

Công trình là kết quả của đề tài “Xây dựng mã vạch ADN (DNA barcode) cho các giống cây trồng đặc hữu có giá trị kinh tế của Việt Nam” thuộc chương trình Công nghệ Sinh học Nông nghiệp và Thủy sản.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

**Kellogg E., Juliano ND,** 1997. The structure and function of RuBisCo and their implications for systematic studies. *Am J Bot*, 84: 413-428.

**Saitou N, Nei M,** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, volume 4, issue 4, 406-425.

**Suyama Y., Yoshimaru H., Tsmura Y,** 2000. Molecular phylogenetic position of Japanese *Abies* (Pinaceae) based on chloroplast sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 16(2):271-277, doi: 10.1006/mpev.2000.0795.

**Tshering Penjor, Toyoaki Anai, Yukio Nagano, Ryoji Matsumoto, Masashi Yamamoto,** 2010. Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on *rbcL* gene sequences. *Tree Genetics & Genomes* (2010) 6: 931-939, doi: 10.1007/s11295-010-0302-1.

**John Kress W. and David L. Erickson,** 2007. A two - locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One*, 2(6): e508, doi: 10.1371/journal.pone.0000508.

### Genetic diversity of *rbcL* gene in Vietnam's grapefruit germplasms

Nguyen Thi Ngoc Lan, Nguyen Thi Lan Hoa,  
Nguyen Thi Thanh Thuy, La Tuan Nghia

#### Abstract

Grapefruit is one of the most important tropical fruit trees and has high economic value in many countries. Research on genetic diversity in *rbcL* gene of 25 Vietnam's grapefruit germplasms has identified two specific nucleotide sequences of Thanh Tra (G2) and Da Xanh (G27). This mutation was transition mutation (C>T) at 595 downstream position of sequence in both Thanh Tra and Da Xanh and it can be used for distinguishing Thanh Tra and Da Xanh varieties from others. These two sequences have been registered with NCBI codes as KR073282 and KR073281, respectively. The phylogenetic tree analysis by Neighbour Joining method based on 600 nucleotides of *rbcL* gene exactly grouped all surveying sequences. In addition, this analysis has clearly separated the *Citrus* in Rutaceae and discriminated two grapefruits of Vietnam (Thanh Tra and Da Xanh).

**Keywords:** Grapefruit, sequencing, DNA barcode, *rbcL*

Ngày nhận bài: 16/9/2018

Ngày phản biện: 21/9/2018

Người phản biện: TS. Trần Danh Sứ

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

### ĐÁNH GIÁ TÍNH CHỊU MẶN CỦA QUẦN THỂ LAI HỒI GIAO OMCS2000\*4/POKKALI Ở THỂ HỆ $BC_3F_2$

Biện Anh Khoa<sup>1</sup>, Bùi Phước Tâm<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thị Hồng Loan<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lang<sup>1</sup>

#### TÓM TẮT

Cây lúa mẫn cảm với điều kiện mặn và cho phản ứng khác nhau tùy thuộc vào loại môi trường cũng như bản chất di truyền của từng cá thể. Phân tích tính chịu mặn ở cây lúa đòi hỏi phải kết hợp giữa đánh giá kiểu hình và kiểu gen. Chín mươi chín (99) dòng  $BC_3F_2$  của quần thể lai hồi giao OMCS2000\*4/ Pokkali được thanh lọc khả năng chịu mặn với ba nồng độ muối khác nhau (EC = 0, 6 và 12 dS/m) ở giai đoạn mạ sau hai và bốn tuần thanh lọc. Kết quả ghi nhận 21/99 dòng biểu hiện tính chịu khá tốt ở cả 6 và 12 dS/m. Các dòng này tiếp tục được kiểm tra kiểu gen liên quan tính chịu mặn (*Saltol*) trên NST1 với hai chỉ thị phân tử RM3412b và RM8094. Kết quả cho thấy 100% dòng chịu mặn (21 dòng) đều có alen mặn trên NST1. Qua đánh giá kiểu hình và kiểu gen, các dòng lúa xác định có tiềm năng chịu mặn tốt là  $BC_3F_2$ -65,  $BC_3F_2$ -66,  $BC_3F_2$ -70,  $BC_3F_2$ -71,  $BC_3F_2$ -76,  $BC_3F_2$ -77,  $BC_3F_2$ -81 và  $BC_3F_2$ -83.

**Từ khóa:** Mặn, chịu mặn, quần thể lai hồi giao, thanh lọc, giai đoạn mạ

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Nông nghiệp công nghệ cao Đồng bằng sông Cửu Long

<sup>2</sup> Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chiến lược tạo chọn giống chịu mặn được xem như là cách làm kinh tế và có hiệu quả nhất để gia tăng sản lượng lúa ở vùng nhiễm mặn (Buu *et al.*, 1995). Tính chịu mặn ở cây lúa là một tính trạng đa gen, chịu ảnh hưởng nhiều của các điều kiện môi trường. Trong công tác chọn lọc dòng lúa chịu mặn, bên cạnh kiểu hình, kiểu gen cũng đóng vai trò quan trọng. Nếu như lai hồi giao giúp chuyển một gen mục tiêu từ giống cho sang giống nhận gen trong khi vẫn giữ lại các đặc tính quan trọng của giống nhận thì việc sử dụng các chỉ thị phân tử cho phép giải mã di truyền của con lai ở mỗi thế hệ, làm tăng tốc độ của quá trình chọn tạo, do đó tăng hiệu quả chọn lọc gen trên một đơn vị thời gian (Hospital, 2003). Nhiều nghiên cứu tạo chọn giống lúa chịu mặn nhờ chỉ thị phân tử đã được thực hiện trước đây (Mondal và Borromeo, 2016; Huyen *et al.*, 2013; Thomson *et al.*, 2010).

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tính chịu mặn của quần thể hồi giao BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> (OMCS2000\*4/Pokkali) trên cơ sở thanh lọc kiểu hình ở giai đoạn mạ và đánh giá kiểu gen. Qua đó chọn lọc các dòng mang gen mục tiêu và chịu mặn tốt.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa Pokkali có nguồn gốc từ Ấn Độ, được dùng làm bố và là giống chịu mặn đến 15dS/m (Zeng, 2005). Giống lúa OMCS2000 được dùng làm mẹ, đây là giống có năng suất ổn định và phẩm chất tốt, được công nhận giống quốc gia vào năm 2002 (theo Ngân hàng kiến thức cây lúa). Giống chuẩn nhiễm IR29 có nguồn gốc từ Viện lúa quốc tế (IRRI), thường được dùng làm đối chứng nhiễm (khả năng chịu thấp) trong các nghiên cứu về gen mặn trên cây lúa (Bonilla *et al.*, 2002). Quần thể lúa hồi giao BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> của tổ hợp lai OMCS2000\*4/Pokkali bao gồm 99 dòng được kế thừa từ nghiên cứu của Nguyễn Thị Lang và cộng tác viên (2016).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thanh lọc mặn giai đoạn mạ trong nhà lưới: Thanh lọc mặn ở giai đoạn mạ trong dung dịch Yoshida chứa muối NaCl theo phương pháp của IRRI (1997). Các nồng độ mặn lần lượt là 0, 6 và 12 dS/m. Các thí nghiệm được thiết kế theo khối ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Kết quả thanh lọc được ghi nhận ở 2 tuần và 4 tuần sau khi cho cây lúa nhiễm mặn. Các chỉ tiêu theo dõi: cấp chịu mặn (cấp 1, 3, 5, 7, 9), chiều dài thân (cm), chiều dài rễ (cm), sinh khối tươi (mg) và sinh khối khô (mg). Cấp chịu mặn được phân loại theo hệ thống SES của IRRI (1997) (Bảng 1).

**Bảng 1.** Đánh giá tính chịu mặn ở giai đoạn mạ trên cây lúa

Cấp	Mô tả	Mức chịu mặn
1	Tăng trưởng bình thường, không có vết cháy lá trên lá non	Chịu tốt
3	Gần như bình thường, nhưng đầu lá hoặc vài lá bị cháy và cuộn lại	Chịu khá
5	Tăng trưởng chậm, hầu hết lá bị khô, một vài chồi bị chết	Chịu trung bình
7	Ngừng tăng trưởng, hầu hết lá bị khô, một vài chồi bị chết	Nhiễm
9	Tất cả các cây bị chết hoặc khô	Rất nhiễm

(Nguồn: IRRI, 1997).

- Đánh giá kiểu gen liên quan đến tính chịu mặn: Ly trích DNA, đo nồng độ DNA, phản ứng PCR, điện di kiểm tra kiểu gen trên gel agarose 2,5% được thực hiện theo phương pháp của IRRI (2011).

- Phân tích thống kê: Nhập, xử lý và phân tích số liệu dựa trên phần mềm Microsoft Office Excel, STAR và R-studio.

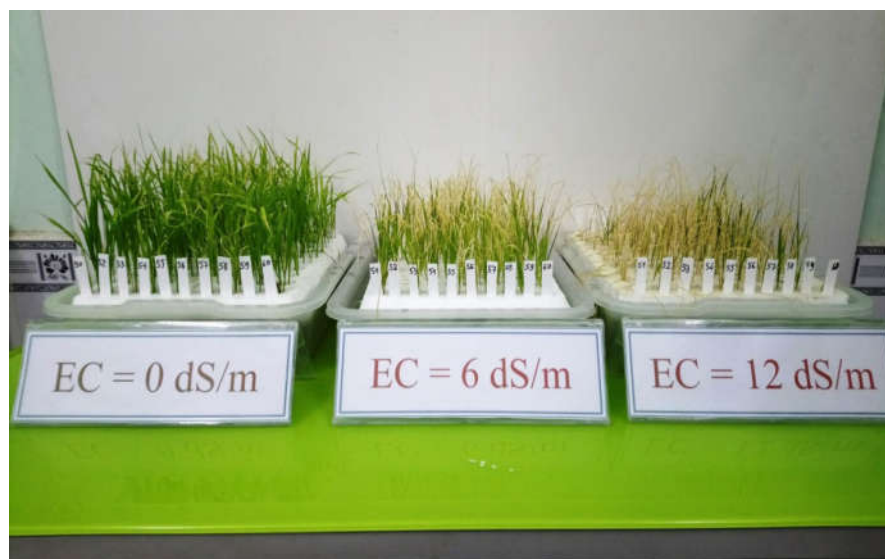
### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại Viện nghiên cứu Nông nghiệp công nghệ cao Đồng bằng sông Cửu Long từ tháng 1/2018 đến tháng 6/2018.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Đánh giá cấp chịu mặn (SES)

Dựa vào thang điểm đánh giá chuẩn (SES), nếu qui ước nhóm chịu của cây lúa từ cấp 1 đến cấp 5 và nhóm nhiễm từ trên cấp 5 đến cấp 9 thì thứ tự tính chịu theo môi trường lần lượt là 0 dS/m > 6 dS/m > 12 dS/m và theo thời gian là 2 tuần STL > 4 tuần STL. Các thứ tự này cho thấy có tính chịu mặn của cây lúa biến thiên theo nồng độ mặn và thời gian mà cây lúa tiếp xúc với môi trường mặn tương ứng.



**Hình 1.** Sự khác biệt về cấp chịu của các dòng lúa ở thời điểm 4 tuần sau thanh lọc

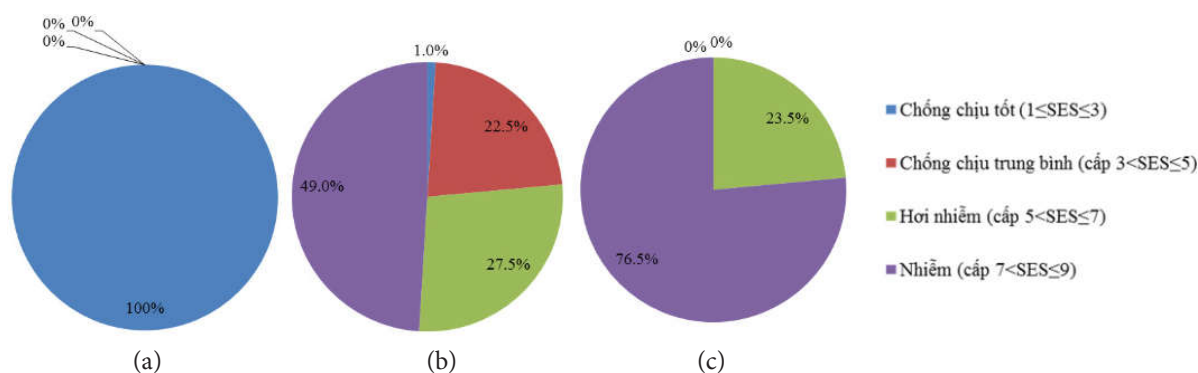
Về mức chịu mặn cụ thể ở từng nồng độ mặn, 100% số dòng ở môi trường 0 dS/m đạt mức độ chịu tốt ( $1 \leq SES \leq 3$ ). Ở môi trường  $EC = 6 \text{ dS/m}$ , các dòng có khả năng mức chịu tốt ( $1 \leq SES \leq 3$ ) chiếm tỉ lệ thấp nhất (1,0 %) và chịu trung bình ( $3 < SES \leq 5$ ) chiếm tỉ lệ 22,5%. Ở môi trường  $EC = 12 \text{ dS/m}$ , mức chịu của các dòng giảm nhanh và hầu hết đều biểu hiện từ hơi nhiễm đến nhiễm ( $SES > 5$ ) sau 4 tuần thanh lọc (Hình 2).

Kết quả thí nghiệm ghi nhận mức độ chịu mặn của cây lúa không những bị ảnh hưởng của môi trường mà còn phụ thuộc vào thời gian mà cây lúa tiếp xúc với điều kiện mặn (Hình 3). Ở môi trường 6 dS/m, sau 2 tuần thanh lọc, tính chịu của các dòng biểu hiện khác nhau từ chịu tốt đến nhiễm, trong đó, số lượng các dòng chịu tốt và trung bình ( $1 \leq SES \leq 5$ ) chiếm 25%. Tuy nhiên, sau 4 tuần thanh lọc

ở nồng độ này, cấp độ chịu mặn  $1 < SES \leq 3$  giảm đi khoảng 4%, khoảng 3% cho cấp  $3 < SES \leq 5$  và 13% cho cấp  $5 < SES \leq 7$  nhưng tăng khoảng 21% các dòng nhiễm ở mức  $7 < SES \leq 9$ .

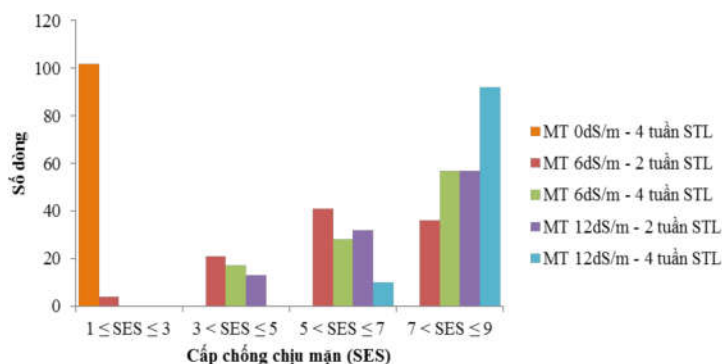
Tương tự, cây lúa ở môi trường 12 dS/m sau 2 tuần thanh lọc, có mức độ chịu mặn thấp hơn ở môi trường 6 dS/m. Không có dòng nào chịu tốt, có 12,7% dòng chịu trung bình, còn lại là mức hơi nhiễm đến nhiễm. Tuy nhiên, so với cấp độ chịu ở 6dS/m sau 4 tuần thanh lọc, tỷ lệ dòng chịu mặn là tương đương nhau. Ở thời điểm 4 tuần sau thanh lọc ở môi trường 12 dS/m, không có dòng nào chịu, đa số các dòng đều thể hiện tính nhiễm ( $7 < SES \leq 9$ ).

Như vậy, trong số 99 dòng lúa ban đầu, có 21 dòng thể hiện khả năng chịu mặn (Bảng 2). Các dòng này chịu tốt ở 6 dS/m trong 4 tuần và 12 dS/m trong 2 tuần.



**Hình 2.** So sánh tính chịu mặn của quần thể lúa với các nồng độ mặn khác nhau sau 4 tuần thanh lọc

Chú thích: a)  $EC = 0 \text{ dS/m}$ ; b)  $EC = 6 \text{ dS/m}$ ; c)  $EC = 12 \text{ dS/m}$ .



**Hình 3.** Tính chịu mặn của quần thể lúa ở 3 nồng độ mặn 0, 6 và 12 dS/m trong các khoảng thời gian thanh lọc khác nhau

Ghi chú: MT: Môi trường; SES: Hệ thống đánh giá tiêu chuẩn; STL: sau thanh lọc.

**Bảng 2.** Khả năng chịu mặn của các dòng con lai ưu tú

TT	Tên dòng/ giống	Cấp chịu mặn (SES)				
		0 dS/m	6 dS/m		12 dS/m	
			2 tuần -STL	4 tuần -STL	2 tuần -STL	4 tuần -STL
1	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -2	C	C	HC	HC	HN
2	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -15	C	HC	HC	HC	N
3	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -18	C	HC	HC	HN	N
4	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -19	C	HC	HC	HN	N
5	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -22	C	HC	HN	HN	HN
6	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -59	C	HC	HC	HC	HN
7	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -64	C	C	HC	HC	HN
8	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -65	C	C	HC	C	HN
9	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -66	C	C	HC	HN	HN
10	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -70	C	C	HC	HC	HN
11	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -71	C	HC	HC	HC	HN
12	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -72	C	C	HC	HC	HN
13	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -73	C	HC	HC	HC	HN
14	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -76	C	C	HC	HC	HN
15	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -77	C	C	HC	HC	HN
16	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -78	C	C	HC	HC	HN
17	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -79	C	HC	HN	HN	HN
18	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -81	C	HC	HC	HC	HN
19	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -83	C	C	C	C	HN
20	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -100	C	HC	HC	HC	N
21	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -101	C	HC	HN	HC	HN
22	<b>Pokkali</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>HC</b>	<b>HC</b>	<b>HN</b>
23	<b>IR29</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
24	<b>OMCS2000</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
F		-	**	**	**	**
CV (%)		-	16,68	15,55	18,82	9,46
SD		-	1,82	1,94	1,85	1,18

Ghi chú: F: mức ý nghĩa; \*\*: mức ý nghĩa 99%; CV: hệ số biến thiên; SD: Độ lệch chuẩn; C: Chịu tốt (1 ≤ SES ≤ 3); HC: Chịu trung bình (3 < SES ≤ 5); HN: Hơi nhiễm (5 < SES ≤ 7); N: Nhiễm (7 < SES ≤ 9).

### 3.2. Các đặc tính nông học của các dòng lúa thông qua thanh lọc ở các nồng độ mặn khác nhau

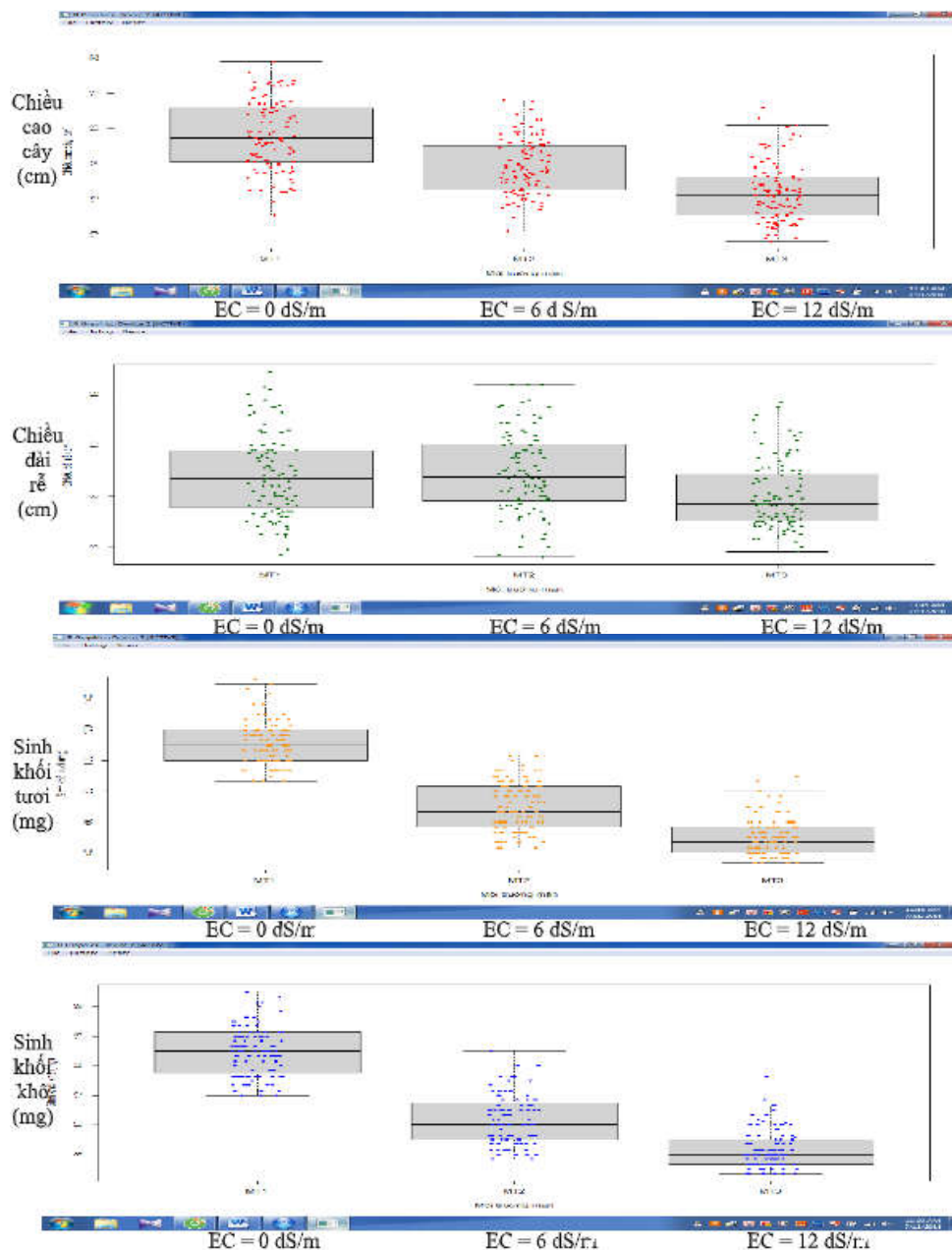
Chiều cao cây (cm): ở môi trường có EC là 0, 6 và 12 dS/m, chiều cao cây trung bình theo thứ tự giảm dần là 15,7 cm, 13,9 cm và 12,4 cm. Điều này cho thấy ở nồng độ mặn càng cao, chiều cao của cây lúa càng giảm. Sự giảm của chiều cao trong điều kiện mặn phản ánh ảnh hưởng của muối đối với sự phát triển của cây, tương tự như kết quả của các nghiên cứu trước đây (Hasanuzzaman *et al.*, 2009; Hakim *et al.*, 2014). Các dòng có khả năng chịu mặn có xu hướng phát triển nhanh để thoát khỏi giai đoạn mẫn cảm để chống chịu với điều kiện bất lợi. Ngược lại, các dòng mẫn cảm sẽ phát triển chậm lại, sinh trưởng kém và chết (Yeo và Flower, 1984) (Hình 4).

Chiều dài rễ (cm): Ở 0 dS/m, giá trị về chiều dài rễ dao động từ 5,7 - 12,9 cm, đạt trung bình 8,8 cm. Ở môi trường 6 dS/m, chiều dài rễ trung bình giảm (9,0 cm) và dao động từ 5,6 - 14,0 cm. Ở nồng độ 12 dS/m, chiều dài rễ của các dòng lại nhỏ hơn so với môi trường 0 và 6 dS/m, giá trị thấp nhất là 3,8 cm, cao nhất là 12,9 cm và trung bình là 8,8 cm. Điều này cho thấy khi nồng độ muối của môi trường tăng lên sẽ gây ức chế sự sinh trưởng ở các dòng lúa, nhất là các dòng mẫn cảm hay có khả năng thích nghi kém.

Sinh khối tích lũy trong cây (mg): Khối lượng sinh khối tươi của các dòng đạt cao nhất ở nồng độ 0 dS/m, trung bình là 111,9 mg, cao nhất đạt 160,0 mg (Pokkali) và thấp nhất đạt 86,7 mg. Ở nồng độ 6 dS/m, khối lượng sinh khối tươi giảm hơn so với môi trường đối chứng, đạt trung bình 70,0 mg. Trong khi đó, ở nồng độ 12 dS/m, giá trị trung bình này giảm xuống còn 49,8 cm. Kết quả khối lượng sinh khối khô được ghi nhận tương tự như khối lượng sinh khối tươi. Khối lượng sinh khối khô có giá trị cao nhất ở 0 dS/m, kể đến là 6 dS/m và thấp

nhất ở 12 dS/m. Như vậy, qua phân tích kết quả khối lượng sinh khối tươi và khô của các dòng lúa ở 3 môi trường ghi nhận rằng khi độ mặn càng tăng thì sinh khối tích lũy trong cây lúa càng giảm. Haq và cộng tác viên (2009) cũng báo cáo rằng sinh khối tích lũy

của cây lúa giảm đi trong điều kiện mặn. Điều này xảy ra là do mặn kìm hãm sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa bởi các stress thẩm thấu và sinh lý (Shani and Ben-Gal, 2005).

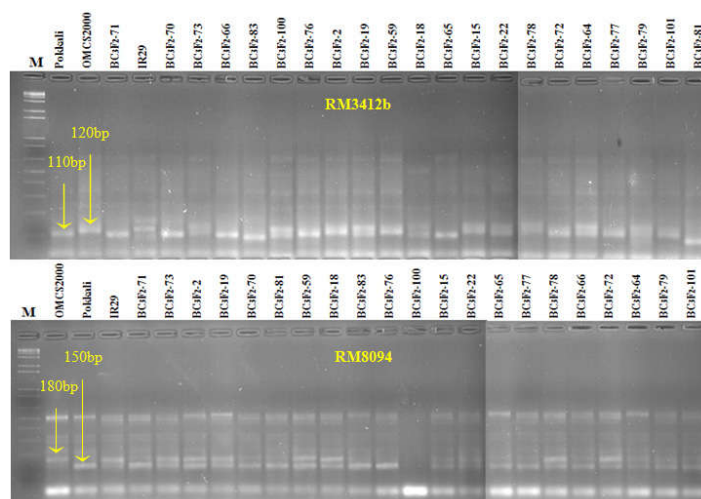


Hình 4. Sự biến động của chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và khô của cây lúa qua ba môi trường mặn (0, 6 và 12 dS/m)

### 3.3. Đánh giá kiểu gen liên quan tính chịu mặn trên các dòng lúa

Trong thí nghiệm này, các alen mặn được đánh giá thông qua chỉ thị phân tử liên kết với gen mặn trên vùng gen chính (*Saltol*) (nhiễm sắc thể số 1)

được đánh dấu bởi chỉ thị RM8904 ở vị trí 44,9 cM và RM3412b ở vị trí 46,3 cM (Thomson *et al.*, 2010). Các (21) dòng có kiểu hình chịu mặn tốt nhất và các đối chứng (bố Pokkali, mẹ OMCS2000, IR29) được chọn để tìm alen mặn với hai chỉ thị này.



**Hình 5.** Kết quả đánh giá kiểu gen các dòng lúa chịu mặn trên gel agarose 2,5% với chỉ thị RM3412b và RM8094 đánh dấu gen mặn định vị trên NST1

Ghi chú: M (thang chuẩn 1 Kb\*); NST1: Nhiễm sắc thể số 1.

Chỉ thị RM3412b cho sản phẩm PCR ở vị trí 110 và 120 bp. Giống bố cũng là giống chuẩn kháng Pokkali có vị trí băng ở 110 bp, trong khi đó, giống mẹ OMCS2000 và giống chuẩn nhiễm IR29 cùng thể hiện băng hình ở vị trí 120 bp. Do đó, vị trí 110 bp cho biết cá thể mang gen mặn, ngược lại, vị trí không mang gen là 120bp. Quần thể OMCS2000\*4/Pokkali có 8/21 dòng mang gen mặn đồng hợp và 13/21 dòng biểu hiện dị hợp tử. Tương tự, đối với chỉ thị RM8094, Pokkali thể hiện băng ở vị trí 150bp, đây là vị trí của gen mục tiêu. Xét trên tổ hợp OMCS2000\*4/Pokkali, 8/21 dòng mang gen mặn đồng hợp, 12/21 dòng dị hợp tử và một dòng (BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-100) không có băng. Như vậy, 100% dòng chịu mặn thuộc quần thể

OMCS2000\*4/Pokkali đều tìm thấy được alen mặn (*Saltol*) trên NST1.

### 3.4. Sự tương đồng giữa kiểu gen và kiểu hình của tính trạng chịu mặn

Qua đánh giá sự tương đồng giữa kiểu hình và kiểu gen của 21 dòng chịu mặn, kết quả ghi nhận 100% các dòng này đều mang gen mục tiêu ở thể đồng hợp hoặc dị hợp. Trong đó, 8 dòng (BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-65, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-66, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-70, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-71, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-76, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-77, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-81 và BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-83) mang gen mặn đồng hợp, các dòng còn lại mang alen mặn nhưng vẫn còn ở thể dị hợp tử. Kết quả này có thể giải thích do sự phân ly của các dòng lúa, vì vậy, các dòng này cần tiếp tục được chọn lọc trong các thế hệ tiếp theo.

**Bảng 3.** Kết quả kiểu gen quy định tính chịu mặn của các dòng lúa có kiểu hình chịu mặn trên quần thể OMCS2000\*4/Pokkali

TT	Tên	Kiểu gen (bp)		Gen <i>Saltol</i>	TT	Tên	Kiểu gen (bp)		Gen <i>Saltol</i>
		RM3412b	RM8094				RM3412b	RM8094	
1	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -2	110-120	150-180	DHT	13	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -73	110-120	150-180	DHT
2	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -15	110-120	150-180	DHT	14	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -76	110	150	ĐHT
3	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -18	110-120	150-180	DHT	15	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -77	110	150	ĐHT
4	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -19	110-120	150-180	DHT	16	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -78	110-120	150-180	DHT
5	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -22	110-120	150-180	DHT	17	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -79	110-120	150-180	DHT
6	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -59	110-120	150-180	DHT	18	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -81	110	150	ĐHT
7	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -64	110-120	150-180	DHT	19	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -83	110	150	ĐHT
8	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -65	110	150	ĐHT	20	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -100	110-120	-	DHT
9	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -66	110	150	ĐHT	21	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -101	110-120	150-180	DHT
10	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -70	110	150	ĐHT	22	<b>Pokkali</b>	<b>110</b>	<b>150</b>	<b>ĐHT</b>
11	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -71	110	150	ĐHT	23	<i>IR29</i>	<i>120</i>	<i>180</i>	<i>không</i>
12	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> -72	110-120	150-180	DHT	24	<i>OMCS2000</i>	<i>120</i>	<i>180</i>	<i>không</i>

Ghi chú: ĐHT: đồng hợp tử; DHT: dị hợp tử.

#### IV. KẾT LUẬN

Các dòng của quần thể OMCS2000\*4/Pokkali thể hiện nhiều mức độ mặn cảm với từng môi trường mặn khác nhau. Môi trường có độ mặn càng cao, thời gian tiếp xúc của cây lúa với môi trường càng dài, mức chống chịu và sự sinh trưởng của cây lúa càng giảm. Quần thể OMCS2000\*4/Pokkali chịu tốt ở 6 dS/m trong 4 tuần và ở 12 dS/m trong 2 tuần sau khi cây lúa tiếp xúc với điều kiện mặn. Kết quả xác định 8 dòng thể hiện tính chịu mặn khá tốt và mang gen mặn là BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-65, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-66, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-70, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-71, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-76, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-77, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-81 và BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-83. Các dòng này cần được tiếp tục chọn lọc và phát triển cho các vùng bị ảnh hưởng bởi mặn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Lang, Russell R, Ismail AM, Nguyễn Văn Hiếu, Bùi Phước Tâm, Phạm Thị Thu Hà, Nguyễn Hoàng Thái Bình, Phạm Công Trứ, Trần Thị Nhiên, Nguyễn Trọng Phước, Bùi Chí Bửu, Wassmann R, 2016. Chọn giống lúa ngập và mặn phục vụ Đồng bằng sông Cửu Long. Dự án CLUES, Cần Thơ, 2012-2016.
- Bonilla P, Dvorak J, Mackill D, Deal K, Gregorio G, 2002. RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines. *Philipp Agricultural Scientist*, 85: 68-76.
- Buu BC, Lang NT, Tao PB, Bay ND, 1995. Rice breeding research strategy in the Mekong Delta. *Proc. Of the Int. Rice Res. Conf. "Fragile Lives in Fragile Ecosystems, IRRI"*, page: 739-755.
- Hakim MA, Juraimi AS, Hanafi MM, Ismail MR, Rafii MY, Islam MM, Selamat A, 2014. The effect of salinity on growth, ion accumulation and yield of rice varieties. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(3): page: 874-885.
- Haq T, Akhtar J, Nawaz S, Ahmad R, 2009. Morpho-physiological response of rice (*Oryza sativa* L.) varieties

- to salinity stress. *Pak. J.Bot.*, 41 (6): 2943-2956.
- Hasanuzzaman M, Fujita M, Islam MN, Ahamed KU, Nahar K, 2009. Performance of four irrigated rice varieties under different levels of salinity stress. *Int J Integ Biol.*, 6: 85 - 90.
- Hospital F, 2003. Marker-assisted breeding. In: *Newbury HJ, editor. Plant molecular breeding*. Oxford: Blackwell; pp. 30-59.
- Huyen LTN, Cuc LM, Ham LH, Khanh TD, 2013. Introgression the Saltol QTL into Q5BD, the elite variety of Vietnam using marker assisted selection (MAS). *Am J Biosci.*, 1: 80-84.
- IRRI, 1997. Screening rice for salinity tolerance. International Rice Research Institute. *Discussion paper series*. No.22.
- IRRI, 2011. Laboratory Handbook of Molecular Marker Application for Rice Breeding. International Rice Research Institute. Rice Breeding Course 19 August 2011.
- Mondal S, Borromeo TH, 2016. Screening of salinity tolerance of rice at early seedling stage. *J. Biosci. Agric. Res.*, 10 (01): 843-847.
- Shani U, Ben-Gal A, 2005. Long-term response of grapevines to salinity: Osmotic effects and ion toxicity. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56: 148-154.
- Thomson MJ, de Ocampo M, Egdane J, Rahman MA, Sajise AG, Adorada DL, Tumimbang-Raiz E, Blumwald E, Seraj ZI, Singh RK, Gregorio GB, Ismail AM, 2010. Characterizing the Saltol quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice.*, 3: 148-160.
- Yeo AR, Flowers TJ, 1984. Mechanisms of salinity resistance in rice and their role as physiological criteria in plant breeding. In: *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*, Wiley Interscience, New York, pp.151-170.
- Zeng LH, 2005. Exploration of relationships between physiological parameters and growth performance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under salinity stress using multivariate analysis. *Plant Soil*, 268: 51-59.

### Evaluation of salinity tolerance of rice backcross population (OMCS2000\*4/Pokkali) in BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> generation

Bien Anh Khoa, Bui Phuoc Tam,  
 Nguyen Thi Hong Loan, Nguyen Thi Lang

#### Abstract

Rice plants are susceptible to salinity conditions and give different responses depending on the type of environment as well as the genetic nature of the individual. Analysis of salinity tolerance in rice requires a combination of phenotypic and genotypic assessment. Ninety nine (99) BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> lines of OMCS2000\*4/Pokkali hybrid population were screened for salinity tolerance at three different concentrations (EC = 0, 6 and 12 dS/m) after two and four weeks at seedling stage. Of these, 21 lines were tolerant to both 6 and 12 dS/m. These lines were further tested for *Saltol* gene expression on the chromosome 1 with two tightly linked markers, RM3412b and RM8094. The results showed that 100% of identified lines (21 lines) carrying *Saltol* allele. With the phenotypic and genotypic analysis, the study identified 8 of promising salinity tolerant lines that were BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-65, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-66, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-70, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-71, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-76, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-77, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-81, and BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-83.

**Keywords:** Salinity, tolerance, backcross population, screen, seedling stage

Ngày nhận bài: 12/7/2018  
 Ngày phản biện: 19/7/2018

Người phản biện: TS. Dương Hoàng Sơn  
 Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

## PHÂN BIỆT MỘT SỐ CẶP GIỐNG LÚA GIỐNG NHAU BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ĐỂ HỖ TRỢ KHẢO NGHIỆM DUS

Trần Long<sup>2</sup>, Lưu Minh Cúc<sup>1</sup>, Nguyễn Quang Sáng<sup>2</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Đặc trưng ADN có thể trở thành chỉ tiêu quan trọng hỗ trợ trong khảo nghiệm DUS vì nó giúp đánh giá chính xác cho việc giám định và phân biệt một giống cây trồng mới. Nghiên cứu tiến hành phân tích một số cặp giống lúa có đặc điểm hình thái giống nhau bằng phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử ADN. Phân tích bằng phần mềm POWER MARKER cho thấy với tần suất 4,9 - 7,2 alen, thì độ tương đồng chung của 62 tính trạng hình thái và các chỉ thị SSR là từ 0,36 - 0,64, trong khi hệ số đa dạng di truyền sẽ từ 0,33 - 0,59. Sử dụng bộ 30 chỉ thị SSR để phân tích 19 giống lúa giống nhau theo cặp trong khảo nghiệm DUS, kết quả cho thấy, cặp giống Nếp Triều Tiên cũ - Nếp Triều Tiên mới và cặp QX22 - X33 có hệ số tương đồng di truyền là 1.00. Các cặp có hệ số tương đồng di truyền xa nhau nhất là DB15 - NH3 (0,63), Thịnh dụ 8 - Thịnh dụ 4 (0,87). Còn lại gồm có cặp giống Nếp NĐ 1 - NĐ 2; cặp giống Nhiệt đới 1 - CL10; ba giống HT1, HT6, HT9, cặp giống TBR36 - TQ08, cặp giống Nếp Lang Liêu - Nếp GRQ10 có sự khác biệt không rõ ràng, chưa đủ để công nhận đó là các giống khác nhau theo cặp.

**Từ khóa:** Chỉ thị phân tử, giống lúa, khảo nghiệm DUS

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo tiêu chuẩn của Hiệp hội Quốc tế về Bảo hộ giống cây trồng mới (UPOV), các cây trồng mới được chọn tạo phải qua được khâu kiểm nghiệm theo tiêu chí DUS mới được đưa vào sản xuất. Khảo nghiệm DUS bao gồm khảo nghiệm tính Khác biệt - Distinctness, tính Đồng nhất - Uniformity, và tính Ổn định - Stability. Trong 15 năm gần đây, mỗi năm Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống, Sản phẩm Cây trồng Quốc gia (TTKKN) tiến hành khảo nghiệm khoảng 100 giống lúa. Khi khảo nghiệm, TTKKN thường gặp phải 5 - 10 trường hợp mỗi năm các giống đưa ra khảo nghiệm có các tính trạng hình thái, đôi khi cả tính trạng hóa sinh giống nhau. Trong một số trường hợp, giống của các tác giả khác nhau nghiên cứu ra hoặc được nhập nội vào Việt Nam, tên gọi khác nhau, nhưng về mặt hình thái lại hoàn toàn giống nhau gây ra những tranh cãi khó giải quyết. Câu hỏi đặt ra là thực chất chúng thuộc cùng một giống hay chúng thuộc các giống khác nhau? Các tiêu chí khảo nghiệm DUS truyền thống dựa trên cơ sở 62 - 65 tính trạng hình thái và hóa sinh đôi khi chưa đủ để phân biệt các giống, làm dấy lên sự tranh cãi về bản quyền giống. Để giải quyết vấn đề đó, nghiên cứu này đã tiến hành phân tích một số cặp giống lúa giống nhau bằng phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử ADN. Đặc trưng ADN có thể trở thành chỉ tiêu quan trọng hỗ trợ trong khảo nghiệm DUS vì nó giúp đánh giá chính xác cho việc giám định và phân biệt một giống cây trồng mới. Kết quả “vân tay ADN - DNA fingerprinting” nhận được thông qua phân tích PCR cùng với thông tin về phả hệ, kết hợp đánh giá các tính trạng đa gen quan trọng có ý nghĩa nông học được thừa nhận như là cơ sở khoa học và thực tiễn khách quan nhất để mô tả và đăng ký giống. Các nhà khoa học Trung Quốc đã đi tiên

phong trong lĩnh vực sử dụng chỉ thị phân tử SSR cho đánh giá và khảo nghiệm lúa lai. Họ đã chọn được 2 bộ chỉ thị chuẩn (1 bộ gồm 10 chỉ thị, bộ kia gồm 12 chỉ thị) để sử dụng (Xiao *et al.*, 2006). Tiếp theo, các nhà khoa học ở Viện Nghiên cứu Lúa Quốc gia (Hàng Châu) phối hợp với Trường Đại học Nông nghiệp Hoa Nam và Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI) đã sử dụng bộ chỉ thị chuẩn gồm 24 chỉ thị SSR (2 chỉ thị SSR trên mỗi NST lúa) để đánh giá 63 dòng bố mẹ lúa lai cùng các con lai (Ying *et al.*, 2007). Theo các tác giả này, chỉ cần sử dụng bộ gồm 12 chỉ thị chính để đánh giá. Mark và cộng tác viên đã phân biệt các giống lúa mang tên Basmati trong thị trường Anh bằng 9 chỉ thị (Mark *et al.*, 2004).

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- 19 giống lúa giống nhau theo cặp trong khảo nghiệm DUS năm 2010 - 2012: Cặp số 1 (1.Nếp triều tiên cũ, 2.Nếp triều tiên mới); Cặp số 2 (3.Nếp NĐ1, 4.Nếp NĐ2); Cặp số 3 (5.Nhiệt đới 1, 6.CL10); Bộ ba (7.HT1, 8.HT6, 9.HT9); Cặp số 4 (10.TBR36; 11.TQ08); Cặp số 5 (12.Thịnh dụ 8, 13.Thịnh dụ 4); Cặp số 6 (14.Nếp Lang Liêu, 15.Nếp GRQ10); Cặp số 7 (16.DB15, 17.NH3); Cặp số 8 (18.QX2, 19.X33).

- Các hóa chất sinh học phân tử và vật tư thí nghiệm.

- Bộ 30 chỉ thị SSR: RM11, RM21, RM163, RM481, RM3412, RM1, RM5, RM6, RM17, RM19, RM25, RM206, RM215, RM223, RM333, RM341, RM3252, RM3843, RM6318, RM3486, RM5758, RM10825, RM17954, RM26063, R4M13, MADS3, MADS8, SO1160, S11033, EST20.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thí nghiệm được tiến hành theo quy phạm

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp; <sup>2</sup> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên