

ĐÁNH GIÁ SỰ KHÁC BIỆT CỦA CÁC MẪU GIỐNG LÚA HUYẾT RỒNG PHỤC VỤ KHAI THÁC VÀ PHÁT TRIỂN NGUỒN GIEN LÚA ĐẶC SẢN TẠI VÙNG BẮC TRUNG BỘ

Tạ Hồng Linh¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt²,

Phạm Văn Tĩnh³, Nguyễn Thị Nhài²,

Nguyễn Bá Ngọc², Nguyễn Phi Long³,

Nguyễn Thị Thanh Thủy⁴

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá đa dạng di truyền của 08 mẫu giống lúa huyết rồng, bao gồm 04 mẫu giống thu thập tại Quảng Trị. Đa dạng di truyền của các mẫu giống lúa đã được đánh giá ở mức độ phân tử với các chỉ thị SSR. Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 8 mẫu giống lúa huyết rồng với 18 cặp mồi SSR đã thu được 31 alen đa hình. Số alen trên một locus dao động từ 2- 5 alen, với giá trị trung bình 2,6. Kết quả phân nhóm dựa trên hệ số tương đồng di truyền Dice đã nhóm các mẫu giống thành 2 nhóm chính. Kết quả đánh giá cũng cho thấy 04 mẫu giống huyết rồng thu thập tại Quảng Trị đã có sự tương đồng về mặt di truyền và có sự khác biệt di truyền so với các mẫu giống huyết rồng thu thập tại các địa điểm khác. Các mẫu giống lúa huyết rồng chính là nguồn gen giá trị và là nguồn vật liệu quý cho công tác chọn tạo giống lúa đặc sản ở Việt Nam.

Từ khóa: Chỉ thị SSR, đa dạng di truyền, lúa huyết rồng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Huyết rồng là giống lúa quý, sinh trưởng và phát triển tốt tại các vùng đất ngập lầy, nhiễm phèn như vùng Đồng Tháp Mười. Gạo huyết rồng màu đỏ nâu, bẻ đôi hạt gạo vẫn còn màu hồng bên trong, cơm ngon và có vị thơm, là loại gạo có giá trị dinh dưỡng cao, khả năng chống chịu khí hậu và kháng bệnh tốt. Hiện nay, diện tích canh tác lúa huyết rồng còn rất ít.

Theo nghiên cứu của các nhà khoa học, anthocyanin được giữ lại trong lớp vỏ lụa màu đỏ nâu là một chất có tiềm năng chống lại các bệnh ung thư, tim mạch và nhiều bệnh khác. Nếu trong một tháng dành ra khoảng mười ngày ăn các loại gạo màu thay gạo trắng bình thường thì có thể giúp cơ thể giải độc, hạ cholesterol, giảm đau nhức gân cốt, khớp xương ngón chân tay, thải độc tố trong gan, ngừa ung thư.

Do huyết rồng là giống lúa mùa truyền thống, canh tác từ nhiều thập kỷ, quá trình canh tác lâu dài đã làm cho giống lúa này giảm chất lượng và mất dần thị trường. Do vậy, việc phục tráng giống lúa huyết rồng là rất cần thiết.

Việc ứng dụng hiệu quả chỉ thị phân tử trong nghiên cứu di truyền thực vật đã góp phần rút ngắn đáng kể thời gian và tăng độ chính xác của quy trình sản xuất giống siêu nguyên chủng từ ruộng lúa đã thoái hóa, đồng thời giúp cho việc duy trì được tính đa dạng của giống. Đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen lúa huyết rồng địa phương dựa trên kiểu hình và chỉ thị phân tử không những có ý nghĩa trong việc bảo tồn các mẫu giống lúa đặc sản mà còn có đóng góp quan trọng trong công tác chọn tạo giống lúa chất lượng cao.

Nghiên cứu này tập trung vào ứng dụng chỉ thị phân tử để đánh giá sự khác biệt của 08 mẫu giống lúa huyết rồng thu thập từ các địa điểm khác nhau phục vụ công tác khai thác và phát triển nguồn gen lúa đặc sản huyết rồng tại vùng Bắc Trung bộ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu thực vật: 8 mẫu giống lúa huyết rồng (bảng 1, hình 1).

- Chỉ thị SSR: 18 chỉ thị SSR cung cấp bởi hãng IDT, Mỹ, phân bố rải rác trên 12 nhiễm sắc thể của hệ gen lúa (bảng 2).

- Các hóa chất, dụng cụ, máy móc dùng trong sinh học phân tử.

¹ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

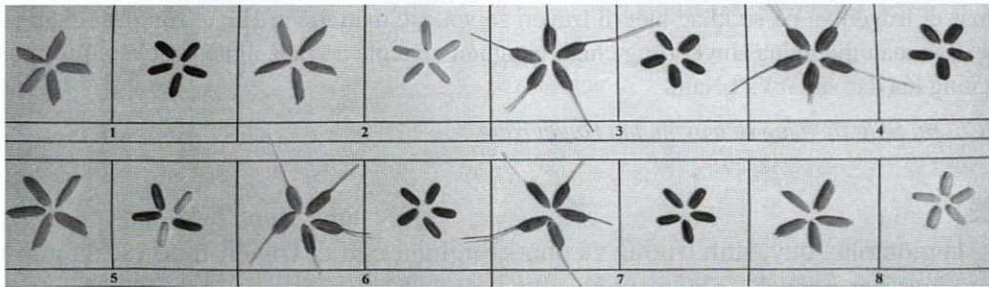
² Viện Di truyền Nông nghiệp

³ Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm

⁴ Bộ Nông nghiệp và PTNT

Bảng 1. Danh sách các dòng/giống lúa sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu	Tên mẫu giống	Nguồn gốc
1	HR1	Huyết rồng Thái Bình	Chọn lọc bằng phương pháp chọn lọc cá thể từ giống nhập nội
2	HR2	Huyết rồng (nhập nội)	Nhập nội
3	HR3	Huyết rồng Quảng Trị (dòng 1)	Thu thập tại Triệu Phước - Triệu Phong - Quảng Trị
4	HR4	Huyết rồng Quảng Trị (dòng 2)	Thu thập tại Triệu Thuận - Triệu Phong - Quảng Trị
5	HR5	Sóc Trăng Đỏ	Lai tạo giữa giống lúa Huyết rồng và giống lúa thơm ST1
6	HR6	Huyết rồng Quảng Trị (dòng 3)	Thu thập tại Triệu Long, Triệu - Triệu Phong - Quảng Trị
7	HR7	Huyết rồng Quảng Trị (dòng 4)	Thu thập tại Triệu Đông - Triệu Phong - Quảng Trị
8	HR8	Huyết rồng (nhập nội)	Nhập nội



Hình 1. Các mẫu giống lúa Huyết rồng sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 2. Danh sách các cặp mồi SSR sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự mồi	NST	Tên mồi	Trình tự mồi	NST
RM1	F: GCGAAAACACAATGCAAAAA R: GCGTTGGTTGGACCTGAC	1	RM8261	F: GACGACTGGATGGTACGAC R: TGCTTCTCCTGCAAACAC	7
RM1003	F: GATTCTTCCTCCCCTTCGTG R: TTCCTGTCAGAACAGGGAGC	1	RM234	F: ACAGTATCCAAGGCCCTGG R: CACGTGAGACAAAGACGGAG	7
RM104	F: GGAAGAGGAGAGAAAGATGTGTGTCG R: TCAACAGACACACCGCCACCGC	1	RM22774	F: CGCTGGAGAAGACAAGAAACG R: TAGAATCGGATCTACGGTTCAGG	8
RM279	F: GCGGGAGAGGGATCTCCT R: GGCTAGGAGTTAACCTCGCG	2	RM22257	F: ACGAGTGTACTAGAGATGAACTGG R: ACGACTTCCTTTACGAGTAGG	8
RM5474	F: AAAGTGTTGGTGAGCATAGC R: TTTGTGTTTGGAGAGACGAG	3	RM23747	F: ACCTACAGCTGAAGCCTCATACC R: GGAAGACAATCAAAGAAGCTCAGG	9
RM405	F: TCACACACTGACAGTCTGAC R: AATGTGGCACGTGAGGTAAG	5	RM25319	F: AGGGTAGAGTATGTCCGGTGTTTCC R: CCGTGGCAGTAGCAGTAGGC	10
RM3663	F: CATCAACCTCCACGAACATG R: CTCGGTGGTGATCCTCCTC	5	RM25248	F: GTGACGGCATAGGAGCGTTTATAGG R: TATTGCTGTTGACCGGTATGTCG	10
RM276	F: CTCAACGTTGACACCTCGTG R: TCCTCCATCGAGCAGTATCA	6	RM21	F: ACAGTATTCCGTAGGCACGG R: GCTCCATGAGGGTGGTAGAG	11
RM20591	F: TCGTCTGCGCGAATATTTAGAGAGG R: ATCTGCATCGGAGTCAGCAACG	6	RM247	F: TAGTGCCGATCGATGTAACG R: CATATGGTTTTGACAAAGCG	12

Chú thích: NST: Nhiễm sắc thể; F: Mồi xuôi; R: Mồi ngược

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích bằng chỉ thị phân tử SSR

ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp "NaOH extraction" của Wang (1993). Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96well Thermal cyclers với tổng thể tích 15 µl, gồm: 5 µl ADN, 0,15 µM mỗi, 0,2 mM dNTPs, 1X dịch đệm PCR, 2,5 mM MgCl₂ và 0,25 đơn vị Taq TaKaRa. Điều kiện phản ứng: 95°C - 7 phút; 35 chu kỳ (94°C - 15 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 1 phút; 72°C - 5 phút) và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,5% trong đệm TBE, nhuộm bằng EtBr và được soi dưới đèn UV.

2.2.2. Phương pháp phân tích số liệu

+ *Phân tích thống kê*: Những số liệu thống kê bao gồm số alen trên locus, tần số allele phổ biến nhất, số alen độc nhất, chỉ số PIC (Polymorphism Information Content) được tính toán sử dụng phần mềm Excel, trong đó:

- Đa dạng di truyền alen của các chỉ thị SSR được đánh giá thông qua hệ số đa hình PIC (Botstein, 1980) và được tính theo phương trình:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Trong đó: P_{ij} : là tần số xuất hiện của alen thứ j tương ứng với mỗi i .

Giá trị PIC càng lớn tức là mức độ đa hình của locus do mỗi i khuếch đại càng lớn, tức là càng nhiều alen được sinh ra.

+ *Phân tích đa dạng di truyền giữa các giống lúa*: Sử dụng chương trình NTSYS-pc v. 2.1 (Rohlf, 1997) để xây dựng ma trận tương đồng di truyền với hệ số

Dice (Nei and Li, 1979) và sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa các giống lúa nghiên cứu bằng phương pháp phân nhóm UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical averages).

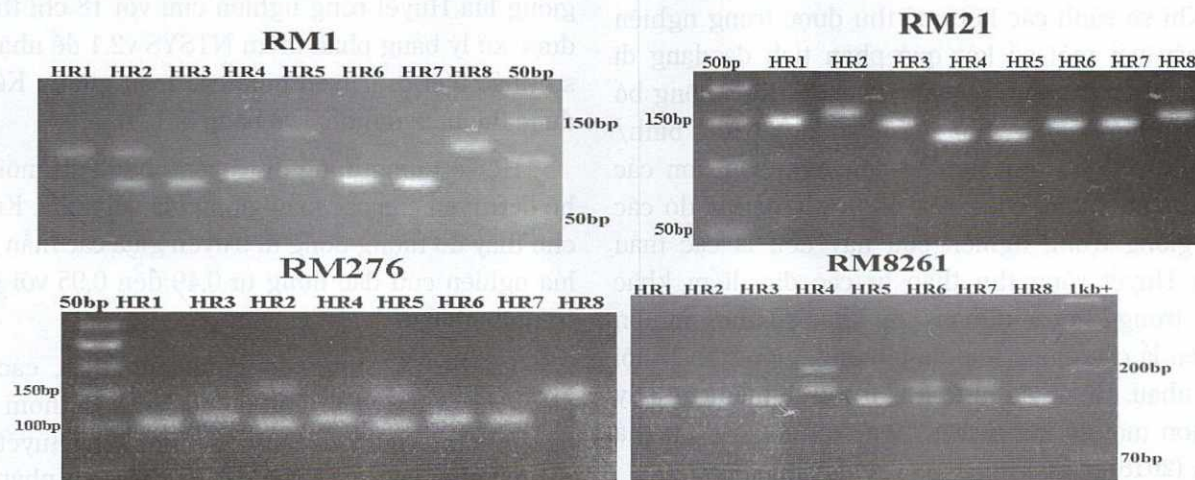
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích đa hình ADN các mẫu giống lúa huyết rồng bằng các chỉ thị phân tử SSR

Trong nghiên cứu này, đã lựa chọn 18 chỉ thị SSR phân bố rải rác trên các nhiễm sắc thể của hệ gen lúa để đánh giá sự khác biệt giữa các mẫu giống Huyết rồng nhập nội so với các mẫu giống Huyết rồng thu thập tại Quảng Trị (Hình 2).

Kết quả khảo sát đa hình ADN với 18 chỉ thị SSR thu được tỷ lệ đa hình khá cao, 12/18 chỉ thị SSR cho đa hình, chiếm 66,67%. Tổng số alen thu được tại 12 locus cho đa hình là 31 alen, số alen dao động trong khoảng 2-5 alen, trung bình 2,6 alen/locus. Trong đó, chỉ thị RM1 cho số alen cao nhất với 5 alen (Bảng 3).

Kết quả phân tích các chỉ số chính như tần số alen phổ biến nhất và chỉ số đa dạng PIC của các locus SSR cho đa hình đã cho thấy tần số alen phổ biến nhất dao động trong khoảng từ 40 đến 87,5%, tương ứng với chỉ thị RM1 và RM22257, với giá trị trung bình 61,02%. Chỉ số đa dạng PIC của các locus nghiên cứu thay đổi từ 0,22 đến 0,74, với giá trị trung bình là 0,49. Giá trị PIC trung bình phản ánh mức độ đa dạng chung cho tất cả các locus nghiên cứu. Điều này chứng tỏ những chỉ thị SSR được sử dụng trong nghiên cứu này đã cho kết quả đa dạng khá cao giữa các mẫu giống lúa Huyết rồng nghiên cứu, có ý nghĩa trong phân tích di truyền cây lúa.



Hình 2. Sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa Huyết rồng với các chỉ thị RM1, RM21, RM276 và RM8261 trên gel agarose 2,5%

Từ trái sang phải: Thang ADN 50bp, các mẫu giống huyết rồng ký hiệu từ HR1 đến HR8

Bảng 3. Các chỉ tiêu về alen, chỉ số đa dạng PIC của các locut SSR đa hình nhận biết trên 8 mẫu giống lúa Huyết rồng

TT	Chỉ thị SSR	NST	Số alen	Tần số alen phổ biến nhất	PIC
1	RM1	1	5	40,00	0,74
2	RM1003	1	2	50,00	0,50
3	RM104	1	2	50,00	0,50
4	RM279	2	3	63,64	0,51
6	RM276	6	3	40,00	0,66
7	RM8261	7	3	63,64	0,51
8	RM234	7	2	75,00	0,38
9	RM22774	8	2	62,50	0,47
5	RM22257	8	2	87,50	0,22
10	RM25248	10	2	75,00	0,38
11	RM21	11	3	50,00	0,63
12	RM247	12	2	87,50	0,22
Tổng cộng			31		
Trung bình			2,6	61,02	0,49
Giá trị nhỏ nhất			2	40,00	0,22
Giá trị lớn nhất			5	87,50	0,74

Ghi chú: NST: Nhiễm sắc thể; PIC: Hệ số đa hình

Bảng 4. Một số kết quả phân tích đa dạng di truyền SSR trên cây lúa đã được công bố

TT	Tác giả	Số giống	Số chỉ thị	Tổng số alen	Trung bình	
					Số alen	PIC
1	Thuy T. T. Nguyen và cs. (2012)	41	30	192	6,4	0,74
2	Nguyễn Thị Minh Nguyệt và cs. (2013)	40	27	193	7,1	0,76
3	Ngô Thị Hồng Tươi và cs. (2014)	46	35	68	2,62	0,46
4	Mengli Ma và cs. (2016)	61	78	499	6,397	0,59
5	Đoàn Thanh Quỳnh và cs. (2016)	42	38	106	3,03	0,50
6	Islam và cs. (2018)	50	50	162	3,24	0,32
Nghiên cứu này		8	19	31	2,6	0,49

Khi so sánh các kết quả thu được trong nghiên cứu này với một số kết quả phân tích đa dạng di truyền của các giống lúa với chỉ thị SSR đã công bố trong và ngoài nước, nhận thấy số alen trung bình/locut thu được trong nghiên cứu này thấp hơn các nghiên cứu trước. Điều này có thể lý giải là do các mẫu giống trong nghiên cứu này đều là các mẫu giống Huyết rồng thu thập từ các địa điểm khác nhau, trong khi các nghiên cứu khác sử dụng nguồn vật liệu là các giống lúa địa phương, giống nhập nội khác nhau. Hệ số đa hình PIC trong nghiên cứu này cao hơn một số kết quả nghiên cứu của các tác giả Islam (2018), Ngô Thị Hồng Tươi (2014) (Bảng 4).

3.2. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của các giống lúa Huyết rồng nghiên cứu

Kết quả phân tích đa dạng di truyền của các mẫu

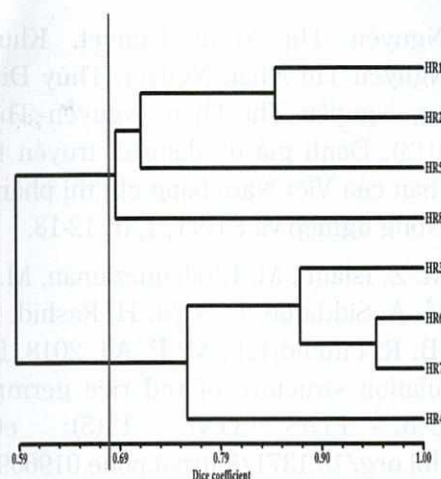
giống lúa Huyết rồng nghiên cứu với 18 chỉ thị SSR được xử lý bằng phần mềm NTSYS v2.1 để nhận biết sự khác biệt di truyền giữa các mẫu giống. Kết quả được thể hiện ở hình 3 và bảng 5.

Hệ số tương đồng di truyền phản ánh mối quan hệ di truyền của các mẫu giống lúa với nhau. Kết quả cho thấy độ tương đồng di truyền giữa các mẫu giống lúa nghiên cứu dao động từ 0,49 đến 0,95 với giá trị trung bình 0,67.

Tại hệ số tương đồng khoảng 0,68, các mẫu giống lúa Huyết rồng đã phân thành 2 nhóm riêng biệt, nhóm 1 gồm các mẫu giống HR1 (Huyết rồng Thái Bình), HR2 (mẫu giống Huyết rồng nhập nội), HR5 (Sóc Trăng Đỏ) và HR 8 (mẫu giống Huyết rồng nhập nội); nhóm 2 gồm 4 mẫu giống lúa Huyết rồng thu thập tại Quảng Trị là HR3, HR4, HR6 và HR7.

Những kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống lúa Huyết rồng thông qua ma trận tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây phân nhóm di truyền đã cho thấy các mẫu giống lúa đã thể hiện sự đa dạng về mặt di truyền.

Nghiên cứu này đã sử dụng 4 giống lúa Huyết rồng thu thập tại Quảng Trị, ký hiệu HR3, HR4, HR6 và HR7. Kết quả đánh giá đa dạng di truyền với 18 chỉ thị SSR cho thấy các giống lúa thu thập tại Quảng Trị có sự tương đồng về mặt di truyền. Trong 4 mẫu giống lúa Huyết rồng thu thập tại Quảng Trị, mẫu giống HR6 và HR7 có sự tương đồng di truyền cao nhất, với hệ số tương đồng 0,95 (Bảng 5). Khi phân tích sự tương đồng di truyền của 04 mẫu giống lúa Huyết rồng thu thập tại Quảng Trị đã có sự khác biệt di truyền so với các mẫu giống lúa Huyết rồng nhập nội, thu thập tại các địa điểm khác.



Hình 3. Sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống lúa Huyết rồng

Chú thích: Hệ số tương đồng di truyền Dice dựa trên phân tích 18 chỉ thị SSR đã thể hiện mối quan hệ giữa 8 mẫu giống lúa Huyết rồng

Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống lúa Huyết rồng nghiên cứu

	HR1	HR2	HR3	HR4	HR5	HR6	HR7	HR8
HR1	1							
HR2	0,85	1						
HR3	0,63	0,65	1					
HR4	0,56	0,59	0,77	1				
HR5	0,68	0,74	0,49	0,57	1			
HR6	0,55	0,57	0,90	0,73	0,56	1		
HR7	0,60	0,62	0,85	0,78	0,60	0,95	1	
HR8	0,63	0,75	0,58	0,56	0,68	0,60	0,65	1

4. KẾT LUẬN

- Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 8 mẫu giống lúa Huyết rồng với 18 cặp mỗi SSR đã thu được 31 alen với giá trị trung bình 2,6 alen/locut. Tần số alen phổ biến nằm trong khoảng 40- 87,5%, với giá trị trung bình 61,02 %. Chỉ số đa dạng PIC thay đổi từ 0,22- 0,74, với giá trị trung bình 0,49.

- Hệ số tương đồng di truyền Dice dựa trên phân tích 18 chỉ thị SSR đã thể hiện mối quan hệ giữa 8 mẫu giống lúa Huyết rồng. Tại hệ số tương đồng 0,68, 8 mẫu giống lúa đã phân thành 2 nhóm: Nhóm 1 gồm các giống HR1 (thu thập tại Thái Bình), HR2 (thu thập tại Sóc Trăng), HR5 (dòng 3 thu thập tại Quảng Trị) và HR 8 (giống Huyết rồng nhập nội); nhóm 2 gồm 3 giống lúa Huyết rồng thu thập tại Quảng Trị HR3, HR4, HR6 và giống lúa Huyết rồng nhập nội HR7.

- Kết quả đánh giá đã cho thấy các giống lúa Huyết rồng thu thập tại Quảng Trị có sự tương đồng

về mặt di truyền và thể hiện sự khác biệt di truyền so với các mẫu giống Huyết rồng thu thập tại các địa điểm khác.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu này là kết quả thuộc Nhiệm vụ quỹ gen cấp Quốc gia “Khai thác và phát triển nguồn gen lúa đặc sản Huyết Rồng tại vùng Bắc Trung bộ” thuộc Chương trình khai thác và phát triển nguồn gen do Bộ Khoa học Công nghệ cấp kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Thị Hồng Tươi, Phạm Văn Cường, 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 2014, tập 12, số 4: 485-494

2. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Khuất Hữu Trung, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Thúy Diệp, Kiều Thị Dung, Nguyễn Thị Thảo, Nguyễn Thị Thanh Thủy (2013). Đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn lúa chịu hạn của Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, 1, tr. 12-18.

3. M. Z. Islam, M. Khalequzzaman, M. F. R. K. Prince, M. A. Siddique, E. S. M. H. Rashid, M. S. U. Ahmed, B. R. Pittendrigh, M. P. Ali, 2018. Diversity and population structure of red rice germplasm in Bangladesh. PLoS ONE 13(5): e0196096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196096>

4. Mengli Ma, Yanhong Liu, Hengling Meng and Bingyue Lu, 2016. Genetic Diversity Analysis of Red Rice from Hani's Terraced Fields in Yunnan

Province. Advances in Computer Science Research, volume 63: 154-158.

5. Rohlf F., 1997. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, 2.1 edn. Department of Ecology and Evolution, State University of NY, Stony Brook.

6. Thuy T. T. N, Nguyet M. T. N., Long H. H., Naruto F. and Kenichi T. (2012). Genetic Diversity in Vietnamese Upland Rice Germplasm Revealed by SSR Markers. J. Fac. Agr., 57 (2), tr. 383- 391.

7. Wang H. M Qi and Cutler A. J (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res., 21(17): 4153-4154.

8. Gramene <http://www.gramene.org/>.

EVALUATING THE DIFFERENCES OF RED RICE SAMPLES FOR THE EXPLOITATION AND DEVELOPMENT OF INDIGENOUS RICE GENETIC RESOURCES IN THE CENTRAL NORTH VIET NAM

Ta Hong Linh, Nguyen Thi Minh Nguyet, Pham Van Tinh,

Nguyen Thi Nhai, Nguyen Ba Ngoc, Nguyen Phi Long, Nguyen Thi Thanh Thuy

Summary

The purpose of this study was to evaluate the genetic diversity within 08 Huyet Rong rice accessions, including 04 accessions collected in Quang Tri province. Genetic diversity of the rice accessions was evaluated at the DNA level. Eight accessions were surveyed with 18 simple sequence repeat (SSR) markers revealing the genetic relationship among the varieties. A total of 31 polymorphic bands were detected. The number of alleles per locus ranged from 2 to 5, with an average of 2.6. Cluster analysis based on Dice's similarity coefficients using UPGMA grouped the rice accessions into two major groups. The results showed that the 04 accessions collected in Quang Tri province showed genetic similarity among them and the genetic difference compared to accessions collected at other sites. The Huyet Rong rice accessions presents a valuable gene source and sufficient genetic background for specialty rice breeding in Vietnam.

Keywords: *Genetic diversity, Huyet Rong rice, SSR marker.*

Người phản biện: PGS.TS. Lã Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 3/8/2018

Ngày thông qua phản biện: 5/9/2018

Ngày duyệt đăng: 12/9/2018