

- nghệ và phát triển nông thôn 20 năm đổi mới, Bộ NN và PTNT, Trồng trọt và Bảo vệ thực vật, Tập 1, tr. 311- 324.
2. Chen S., Huang Z.H., Zeng L.X., Yang J.Y., Liu Q.G., and Zhu X.Y., 2008, *High resolution mapping and gen prediction of Xanthomonas oryzae pv. oryzae resistance gene Xa7*, Molecular Breeding, 22(3): 433-441.
 3. Huang N, Angeles ER, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadivel N, Bennett J, Khush GS (1997) *Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker assisted selection using RFLP and PCR*. Theor Appl Genet, 95:313-320.
 4. Porter BW, Chittoor JM, Yano M, Sasaki T & White FF (2003). *Development and mapping linked to the rice bacterial blight resistance gene Xa7*. Crop Science, 43: 1484-1492.
 5. Ronald PC, Albano B, Tabien R, Abenes L, Wu KS, McCouch S, Tanksley SD (1992) *Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, Xa21*. Mol Gen Genet 236:113±120.
- Ngày nhận bài: 7/3/2013
Người phản biện: TS. Lã Tuấn Nghĩa,
ngày 10/4/2013
Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN TẬP ĐOÀN LÚA KHÁNG BẠC LÁ BẢN ĐỊA CỦA VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR (Microsatellite)

Khuất Hữu Trung, Đặng Thị Thanh Hà,
Kiều Thị Dung, Nguyễn Thúy Diệp,
Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Thanh Thủy,
Đặng Trọng Lương, Lê Huy Hàm

SUMMARY

Analyzing of genetic diversity of bacterial blight resistance rice varieties in Vietnam by microsatellite markers

The results using 21 SSR markers for analyzing genetic diversity of Vietnam bacterial blight resistance rice varieties have obtained a total number of 93 difference alleles (with a mean of 7.25 alleles per loci). PIC value changed from 0,1 to 0.9 (with a mean of 0.68). The rate of heterozygosity of Vietnam bacterial blight resistance rice varieties are very different in 21 SSR loci, the heterozygosity changed from 0 to 20%. Genetic similarity coefficients of 38 varieties were ranging from 0 to 0.78. Genetic similarity was determined using Jaccard's similarity coefficients and final dendrogram construction using a UPGMA clustering methods showed that 38 varieties were divided into seven major groups, which shows great diversity among varieties: Group I consists of 05 varieties; group II consists of 03 varieties; group III consists of 02 varieties; group V consists of 19 varieties; group VI consists of 07 varieties; group IV and VII have only one variety. Based on genetic clustering result, bacterial blight resistance phenotype and the origins of rice varieties, five varieties have been selected as materials for further research on establishment of database for local bacterial blight resistance rice genetic resources in Vietnam.

Keywords: Bacterial blight, genetic diversity, resistance rice, SSR marker.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, được phát hiện lần đầu tiên ở Nhật Bản vào năm 1884, sau đó ở một số nước khác của châu Á. Từ năm 1960, dịch bệnh đã trở nên trầm trọng hơn trên thế giới, làm giảm năng suất lúa từ 20 - 30% có khi tới 50%, riêng ở Việt Nam, bệnh bạc lá làm giảm năng suất lúa từ 30 - 60%. Sau 1 thời gian dài lắng đọng, khoảng chục năm trở lại đây, cùng với sự xâm nhập ô ạt của các giống lúa thuần và lúa lai từ Trung Quốc, bệnh bạc lá đã bùng phát trở lại ở Việt Nam và gây nhiều thiệt hại cho sản xuất lúa.

Theo kết quả điều tra sơ bộ của các nhà khoa học trong nước đã cho thấy nhiều giống lúa địa phương của Việt Nam có khả năng kháng tốt với bệnh bạc lá. Tuy nhiên, những công trình nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học để phân tích, đánh giá đặc tính kháng bệnh bạc lá của các giống lúa bản địa chưa nhiều. Việc phân tích đa dạng di truyền tập đoàn 38 giống lúa địa phương của Việt Nam có khả năng kháng bệnh bạc lá bằng chỉ thị phân tử SSR, với mục đích đưa ra nguồn thông tin hữu ích cho những nghiên cứu khai thác, bảo tồn và sử dụng hiệu quả nguồn gen lúa bản địa Việt Nam là rất cần thiết trong giai đoạn hiện nay.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Tập đoàn 38 giống lúa có khả năng kháng bạc lá được thu thập ở nhiều địa phương khác nhau. Các giống lúa đang được lưu giữ và bảo tồn tại Trung tâm Tài nguyên Thực vật và Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long (bảng 3).

- 21 cặp môi SSR (do hãng IDT của Mỹ cung cấp) sử dụng để phân tích, được chọn lọc dựa vào các thông tin về trình tự và kích thước, số alen chuẩn trên mỗi locus, vị trí

phân bố của các locus trên 12 nhiễm sắc thể khác nhau đã được công bố (bảng 1).

2. Phương pháp nghiên cứu

- Tách chiết ADN tổng số: Mẫu lá của từng mẫu giống được thu thập riêng rẽ và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của Obara và Kako có cải tiến (Obara và Kako, 1998).

- Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt 95°C (7 phút), 35 - 37 chu kỳ [94°C (15 giây); 55°C - 60°C (30 giây); 70°C (30 giây - 60 giây)] và kết thúc ở 72°C (5 phút).

- Điện di trên gel agarose theo phương pháp của Khoa Genome Thực vật, Trường Đại học Công nghệ Texas, Mỹ (2002) có cải tiến

- Phân tích và xử lý số liệu: Kết quả được thống kê dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng ADN (các alen). Số liệu được xử lý, phân tích bằng chương trình Excel và phần mềm NTSYSpc 2.1 (Rohlf F. J., 2000).

Hệ số PIC (Polymorphic Information Content) được tính theo công thức sau:

$PIC = 1 - \sum P_i^2$ (trong đó P_i là tần số xuất hiện của alen thứ i).

Tỷ lệ dị hợp (H) của mỗi mẫu được tính theo công thức: $H\% = \frac{X}{M - Y}$

Trong đó: X là tổng số môi có xuất hiện 2 alen/1 locus SSR; M là tổng số môi sử dụng trong nghiên cứu; Y là tổng số môi SSR không xuất hiện băng ADN.

Tỷ lệ khuyết số liệu (M) được tính bằng công thức: $M\% = \frac{Z}{M}$

Trong đó: Z là tổng số môi không xuất hiện băng ADN; M là tổng số môi sử dụng trong nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân tích đa hình ADN bằng chỉ thị SSR

Kết quả thu được từ bộ tiêu bản điện di sản phẩm PCR của 21 cặp mỗi SSR với tập đoàn 38 giống lúa có khả năng kháng bạc lá (bảng 1) thu được 93 loại alen khác nhau, cả 21 môi đều cho đa hình. Số alen/locus dao động từ 2 (cặp mỗi RM3436) đến 13 (cặp mỗi RM3468). Trong đó, có 1 cặp mỗi thu được 2 alen; 1 cặp mỗi thu được 4 alen;

2 cặp mỗi thu được 5 alen; 6 cặp mỗi thu được 6 alen; 4 cặp mỗi thu được 7 alen; 4 cặp mỗi thu được 8 alen; 2 cặp mỗi thu được 9 alen và 1 cặp mỗi thu được 13 alen, trung bình là 7,25 alen/locus.

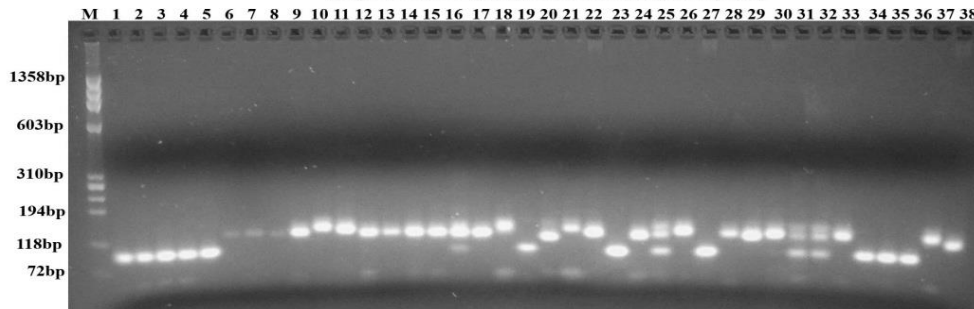
Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, giá trị PIC của 21 cặp mỗi dao động từ 0,10 (ở cặp mỗi RM3436) đến giá trị PIC cao nhất là 0,90 (ở cặp mỗi RM3468). Hệ số PIC trung bình của 21 cặp mỗi nghiên cứu là 0,68 (bảng 1).

Bảng 1. Hệ số PIC, số alen thể hiện trên từng môi

TT	Chỉ thị SSR	NST	Số alen	PIC	TT	Chỉ thị SSR	NST	Số alen	PIC
1	RM145	2	9	0,83	14	RM5811	1	9	0,77
2	RM152	8	6	0,60	15	RM6051	9	7	0,74
3	RM267	5	7	0,67	16	RM6648	1	7	0,55
4	RM1367	2	8	0,80	17	RM7003	12	6	0,72
5	RM1155	4	7	0,52	18	RM7372	9	4	0,47
6	RM1364	7	8	0,85	19	RM7419	1	5	0,79
7	RM3431	6	6	0,70	20	RM8214	12	6	0,77
8	RM3436	3	2	0,10	21	RM25271	10	6	0,66
9	RM3468	1	13	0,90		Tổng số		93	
10	RM3483	12	8	0,83		Trung bình		7,25	0,68
11	RM3515	2	8	0,79		Min		2	0,10
12	RM3534	4	6	0,54		Max		13	0,90
13	RM5599	11	5	0,71					

RM3467

(Tập đoàn 38 giống lúa kháng bệnh bạc lá)



Hình 1: Ảnh điện di sản phẩm PCR của 38 giống lúa kháng bạc lá nghiên cứu với cặp mỗi RM3467 (M: øX17-Hea III digest DNA ladder)

Hệ số PIC (Polymorphic Information Content) được xem là thước đo đa hình của các alen trên mỗi locus SSR (Smith *et al.*, 1997). Khi so sánh về chỉ số đa dạng PIC với một số công trình trên thế giới (bảng 2),

đã cho thấy chỉ số PIC thu được có giá trị trung bình ở mức khá cao (0,68). Điều này chứng tỏ các giống lúa kháng bạc lá bản địa của Việt Nam rất đa dạng về các thành phần alen.

Bảng 2. 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 TB/locus	PIC
1	Nagaraju J., 2002	24	19	70	3,8	-
2	Yu S. B., 2003	193	101	628	6,2	0,68
3	Chakravarthi B. K., 2006	15	30	462	-	-
4	Giarrocco L. E., 2007	69	26	219	8,4	0,69
5	Alvarez A., 2007	50	10	66	6,6	0,74
6	Herrera T.H., 2008	18	48	203	4,23	0,52
7	Wong S. C., 2009	8	12	31	2,6	0,52
8	Malik A. R., 2010	41	30	104	3,5	0,57
9	Girija R., 2011	50	39	-	2,26	0,25
10	Nghiên cứu này	38	21	93	7,25	0,68

2. Tỷ lệ dị hợp (H%) và tỷ lệ khuyết số liệu (M%) của 38 giống lúa kháng bạc lá nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Tỷ lệ dị hợp ở 38 giống lúa kháng bạc lá nghiên cứu rất khác biệt. Tỷ lệ dị hợp tử (H%) cao nhất ở giống lúa Khẩu tan nướng là 20%; tiếp theo là giống lúa Khẩu tan hang (15%);

giống lúa Nếp hạt mây có tỷ lệ dị hợp là 10%; giống lúa Nếp ông lão có tỷ lệ dị hợp 9,52%. Còn lại 34 giống có tỷ lệ dị hợp tử là 0%, có nghĩa là các giống này đều đồng hợp ở cả 21 môi nghiên cứu (tức là chỉ có duy nhất 01 alen/locus). Tỷ lệ dị hợp tử trung bình của cả tập đoàn 38 giống lúa kháng bạc lá khá thấp là 1,43% (bảng 3).

Bảng 3. Tỷ lệ dị hợp tử (H%) và tỷ lệ số liệu khuyết (M%) của các giống lúa kháng bạc lá nghiên cứu

TT	Tên dòng	M%	H%	TT	Tên dòng	M%	H%
1	Tép Thái Bình	0,00	0,00	21	Plau gung han	0,00	0,00
2	Tép Hải Dương	4,76	0,00	22	Khẩu đang đanh	4,76	0,00
3	Tép Hải Phòng	0,00	0,00	23	Tốc lùn	0,00	0,00
4	Ven thương Nghệ An	0,00	0,00	24	Nếp ông lão	0,00	9,52
5	Ven Nghệ An	0,00	0,00	25	Nếp hạt mây	4,76	10,00
6	Nếp xấp	0,00	0,00	26	Hom râu	4,76	0,00
7	Khẩu nua mảnh thương	9,52	0,00	27	Tám thơm áp bẹ	14,29	0,00
8	Khẩu nu khao	0,00	0,00	28	Nếp cái dóc	4,76	0,00
9	Khẩu ba trắng	0,00	0,00	29	Khẩu tan vang	0,00	0,00
10	Nếp ruộng	0,00	0,00	30	Khẩu tan pôm	0,00	0,00
11	Nếp mèo nướng	0,00	0,00	31	Khẩu tan hang	4,76	15,00
12	Tam tân màu vàng	0,00	0,00	32	Khẩu tan nướng	4,76	20,00
13	Nếp tan thơm	4,76	0,00	33	Tan nội	0,00	0,00
14	Nếp Lai Châu	0,00	0,00	34	Nếp đỏ	0,00	0,00
15	Nếp râu	0,00	0,00	35	Lúa chùm đóc	0,00	0,00
16	Nếp cầm đen	0,00	0,00	36	Lúa ma	0,00	0,00
17	Khẩu nua cái	0,00	0,00	37	Khẩu tan lạnh	0,00	0,00
18	Tẻ nướng mây	0,00	0,00	38	Khẩu điền lư	0,00	0,00
19	Nếp lốc nướng	14,29	0,00	TB			1,43
20	Plau vang	0,00	0,00				

Tỷ lệ số liệu khuyết (M%) cao nhất ở giống lúa Nếp lốc nương và Tám thom áp bẹ đều là 14,29%. Giống lúa Khẩu nua mảnh thương có tỷ lệ khuyết số liệu là 9,52%. Các giống lúa Tép Hải Dương, Nếp tan thom, Khẩu đang đánh, Nếp hạt mây, Hom râu, Nếp cái dóc, Khẩu tan hang và Khẩu tan nương có tỷ lệ khuyết số liệu là 4,76%. Còn lại 27 giống trong tập đoàn nghiên cứu không bị khuyết số liệu ở tất cả các môi, không có giống lúa nào trong tập đoàn có tỷ lệ khuyết số liệu lớn hơn 15%. Như vậy, cả 38 giống lúa nghiên cứu đều có ý nghĩa thống kê trong phân tích đa dạng di truyền.

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

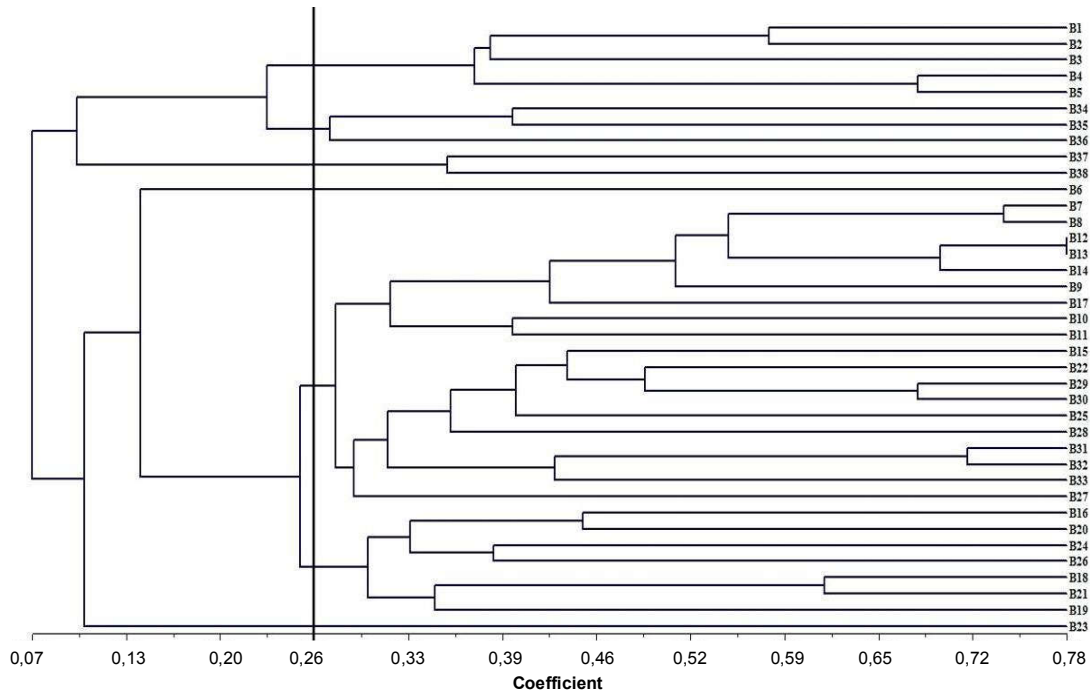
Kết quả điện di sản phẩm PCR của 21 cặp môi SSR với tập đoàn 38 giống lúa nghiên cứu được thông kê và phân tích bằng phần mềm NTSYSp 2.1, từ đó thiết

lập được bảng hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống lúa kháng bạc lá (hình 2).

Qua bảng hệ số tương đồng và sơ đồ về mối quan hệ di truyền giữa các giống nghiên cứu (hình 2) cho thấy: Hệ số tương đồng di truyền của 38 giống lúa kháng bạc lá nghiên cứu dao động trong khoảng từ 0 đến 0,78. Dựa vào sơ đồ phát sinh chủng loại, ở mức tương đồng di truyền 26%, 38 giống lúa kháng bạc lá nghiên cứu được chia thành bảy nhóm cách biệt di truyền.

* **Nhóm I:** Gồm có 5 giống: Tép Thái Bình, Tép Hải Dương, Tép Hải Phòng, Ven thương Nghệ An, Ven Nghệ An. Hệ số tương đồng di truyền giữa các giống dao động từ 0,35 đến 0,68;

* **Nhóm II:** Gồm có 3 giống: Nếp đỏ, Lúa chùm đóc, Lúa ma. Hệ số tương đồng di truyền trong nhóm này dao động từ 0,24 đến 0,40;



Hình 2: Sơ đồ phát sinh chủng loại của các giống lúa kháng bạc lá nghiên cứu

* **Nhóm III:** Gồm có 2 giống Khẩu tan lạnh và Khẩu điển lư có hệ số tương đồng di truyền là 0,35;

* **Nhóm IV:** Gồm có duy nhất 1 giống B6: Nếp xấp;

* **Nhóm V:** Gồm 19 giống: Khẩu nua mảnh thương, Khẩu nu khao, Khẩu ba tràng, Nếp ruộng, Nếp mèo nướng, Tam tân màu vàng, Nếp tan thơm, Nếp Lai Châu, Nếp râu, Khẩu nua cái, Khẩu đang đanh, Nếp hạt mây, Tám thơm áp bẹ, Nếp cái dóc, Khẩu tan vang, Khẩu tan pòm, Khẩu tan hang, Khẩu tan nướng, Tan nội. Trong nhóm này, hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,17 đến 0,78;

* **Nhóm VI:** Gồm có 7 giống: Nếp cẩm đen, Tẻ nướng mây, Nếp lóc nướng, Plau vang, Plau gung han, Nếp ông lão, Hom râu. Nhóm này có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,29 đến 0,62.

* **Nhóm VII:** Có duy nhất giống B23: Tóc lùn.

IV. KẾT LUẬN

Tập đoàn 38 giống lúa bản địa kháng bạc lá của Việt Nam rất đa dạng về thành phần các alen. Kết quả phân tích với 21 cặp môi SSR, thu được 93 loại alen khác nhau, (trung bình là 7,25 alen/locus). Hệ số PIC của 21 cặp môi dao động từ 0,10 đến 0,90 (trung bình là 0,68). Các giống lúa nghiên cứu có độ thuần di truyền khác nhau. Tỷ lệ dị hợp tử dao động trong khoảng từ 0% cho đến 20% (trung bình là 1,43).

Mức độ đa dạng di truyền giữa các giống lúa kháng bạc lá rất cao. Hệ số tương đồng di truyền giữa các giống lúa dao động từ 0 đến 0,78. Ở mức tương đồng di truyền 26%, 38 giống lúa kháng bạc lá trong tập

đoàn nghiên cứu được phân chia thành 7 nhóm cách biệt di truyền. Dựa vào khoảng cách di truyền 5 giống lúa điển hình có độ đa dạng cao, nguồn gốc khác nhau (Tép Thái Bình, Khẩu điển lư, Nếp mèo nướng, Tóc lùn, Hom râu) đã được chọn lọc để giải trình tự, tạo lập cơ sở dữ liệu genotype phục vụ công tác bảo tồn, chọn tạo giống lúa kháng bạc lá của Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Girija RM, Adilakshmi D (2011). *Genetic Analysis of Blast Resistance in Rice with Simple Sequence Repeats (SSR)*. Journal of Crop Improvement, 25(3): 232 - 238, 2011.
2. IPGRI (2004). *Diversity for well-being. Making the most of agricultural biodiversity*. IPGRI's new strategic direction. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
3. Jeong SK, Jae GG, Ki HP and Chang KS (2009), *Evaluation of Bacterial Blight Resistance using SNP and STS Marker-assisted selection in Aromatic rice germplasm*, The Plant pathology journal, 25(4): 408 - 416.
4. Malik AR, Muhammad SM, Zabta KS and Kazuko YS (2010). *Genetic analysis of Basmati and non-Basmati Pakistani rice (Oryza sativa L.) cultivars using microsatellite markers*. Pak. J. Bot. 42(4): 2551 - 2564.
5. Lu H, Redus MA, Coburn JR, Rutger JN, McCouch SR and Ai TH (2005). *Population structure and breeding patterns of 145 US rice cultivars base don SSR marker analysis*. Crop Science, January, No. 1: 66 - 76.

Ngày nhận bài: 10/3/2013

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,
ngày 22/4/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013