặp lai có thể có ý nghĩa cho chọn tạo giống chịu hạn.

Từ khóa: *Oryza sativa*, allen hiếm, chỉ thị SSR, chịu hạn, đa dạng di truyền.

MỞ ĐẦU

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực chính của thế giới nhưng cũng là cây trồng rất mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh, đặc biệt là yếu tố nước. Trong những thập kỷ gần đây, do ảnh hưởng của hiện tượng biến đổi khí hậu toàn cầu, hạn hán xảy ra nhiều nơi trên thế giới, gây ra nhiều thiệt hại về kinh tế, đặc biệt là những vùng đất trồng lúa gạo. Trong gần 1/4 thế kỷ vừa qua, hơn 1/3 đất đai thế giới đã bị khô cằn và sa mạc hóa, không có khả năng sử dụng trong nông nghiệp. Trước tình hình biến đổi khí hậu phức tạp như hiện nay, việc tạo ra những giống lúa có khả năng chịu hạn, sử dụng nguồn nước hiệu quả là một trong những yêu cầu cấp bách cần thực hiện.

Trong chọn tạo giống, chọn cặp lai bố mẹ có vai trò quyết định sự thành công của công tác chọn tạo giống. Cặp bố mẹ được chọn phải đảm bảo có khả năng kết hợp, khả năng tạo ra thế hệ con lai tốt, khả năng truyền đạt tính trạng tốt của bố mẹ vào con lai. Nó phải đảm bảo những nguyên tắc khác nhau về kiểu sinh thái địa lý, các yếu tố cấu thành năng suất, tính chống chịu, giai đoạn phát dục, bổ sung cho nhau những tính trạng cần thiết. Bản chất sự khác nhau này chính là khác nhau về kiểu gen và được xác định bằng hệ số tương đồng di truyền của cặp

lai. Nghiên cứu đa dạng di truyền là một phương pháp cho kết quả chính xác trong thời gian ngắn và kết quả có thể kết hợp với đặc điểm nông học của các giống lúa để xây dựng cặp lai phù hợp. Trong số các chỉ thị phân tử, chỉ thị SSR (simple sequence repeat) được sử dụng rộng rãi và hiệu quả trong nghiên cứu đa dạng di truyền ở lúa bởi vì đây là chỉ thị đồng trội cho đa hình cao và ổn định.

Việc nghiên cứu đa dạng di truyền lúa phục vụ cho chọn tạo giống chịu hạn mới bắt đầu khoảng 2 tới 3 thập kỷ nay. Nguyễn Đức Thành và nnk. (1999) [13] đã sử dụng 14 mồi SSR phân tích 46 giống lúa nương phục vụ cho chọn tạo giống chịu hạn.

Lin et al. (2007) [7] đã sử dụng 525 mồi SSR, trong đó có 135 mồi đa hình. Những mồi liên kết với tính trạng liên quan đến khả năng chịu hạn bao gồm RM522, RM5443, RM259, RM1349, RM561, RM327, RM518, RM136, RM3, RM528, RM25, RM72, RM189, RM222, RM311, RM228, RM17 và RM20A.

Kanbar et al. (2010) [4] đã phân tích quần thể con lai giữa dòng Moroberekan và IR20 với các chỉ thị SSR. Tác giả đã xác định ra một số chỉ thị liên kết với tính trạng tăng cường tính chịu hạn ở lúa là RM7, RM201, RM472, RM282 liên quan đến tính trạng chiều dài tối đa

của rễ, trọng lượng khô của rễ. Nguyễn Thị Phương Đoài và nnk. (2010) [1] đã tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn lúa nương bản địa Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR. Tác giả sử dụng 29 cặp mồi thu được 786 băng DNA thuộc 96 loại allen khác nhau, trung bình 3,310 allen trên mỗi cặp mồi. Hệ số PIC dao động từ 0 đến 0,808 với giá trị trung bình là 4,34. Hệ số tương đồng di truyền của các giống dao động trong khoảng từ 0,06 đến 0,84. Tập đoàn 27 giống lúa nương nghiên cứu được chia thành hai nhóm: nhóm I gồm 6 giống lúa thuộc loài phụ Indica có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,32 đến 0,63. Nhóm II bao gồm 21 giống thuộc loài phụ Japonica có hệ số tương

đồng di truyền dao động từ 0,20 đến 0,84.

Gần đây, Singh et al. (2012) [11] đã tiến hành xác định mồi và đa dạng di truyền ở một số dòng lúa lai cho tính chịu hạn. Tác giả đã xác định được 2 mồi (RM60 và RM252) có liên kết với tính trạng độ dày của rễ, trong đó RM252 có liên kết mạnh hơn RM60.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn 75 giống lúa bằng chỉ thị SSR với mục đích làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng các cặp lai phục vụ chọn tạo giống lúa chịu hạn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Bảng 1. Danh sách 75 giống lúa nghiên cứu

Số đăng ký	Tên giống	Khả năng chịu hạn	Số đăng ký	Tên giống	Khả năng chịu hạn
HD1	Lưỡng Quảng	Trung bình	HD39	OM4495	Trung bình
HD2	OM5954	Trung bình	HD40	CL3	Trung bình
HD3	DT36	Kém	HD41	Nanjing 70272	Khá
HD4	IR68465	Trung bình	HD42	AC5	Trung bình
HD5	IR58100	Trung bình	HD43	CHTL	Tốt
HD6	DT122	Trung bình	HD44	SH108	Trung bình
HD7	IR67014	Trung bình	HD45	MTL560	Trung bình
HD8	OM3007	Kém	HD46	Basmati	Trung bình
HD9	P1	Kém	HD47	NTK5	Trung bình
HD10	IR71693-111	Kém	HD48	Vtur NN1	Trung bình
HD11	MT36	Trung bình	HD49	IR65381-139	Kém
HD12	BB3/17	Trung bình	HD50	IR36	Kém
HD13	IR717	Trung bình	HD51	DT45	Kém
HD14	OM5756	Kém	HD52	MTL645	Kém
HD15	CSR11	Trung bình	HD53	HT9	Kém
HD16	IR68465	Trung bình	HD54	KonChieng	Khá
HD17	NICO	Kém	HD55	IR70445	Trung bình
HD18	Chapuma	Khá	HD56	NN514	Kém
HD19	IR64	Kém	HD57	Lò Cú	Trung bình
HD20	Nếp lai	Trung bình	HD58	P376	Trung bình
HD21	Khang Dân 18	Trung bình	HD59	TOK1	Kém
HD22	VND95-20	Trung bình	HD60	Q5	Trung bình
HD23	IR90	Trung bình	HD61	Nghi Hương	Kém
HD24	OM2717	Kém	HD62	IR58200	Khá
HD25	CL9	Trung bình	HD63	ĐH99-81	Kém
HD26	VH2	Kém	HD64	OM6070	Kém
HD27	IRBB60	Trung bình	HD65	Quê thơm	Tốt
HD28	BT7	Trung bình	HD66	MT205	Trung bình
HD29	TBR36	Kém	HD67	MNR3	Kém

HD30	IR71730	Trung bình	HD68	GSR-I-0058	TB
HD31	I104	Kém	HD69	LC88-66	Tốt
HD32	ND4	Kém	HD70	CH7	Khá
HD33	Nếp Lào Cai	Trung bình	HD71	IR72883	Trung bình
HD34	C22	Tốt	HD72	NSic	Trung bình
HD35	IR71676	Kém	HD73	OM6610	Kém
HD36	AI Cuba22	Kém	HD74	PC7	Kém
HD37	OM6600	Trung bình	HD75	JJ92	Kém
HD38	IR72164-110	Trung bình			

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu này gồm 75 giống lúa do Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp (bảng 1). Các giống lúa này đã được Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm đánh giá khả năng chịu hạn thông qua một số tính trạng như độ cuộn vào của lá, khả năng phục hồi sau hạn, hệ số nảy mầm sau khi xử lý Xacarin 1%, KClO₃ 3%, hệ số rễ mầm đen khi xử lý KClO₃ 3%.

Các cặp mồi SSR sử dụng gồm 22 cặp được tổng hợp bởi hãng IDT (Hoa Kỳ) dựa vào trình tự trên Ngân hàng Gen quốc tế (GenBank) và do phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp, trong đó có 5 mồi đã xác định là liên kết với tính trạng số lượng (QTL) chịu hạn: RM21 (liên quan tính trạng lực hút của rễ và trọng lượng khô của rễ), RM25, RM223 và RM229 (liên quan đến tính trạng chiều dài rễ), RM288 (liên quan tính trạng khối lượng rễ và tỷ lệ rễ/thân).

Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA genome

DNA genome được tách từ các mẫu lá theo phương pháp CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) của Saghai-Marroof et al. (1984) [10] có cải tiến cho phù hợp với việc tách chiết DNA tổng số của các mẫu lúa.

Kỹ thuật SSR

Phản ứng SSR được tiến hành theo phương pháp của Kanagarai et al. (2010) [3] có cải tiến trên máy PCR PTC-100 (MJ Research Inc, Hoa Kỳ). Trong tổng dung dịch phản ứng là 20 µl bao gồm 1 µl DNA genome (25 ng/µl); 13,4 µl H₂O; 2,0 µl đệm 10xPCR; 2,5 µl dNTP (1 mM); 0,5 µl mồi xuôi (50 ng/µl); 0,5 µl mồi ngược (50 ng/µl); 0,1 µl enzyme Taq polymerase (5

U/µl). Điều kiện phản ứng PCR: 94°C trong 4 phút; 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm: 1 phút 94°C, 1 phút 55°C-59°C (tùy thuộc T_m của mồi), 2 phút 72°C. Sản phẩm được kiểm tra trên gel agarose 1% và tiếp tục được phân tích trên gel polyacrylamide.

Phân tích đa hình di truyền

Kết quả được thống kê dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng DNA. Xác định hệ số tương đồng di truyền Jaccard, thiết lập sơ đồ hình cây để so sánh hệ số tương đồng di truyền giữa 75 giống lúa theo phương pháp UPGMA trong NTSYSpc 2.1.

Hàm lượng thông tin đa hình (PIC-Polymorphic Information Content) được xác định nhờ phần mềm dựa trên công thức của Saal & Wricke (1999) [9, 14]: $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$. Trong đó, P_{ij} là tần số xuất hiện của allel thứ j của kiểu gen i được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

Hệ số dị hợp (H) của mỗi mẫu được tính theo công thức:

$$H\% = \frac{X}{M - Y}$$

Trong đó, X là tổng số mồi có xuất hiện 2 allel/locus SSR; M là tổng số mồi sử dụng trong nghiên cứu; Y là tổng số mồi SSR không xuất hiện băng DNA.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mẫu lá non 2 tuần tuổi được thu thập và tách chiết DNA genome theo phương pháp CTAB có cải tiến. Từ 75 mẫu giống lúa thu được 75 mẫu DNA có chất lượng tốt, với nồng độ dao động 0,5 µg/µl đến 4 µg/µl. DNA genome sau khi tách chiết được pha loãng với nồng độ 25 ng/µl để sử dụng cho các phản ứng

PCR với 22 cặp mồi SSR. Sản phẩm được chạy điện di trên gel polyacrylamide và thống kê kết quả.

Đa dạng di truyền các giống lúa bằng chỉ thị phân tử SSR

Hệ số PIC và số allen của từng cặp mồi

Phân tích 22 cặp mồi SSR trên tập đoàn 75 giống lúa nghiên cứu thu được tổng số 1.633 băng DNA của 90 allen khác nhau. Kết quả cho thấy, 22 cặp mồi đều cho các locus đa hình từ 2 đến 8 allen trên một locus, 6 cặp cho 2 allen, 6 cặp cho 3 allen, 1 cặp cho 4 allen, 2 cặp cho 5 allen, 4 cặp cho 6 allen, 2 cặp cho 7 allen và 1 cặp cho 8 allen (bảng 2).

Bảng 2. Số allen thể hiện và hệ số PIC của 22 cặp mồi SSR

STT	Tên mồi	Vị trí trên NST	Số allen thể hiện	PIC	Kích thước (bp)
1	RM19	12	6	0,678	225-270
2	RM21	11	7	0,735	135-177
3	RM25	8	5	0,680	140-170
4	RM38	8	3	0,245	250-260
5	RM42	8	2	0,106	220-230
6	RM101	12	3	0,101	300-330
7	RM128	1	3	0,237	160-170
8	RM144	11	2	0,081	240-245
9	RM167	11	2	0,355	135-150
10	RM209	11	5	0,727	130-200
11	RM223	8	7	0,699	155-185
12	RM224	11	8	0,767	125-175
13	RM229	11	6	0,774	110-160
14	RM244	10	2	0,332	160-170
15	RM247	12	4	0,334	130-160
16	RM271	10	3	0,461	100-125
17	RM277	12	3	0,172	150-165
18	RM288	9	3	0,186	125-135
19	RM308	8	2	0,026	130-140
20	RM321	9	2	0,305	200-205
21	RM408	8	6	0,661	123-145
22	RM547	8	6	0,776	225-310
Tổng			90	9,404	
Trung bình			4,09	0,427	

Hệ số PIC (Polymorphic Information Content) phản ánh khả năng cho đa hình của các cặp mồi SSR. Hệ số PIC của cặp mồi nào cao thì khả năng cho đa hình càng cao trong phân tích đa dạng di truyền của các đối tượng nghiên cứu và ngược lại.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các mồi sử dụng đều có khả năng cho đa hình. Hệ số PIC của 22 cặp mồi dao động từ 0,026 (RM308) đến 0,776 (RM547). Hệ số PIC trung bình của 22 cặp mồi nghiên cứu là 0,427.

Kết quả này tương tự với một số kết quả nghiên cứu của Việt Nam và trên thế giới: Khuất Hữu Trung và nnk. (2010) [13] và Nguyễn Thị Phương Đoài và nnk. (2010) [1] khi đánh giá đa dạng di truyền của một số giống lúa bản địa của Việt Nam đã chỉ ra hệ số PIC của các giống lúa nghiên cứu dao động từ 0 đến 0,65 (đối với tập đoàn lúa Tám đặc sản) và từ 0 đến 0,808 (đối với tập đoàn lúa Nương); Kumar et al. (2006) [6] khi sử dụng 12 cặp mồi SSR để đánh giá đa dạng di truyền các giống lúa của

Ấn Độ, đã chỉ ra hệ số PIC dao động từ 0 đến 0,830; Jayamani (2007) [2] đánh giá đa dạng di truyền của 179 giống lúa ở 19 địa phương bằng các chỉ thị SSR cũng đã chỉ ra hệ số PIC dao động từ 0,179 đến 0,894.

Hệ số dị hợp tử (H) của các giống lúa nghiên cứu

SSR là chỉ thị đồng trội, do đó có thể phân biệt được những mẫu mang kiểu gen dị hợp và những mẫu mang kiểu gen đồng hợp. Hệ số dị hợp tử (H) được tính bằng tỷ lệ giữa tổng số môi có xuất hiện 2 allel/locus SSR với hiệu của tổng số môi nghiên cứu với số môi không xuất hiện băng DNA trên một giống xác định sẽ đánh giá được độ đa hình của giống nghiên cứu. Kết quả hệ số dị hợp tử (H) của các giống lúa nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hệ số dị hợp tử (H) của các giống lúa nghiên cứu

STT	Hệ số dị hợp tử	Số lượng giống
1	0	60
2	$\leq 9,09$	10
3	$\geq 10,0$	5

Hệ số dị hợp tử của tập đoàn lúa được đánh giá là khá thấp: sáu mươi giống có hệ số dị hợp tử 0% (đồng hợp ở cả 22 locus nghiên cứu); 10 giống có hệ số dị hợp tử nhỏ hơn 9,09%; chỉ có 5 giống là có hệ số dị hợp tử lớn hơn 10% (TOK1 với 22,73%; IR58200 với 14,29%; OM5954 với 13,64%; IR72164-1106 và CL3 với 10%).

Phân tích quan hệ di truyền giữa các giống lúa bằng chỉ thị phân tử SSR

Số liệu thu được từ tiêu bản điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide của 75 giống lúa với 22 cặp môi SSR được thống kê và phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1, từ đó xác định được hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống lúa (hình 1).

Hệ số tương đồng di truyền của 75 giống lúa nghiên cứu dao động trong khoảng từ 0,026 đến 0,826. Hệ số tương đồng di truyền cao nhất (0,826) là giữa hai giống Basmati (HD46) và IR65381-139 (HD49), hệ số tương đồng di

truyền thấp nhất 0,026 là giữa hai giống Nanjing 70272 (HD41) và OM6500 (HD73). Ở mức tương đồng di truyền 14%, 75 giống lúa nghiên cứu được chia thành 2 nhóm:

Nhóm I gồm có 3 giống, với hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm dao động trong khoảng 0,233-0,320. Hệ số tương đồng di truyền cao nhất trong nhóm này là 0,320 giữa hai giống Nanjing 70272 (HD41) và Q5 (HD60); hai giống lúa NICO (HD17) và Q5 (HD60) có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất trong nhóm (0,233). NICO là giống có mối quan hệ di truyền xa nhất so với tất cả các giống lúa còn lại trong tập đoàn giống nghiên cứu. Hệ số tương đồng di truyền của giống NICO (HD17) với các giống lúa còn lại khá thấp dao động trong khoảng 0,047-0,290.

Nhóm II gồm 72 giống lúa còn lại với hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm này dao động trong khoảng 0,122-0,826. Hai giống lúa HD37 và HD56 có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất trong nhóm (0,122). Nhóm II được chia thành 8 nhóm phụ:

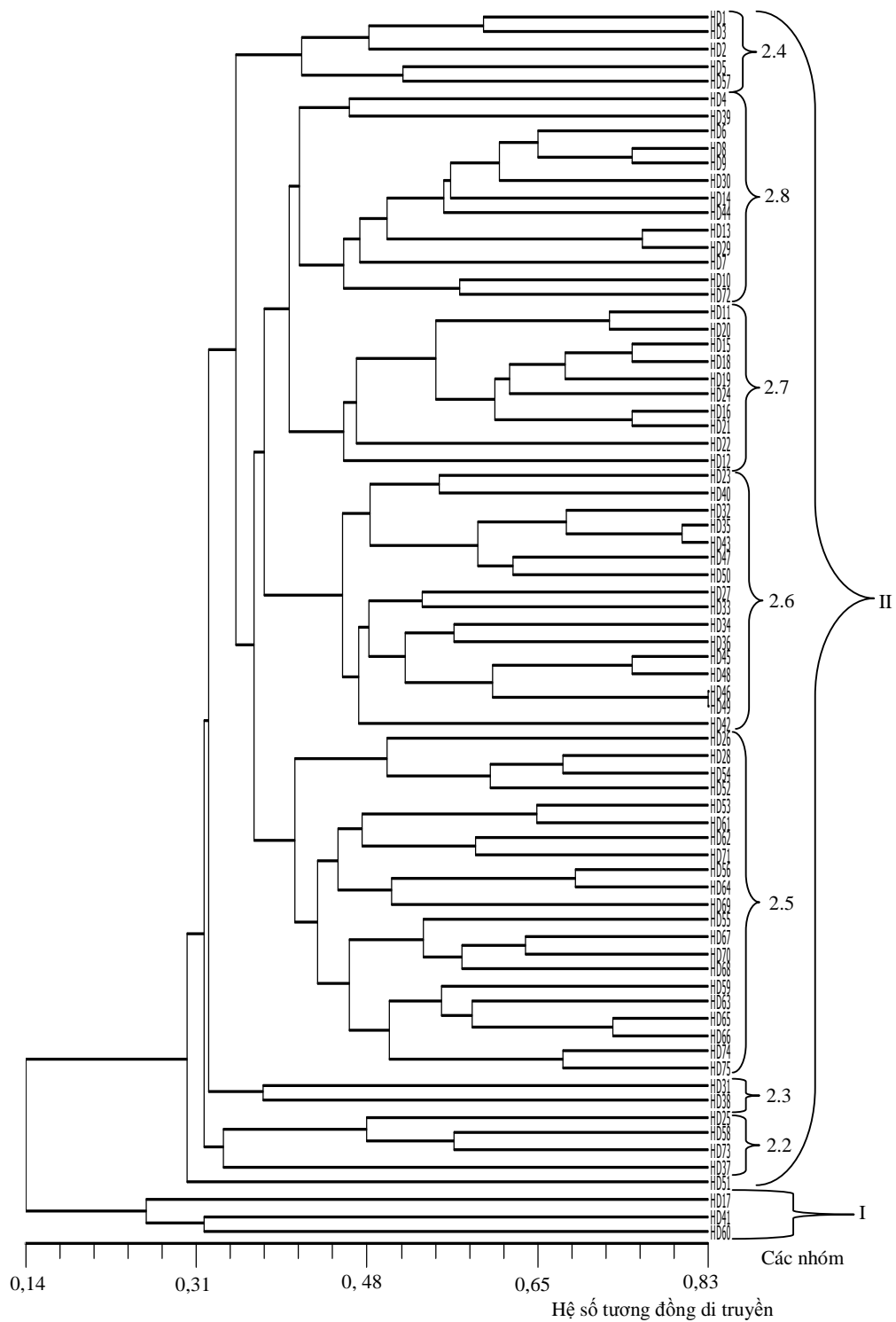
Nhóm phụ 2.1 bao gồm một giống duy nhất là DT45 (HD51).

Nhóm phụ 2.2 gồm 4 giống là CL9 (HD25), OM6600 (HD37), P376 (HD58), OM6500 (HD73), hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm này dao động trong khoảng 0,273-0,571.

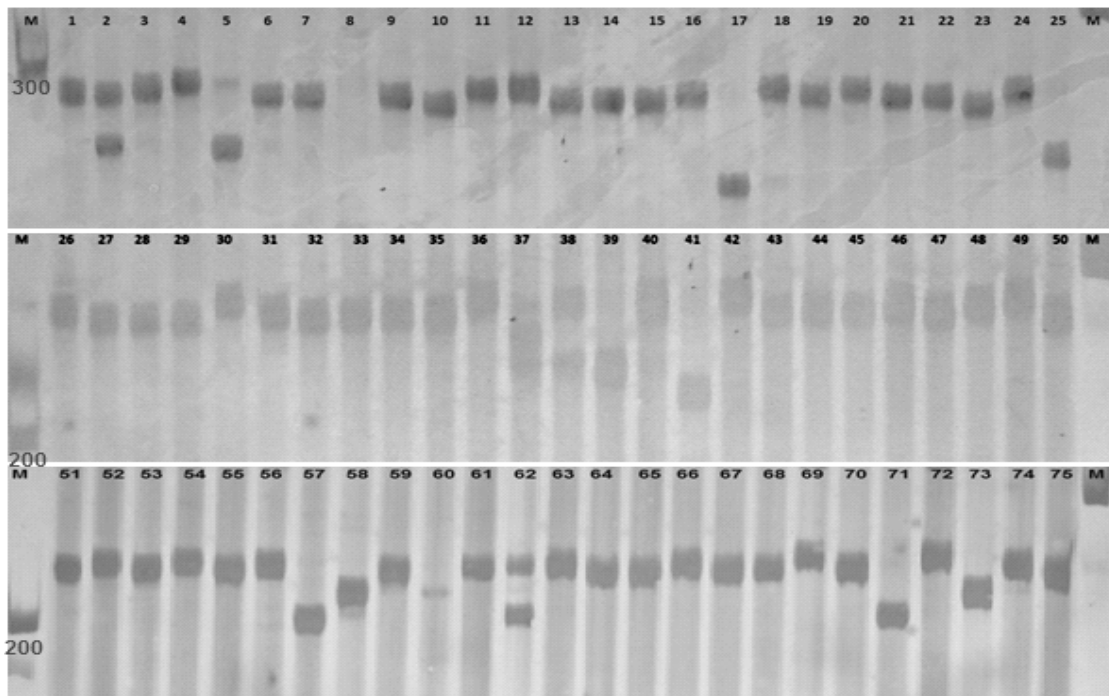
Nhóm phụ 2.3 gồm 2 giống là I104 (HD31) và IR72164-110 (HD38) với hệ số tương đồng di truyền của hai giống là 0,379.

Nhóm phụ 2.4 gồm 5 giống là Lương Quảng (HD1), OM5954 (HD2), DT36 (HD3), IR58100 (HD5), Lò Cú (HD57) có hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng 0,303-0,600. Hai giống có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất nhóm là OM5954 (HD2) và Lò Cú (HD57); hệ số tương đồng di truyền cao nhất là giữa giống Lương Quảng (HD1) và DT36 (HD3).

Các nhóm phụ 2.5; 2.6; 2.7 và 2.8 có số lượng giống lần lượt là 21; 16; 10 và 13 (hình 1). Riêng nhóm phụ 2.6 có hai giống với hệ số tương đồng lớn nhất (0,826) trong quần thể là Basmati (HD46) và IR65381-139 (HD49).



Hình 1. Sơ đồ quan hệ di truyền của 75 giống lúa dựa trên số liệu phân tích DNA với chỉ thị phân tử SSR



Hình 2. Ảnh điện di của mỗi RM19 của 75 giống lúa trên gel polyacrylamide

Hình 2 là ảnh điện di trên gel polyacrylamide của tập đoàn lúa với mỗi RM19. Cặp mỗi RM19 có tính đa hình, bao gồm 6 allen với kích thước tương ứng của từng allen là khoảng 225 bp, 240 bp, 255 bp, 260 bp, 265 bp và 270 bp. Mỗi RM19 có một allen hiếm là allen có kích thước nhỏ nhất (225 bp), xuất hiện một lần duy nhất ở giống Lò Cú (HD57).

Xác định các allen hiếm xuất hiện trong tập đoàn lúa nghiên cứu

Allen hiếm (rare allen) được định nghĩa dựa

trên tần số xuất hiện của chúng. Kimura (1983) [5] đã định nghĩa allen hiếm là allen có tần số xuất hiện nhỏ hơn q với $q = 0,01$. Đối với số lượng mẫu lên đến 100 thì một allen sẽ được xem là hiếm nếu nó xuất hiện không quá hai lần và số lần xuất hiện của một allen hiếm sẽ là không quá 200 lần khi lượng mẫu đạt tới 10.000. Nhưng theo Pervaiz et al. (2009) [8], allen hiếm là allen xuất hiện với tần số $\leq 0,05$ trong tổng số mẫu nghiên cứu. Bảng 4 là kết quả các allen hiếm ghi nhận được trong nghiên cứu này.

Bảng 4. Locus mang allen hiếm và kích thước của allen hiếm

STT	Mỗi	Giống	Số đăng ký giống	Kích thước allen hiếm (bp)
1	RM19	Lò Cú	HD57	225
2	RM25	IR71693-111	HD10	150
		IR72164-110	HD38	
		CH7	HD70	
3	RM38	NICO	HD17	260
		Nanjing 70272	HD41	
		Q5	HD60	
4	RM101	NICO	HD17	325
		IR67014	HD7	330

		I104	HD31	
		Q5	HD60	
5	RM128	IR68465	HD16	170
		Nanjing 70272	HD41	
		Q5	HD60	
6	RM144	NTK5	HD47	245
		DT45	HD51	
		LC88-66	HD69	
7	RM223	IR68465	HD4	185
		OM4495	HD39	
8	RM224	IR72164-110	HD38	125
		Q5	HD60	
		NICO	HD17	135
		NTK5	HD47	
		LC88-66	HD69	
9	RM229	NICO	HD17	160
		Nanjing 70272	HD41	
		Lò Cú	HD57	
10	RM247	NICO	HD17	130
		IR72164-110	HD38	
		Nanjing 70272	HD41	160
11	RM277	OM5954	HD2	165
		IR72883	HD71	
12	RM288	CL9	HD25	125
		P376	HD58	
		OM6500	HD73	
13	RM308	HD17	HD17	140

Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền của các cặp lúa

Giống chịu hạn kém \ Giống chịu hạn tốt	C22 (HD34)	CHTL (HD43)	Quê thom (HD65)	LC88-66 (HD69)
DT36 (HD3)	0,235	0,400	0,355	0,222
OM3007 (HD8)	0,400	0,313	0,355	0,294
P1 (HD9)	0,467	0,419	0,419	0,353
IR71693-111(HD10)	0,414	0,281	0,367	0,344
OM5756 (HD14)	0,419	0,375	0,375	0,243
NICO (HD17)	0,075	0,132	0,162	0,184
IR64 (HD19)	0,355	0,400	0,448	0,333
OM2717 (HD24)	0,500	0,355	0,500	0,333
VH2 (HD26)	0,294	0,419	0,333	0,353
TBR36 (HD29)	0,375	0,419	0,419	0,394
I104 (HD31)	0,273	0,400	0,273	0,257
NĐ4 (HD32)	0,419	0,760	0,333	0,353
IR71676 (HD35)	0,500	0,800	0,324	0,270
AI Cuba22 (HD36)	0,571	0,467	0,294	0,438
IR65381-139 (HD49)	0,500	0,448	0,400	0,387
IR36 (HD50)	0,333	0,630	0,333	0,314

DT45 (HD51)	0,158	0,257	0,467	0,278
MTL645 (HD52)	0,278	0,438	0,394	0,333
HT9 (HD53)	0,324	0,324	0,406	0,382
NN514 (HD56)	0,333	0,333	0,517	0,533
TOK1 (HD59)	0,400	0,324	0,581	0,457
Nghi Hương (HD61)	0,448	0,355	0,556	0,517
ĐH99-81 (HD63)	0,419	0,467	0,571	0,394
OM6070 (HD64)	0,294	0,257	0,467	0,484
MNR3 (HD67)	0,257	0,294	0,467	0,353
OM6500 (HD73)	0,294	0,222	0,333	0,278
PC7 (HD74)	0,313	0,448	0,500	0,375
JJ92 (HD75)	0,375	0,419	0,571	0,314

Bảng 6. Hệ số tương đồng di truyền và các môi đa hình ở 14 cặp lai

STT	Cặp lai	Hệ số tương đồng di truyền	Số môi cho đa hình	Tên môi cho đa hình
1	C22 (HD34) x OM2717 (HD24)	0,500	7	RM25; RM223; RM224; RM288; RM321; RM408; RM547
2	C22 (HD34) x IR71676 (HD35)	0,500	7	RM21; RM25; RM209; RM229; RM244; RM271; RM547
3	C22 (HD34) x AI Cuba22 (HD36)	0,571	6	RM19; RM25; RM38; RM209; RM223; RM547
4	C22 (HD34) x IR65381-139 (HD49)	0,500	7	RM19; RM25; RM223; RM224; RM244; RM288; RM408
5	CHTL (HD43) x IR36 (HD50)	0,630	5	RM19; RM25; RM209; RM224; RM408
6	Quế thơm (HD65) x OM2717 (HD24)	0,500	6	RM19; RM21; RM167; RM229; RM408; RM547
7	Quế thơm (HD65) x NN514 (HD56)	0,517	7	RM19; RM21; TM25; RM38; RM209; RM224; RM229
8	Quế thơm (HD65) x TOK1 (HD59)	0,581	5	RM21; RM25; RM224; RM229; RM547
9	Quế thơm (HD65) x Nghi Hương (HD61)	0,556	6	RM21; RM25; RM209; RM223; RM229; RM547
10	Quế thơm (HD65) x ĐH99-81 (HD63)	0,571	6	RM19; RM25; RM223; RM224; RM229; RM547
11	Quế thơm (HD65) x PC7 (HD74)	0,500	7	RM19; RM21; RM209; RM223; RM224; RM229; RM271
12	Quế thơm (HD65) x JJ92 (HD75)	0,571	6	RM19; RM21; RM224; RM229; RM244; RM271
13	LC88-66 (HD69) x NN514 (HD56)	0,533	7	RM19; RM21; RM144; RM209; RM223; RM224; RM547
14	LC88-66 (HD69) x Nghi Hương (HD61)	0,517	8	RM19; RM21; RM38; RM144; RM209; RM223; RM224; RM547

Trong 90 allen của 22 locus (cặp môi), xuất hiện 16 allen hiếm ở 13 cặp. Như vậy, số allen hiếm xuất hiện trong tổng số allen của 22 locus là 16/90 (17,78%); hệ số allen hiếm xuất hiện

trên mỗi locus trung bình là 13/22 (59,09%). Số allen hiếm xuất hiện nhiều nhất ở các locus RM101, RM247 và RM224 (với 2 allen hiếm). Tiếp theo là các locus RM19, RM25, RM38, RM101, RM128, RM144, RM223, RM229, RM247, RM277, RM288 và RM308 xuất hiện 1 allen hiếm trên mỗi locus. Những allen hiếm có vai trò rất lớn trong việc phân biệt, nhận dạng các giống lúa trên trong nghiên cứu tiếp theo.

Khuyến cáo một số cặp lai

Dựa vào khả năng chịu hạn của các giống lúa (bảng 1), chúng tôi chọn ra hai nhóm lúa: nhóm có khả năng chịu hạn tốt gồm 4 giống và nhóm chịu hạn kém bao gồm 28 giống. Các giống này tổ hợp với nhau được 112 cặp lai. Hệ số tương đồng di truyền của các cặp lai được trình bày ở bảng 5. Trong số 112 cặp lai trên, chúng tôi xác định được 14 cặp lai có hệ số tương đồng di truyền từ 0,5 đến 0,7 và cũng xác định được các môi cho đa hình giữa hai giống lúa trong cặp lai (bảng 6) đặc biệt đa hình ở những cặp môi liên kết với các tính trạng tăng cường tính chịu hạn (RM21; RM25; RM223; RM229 và RM288).

Trong số 14 cặp lai, có 8 cặp có hệ số tương đồng thấp và tính đa hình cao. Tám cặp lai này có thể có ý nghĩa cho chọn tạo giống chịu hạn, cụ thể là: Cặp C22 (HD34) x OM2717 (HD24); C22 (HD34) x IR71676 (HD35); C22 (HD34) x IR65381-139 (HD49) với hệ số tương đồng di truyền lần lượt là 50%; 50%; 57,1% và đều có 3/7 môi đa hình liên quan đến tính chịu hạn. Cặp Quế thơm (HD65) x NN514 (HD56); Quế thơm (HD65) x Nghi Hương (HD61); Quế thơm (HD65) x PC7 (HD74) với hệ số tương đồng di truyền lần lượt là 51,7%; 55,6%; 50% và có số môi đa hình liên quan đến tính chịu hạn tương ứng là 3/7; 4/6 và 3/7. Cặp LC88-66 (HD69) x NN514 (HD56) và LC88-66 (HD69) x Nghi Hương (HD61) có hệ số tương đồng di truyền và môi đa hình liên quan đến tính chịu hạn lần lượt là 53,3%; 51,7%; 2/7 và 2/8.

KẾT LUẬN

Tất cả 22 cặp môi SSR đều thể hiện đa hình trên tập đoàn 75 giống lúa nghiên cứu, cho tổng số 1633 băng DNA thuộc 90 loại allen khác

nhau, số allen/locus dao động trong khoảng từ 2 đến 8 allen, số allen trung bình là 4,09.

Hệ số PIC của 22 cặp môi trong khoảng từ 0,026 (RM308) đến 0,776 (RM547). Hệ số PIC trung bình là 0,427.

Có 16 allen hiếm (với tần số < 0,05) ở 13 cặp môi. Số allen hiếm xuất hiện nhiều nhất ở cặp môi (locus) RM101, RM247 và RM224 (2 allen hiếm/locus). Một allen hiếm/locus ghi nhận ở các cặp môi RM19, RM25, RM38, RM101, RM128, RM144, RM223, RM229, RM247, RM277, RM288 và RM308.

Hệ số dị hợp tử (H) cao nhất (22,73%) ở giống lúa TOK1 (HD59). Bảy mươi giống có hệ số dị hợp tử từ 0 đến 9,09%; 5 giống có hệ số dị hợp tử trên 10%.

Tập đoàn 75 giống lúa khá đa dạng về mặt di truyền. Hệ số tương đồng di truyền của các giống lúa dao động trong khoảng từ 0,026 đến 0,826. Ở mức tương đồng di truyền 14%, 75 giống lúa nghiên cứu được chia thành 2 nhóm: nhóm I gồm 3 giống với hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm dao động trong khoảng 0,233-0,320. Nhóm II gồm 72 giống lúa với hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm này dao động trong khoảng 0,122-0,826, được chia thành 8 nhóm phụ.

Tám cặp lai C22 (HD34) x OM2717 (HD24); C22 (HD34) x IR71676 (HD35); C22 (HD34) x IR65381-139 (HD49); Quế thơm (HD65) x NN514 (HD56); Quế thơm (HD65) x Nghi Hương (HD61); Quế thơm (HD65) x PC7 (HD74); LC88-66 (HD69) x NN514 (HD56); LC88-66 (HD69) x Nghi Hương (HD61) có thể có ý nghĩa trong chọn tạo giống chịu hạn.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ về kinh phí từ đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu chọn tạo giống lúa chịu hạn bằng chỉ thị phân tử cho các tỉnh phía Bắc” thuộc “Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến 2020” của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Phương Đào, Khuất

- Hữu Trung, Nguyễn Thúy Diệp, Hà Minh Loan, Trần Danh Sửu, Đặng Trọng Lương, 2010. Nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn lúa nương bản địa Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR. Tạp chí Công nghệ sinh học, 4: 381-287.
2. Jayamani P., Negrao S., Martins M., Macas B., Oliveira M. M., 2007., Genetic relatedness of portuguese rice accessions from diverse origins as assessed by Microsatellite markers. *Crop. Sci.*, 47: 879-884.
 3. Kanagaraj P., Prince K. S. J., Sheeba J. A., Biji K. R., Paul S. B., Senthil A., Babu R. C., 2010. Microsatellite markers linked to drought resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Sci.*, 98(6): 836-839.
 4. Kanbar A., Shashidhar H. E., 2011. Participatory selection assisted by DNA markers for enhanced drought resistance and productivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 178(1): 137-150.
 5. Kimura M., 1983. Rare variant allens in the light of the neutral theory. *Mol. Biol. Evol.*, 1(1): 84-93.
 6. Kumar J. R., Behera L., 2006. Identification and differentiation of indigenous non-Basmati aromatic rice genotypes of India using microsatellite. *Afr. J. Biotechnol.*, 6 (4): 348-354.
 7. Lin M. H., Lin C. W., Chen J. C., Lin Y. C., Cheng S. Y., Liu T. H., Jan F. J., Wu S. T., Thseng F. S., Ku H. M., 2007. Tagging rice drought-related QTL with SSR DNA makers, *Crop. Environ. Bioinformat.*, 4: 65-76.
 8. Pervaiz Z. H., Rabbani M. A., Pearce S. R., Malik S. A., 2009. Determination of genetic variability of Asian rice (*Oryza sativa* L.) varieties using microsatellite markers. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(21): 5641-5651.
 9. Saal B., Wricke G., 1999. Development of simple sequence repeat makers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome*, 42(5): 964-972.
 10. Saghai-Marooif M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W., 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Medelian inheritance, chromosomal location and population dymnatics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 8014-8018.
 11. Singh S., Pradhan S. K., Singh A. K., Singh O. N., 2012. Marker validation in recombinant inbred lines and random varieties of rice for drought tolerance. *Austral. J. Crop. Sci.*, 6(4): 606-612.
 12. Thanh N. D., Zheng H. G., Dong N. V., Trinh L. N., Ali M. L., Nguyen H. T., 1999. Genetic variation in root morphology and microsatellite DNA loci in upland rice (*Oryza sativa* L.) from Vietnam. *Euphytica*, 105(1): 53-62.
 13. Khuất Hữu Trung, Nguyễn Thị Phương Đoài, 2010. Nghiên cứu đa dạng di truyền và nhận dạng một số giống trong tập đoàn lúa Tám đặc sản của Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR (microsatellite). Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn, 149: 3-8.
 14. <http://www.liv.ac.uk/~kempsj/pic.html>

**ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF VIET NAM RICE BY SSR
MARKERS TO IDENTIFY CROSS COMBINATIONS FOR DEVELOPMENT OF
DROUGHT TOLERANT RICE CULTIVARS**

**Vu Thi Bich Huyen¹, Le Thi Bich Thuy¹, Nguyen Anh Dung²,
Hoang Ba Tien², Nguyen Duc Thanh¹**

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Field Crops Research Institute

SUMMARY

SSR (simple sequence repeat) are the markers of high polymorphism and stability, which are widely used in studying the genetic diversity of rice. In this study, we present results on the use of 22 SSR primer pairs to analyze the genetic diversity of 75 rice lines, in an attempt to identify cross combinations for the development of drought tolerant rice cultivars. All 22 primer pairs gave polymorphisms with 90 alleles, alleles number of each SSR primer pairs ranged from 2 to 8 and an average value is 4,09. Polymorphic information contents (PIC) of used primer pairs ranged from 0.026 (RM308) to 0.776 (RM547). The heterozygosity coefficient (H) of the investigated rice lines were rather low: 70 lines have H's value ranged from 0% to 9.09%; only 5 lines have H's value more than 10%. There were 16 rare alleles on 13 primer pairs. Genetic similarity coefficient ranged from 0.026 to 0.826, and 75 lines divided into 2 groups. Based on results of genetic diversity and drought characteristics of 75 rice lines, 8 cross combinations which could be useful for the development of drought tolerant rice were proposed.

Keywords: *Oryza sativa*, drought tolerance, genetic diversity, rare alleles, SSR marker.

Ngày nhận bài: 8-10-2012