

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC GIỐNG LÚA ĐỊA PHƯƠNG TỈNH LÀO CAI BẰNG CHỈ THỊ ADN

Trần Danh Sửu, Nguyễn Thị Lan Hoa,
Hà Minh Loan, Ngô Kim Hoài,
Bùi Thị Thu Giang, Hoàng Thị Huệ,
Hà Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Tuyết

SUMMARY

Evaluation of genetic diversity of local rice varieties collected from Lao Cai province by using DNA markers

The genetic diversity and DNA fingerprinting of 124 local rice varieties collected from three districts of Lao Cai Provinces were elucidated by using 36 simple sequence repeat (SSR) markers distributed through 12 rice chromosomes. The result of SSR fingerprinting showed that total of 235 polymorphic bands were detected at 36 SSR loci. The numbers of polymorphic alleles varied from 3 to 14 depending on each locus, yielding average of 6 alleles per locus. The DNA profiles analysis indicated three out of 36 SSR markers revealed 3 unique alleles (rare alleles) in 3 surveyed rice genotypes. The information of these markers may come in handy to distinctly identify and characterize those 3 local varieties. Cluster analysis based on UPGMA resolved the local rice varieties into two major *O. sativa* groups, *indica* and *japonica*, agreed with classification based on chloroplast DNA analysis. This application of DNA polymorphism analysis revealed genomic relationship in Vietnamese rice germplasm, generating a database useful for cultivar identification, local germplasm conservation, and breeding programs.

Keywords: Chloroplast DNA, DNA markers, genetic diversity, local rice, SSR markers

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo một số kết quả nghiên cứu, tài nguyên di truyền lúa ở miền núi phía Bắc Việt Nam có sự đa dạng bậc nhất thế giới (Okuno et al. 1996). Việc nghiên cứu đa dạng di truyền, phân loại những nguồn gen là công tác đầu tiên cần tiến hành, không chỉ có ý nghĩa trong việc bảo tồn các giống lúa địa phương mà còn có ý nghĩa quan trọng trong công tác khai thác phát triển và chọn tạo các nguồn gen đặc sản.

Ngày nay, chỉ thị phân tử đã được sử dụng rộng rãi như một công cụ hữu hiệu trong nghiên cứu di truyền và cho phép đánh giá một số lượng lớn locut trải khắp bộ gen của lúa. Những thông tin về đa dạng di truyền ở mức độ ADN có thể phát

hiện sự khác biệt nhỏ nhất giữa các giống, vì thế giúp nhận dạng những giống quý, hiếm trong các tập đoàn giống lúa trồng địa phương một cách nhanh chóng và chính xác.

Trong số các chỉ thị ADN thì chỉ thị SSR được sử dụng rộng rãi và hiệu quả trong nghiên cứu cấu trúc di truyền lúa trồng *O. sativa*, nghiên cứu quá trình tiến hóa, làm rõ độ thuần của vật liệu lai tạo giống... do đây là các chỉ thị đồng trội cho đa hình cao và ổn định. Hiện nay, hơn 15.000 chỉ thị SSR đã được thiết lập (www.gramene.org, 2006), phủ kín trên bản đồ liên kết di truyền của lúa (Giarrocco và ctv., 2007). Nhiều nghiên cứu ứng dụng SSR và DNA fingerprinting trong nghiên cứu đa dạng di truyền để

nhận dạng giống ở lúa đã được công bố trong những năm gần đây (Kalyan, 2006; Jalaluddin, 2007; Muhammad SR, 2009; Navraj KS, 2009).

Trong nghiên cứu này, chỉ thị SSR được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền và lập tiêu bản ADN của 124 nguồn gen lúa thu thập tại 3 huyện của tỉnh Lào Cai, nằm trong vùng lòng hồ thủy điện Sơn La, giúp nhận dạng giống, phát hiện khả năng trùng lặp, phục vụ công tác bảo tồn nguồn gen lúa bản địa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- 124 giống lúa thu thập từ vùng lòng hồ thủy điện Sơn La và các vùng phụ cận, gồm 3 huyện Mường Khương, Bắc Hà, Si Ma Cai của tỉnh Lào Cai đang được lưu giữ tại Trung tâm Tài nguyên thực vật và 2 giống đối chứng Kasalath, Nipponbare.

- Chỉ thị ADN: Cặp mồi ORF 100 và 50 chỉ thị SSR định vị trên 12 nhiễm sắc thể của bộ gen lúa.

2. Phương pháp nghiên cứu

- ADN lá non của các giống lúa nghiên cứu được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp CTAB của Doyle, JJ. và ctv (1987).

- Phản ứng PCR với mồi SSR được thực hiện ở điều kiện chuẩn. Sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide 8%.

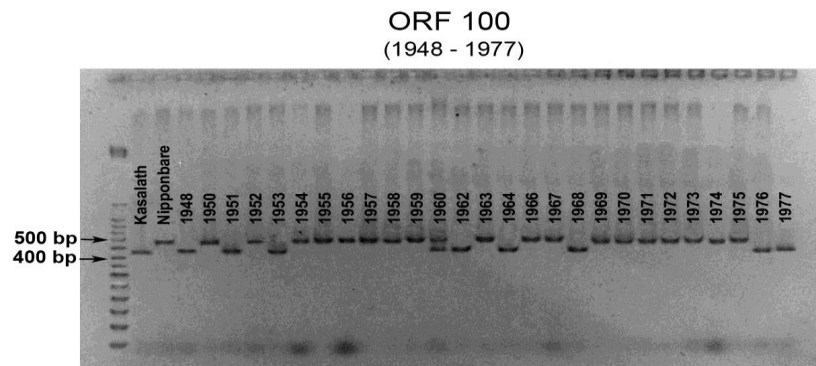
- Số liệu phân tích SSR được xử lý bằng phần mềm NTSYS pc2.1 và popgene3.1.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đa dạng các giống lúa nghiên cứu dựa trên chỉ thị ADN lục lạp

Trong nghiên cứu này, 124 giống lúa bản địa đã được phân loại dựa trên sự khác biệt ADN lục lạp của hai loài phụ *Indica* và *Japonica* bằng cặp mồi ORF100 với hai giống đối chứng Nipponbare (lúa *Japonica*) và Kasalath (lúa *Indica*).

Kết quả phân tích đa hình cho thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa 2 giống đối chứng Nipponbare (lúa *Japonica*) và Kasalath (lúa *Indica*). Giống Kasalath (lúa *Indica*) cho sản phẩm khuếch đại là băng ADN có kích thước nhỏ hơn so với giống Nipponbare (lúa *Japonica*). Trong số 124 giống lúa nghiên cứu, 34 giống có kiểu ADN lục lạp khuyết thiếu tại đoạn *Pst1* của ORF100 giống Kasalath (*Indica*), 88 giống còn lại đều có kiểu ADN lục lạp không khuyết thiếu giống Nipponbare (*Japonica*) (Hình 1). Như vậy, tỷ lệ lúa *Japonica* trong tập đoàn lúa nghiên cứu tại Lào Cai chiếm đa số, đạt 72,13%. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Trần Danh Sửu và cộng tác viên (2001) khi sử dụng kỹ thuật RAPD để nghiên cứu các giống lúa ở vùng Tây Bắc và Tây Nam nước ta cho thấy hầu hết các giống lúa ở vùng Tây Bắc thuộc loài phụ *Japonica* và nghiên cứu phân loại lúa dựa trên phân tích ADN nhân và ADN lục lạp của Fukuoka (2001) về đa dạng di truyền của 129 giống lúa bản địa của miền Bắc Việt Nam bằng chỉ thị phân tử RFLP và ADN lục lạp cũng cho thấy đa phần các giống lúa thuộc phân loài phụ *Japonica*.



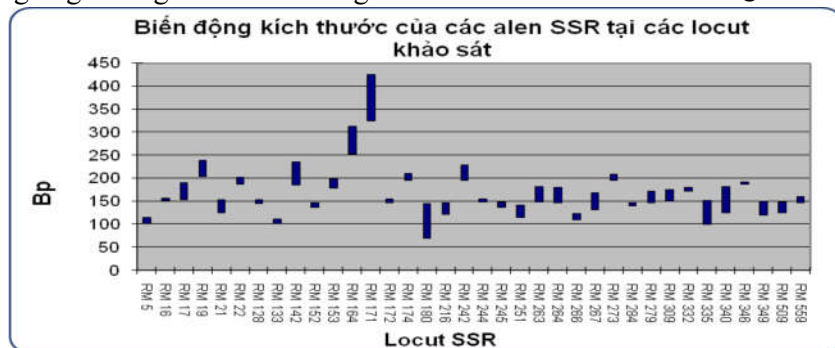
Hình 1: Sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với cặp mồi ORF100

Từ trái sang phải: 1: 50bp ladder; 2: Kasalath; 3: Nipponbare; 4-30: các mẫu giống lúa nghiên cứu

2. Đánh giá đa dạng di truyền các nguồn gen lúa có nguồn gốc thu thập thuộc khu vực thủy điện Sơn La và các tỉnh lân cận bằng chỉ thị SSR

Trong nghiên cứu này, 50 chỉ thị SSR của lúa định vị trên 12 nhiễm sắc thể được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền của 124 giống lúa. Trong số 50 chỉ thị SSR thì 45 chỉ thị cho sản phẩm PCR, tuy nhiên chỉ có 36 chỉ thị cho sản phẩm là các băng rõ nét ở các mẫu giống lúa nghiên cứu. Thống kê

trên 36 locut SSR, sản phẩm PCR là các băng có kích thước nằm trong khoảng từ 80 - 420 bp (Hình 2). Tuy nhiên, kích thước phổ biến của các alen thu được trong tập đoàn biến thiên trong khoảng 100 - 250bp. Các nghiên cứu về DNA fingerprinting của lúa Bangladesh, India và Argentina dựa trên chỉ thị SSR trước đó của Muhammad (2009), Navraj (2009), Rinehart (2007), Kalyan (2006) cũng cho kết quả tương tự về biến thiên kích thước băng ADN.



Hình 2: Biến động kích thước của các alen tại các locut SSR khảo sát

Tại mỗi locut SSR, kích thước của alen thu được trong tập đoàn nghiên cứu biến thiên trong phạm vi 2 bp (RM16, RM172, RM244, RM284, RM346...) cho đến hàng chục, hàng trăm bp (RM164, RM171, RM180, RM335, RM340...).

Tổng số alen được phát hiện tại 36 locut là 235. Số alen đa hình tại mỗi locut biến động từ 3 đến 14, đạt trung bình 6,53 alen/locut. Số lượng alen nhiều nhất là 14 (locut RM335), đạt 11 alen (locut RM164) và 10 (locut RM21). Locut cho ít đa hình nhất (3 alen) tại RM172, RM245, RM559.

Hệ số đa hình di truyền (PIC) thu được tại các locut SSR biến động từ 0,33 (locut RM21) đến 0,88 (RM335). Hệ số đa hình di truyền (PIC) trung bình thu được tại các locut SSR đạt 0,68, cho thấy mức độ đa dạng gen tồn tại trong 126 mẫu lúa nghiên cứu ở mức rất đa dạng. Chỉ số PIC thấp hơn cũng thu được trong nghiên cứu đa dạng lúa Bangladesh (Jalaluddin, 2007)) 0,44; nghiên cứu đối với lúa *Japonica* của Mỹ 0,46 (Lu, 2005)) và đạt cao hơn so với hệ số PIC của nghiên cứu đa dạng lúa tám (0,35), lúa nếp đồng bằng Bắc Bộ (0,43) (Trần Danh Sửu và cs., 2008, 2010) và

nghiên cứu đa dạng lúa temperate *Japonica* (0,37) (Garris và ctv, 2005).

Trong số 36 locut khảo sát, 18 locut không phát hiện dị hợp tử, 18 locut còn lại phát hiện ít nhất 1 mẫu giống dị hợp. Trong đó, tỷ lệ alen dị hợp tử quan sát được (H) lớn nhất ở 2 locut RM335 và RM251 (6,35%), tính trung bình đạt 1,3 % (Bảng 1). Tỷ lệ đạt thấp hơn so với tỷ lệ dị hợp tử của tập đoàn lúa nếp đồng bằng đạt 2,4% khi khảo sát bằng 45 chỉ thị SSR trong đó có 36 chỉ thị tương tự trong nghiên cứu này (Trần Danh Sửu và cs. 2010).

Bảng 1. Đa hình các locut SSR ở các giống lúa nghiên cứu

TT	Locut	NST	Số alen	Số alen đặc trưng	Giống có alen đặc trưng (SDK) ^a	PIC ^b	H ^c (%)	TT	Locut	NST	Số alen	Số alen đặc trưng	Giống có alen đặc trưng (SDK) ^a	PIC ^b	H ^c (%)
1	RM5	1	7			0,78	1,59	20	RM559	6	3			0,50	2,38
2	RM128	1	4			0,58	0	21	RM172	7	3			0,59	0
3	RM174	2	5			0,48	0	22	RM180	7	8			0,69	0
4	RM263	2	8			0,78	0	23	RM346	7	4			0,66	0
5	RM266	2	8			0,76	4,76	24	RM152	8	4			0,37	1,59
6	RM279	2	7			0,77	0	25	RM264	8	9			0,82	0
7	RM509	2	7			0,75	0	26	RM284	8	4			0,73	0
8	RM16	3	6	1	T7499	0,76	1,98	27	RM242	9	8			0,84	0
9	RM22	3	7			0,77	0	28	RM245	9	3			0,54	0
10	RM251	3	8			0,69	6,35	29	RM171	10	4			0,52	0
11	RM142	4	5			0,74	5,95	31	RM 216	10	9			0,75	0,4
12	RM273	4	6			0,68	0	32	RM244	10	6			0,77	1,19
13	RM335	4	14	1	1984	0,88	6,35	33	RM21	11	10			0,33	1,19
14	RM349	4	8	1	T7022	0,64	4,37	34	RM332	11	5			0,70	0
15	RM153	5	5			0,66	0	35	RM17	12	12			0,84	0,79
16	RM164	5	11			0,81	0,4	36	RM 19	12	4			0,54	0,4
17	RM267	5	7			0,79	0,79		RM309	12	5			0,64	5,16
18	RM133	6	4			0,65	0	Σ	Tổng số		235	3	3		
19	RM340	6	7			0,65	1,19		T. bình		6,53			0,68	1,3

Ghi chú: a: Số đăng ký

b: PIC: Hệ số đa dạng gen (PIC = Polymorphism Information Content)

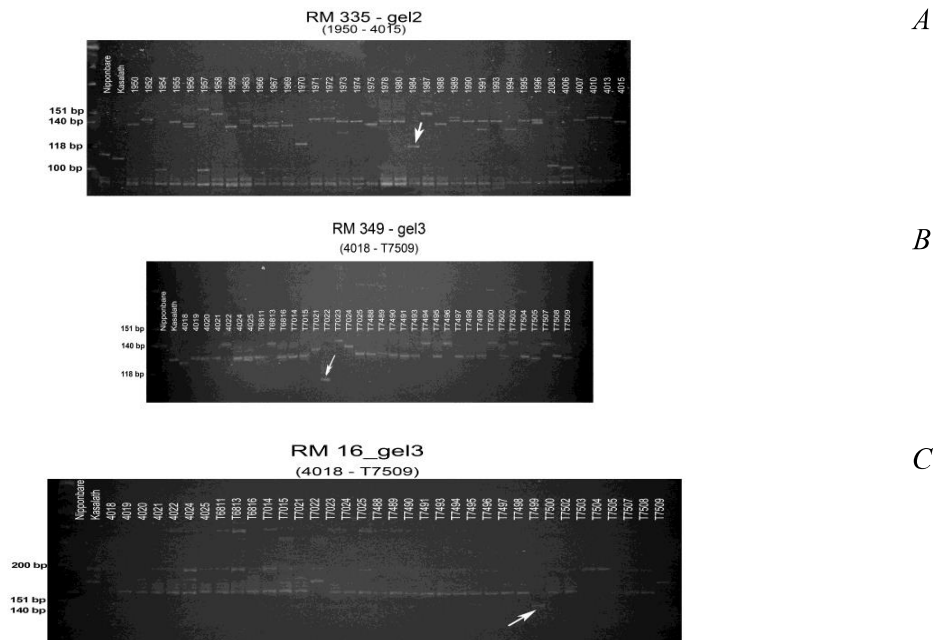
c: H: Tỷ lệ dị hợp tử quan sát được tại 1 locut

Trong số 36 chỉ thị SSR, chỉ có 3 chỉ thị cho nhận dạng đặc biệt (unique allele) với 3 alen duy nhất của 3 mẫu giống SĐK T7499, SĐK 1984, SĐK T7022 (Bảng 2, Hình 3) Các băng có kích thước nằm trong khoảng 100-250bp. Các nghiên cứu về

DNA fingerprinting của lúa Bangladesh, India và Argentina dựa trên chỉ thị SSR trước đó của Muhammad (2009), Navraj (2009), Rinehart (2007), Kalyan (2006) cũng cho kết quả tương tự về biến thiên kích thước băng ADN hiếm.

Bảng 2. Các chỉ thị SSR cho alen đặc trưng với các giống

TT	Số đăng ký	Tên giống	Kích thước	Tên chỉ thị
1	1984	Ne Nương	~ 120 bp	RM335
2	T7022	Séng Cù	~ 112 bp	RM349
3	T7499	Plề Mùa là	~ 145 bp	RM16
Tổng số		3		3



2 gồm 24 giống lúa trong đó đa phần là các giống lúa nương. Nhóm 2 gồm Kasalath và 47 mẫu giống, trong đó gồm tất cả 34 mẫu giống có kiểu ADN lục lạp khuyết thiếu của lúa *Indica*. Kết quả cho thấy có sự tương đồng lớn giữa cách phân loại dưới loài giữa ADN lục lạp và genome.

Hệ số tương đồng di truyền giữa các giống lúa nghiên cứu dao động từ 0,08 đến 0,95; thấp nhất (0,08) giữa cặp giống SDK T7533 và SDK T7021; tiếp theo hệ số tương đồng thấp cũng đạt được (0,11 và 0,13) là giữa mẫu giống SDK 4024 và giống SDK 4020 với mẫu giống SDK T7022 và cao nhất (0,95) là giữa hai giống SDK 4020 và SDK 4024. Các giống đối chứng đều có tương đồng rất thấp so với các giống trong nhóm lúa nghiên cứu: đạt từ 0,05 đến 0,45 đối với giống Nipponbare và 0,09 đến 0,3 đối với giống Kasalath. Giống Kasalath có nguồn gốc từ Ấn Độ và giống Nipponbare có nguồn gốc từ Nhật Bản. Các giống đối chứng này tuy đều nằm trong 2 nhóm lớn nhưng đứng tách biệt khỏi các giống địa phương được thu thập tại Lào Cai. Các cặp giống đa phần có tương đồng di truyền nằm trong khoảng từ 0,4-0,6.

Trong các cặp giống, có 2 cặp giống có hệ số tương đồng di truyền từ 0,9 trở lên: đó là SDK 4020 và SDK 4024 (0,91), cặp SDK 4020 và SDK 4021 (0,95). Hai cặp giống này có hệ số tương đồng lớn nhất và nên được xem xét để tránh loại trùng lặp dựa trên các chỉ tiêu theo dõi thêm về kiểu hình.

IV. KẾT LUẬN

Trong số 36 chỉ thị SSR được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền của 124 mẫu giống thu thập, 36 chỉ thị cho đa hình. Trong đó, nghiên cứu đã phát hiện 3 locus SSR cho các băng đặc trưng của 3 giống lúa bản địa thu thập tại Lào Cai, có thể được ứng dụng trong công tác tạo lập bộ chỉ thị nhận dạng giống lúa.

Các giống lúa tại Lào Cai rất đa dạng, trong số 124 giống, có 88 giống lúa thuộc loài phụ *Japonica* dựa trên đa hình ADN lục lạp, số còn lại thuộc loài phụ *Indica*.

Trong 124 giống nghiên cứu, có 2 cặp giống có hệ số tương đồng di truyền từ 0,9 trở lên: đó là SDK 4020 và SDK 4024 (0,91), cặp SDK 4020 và SDK 4021 (0,95). Hai cặp giống này có hệ số tương đồng lớn nhất và cần tiếp tục nghiên cứu để đánh giá trùng lặp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Danh Sửu, Lưu Ngọc Trình (2001), Sử dụng chỉ thị ADN để nghiên cứu quan hệ di truyền tiến hóa của lúa địa phương các vùng Tây Bắc và Tây Nam nước ta, *Thông tin công nghệ sinh học ứng dụng*, số 1/2001. Tr. 25-29, Viện Di truyền nông nghiệp.
2. Giarrocco LE, Marassib MA and Salerno GL (2007). Assessment of the Genetic Diversity in Argentine Rice Cultivars with SSR Markers, *Crop Sci* 47:853-858.
3. Jalaluddin M, Nakai H, and Yamamoto T (2007). Genetic diversity and DNA fingerprinting of some modern *Indica* and *Japonica* rice, *Breeding and Genetics, SABRAO*. 39(1), 43-52.
4. Kalyan Chakravarthi B and Rambabu Naravaneni (2006). SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). *AJB*. 5 (9): 684-688.
5. Muhammad SR, Rezwan MM, Samsul AM and Lutfur Radman (2009). DNA fingerprinting of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using microsatellite markers. *AJCS*. 3 (3): 122-128.

Người phản biện
GS. TSKH. Trần Duy Quý

KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG NGUỒN GEN CÂY KHOAI MỠ (*Dioscorea alata* L.) ĐANG BẢO QUẢN TẠI NGÂN HÀNG GEN CÂY TRỒNG QUỐC GIA NĂM 2009

Lê Văn Tú, Vũ Linh Chi, Nguyễn Phùng Hà,
Nguyễn Thị Ngọc Huệ, Lê Tuấn Nghĩa

SUMMARY

Results on diversity of Yam (*Dioscorea alata*) germplasms maintaining in National Genebank

Dioscorea alata collection, including 102 accessions collected from 07 ecologies of Vietnam was characterized and evaluated based on 48 different agro-morphological characteristics at National Plant Genebank.

The high level of ranges on geographic distribution, morphologies, usage was found among accessions of the *Dioscorea alata* collection. Five morphological traits such as leaf shape, wing colour, petiole colour, tuber shape and flesh colour were identified as key criteria for under species classification. Based on characterized and evaluated results of *Dioscorea alata* collection in 2009, 08 cultivars were identified to be promising ones. These cultivars will be introduced to farmers and breeding programs.

Keywords: Yam (*Dioscorea alata*), Results, diversity

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai mỡ (*Dioscorea alata*) thuộc chi *Dioscorea*, họ củ nâu *Dioscoreaceae* là một cây trồng truyền thống, ở Việt Nam nó có rất nhiều tên gọi khác nhau như: Khoai vạc, củ mỡ, củ cái, củ đầu... Nước ta có nguồn gen khoai mỡ rất đa dạng và phong phú, nhiều loài đã được người dân đưa vào khai thác và sử dụng từ rất sớm. Sản phẩm của nó được sử dụng vào rất nhiều mục đích khác nhau: Làm lương thực thực phẩm, làm thuốc, làm thức ăn chăn nuôi, và được sử dụng trong công nghiệp nhuộm vải... Thực tế sản xuất cho thấy tại một số vùng có điều kiện trồng khoai mỡ thâm canh thì trồng khoai mỡ cho hiệu quả kinh tế cao, chi phí lao động thấp.

Hiện nay việc mở rộng sản xuất trồng khoai mỡ gặp vấn đề về giống. Bà con

nông dân cần những giống đáp ứng được nhu cầu thị trường sẽ dễ dàng cho việc tiêu thụ sản phẩm. Vì vậy, ngoài mục tiêu đánh giá sự đa dạng nguồn gen tập đoàn cây khoai mỡ đang lưu giữ tại Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia, chúng tôi cũng lưu ý đến việc tuyển chọn những nguồn gen khoai mỡ triển vọng, có những đặc tính tốt như năng suất cao, chống chịu sâu bệnh, vỏ củ nhẵn, màu thịt củ hấp dẫn, kích thước và hình dạng củ phù hợp với yêu cầu của thị trường.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Gồm 102 mẫu giống khoai mỡ đang bảo quản tại Trung tâm Tài nguyên thực vật, An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội.