

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

Trần Long², Lưu Minh Cúc¹, Nguyễn Quang Sáng², Phạm Xuân Hội¹

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

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp; ² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định của giống lúa 10TCN 554 2002.

- Phương pháp đánh giá 62 tính trạng: Các quan sát đánh giá được tiến hành trên 20 cây hoặc 20 bộ phận của cây trong mỗi lần nhắc. Số liệu được xử lý trên phần mềm khảo nghiệm DUS-T (Trung tâm Khảo nghiệm Giống). Mỗi một tính trạng có phương pháp cụ thể và được theo dõi ở những giai đoạn nhất định mà tính trạng đó biểu hiện rõ nhất.

- DNA tổng số được tách chiết tinh sạch bằng phương pháp CTAB cải tiến (Zheng *et al.*, 1995). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích phản ứng 15 µl, trong đó gồm 2 µl DNA khuôn mẫu (10 - 20 ng/µl); 1,5 µl PCR buffer; 1 µl dNTPs (2 mM); 0,5 µl mỗi xuôi và ngược; 8,5 µl Q-water và 1 µl Taq polymerase (Fermentas, California, USA). Hỗn hợp phản ứng PCR được chạy trên máy Eppendorf Thermocycler (Mastercycler Pro S, Germany) loại 96 giếng. Chương trình PCR: 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ với các bước: biến tính 94°C trong 1 phút, gắn nối ở 55°C C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút, và bước hoàn thiện ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được trộn với hóa chất nhuộm bromophenol blue và phân tích trên gel 8% polyacrylamide ở 100 volts (Dual Trip-Wide Mini-Vertical System, C.B.S. Scientific, CA, USA), nhuộm SYBR-Safe staining (Invitrogen) để phát hiện băng DNA trên gel.

- Số liệu kiểu gen được phân tích trên phần mềm NTSYS 2.1. Sơ đồ hình cây được thiết lập theo phương pháp UPGMA. Chương trình Excel và Power Marker 3.25 tính toán các chỉ số tần suất alen, số alen, độ tương đồng di truyền, hệ số đa dạng di truyền.

- Độ tương đồng di truyền theo công thức của Nei và Li (1972):

$$S_{ij} = S_{ji} = 2a / (2a + b + c)$$

Trong đó, S_{ij} : độ tương đồng giữa hai mẫu i và j ; a_{ij} là số băng có mặt ở cả hai mẫu i và j ; b_{ij} là số băng có mặt ở mẫu i nhưng không có ở mẫu j ; c_{ij} là số băng có mặt ở mẫu j nhưng không có ở mẫu i .

- Hệ số đa dạng di truyền hay giá trị thông tin đa hình giữa các marker (PIC, Polymorphism Information Content) được tính toán theo Saal and Wricke (1999):

$$PIC = 1 - \sum p_{ij}^2$$

Trong đó, P_{ij} là tần suất của alen thứ i đối với marker thứ j .

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành trong năm 2016 - 2017 tại Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống và Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết hợp cùng với Trung tâm Khảo kiểm nghiệm Giống, tiến hành đánh giá DUS của các giống trong các năm 2010, 2011, 2012. Mục đích của công việc là tìm kiếm sự liên quan giữa các tính trạng hình thái và các chỉ tiêu ADN. Sau khi khảo nghiệm, sẽ tiến hành so sánh mức độ tương đồng giữa khảo nghiệm hình thái và đánh giá chỉ tiêu ADN bằng các chỉ thị của bộ chỉ thị tham chiếu SSR sử dụng. Trên cơ sở đó, kết luận về sự liên quan của hai phương pháp với nhau. Số liệu phân tích 62 tính trạng hình thái DUS và phân tích ADN với các chỉ thị được chuyển đổi thành định dạng file dữ liệu đầu vào của chương trình Excel. Số liệu đầu ra được thể hiện trong bảng 1, bảng 2.

Bảng 1. Phân tích 30 chỉ thị của bộ chỉ thị SSR trong chương trình PowerMarker

Chỉ thị	Tần suất alen	Số alen	Độ tương đồng di truyền	Hệ số đa dạng di truyền
RM11	0,5405	5	0,6355	0,5906
RM21	0,2162	6	0,8225	0,7974
RM163	0,2703	5	0,7772	0,7409
RM481	0,3243	7	0,7889	0,7596
RM3412	0,3243	7	0,8167	0,7952
RM1	0,5676	5	0,6048	0,5550
RM5	0,6216	4	0,5581	0,5135
RM6	0,3784	4	0,7071	0,6539
RM17	0,5135	4	0,6574	0,6117
RM19	0,6757	6	0,5113	0,4814
RM206	0,3514	7	0,7421	0,7023
RM333	0,4865	6	0,6939	0,6580
RM3252	0,3243	5	0,7626	0,7242
RM3843	0,3784	5	0,6998	0,6461
RM7097	0,6486	3	0,5142	0,4578
R4M13	0,5405	5	0,6384	0,5951
SO1160	0,4865	3	0,5698	0,4757
S11033	0,6757	5	0,5113	0,4814
RM223	0,4595	4	0,6311	0,5603
RM341	0,5946	5	0,5873	0,5442
RM3468	0,7568	2	0,3682	0,3004
RM10825	0,3784	4	0,7144	0,6627
RM17954	0,5405	7	0,6472	0,6103
RM26063	0,3784	4	0,7275	0,6795
MADS3	0,4865	4	0,6662	0,6151
MADS8	0,8649	2	0,2337	0,2064
EST20	0,4595	3	0,6297	0,5536
RM215	0,5135	4	0,6443	0,5915
RM25	0,7838	5	0,3696	0,3498
RM5758	0,6757	4	0,5026	0,4644
Trung bình	0,4882	5,6563	0,6374	0,5931

Đối với 62 tính trạng hình thái, số liệu khảo nghiệm DUS được ký hiệu hóa theo nguyên tắc: sự khác biệt đối với từng tính trạng được coi như là các

alen khác nhau trong cùng một locut. Sau khi phân tích trong chương trình PowerMarker, các kết quả được liệt kê ở bảng 2.

Bảng 2. Phân tích 62 tính trạng hình thái trong chương trình PowerMarker

Tính trạng	Tần suất alen	Số alen	Độ tương đồng di truyền	Hệ số đa dạng di truyền	Tính trạng	Tần suất alen	Số alen	Độ tương đồng di truyền	Hệ số đa dạng di truyền
1	1,0000	1	0,0000	0,0000	34	0,6486	3	0,4733	0,3841
2	1,0000	1	0,0000	0,0000	35	0,7297	2	0,3944	0,3167
3	0,5135	5	0,6355	0,5782	36	0,8378	5	0,2907	0,2804
4	1,0000	1	0,0000	0,0000	37	0,2973	6	0,7801	0,7457
6	1,0000	1	0,0000	0,0000	38	0,7297	2	0,3944	0,3167
8	0,2973	8	0,8108	0,7868	39	0,7297	3	0,4076	0,3437
9	1,0000	1	0,0000	0,0000	40	0,7297	5	0,4412	0,4129
10	1,0000	1	0,0000	0,0000	41	1,0000	1	0,0000	0,0000
11	1,0000	1	0,0000	0,0000	42	0,5946	2	0,4821	0,3659
12	1,0000	1	0,0000	0,0000	43	0,7297	3	0,4076	0,3437
13	1,0000	1	0,0000	0,0000	44	0,8378	4	0,2849	0,2664
14	1,0000	1	0,0000	0,0000	45	0,3784	4	0,7071	0,6539
15	1,0000	1	0,0000	0,0000	46	0,9459	3	0,1037	0,1011
16	0,6216	5	0,5654	0,5268	48	1,0000	1	0,0000	0,0000
17	0,9730	2	0,0526	0,0512	49	0,4054	4	0,6998	0,6459
18	0,9730	2	0,0526	0,0512	50	0,5946	4	0,5683	0,5108
19	0,2162	10	0,8619	0,8468	52	0,6757	3	0,4777	0,4169
21	0,4054	5	0,7392	0,7012	53	0,4865	4	0,6457	0,5847
22	0,4865	5	0,6560	0,6016	54	0,5135	4	0,6209	0,5552
23	0,8919	2	0,1928	0,1742	55	0,6486	3	0,4733	0,3841
24	0,7568	4	0,3974	0,3629	56	0,3784	4	0,7188	0,6680
25	0,8919	3	0,1987	0,1894	57	0,8378	3	0,2849	0,2663
26	1,0000	1	0,0000	0,0000	58	0,7027	3	0,4617	0,4167
27	0,7568	3	0,3886	0,3441	59	0,2973	7	0,8093	0,7835
28	0,4324	5	0,6896	0,6357	60	0,3514	5	0,7480	0,7064
29	1,0000	1	0,0000	0,0000	61	0,5946	4	0,5741	0,5214
31	1,0000	1	0,0000	0,0000	62	0,7568	2	0,3682	0,3004
32	0,4595	4	0,6384	0,5682	<i>Trung bình</i>	0,7202	3,7018	0,3626	0,3311
33	0,8919	4	0,2001	0,1932					

Ở cả bảng 1 và 2 cho thấy với tần suất 4,9 - 7,2 alen, thì độ tương đồng chung của các tính trạng hình thái và các chỉ thị SSR là từ 0,36 - 0,64, trong khi hệ số đa dạng di truyền sẽ thay đổi từ 0,33 - 0,59. Dựa trên kết quả phân tích tìm sự liên quan trong phân nhóm các giống giữa các tính trạng hình thái trong khảo nghiệm DUS, và các chỉ thị ADN trong bộ chỉ thị tham chiếu cho thấy, không có sự liên quan mật thiết khi phân tích cả tổng thể chung. Như

vậy, biểu hiện kiểu hình của 62 tính trạng và kết quả phân tích ADN đối với các locut của bộ chỉ thị tham chiếu là độc lập nhau. Điều này cho thấy sự cần thiết khi phân tích chỉ tiêu ADN như là một trong các yếu tố hỗ trợ để đánh giá, phân biệt các giống lúa trong khảo nghiệm DUS, đặc biệt trong những trường hợp sự khác biệt về hình thái không rõ ràng như ở trong nghiên cứu này.

Tổng số 19 giống lúa giống nhau theo cặp trong khảo nghiệm DUS năm 2010 - 2012 đã nêu trong phần vật liệu được song song đánh giá các tính trạng hình thái theo quy định của khảo nghiệm DUS và đánh giá phân tích DNA. Hình 1 và 2 là hình ảnh đánh giá tính trạng “trạng thái lá đòng” (Hình 1)

của giống Nếp GRQ10 và Nếp Lang Liêu; Nếp Triều Tiên cũ và Nếp Triều Tiên mới; “hạt gạo lật và hạt thóc” (hình 2) của 3 giống HT1, HT6, HT9, 2 giống Nếp Lang Liêu, Nếp GQR10 giống nhau trong khảo nghiệm DUS. Qua đó có thể thấy, các cặp giống này giống hệt nhau ở các tính trạng hình thái.



Hình 1. Tính trạng “Trạng thái lá đòng” của các cặp giống: Nếp GRQ10 và Nếp Lang Liêu; Nếp Triều Tiên cũ và Nếp Triều Tiên mới



Hình 2. Tính trạng “hạt gạo lật” và “hạt thóc” của 3 giống HT1, HT6, HT9; 2 giống Nếp Lang Liêu, Nếp GQR10 giống nhau trong khảo nghiệm DUS

Các cặp giống lúa giống nhau theo 62 tính trạng DUS hình thái đã được liệt kê trong phần vật liệu được thu mẫu lá lúa và tách chiết DNA tổng số. Tiến hành phản ứng PCR để với điện di trên gel polyacrylamide và so sánh với kích thước alen chuẩn của bộ giống tham chiếu, thang chuẩn 25bp. Trên hình 3 là hình ảnh điện di trên gel polyacrylamide 8% của một số chỉ thị a.MADS8, b.RM223, c.RM19, d.RM21 cho thấy một số cặp giống cho các băng giống nhau như cặp giống Nếp Triều Tiên cũ và Nếp Triều Tiên mới tương ứng với giếng số thứ tự 1 và 2 trên hình.

Ba giống HT1, HT6, HT9 (giếng số thứ tự 7, 8, 9 trên hình) cho băng giống hệt nhau trên các chỉ thị phân tử được dùng để khảo sát. Chỉ có cặp giống

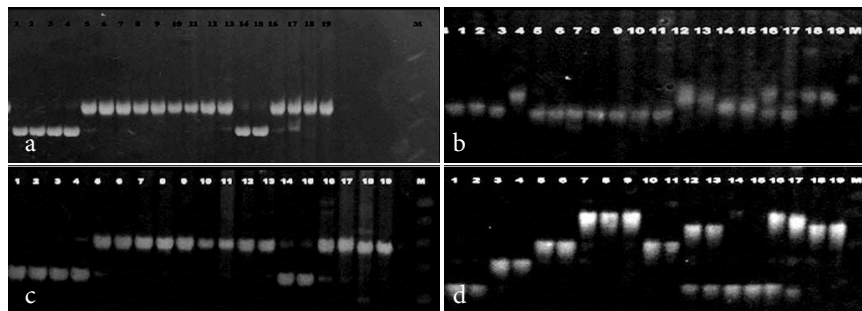
Nếp NĐ1, Nếp NĐ2 và cặp giống ĐB15, NH3 cho alen khác biệt với chỉ thị RM223. Trên hình 4 cho thấy, cặp giống ĐB15, NH3 cho alen khác biệt với chỉ thị RM6318.

Sau khi điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide, tiến hành ghi nhận số liệu, đọc kích thước, xử lý số liệu bằng phần mềm NTSYS, kết quả được thể hiện ở bảng 3 và hình 5.

Qua bảng 3 và hình 5 cho thấy các cặp giống giống nhau có quan hệ di truyền rất gần nhau. Cụ thể cặp giống TTC (Triều Tiên cũ), TTM (Triều Tiên mới) và cặp QX22, X33 có hệ số tương đồng di truyền là 1,00; các alen giống hệt nhau đối với cả 30 chỉ thị SSR được sử dụng. Hai cặp giống có quan hệ di truyền xa nhau nhất là DB15 và NH3 có hệ số

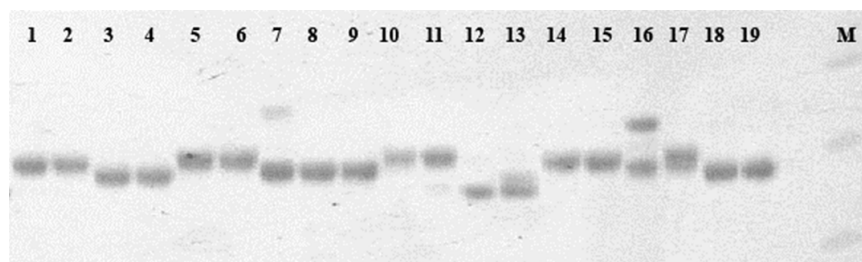
tương đồng di truyền là 0,63 tức là đã khá xa nhau về mặt phân tích ADN. Tuy nhiên, khi nhìn trên ảnh gel điện di đối với bộ chỉ thị, rất nhiều locut cho kết quả hai băng ADN, nhưng cặp giống này vẫn cho sự khác biệt hoàn toàn với 4/30 chỉ thị khảo sát, do

đó có thể thấy rằng DB15 và NH3 là hai giống có sự khác biệt rõ ràng. Tiếp tục phân tích cặp giống Thịnh dụ 8 với Thịnh dụ 4 cho thấy, cặp giống này có mức độ tương đồng 0,857 thể hiện bằng sự khác biệt hoàn toàn của 3/30 chỉ thị khảo sát.



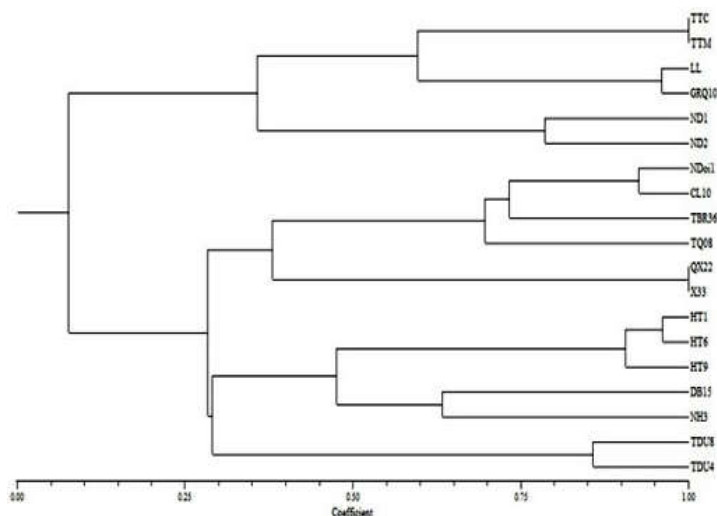
Hình 3. Hình ảnh điện di trên gel polyacrylamide của 19 giống với các chỉ thị a. MADS8, b. RM223, c. RM19, d. RM21.

Giống số 1: Nếp Triều Tiên cũ, 2: Nếp Triều Tiên mới, 3: Nếp ND1, 4: Nếp ND2, 5: Nhiệt đới 1, 6: CL10, 7: HT1, 8: HT6, 9: HT9, 10: TBR36; 11: TQ08, 12: Thịnh dụ 8, 13: Thịnh dụ 4, 14: Nếp Lang Liêu, 15: Nếp GRQ10, 16: DB15, 17: NH3, 18: QX2, 19: X33.



Hình 4. Hình ảnh điện di trên gel polyacrylamide của 19 giống với chỉ thị RM6318

1: Nếp Triều Tiên cũ, 2: Nếp Triều Tiên mới, 3: Nếp ND1, 4: Nếp ND2, 5: Nhiệt đới 1, 6: CL10, 7: HT1, 8: HT6, 9: HT9, 10: TBR36; 11: TQ08, 12: Thịnh dụ 8, 13: Thịnh dụ 4, 14: Nếp Lang Liêu, 15: Nếp GRQ10, 16: DB15, 17: NH3, 18: QX2, 19: X33.



Hình 5. Sơ đồ hình cây thể hiện quan hệ 19 giống lúa khi phân tích bằng 30 chỉ thị SSR, xử lý trong chương trình NTSYS

Bảng 3. Hệ số tương đồng di truyền của 19 giống lúa giống nhau theo cặp khi phân tích bằng bộ 30 chỉ thị SSR trên phân mềm NTSYS

Tên giống	TTC	TTM	ND1	ND2	NDoi1	CL10	HT1	HT6	HT9	TBR36	TQ08	TDU8	TDU4	LL	GRQ10	DB15	NH3	QX22	X33
TTC	1,000																		
TTM	1,000	1,000																	
ND1	0,441	0,441	1,000																
ND2	0,400	0,400	0,960	1,000															
NDoi1	0,085	0,085	0,111	0,111	1,000														
CL10	0,085	0,085	0,111	0,111	0,926	1,000													
HT1	0,041	0,041	0,087	0,111	0,300	0,300	1,000												
HT6	0,042	0,042	0,089	0,114	0,308	0,308	0,962	1,000											
HT9	0,042	0,042	0,089	0,114	0,275	0,275	0,929	0,960	1,000										
TBR36	0,020	0,020	0,042	0,042	0,733	0,733	0,300	0,308	0,342	1,000									
TQ08	0,020	0,020	0,042	0,042	0,677	0,677	0,300	0,308	0,308	0,933	1,000								
TDU8	0,085	0,085	0,042	0,087	0,238	0,268	0,300	0,308	0,342	0,333	0,300	1,000							
TDU4	0,109	0,109	0,064	0,111	0,268	0,300	0,333	0,342	0,378	0,333	0,238	0,857	1,000						
LL	0,613	0,613	0,324	0,289	0,041	0,041	0,085	0,087	0,111	0,063	0,020	0,085	0,133	1,000					
GRQ10	0,581	0,581	0,297	0,263	0,042	0,042	0,087	0,089	0,114	0,064	0,020	0,087	0,136	0,960	1,000				
DB15	0,089	0,089	0,171	0,231	0,250	0,250	0,515	0,531	0,531	0,220	0,250	0,250	0,250	0,043	0,043	1,000			
NH3	0,111	0,111	0,114	0,140	0,308	0,308	0,417	0,429	0,429	0,308	0,342	0,214	0,186	0,064	0,065	0,633	1,000		
QX22	0,067	0,067	0,068	0,093	0,361	0,400	0,225	0,231	0,263	0,400	0,324	0,289	0,289	0,043	0,044	0,343	0,263	1,000	
X33	0,064	0,064	0,065	0,089	0,378	0,417	0,214	0,220	0,250	0,417	0,342	0,308	0,308	0,042	0,043	0,324	0,250	1,000	1,000

Như vậy, các cặp giống ĐB15-NH13, TD8-TD4 này có sự khác biệt rõ ràng đã được chứng minh. Cả hai cặp giống này đã được Trung tâm Khảo nghiệm Giống đánh giá DUS trong vụ thứ hai và đã tìm thấy các sự khác biệt về thời gian sinh trưởng và chất lượng gạo rõ ràng đủ để công nhận giống. Ngoài ra, các cặp giống còn lại có sự tương đồng di truyền từ 92,6 - 100% đối với 30 chỉ thị SSR khảo sát; nhưng khi phân tích từng alen trên mỗi locut, một số locut cho 2 băng ADN. Số locut có sự khác biệt hoàn toàn là 0 - 2 trên tổng số 30 chỉ thị khảo sát. Như vậy, các cặp giống còn lại gồm có cặp giống Nếp NĐ1 - NĐ2; 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.

IV. KẾT LUẬN

4.1. Kết luận

Phân tích bằng phần mềm POWERMARKER 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 thay đổi từ 0,33 - 0,59.

Đã sử dụng bộ 30 chỉ thị SSR để phân tích 19 giống lúa giống nhau theo cặp trong khảo nghiệm DUS: Cặp giống TTC (Nếp Triều Tiên cũ), TTM (Nếp Triều Tiên mới) và cặp QX22, X33 có hệ số tương đồng di truyền là 1.00.

Các cặp hệ số tương đồng di truyền xa nhau nhất là DB15 và NH3 (0,63), Thịnh dụ 8 - Thịnh dụ 4 (0,87) có sự khác biệt rõ ràng trong chỉ tiêu DNA.

Các cặp giống còn lại gồm cặp giống Nếp NĐ1 - NĐ2; 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 (0,926 - 0,962) chưa đủ để công nhận đó là các giống khác nhau theo cặp.

4.2. Đề nghị

Cần tiếp tục sử dụng thêm các chỉ thị SSR để đánh giá các cặp có hệ số tương đồng di truyền là 1 phục vụ cho việc xác định các giống trùng lặp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2011. QCVN 01-65:2011/BNNPTNT. Quy chuẩn Quốc gia về khảo nghiệm giống cây trồng.
- Nei M. and Li T., 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
- PowerMarker 3.25 - Statistical Software for Genetic Marker data analysis. www.mybiosoftware.com/powermarker-3-25-statistical-software-genetics.
- Saal B., Wricke G., 1999. Development of simple sequence repeat makers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome*, 42(5): 964-972.
- Zheng K.L., Huang N., Bennett J., Khush G.S., 1995. *PCR - Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding*. International Rice Research Institute, Manila, the Philippines. 300p.
- Mark W., Simon K., Marie LJ., and Nigel B., 2004. Varietal and geographic origin of five commercial USA rice samples labelled and Basmati rice. Working party on food authenticity methodology report. 20 pages.
- Xiao X.Y., Wang Y.P., Zhang J.Y., Li S.G., Rong T.Z., 2006. SSR marker-based genetic diversity fingerprinting of hybrid rice in Sichuan, China. *Chinese J. Rice Sci.*, 20(1): 1-7.
- Ying J.Z., Shi Y.F., E Z.G., Zeng R.Z., Chen J., Zhu Z.W., Zhuang J.Y., 2007. Construction and testing of a primary microsatellite database of major rice varieties in China. *Rice Science*, 14(4): 247-255.

Distinction of the similar rice varieties using molecular markers to support for DUS test

Tran Long, Luu Minh Cuc, Nguyen Quang Sang, Pham Xuan Hoi

Abstract

DNA profile can become an important indicator of support in the DUS test as it provides an accurate assessment of the inspection and identification of a new plant variety. The research was carried out to analyze some rice varieties with similar morphological characteristics by using DNA markers, combining with 62 morphological traits. The analysis by the POWER MARKER software showed that the frequency of alleles was 4.9 - 7.2; the general similarity of 62 morphological traits and SSR markers ranged from 0.36 to 0.64, while the number of genetic similarity coefficient was from 0.33 to 0.59. By using a set of 30 SSR markers for analysing of 19 rice varieties similar in pairs tested by DUS, showed that: The pairs TTC (Nep Trieu Tien cu) - TTM (Nep Trieu Tien moi) and QX22 - X33 had a genetic similarity coefficient of 1.00. The most different pair in genetic correlation coefficient were DB15 and NH3 (0.63), Thinh du 8 - Thinh du 4 (0.87). The remaining pairs (ND1 - ND 2; Nhiet doi 1 - CL10; HT1 - HT6 - HT9, TBR36 - TQ08, Nep Lang Lieu - Nep GRQ10) were unclear differences.

Keywords: DUS test, molecular marker, rice variety

Ngày nhận bài: 18/9/2018

Ngày phản biện: 24/9/2018

Người phản biện: TS. Trần Danh Sứ

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

ẢNH HƯỞNG CỦA LIỀU LƯỢNG PHÂN LÂN VÀ CHE PHỦ ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ NĂNG SUẤT CỦA GIỐNG LẠC L14 Ở VỤ XUÂN TẠI GIA LÂM - HÀ NỘI

Vũ Ngọc Thắng¹, Nguyễn Thị Yến¹, Nông Thảo Diễm¹,
Nguyễn Ngọc Quát², Trần Anh Tuấn¹

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của 3 mức lân bón (60, 90, 120 kg P₂O₅/ha) đến sinh trưởng và năng suất của giống lạc L14 trong các điều kiện che phủ khác nhau (không che phủ, che phủ bằng trấu, che phủ bằng nilon). Kết quả thí nghiệm cho thấy giống lạc L14 được trồng trong điều kiện có che phủ có thời gian sinh trưởng ngắn hơn trong khi các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất lại cao hơn so với trồng trong điều kiện không được che phủ. Bên cạnh đó, trong cùng một điều kiện che phủ, khi tăng lượng lân bón thì các chỉ tiêu này cũng có xu hướng tăng lên. Các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất của giống lạc L14 đạt giá trị cao nhất được quan sát tại mức bón 120 kg P₂O₅/ha trong điều kiện che phủ nilon. Đánh giá hiệu quả kinh tế kết quả cho thấy lãi thuần đạt giá trị cao nhất trong điều kiện che phủ trấu với mức lân bón là 120 kg P₂O₅/ha.

Từ khóa: Vật liệu che phủ, lạc, phân lân, sinh trưởng, năng suất

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bên cạnh công tác chọn tạo giống thì áp dụng các biện pháp kỹ thuật tổng hợp cũng góp phần mang lại nhiều thành công trong sản xuất lạc. Với khả năng ưu việt của kỹ thuật che phủ nilon như làm tăng nhiệt độ đất, duy trì độ ẩm, cải thiện kết cấu đất, tạo môi trường thuận lợi cho vi sinh vật hoạt động, hạn chế sự thoát hơi nước và dinh dưỡng, tăng khả năng phát triển của hệ thống rễ giúp cho cây lạc sinh trưởng và phát triển tốt cho năng suất cao (Duan Shufen, 1999; Trần Đình Long và *ctv.*, 1999). Tuy nhiên, áp dụng kỹ thuật che phủ nilon dễ gây ô nhiễm và không thân thiện với môi trường. Do vậy, nhằm tăng năng suất cho lạc ngoài biện pháp che phủ nilon trong những năm gần đây đã có nhiều công trình công bố áp dụng các biện pháp kỹ thuật che phủ bằng các vật liệu khác như trấu, xác thực vật đã mang lại hiệu quả kinh tế cao tương đương với kỹ thuật che phủ nilon đặc biệt tránh được ô nhiễm môi trường (Ramakrishna *et al.*, 2006; Vũ Ngọc Thắng và Vũ Đình Chính, 2007; Vũ Văn Liết và *ctv.*, 2010). Mặc dù các kỹ thuật che phủ và lượng phân bón tối thích cho lạc đã được các nhà khoa học trong và ngoài nước đầu tư nghiên cứu tuy nhiên đánh giá hiệu quả của các mức lân bón khác nhau cho lạc trong các điều kiện che phủ khác nhau đến nay chưa được quan tâm đúng mức.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động của các mức lân bón cho giống lạc L14 trong các điều kiện che phủ khác nhau góp phần xây dựng quy trình thâm canh tăng năng suất cho lạc.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lạc L14 được Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ - Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm chọn lọc theo phương pháp chọn lọc quần thể từ dòng lạc QĐ5 từ tập đoàn lạc nhập nội của Trung Quốc. Giống được công nhận chính thức là giống tiến bộ kỹ thuật năm 2002.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp ô lớn ô nhỏ (Slip - plot) với 2 nhân tố. Nền là: 30 kg N + 60 kg K₂O + 1.000 kg phân vi sinh Sông Gianh cho 1 ha. Nhân tố chính là 3 mức lân bón (60; 90; 120 kg P₂O₅/ha). Nhân tố phụ là các điều kiện che phủ khác nhau (Không che phủ; Che phủ bằng trấu; Che phủ bằng nilon). Diện tích mỗi ô thí nghiệm là 10 m².

Các chỉ tiêu theo dõi theo quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng giống lạc QCVN 01-57: 2011/BNNPTNN của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2011).

Số liệu được xử lý theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) bằng phần mềm IRISTAT 5.0 và Excel.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện trên nền đất phù sa trong đê sông Hồng, tại khu đất thí nghiệm Khoa Nông học - Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Thời gian triển khai thí nghiệm từ tháng 2 đến tháng 6 năm 2018.

¹ Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam; ² Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm