



NHẬN DIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHỐNG CHỊU MẶN CỦA CÁC GIỐNG LÚA MÙA DỰA TRÊN DẤU PHÂN TỬ SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEATS)

Trần Hữu Phúc^{1*}, Vũ Anh Pháp¹, Nguyễn Lam Minh², Trần Thị Xuân Mai² và Phạm Văn Mịch³

¹Viện Nghiên cứu Phát triển Đồng bằng sông Cửu Long, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³Trung tâm Giống Nông nghiệp Cà Mau

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Hữu Phúc (email: thphuc@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/11/2017

Ngày nhận bài sửa: 06/02/2018

Ngày duyệt đăng: 30/08/2018

Title:

Identification and assessment of salt tolerance in rice varieties based on Simple Sequence Repeats (SSR) markers

Từ khóa:

Lúa mùa chịu mặn, RM3412, RM493

Keywords:

RM3412, RM493, salt tolerant rice varieties

ABSTRACT

To identify molecular markers linked to salt-tolerant gene of rice, both phenotypic and genotypic evaluation of salt tolerance were performed at seedling stage. The phenotypic screening for salinity stress at EC=12 mS/cm was done using the standard protocol of the International Rice Research Institute. About 23.7% of rice varieties were identified as salt tolerant, 28.9% were moderately tolerant, 39.5% were susceptible and 7.9% were highly susceptible. Two SSR markers (RM493 and RM3412) have shown the ability (over 70%) for salt tolerant identification in all groups. Additionally, 36 rice varieties were grouped into 7 major clusters by UPGMA method based on these markers. Most of tolerant genotypes belonged to cluster I while moderately tolerant genotypes were in cluster II and III. From clusters IV to VII included susceptible and highly susceptible genotypes. These results indicated that RM493 and RM3412 were useful for marker assisted selection at seedling stage.

TÓM TẮT

Để nhận diện dấu phân tử liên kết chặt với gen chịu mặn các giống lúa mùa, cả kiểu hình và kiểu gen chịu mặn giai đoạn mạ, nhóm nghiên cứu đã thanh lọc tính chịu mặn ở mức EC = 12 mS/cm theo quy trình của Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế. Kết quả thí nghiệm có 23,7% giống được đánh giá là chịu mặn, 28,9% chịu mặn trung bình, 39,5% nhiễm mặn và 7,9% rất nhiễm mặn. Về kiểu gen, 2 dấu phân tử các chuỗi lặp lại đơn (simple sequence repeats-SSR) là RM493 và RM3412 được chọn để nhận diện kiểu gen chịu mặn. Hiệu quả đánh giá bằng RM493 và RM3412 đạt từ 70% trở lên ở tất cả các nhóm cấp độ chịu mặn. Dựa trên hai dấu SSR này, 36 giống lúa mùa được chia thành 7 nhóm chính theo phương pháp UPGMA. Nhóm I có các giống có khả năng chịu mặn khá. Các giống có kiểu gen chịu mặn trung bình hầu hết thuộc nhóm II và III. Các kiểu gen nhiễm và rất nhiễm mặn thuộc các nhóm từ IV đến VII. Kết quả RM493 và RM3412 là dấu phân tử hữu ích trong chọn lọc các giống lúa mùa chịu mặn.

Trích dẫn: Trần Hữu Phúc, Vũ Anh Pháp, Nguyễn Lam Minh, Trần Thị Xuân Mai và Phạm Văn Mịch, 2018. Nhận diện và đánh giá tính chống chịu mặn của các giống lúa mùa dựa trên dấu phân tử SSR (Simple Sequence Repeats). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(6B): 82-89.

1 MỞ ĐẦU

Theo kết quả sưu tập nguồn giống tại đồng ruộng năm 2016, trong các tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long, Tỉnh Cà Mau có nhiều giống lúa mùa bản địa chiếm 82% tổng số mẫu giống thu thập được, nổi tiếng như: Tài Nguyên, Ba Bông Mẫn, Trắng Bò Câu, Nàng Co Đỏ, Tép Hành, Trắng Tròn, Trắng Mây, ... Các giống này được canh tác chủ yếu trong vùng nhiễm mặn với mô hình lúa tôm, lúa cá và chống chịu tốt với điều kiện mặn. Trong những năm gần đây, số lượng và diện tích trồng các giống lúa trên bị suy giảm nhanh chóng làm nguy cơ thất thoát nguồn gen di truyền quý giá. Vì vậy, đánh giá, bảo tồn và phát triển các nguồn gen lúa bản địa này rất có ý nghĩa không chỉ trong hiện tại mà còn cho tương lai.

Hiện nay, các tiến bộ về công nghệ sinh học đã được ứng dụng rộng rãi trong công tác chọn tạo giống, trong đó dấu phân tử các chuỗi lặp lại đơn (simple sequence repeats- SSR) đã được sử dụng phổ biến do đặc tính phong phú, phân phối rải đều trên toàn bộ gen lúa, rất đa hình so với các dấu phân tử khác và hơn hết, SSR còn có tính chuyên biệt cao (Miah *et al.*, 2013). Do đó, SSR đã trở thành dấu phân tử di truyền quan trọng trong công tác chọn giống lúa. Mặc dù các dấu SSR liên kết với tính chống chịu mặn được tìm thấy trên tất cả 12 cặp nhiễm sắc thể của lúa, sự phân bố của chúng không đồng đều, tần số hiện diện cao nhất của các dấu SSR nằm trên nhiễm sắc thể số 1 và ít nhất là nhiễm sắc thể thứ 10 (Molla *et al.*, 2015). Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm nhận diện tính chịu mặn của các giống

lúa mùa, dựa trên kiểu hình, từ đó tìm ra dấu SSR liên kết chặt với kiểu gen chống chịu mặn *Saltol* trên nhiễm sắc thể số 1.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Thí nghiệm được thực hiện trên 38 giống lúa, trong đó 35 giống lúa mùa trồng ở tỉnh Cà Mau, 01 giống ở Sóc Trăng, giống IR28 được dùng làm đối chứng (chuẩn nhiễm mặn) và giống Pokkali được dùng làm đối chứng (chuẩn chịu mặn). Các giống lúa mùa được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Phát triển Đồng bằng sông Cửu Long, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Đánh giá khả năng chịu mặn giai đoạn mạ

Phương pháp đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa căn bản dựa theo quy trình chuẩn (Gregorio *et al.*, 1997) của Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế nhưng có một vài cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm như sau các giống lúa được ngâm trong đĩa petri ở 30°C trong 48 giờ cho đến khi mầm cao khoảng 1 cm. Các cây mầm được trồng vào các lỗ đục sẵn trên một tấm phao bằng xốp phía dưới đáy có bọc lưới nylon (mỗi lỗ đặt 3 hạt, mỗi giống trồng trong 3 lỗ). Sau đó, tấm xốp được đặt vào trong khay nhựa có chứa dung dịch dinh dưỡng Yoshida (Yoshida *et al.*, 1976). Sau 21 ngày, môi trường dinh dưỡng có chứa muối NaCl được thêm vào và hiệu chỉnh để độ dẫn điện (EC) đạt 12 mS/cm.

Bảng 1: Thang đánh giá mức độ chống chịu mặn (SES) ở giai đoạn tăng trưởng (Gregorio et al., 1997)

Cấp	Quan sát đánh giá sinh trưởng cây lúa	Mức chống chịu
1	Sinh trưởng và phát triển gần như bình thường	Chống chịu tốt
3	Sinh trưởng gần như bình thường, song đẽ nhánh bị hạn chế đôi chút, vài lá bị đốm trắng và cuộn lại	Chống chịu khá
5	Sinh trưởng và phát triển suy giảm, hầu hết lá bị đốm trắng và cuộn lại, chỉ rất ít lá có thể phát triển dài ra	Chống chịu trung bình
7	Sinh trưởng hoàn toàn bị trì trệ, hầu hết lá bị khô, một vài cây bị chết	Nhiễm
9	Hầu hết các cây bị chết hoặc khô	Rất nhiễm

Trong quá trình thí nghiệm các nghiệm thức luôn được duy trì ở pH = 5, theo dõi hằng ngày, điều chỉnh pH và nồng độ muối thích hợp và môi trường được thay mới sau mỗi 7 ngày. Khả năng sống sót và chịu mặn được ghi nhận theo thang đánh giá mức độ chống chịu mặn (standard evaluation score-SES). Thời điểm đánh giá tính chống chịu mặn là ngay khi giống chuẩn nhiễm mặn (IR28) chết hoàn toàn.

2.3 Nhận diện bằng dấu phân tử SSR liên kết với tính chống chịu mặn của các giống lúa

Hai dấu phân tử SSR là RM493 và RM3412 nằm ở các vị trí xác định trên nhiễm sắc thể đảm trách tính chống chịu mặn (gen *Saltol*) trên nhiễm sắc thể số 1 của lúa, đã được sử dụng để phân tích ở cấp độ phân tử. Trình tự các cặp mồi của các dấu phân tử này (Bảng 2) được khai thác từ nguồn dữ liệu: <http://www.gramene.org/markers/microsat/>.

Bảng 2: Trình tự các đoạn môi được sử dụng

Tên môi	Trình tự môi	Sản phẩm PCR	Tác giả
RM3412 For	5'-AAAGCAGGTTTTCTCCTCC-3'	211 bp	Mohammadi-Nejad <i>et al.</i> , 2008
RM3412 Rev	5'-CCCATGTGCAATGTGTCTTC-3'		
RM493 For	5'-TAGCTCCAACAGGATCGACC-3'	211 bp	Mohammadi-Nejad <i>et al.</i> , 2008
RM493 Rev	5'-GTACGTAAACGCGGAAGGTG-3'		

2.4 Ly trích DNA

Hạt lúa được ủ trên đĩa petri có lót giấy thấm đã được làm ẩm với nước, giữ ở 30-32°C trong 48 giờ cho đến khi hạt nảy mầm. Các cây mầm được trồng ra chậu đất, tưới nước hằng ngày đến khi thấy lá lúa có chiều dài khoảng 15-20 cm (khoảng 10 ngày) thì cắt lấy phần lá lúa và ly trích thu DNA theo quy trình CTAB (Rogers and Bendich, 1988).

2.5 Phản ứng PCR

Phản ứng của quá trình khuếch đại gen (polymerase chain reaction- PCR) được thực hiện với các thành phần như sau: 2,5 µL buffer 10X (750 mM Tris HCl (pH 8,8); 100mM (NH₄)₂SO₄; 1% Triton X-100; 5% DMSO); 1,5 mM MgCl₂; 200µM dNTP mỗi loại; 200 nM mỗi loại môi; 1,25 unit Taq DNA polymerase và 50-100 ng DNA. Thêm nước cất vô trùng cho đủ thể tích 25µL. Phản ứng khuếch đại được tiến hành ở 95°C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: biến tính ở 95°C trong 45 giây, bắt cặp môi vào khuôn ở 55°C trong

Bảng 3) cho thấy có 8 giống có kiểu hình chịu mặn khá, tương đương với giống đối chứng chống chịu mặn Pokkali (cấp 3) chiếm 22% trên số 36 giống được đánh giá; 11 giống chiếm 30% số giống

45 giây, kéo dài ở 72°C trong 50 giây, giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút và giai đoạn trừ được duy trì ở 4°C. Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được phân tích bằng phương pháp điện di trên gel agarose 3% trong dung dịch đệm TBE 1X và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000. Thang chuẩn HyperLadder TM 25 bp của Công ty Bioline đã được sử dụng để ước lượng kích thước các đoạn sản phẩm PCR.

2.6 Phân tích số liệu

Phân nhóm di truyền và vẽ giản đồ được thực hiện với phần mềm thống kê NTSYS-pc (numerical taxonomy system personal computer) version 2.11a theo phương pháp UPGMA (Sneath and Sokal, 1973).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đánh giá cấp độ chống chịu mặn của các giống lúa mùa

Kết quả (

có kiểu hình chịu mặn trung bình (cấp 5); 15 giống chiếm 42% số giống có kiểu hình nhiễm mặn (cấp 7) và 2 giống chiếm 6% số giống có kiểu hình rất nhiễm mặn tương đương với giống đối chứng nhiễm mặn IR28.

Bảng 3: Thang đánh giá mức độ chống chịu mặn (SES) ở giai đoạn tăng trưởng của 38 giống lúa mùa

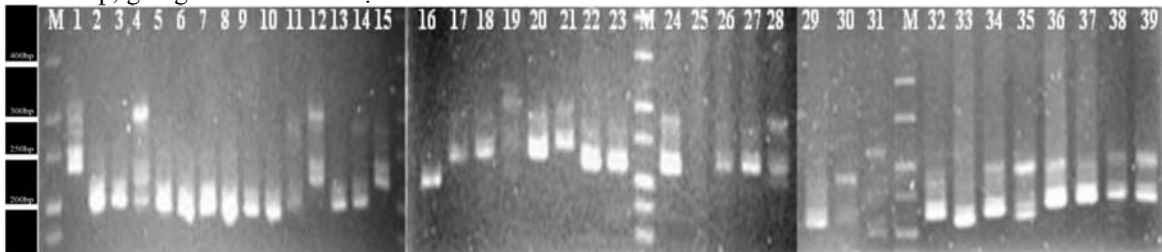
Tên giống	Viết tắt	Cấp	Tên giống	Viết tắt	Cấp
Pokkali (đ/c)	POK	3	Lùn Phệt	LPt	5
Lùn Cần Đỏ	LCD	3	Lùn Phong	LPg	7
Lùn Cần Trắng	LCT	3	Thơm Lùn Mùa	TLM	7
Bờ Liếp 2	BL2	3	Lùn Phèn	LP	7
Một Bụi Đỏ Lùn CM	MBLĐCM	3	Lùn Hèn	LH	7
Một Bụi Lùn	MBL	3	Lùn Vàng	LV	7
Ba Bông Mẫn	BBM	3	Lùn Sữa	LS	7
Lùn Cao Sản Đỏ	LCSĐ	3	Một Bụi Trắng	MBT	7
Lùn Cao Sản Trắng	LCST	3	Móng Chim Đen	MCD	7
Tài Nguyên CM	TNCL	5	Móng Chim Roi 3	MCR3	7
Nàng Co Đỏ 2	NCD2	5	Ba Bụi Lùn	BBL	7
Trà Long 2	TL2	5	Tài Nguyên ST	TNTT	7
Ba Bụi 2	BB2	5	Trắng Bò Câu	TBC	7
Một Bụi Cao 1	MBC1	5	Tét Rần	TR	7
Một Bụi Lùn 2	MBL2	5	Sói Lùn	SL	7
Năm Tài 1	NT1	5	Ngọc Nữ	NN	7
Một Bụi Đỏ Cao CM	MB5	5	Nàng Thơm	NT	9
Nàng Cum 1	NC1	5	Thơm Mẫn	TM	9
Lùn Phèn Hạt Nhỏ	LPHN	5	IR28 (đ/c)	IR28	9

3.2 Nhận diện dấu phân tử SSR liên kết với tính chống chịu mặn các giống lúa mùa

3.2.1 Đánh giá hiệu quả của dấu phân tử RM3412

Phân tích sản phẩm PCR khuếch đại nhờ cặp mồi RM3412 ghi nhận được 12 alen, trong đó 1 alen phụ có sản phẩm PCR là 225 bp được khuếch đại ở hầu hết các kiểu gen lúa trong nghiên cứu và 11 alen chính (giúp phân biệt giữa giống lúa chịu mặn và nhiễm mặn) với kích thước sản phẩm PCR từ 185-330 bp. Giống chuẩn chịu mặn Pokkali có 3 kiểu alen chính tương ứng với sản phẩm PCR là 205, 260 và 280 bp, giống chuẩn nhiễm mặn IR28 có 2 alen

chính tương ứng với sản phẩm PCR là 200 và 330 bp. Qua đánh giá 36 giống lúa mùa bằng dấu phân tử RM3412, kết quả những giống lúa nào có cấp độ chống chịu mặn từ 3 đến 5 có 5 kiểu alen tương ứng với 5 kiểu sản phẩm PCR với các kích thước từ 185, 205, 215, 260 và 280 bp, phần lớn các giống có cấp độ chịu mặn 3 có các alen tương ứng với sản phẩm PCR 205, 260 và 280 bp, trong khi các giống lúa có cấp độ chịu mặn 5 hiện diện một alen tương ứng với sản phẩm PCR 215 bp. Trung bình mỗi giống có từ 1 đến 2 sản phẩm PCR được khuếch đại, giống BL2 cho ra 3 kiểu sản phẩm PCR (215, 260 và 280 bp).



Hình 1: Sản phẩm PCR với dấu phân tử RM3412

M: Thang chuẩn HyperLadder 25 bp (Bioline UK), 1: BL2, 2: LCSĐ, 3: LCST, 4: NCD2, 5: MB5, 6: LP, 7: TLM, 8: MBT, 9: MCR3, 10: TNTT, 11: TBC, 12: SL, 13: NN, 14: TM, 15: MCD, 16: LS, 17: LH, 18: LV, 19: LPg, 20: LPt, 21: NCI, 22: LPHN, 23: NTL, 24: MBC1, 25: Nước, 26: MBL2, 27: BB2, 28: TL2, 29: TR, 30: NT, 31: IR28, 32: Pokkali, 33: BBL, 34: LCD, 35: LCT, 36: BBM, 37: TNCL, 38: MBL, 39: MBLDCM

Kết quả phân tích Hình 1, các giống lúa có cấp độ chống chịu mặn từ 7 đến 9, có 6 kiểu alen tương ứng với 6 kiểu sản phẩm PCR có các kích thước từ 200, 240, 250, 270, 300 và 330 bp được nhận thấy. Các giống Một Bụi Trắng (MBT), Tài Nguyên ST (TNTT), Tét Rần (TR), Trắng Bò Câu (TBC) và Nàng Thơm (NT) chỉ có 1 kiểu sản phẩm PCR với kích thước 200 bp, trong khi giống Thơm Lùn Mùa (TLM) có đến 4 kiểu sản phẩm PCR (200, 240, 270 và 330 bp), các giống còn lại có từ 2 đến 3 sản phẩm PCR trở lên. Những giống lúa rất nhiễm mặn (cấp 9) được ghi nhận không có hiện diện của sản phẩm PCR ở vị trí 240 bp.

những dấu phân tử hữu hiệu vì có liên kết chặt với tính chịu mặn của lúa. Báo cáo của Ali *et al.* (2014) cho rằng sử dụng RM3412 trong phản ứng PCR đã khuếch đại được 5 kiểu alen, các sản phẩm này có kích thước từ 80 bp đến 270 bp khi được phân tích trên gel polyacrylamide 8%. Nghiên cứu của Mohammadi-Nejad *et al.* (2008) cho thấy mồi RM3412 khuếch đại được sản phẩm PCR từ 225-260 bp khi được phân tích trên gel polyacrylamide 10%. Nghiên cứu này cho thấy dấu phân tử RM3412 đã phân biệt được kiểu gen giống lúa chịu mặn Pokkali và nhiễm mặn IR28 đồng thời cũng đã giúp nhận diện được tính chống chịu mặn của các giống lúa.

Dựa vào bản đồ liên kết của các dấu phân tử SSR xác định vị trí gen chống chịu mặn (*Salto1*) trên nhiễm sắc thể số 1, Thomson *et al.* (2010) cho rằng vì nằm bên trong vùng gen chống chịu mặn nên dấu phân tử RM3412 là một trong những dấu phân tử liên kết chặt nhất với gen chịu mặn. Tương tự như vậy, Huyen *et al.* (2013) báo cáo rằng dấu phân tử RM3412 cùng với AP3206 nằm trong vùng vị trí các tính trạng chống chịu mặn (quantitative trait loci-QTL), *Salto1* là những dấu phân tử tốt nhất, các dấu phân tử này được sử dụng trong giai đoạn hồi giao đầu tiên của thế hệ F1 sẽ giúp nhận diện được các cá thể dị hợp. Trong nghiên cứu của Islam *et al.* (2012) dấu phân tử RM3412 được đánh giá là một trong

3.2.2 Đánh giá dấu phân tử RM493

Kết quả phân tích sản phẩm PCR (Hình 2) đã tìm thấy 12 alen được khuếch đại từ cặp mồi RM493, hầu hết các sản phẩm PCR có kích thước từ 210-320 bp. Tương tự như cặp mồi RM3412, tùy theo kiểu gen lúa mà sản phẩm PCR được khuếch đại khác nhau, có 13 giống lúa mùa khuếch đại 3 sản phẩm PCR, 18 giống khuếch đại 2 sản phẩm PCR và 7 giống khuếch đại 1 sản phẩm PCR. So sánh các sản phẩm PCR từ cặp mồi của dấu phân tử RM493 và cấp độ chống chịu mặn của các giống lúa được phân cấp theo phương pháp SES của Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế cho thấy những giống lúa từ cấp 3-5 (lúa

chịu mặn) có 6 kiểu alen tương ứng với 6 kiểu sản phẩm PCR với các kích thước 230, 250, 260, 270, 280, 300 và 310 bp, phần lớn các giống có cấp độ chịu mặn 3 các alen tương ứng với sản phẩm PCR 260 và 300 bp, các giống lúa có cấp độ chịu mặn 5 chứa các alen tương ứng với sản phẩm PCR 230,

250 và 310 bp. Hầu hết những giống lúa có cấp độ chịu mặn từ 7-9 đều cho sản phẩm PCR với kích thước 240 và 290 bp. Vì vậy có thể xem 2 sản phẩm PCR này là hai sản phẩm chính giúp nhận diện sự khác biệt giữa giống lúa chịu mặn và giống lúa nhiễm mặn.



Hình 2: Kết quả phân tích PCR bằng dấu phân tử RM493

M: Thang chuẩn HyperLadder 25 bp (Bioline UK), 1: LP, 2: TR, 3: TNTT, 4: NT, 5: TNCL, 6: MCD, 7: TLM, 8: IR28, 9: Pokkali, 10: LV, 11: TBC, 12: LPg, 13: MBL, 14: BBL, 15: MBC1, 16: MCR3, 17: LCD, 18: LCT, 19: MBLDCM, 20: BBM, 21: TL2, 22: BB2, 23: NCI, 24: LHPN, 25: LH, 26: LS, 27: MBT, 28: SL, 29: NN, 30: TM, 31: BL2, 32: Nước, 33: LCSD, 34: LCST, 35: NCD2, 36: MBL2, 37: NT1, 38: LPt, 39: MB5

Theo Thomson *et al.* (2010) dấu phân tử RM493 nằm ở vùng tâm động của nhiễm sắc thể số 1, là một dấu phân tử hữu hiệu nằm phía bên sườn của vùng gen *Saltol* được sử dụng để phân tích gen chịu mặn. Linh *et al.* (2012) sử dụng phương pháp chọn giống hồi giao nhờ trợ giúp của dấu phân tử để chuyển gen *Saltol* vào quần thể lúa, nhóm nghiên cứu cho rằng sử dụng RM493 bảo đảm chọn lọc được gen chịu mặn mục tiêu hiệu quả. RM493 là dấu phân tử tốt nhất để nhận diện các kiểu gen chịu mặn vì dấu phân tử này có tính đa hình cao (Iqbal *et al.*, 2015). Gần đây nhóm nghiên cứu của Bimpong *et al.* (2016) đã sử dụng RM493 để chọn lọc các giống lúa nhận được alen chịu mặn đồng hợp. Ali *et al.* (2014), đã báo cáo rằng cặp mồi của dấu phân tử RM493 khuếch đại được sản phẩm PCR có kích thước từ 200-300bp khi phân tích trên gel polyacrylamide 8%, trong khi Mohammadi-Nejad *et al.* (2008) cho rằng sản phẩm PCR được khuếch đại trong khoảng từ 193-253bp với cặp mồi này (phân tích trên gel polyacrylamide 10%). Một nghiên cứu khác khi phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 2% cho thấy cặp mồi RM493 khuếch đại các sản phẩm từ 195-281bp (Khatib *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này sản phẩm PCR thu được từ 210-320bp khi được phân tích trên gel agarose 3% chứng tỏ sử dụng gel agarose vẫn hiệu quả, mất ít thời gian chuẩn bị gel như gel polyacrylamide và không độc hại. Ngoài ra kết quả này còn chứng minh được các kiểu gen lúa khác nhau sẽ cho ra các sản phẩm PCR cũng khác nhau, chứng tỏ sự đa hình cao của dấu phân tử này.

3.3 Sự tương quan giữa thang đánh giá mức độ chịu mặn (SES) và phân tích bằng dấu phân tử SSR

Phân tích sự tương quan giữa phương pháp dùng dấu phân tử SSR và phương pháp đánh giá cấp độ

chịu mặn của các giống lúa mùa ở giai đoạn mạ bằng phương pháp SES từ Bảng 4 có 38 giống, kết quả cho thấy trong 9 giống lúa có kiểu hình chịu mặn qua phương pháp đánh giá SES (bao gồm cả giống đối chứng Pokkali) thì có 8 giống đã được nhận diện bằng dấu phân tử RM3412 hiệu quả đạt 89% và 7 giống đối với dấu phân tử RM493 đạt hiệu quả 78%. Trong 11 giống lúa có kiểu hình chịu mặn trung bình qua phương pháp đánh giá SES, 8 giống được nhận diện bằng dấu phân tử RM3412 hiệu quả đạt 73% trong khi dấu phân tử RM493 nhận diện được 10 giống đạt hiệu quả 91%.

Tương tự như vậy, trong 15 giống lúa mùa có kiểu hình nhiễm mặn, dấu phân tử RM3412 đã nhận diện được 13 giống hiệu quả đạt 87% và là 14 giống đối với dấu phân tử RM493 đạt hiệu quả 93%. Đặc biệt 3 giống lúa có kiểu gen rất nhiễm mặn đều được nhận diện bởi cả hai dấu phân tử này, đạt hiệu quả 100%. Từ kết quả của nghiên cứu này cho thấy dấu phân tử RM3412 và RM493 có hiệu quả gần tương đương nhau trong nhận diện các kiểu gen liên quan đến tính chống chịu mặn, sử dụng phối hợp cả hai dấu phân tử này có thể giúp tăng tính hiệu quả và chính xác cho quá trình chọn lọc. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong công tác chọn và lai tạo giống giúp dự đoán sớm được tình trạng chống chịu mặn của các giống, dòng lúa nhằm tiết kiệm thời gian và giảm chi phí trong công tác chọn tạo giống.

Huyen *et al.* (2013) đã sử dụng phương pháp hồi giao nhờ trợ giúp của dấu phân tử để chuyển gen *Saltol* từ giống lúa FL478 vào giống lúa trồng ở Việt Nam Q5DB và sử dụng RM3412 và RM493 để nhận diện các kiểu gen chịu mặn. Mohammadi-Nejad *et al.* (2008), Thomson *et al.* (2010) và Babu *et al.* (2014) cũng đã sử dụng RM3412 và RM493 để phân

biệt khả năng chống chịu mặn của các giống lúa. Kordrostami *et al.* (2016), đã cho thấy rằng RM3412 và RM493 là những dấu phân tử liên kết chặt với tính chống chịu mặn ở 42 kiểu gen lúa dùng trong nghiên cứu của nhóm này. Islam *et al.* (2012) đã báo cáo rằng hai dấu phân tử RM3412 và RM493 có tính đa hình tương đương nhau, có chỉ số thông tin đa hình PIC (Polymorphic Information Content) là

0,81 với 10 alen và được sử dụng để nhận diện sự đa dạng của kiểu gen đơn bội trong các giống hay dòng lúa chịu mặn. Tương tự như vậy, theo Chowdhury *et al.* (2016) RM3412 và RM493 có cùng giá trị PIC là 0,96 với 3 alen cho mỗi dấu phân tử. Theo Mohammadi-Nejad *et al.* (2008) mỗi RM3412 có thể phân tích được 11 alen trong khi mỗi RM493 chỉ có 9 alen.

Bảng 4: Tương quan giữa thang đánh giá mức độ chịu mặn (SES) và dấu phân tử SSR.

TT	Viết tắt tên giống	Cấp (SES)	RM3421	RM493	TT	Viết tắt tên giống	Cấp (SES)	RM3421	RM493
1	POK	3	K	K	20	LPt	5	N	N
2	LCD	3	K	K	21	LPg	7	N	N
3	LCT	3	K	K	22	TLM	7	N	N
4	BL2	3	K	K	23	LP	7	N	N
5	MBLĐCM	3	K	K	24	LH	7	N	N
6	MBL	3	K	K	25	LV	7	N	N
7	BBM	3	K	K	26	LS	7	N	N
8	LCSĐ	3	N	N	27	MBT	7	K	N
9	LCST	3	K	N	28	MCĐ	7	N	N
10	TNCL	5	K	K	29	MCR3	7	N	N
11	NCD2	5	K	K	30	BBL	7	K	K
12	TL2	5	N	K	31	TNTT	7	N	N
13	BB2	5	K	K	32	TBC	7	N	N
14	MBC1	5	K	K	33	TR	7	N	N
15	MBL2	5	K	K	34	SL	7	N	N
16	NT1	5	K	K	35	NN	7	N	N
17	MB5	5	K	K	36	NT	9	N	N
18	NC1	5	N	K	37	TM	9	N	N
19	LPHN	5	K	K	38	IR28	9	N	N

Ghi chú: K = gen kháng; N = gen nhiễm

3.4 Phân nhóm các giống lúa mùa dựa trên dấu phân tử SSR

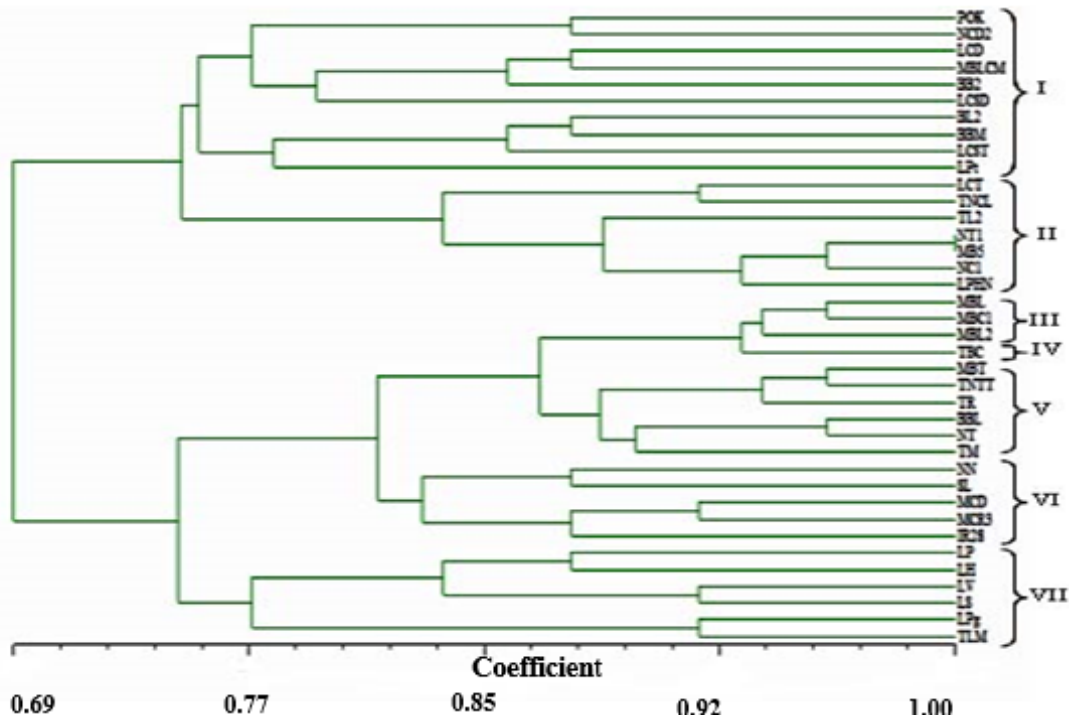
Dựa trên kết quả phân tích sản phẩm PCR từ hai dấu phân tử RM3412 và RM493, một giản đồ phân nhóm dựa trên phương pháp UPGMA đã được xây dựng, 36 giống lúa mùa được chia thành 7 nhóm chính (Hình 3).

Dựa vào giản đồ phân nhóm di truyền, nhóm 1 gồm giống lúa chuẩn chịu mặn Pokkali và 8 giống lúa khác, trong đó 6 giống lúa có kiểu hình chống chịu mặn khá (cấp 3) bao gồm Lùn Cắn Đỏ (LCD), Một Bụi Đỏ Lùn CM (MBLĐCM), Lùn Cao Sản Đỏ (LCSĐ), Bờ Liếp 2 (BL2), Ba Bông Mẫn (BBM) và Lùn Cao Sản Trắng (LCST); 3 giống có kiểu hình chịu mặn trung bình (cấp 5) cũng được xếp trong nhóm này, trong đó giống Nàng Co Đỏ 2 (NCD2) có kiểu gen giống 87% (hệ số tương quan khoảng 0,87 trên giản đồ phân nhóm di truyền) với giống Pokkali, giống Ba Bụi 2 (BB2) kiểu gen giống 85% với giống Lùn Cắn Đỏ (LCD) và Một Bụi Đỏ Lùn CM (MBLĐCM), giống Lùn Phệt (LPt) có 78% kiểu gen giống với giống LCST (Lùn cao sản trắng). Nhóm 2

gồm 6 giống có kiểu hình chịu mặn trung bình (cấp 5) gồm giống Tài Nguyên CM (TNCL), Trà Long 2 (TL2), Năm Tài 1 (NT1), Một Bụi Đỏ Cao CM (MB5), Nàng Cum 1 (NC1) và giống Lùn Phèn Hạt Nhỏ (LPHN) và 1 giống Lùn Cắn Trắng (LCT) có kiểu hình chịu mặn khá (cấp độ 3) lại có kiểu gen hơn 90% tương đồng với giống Tài Nguyên CM (TNCL). Nhóm 3 gồm 2 giống Một Bụi Cao 1 (MBC1) và Một Bụi Lùn 2 (MBL2) có kiểu hình chịu mặn được đánh giá ở cấp độ 5 và 1 giống Một Bụi Lùn (MBL) có kiểu hình chịu mặn được đánh giá ở cấp độ 3 lại có kiểu gen hơn 94% giống với giống Một Bụi Cao 1 (MBC1). Nhóm 4 chỉ có 1 giống Trắng Bò Câu (TBC) với kiểu hình nhiễm mặn được đánh giá ở cấp 7. Nhóm 5 gồm 4 giống lúa có kiểu hình nhiễm mặn được đánh giá ở cấp 7 giống Một Bụi Trắng (MBT), giống Tài Nguyên ST (TNTT), giống Tét Rắn (TR) và giống Ba Bụi Lùn (BBL), có 2 giống Nàng Thom (NT) và Thom Mẫn (TM) có kiểu hình rất nhiễm mặn được đánh giá ở cấp 9. Nhóm 6 gồm giống lúa chuẩn nhiễm mặn IR28 và 4 giống được đánh giá ở cấp 7 giống Ngọc Nữ (NN), Sói Lùn (SL), Móng Chim Đen (MCĐ) và

Móng Chim Roi 3 (MCR3). Nhóm 7 gồm 6 giống có kiểu hình nhiễm mặn được đánh giá ở cấp 7, giống Lùn Phèn (LP), giống Lùn Hèn (LH), giống

Lùn Vàng (LV), giống Lùn Sữa (LS), giống Lùn Phong (LPg) và giống Thom Lùn Mùa (TLM).



Hình 3: Giản đồ phân nhóm di truyền của 36 giống lúa mùa dựa trên dấu phân tử SSR

4 KẾT LUẬN

Khả năng chịu mặn 36 giống lúa mùa có khác nhau tùy vào đặc tính từng giống, 08 giống có khả năng chịu mặn khá, 11 giống chịu mặn trung bình, 15 giống nhiễm mặn và 02 giống rất nhiễm. Hai dấu phân tử SSR RM3412 và RM493 có sự liên kết với gen *Saltol* chống chịu mặn nằm trên nhiễm sắc thể số 1 của lúa, giúp nhận diện và phân biệt được cấp độ chống chịu mặn 36 giống lúa. Dựa trên dấu phân tử SSR đã xây dựng được giản đồ sử dụng phương pháp UPGMA, các giống lúa mùa được phân thành 7 nhóm trong đó nhóm I gồm phần lớn các giống lúa có kiểu hình chịu mặn được đánh giá ở cấp độ 3, nhóm II-IV gồm phần lớn các giống lúa có kiểu hình chịu mặn được đánh giá ở cấp độ 5, nhóm V-VII gồm các giống lúa có kiểu hình chịu mặn được đánh giá ở cấp độ 7 và 9.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành gửi lời cảm ơn đến Sở Khoa học và Công Nghệ tỉnh Cà Mau đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này và Trung Tâm Giống Nông nghiệp Cà Mau đã phối hợp thực hiện. Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng trang thiết bị của Viện Nghiên cứu Phát triển Đồng bằng sông Cửu Long và Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ali, M.N., Yeasmin, L., Gantait, S., Goswami, R., and Chakraborty, S., 2014. Screening of rice landraces for salinity tolerance at seedling stage through morphological and molecular markers. *Physiol Mol Biol Plants*. 20 (4): 411-423.

Babu, N.N., Vinod, K.K., Krishnan, S.G., et al, 2014. Marker based haplotype diversity of *Saltol* QTL in relation to seedling stage salinity tolerance in selected genotypes of rice. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 74 (1): 16–25.

Bimpong, I.K., Manneh, B., Sock, M., et al., 2016. Improving salt tolerance of lowland rice cultivar ‘Rassi’ through marker-aided backcross breeding in West Africa. *Plant Science*. 242: 288–299.

Chowdhury, A.D., Haritha, G., Sunitha, T., et al., 2016. Haplotyping of Rice Genotypes Using Simple Sequence Repeat Markers Associated With Salt Tolerance. *Science Direct*. 23 (6): 317–325.

Gregorio GB, Senadhira D., and Mendoza RD., 1997. Screening rice for salinity tolerance, IRRI Discussion paper Series No.22. International Rice Research Institute, Los Baños. Laguna, Philippines.

Huyen, L.T.N., Cuc, L.M., Ham, L.H., and Khanh, T.D., 2013. Introgression the *Saltol* QTL into Q5DB, the elite variety of Vietnam using

- marker-assisted-selection (MAS). *American Journal of BioScience*. 1(4): 80-84.
- Iqbal, S.A., Islam, M.M., Ahmed Hossain, Md., and Malaker, A., 2015. DNA Fingerprinting of Rice Lines for Salinity Tolerance at Reproductive Stage. *Advances in Crop Science Technology*. 1 (6): 1-7.
- Islam, M.R., Gregorio, G.B., Salam, Md.A., Collard, B.C.Y., Singh, R.K., and Hassan, L., 2012. Validation of Saltol linked markers and haplotype diversity on chromosome 1 of rice. *Molecular plant breeding*. 3(10): 103-114.
- Khatab, I.A., Farid, M.A., and Kumamaru, T., 2016. Genetic diversity associated with heading date in some rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using microsatellite markers. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*. 6: 58-63.
- Kordrostami, M., Rabiei, B., and Kumleh, H.H., 2016. Association analysis, genetic diversity and haplotyping of rice plants under salt stress using SSR markers linked to SalTol and morpho-physiological characteristics. *Plant Systematics and Evolution*. 302(7): 871-890.
- Linh, L.H., Linh, T.H., Xuan, T.D., Ham, L.H., Ismail, A.M. and Khanh, T.D., 2012. Molecular Breeding to Improve Salt Tolerance of Rice (*Oryza sativa* L.) in the Red River Delta of Vietnam. *International Journal of Plant Genomics*. 10:1-9.
- Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., et al., 2013. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. Nov; 14(11): 22499–22528. Published online 2013 Nov 14. doi: 10.3390/ijms141122499.
- Mohammadi-Nejad, G., Arzani, A., Rezai, A.M., Singh, R.K. and Gregorio, G.B., 2008. Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the saltol QTL. *African Journal of Biotechnology*. 7(6): 730-736.
- Molla, K.A., Debnath, A.B., Ganie, S.A. and Mondal, T.K., 2015. Identification and analysis of novel salt responsive candidate gene based SSRs (cgSSRs) from rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*. 15:122-133.
- Rogers, S.O., and Bendich, A.J., 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*. A6:73-83.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman: San Francisco. 573 pages
- Thomson, M.J., Ocampo, M., Egdane, J., et al., 2010. Characterizing the Saltol Quantitative Trait Locus for Salinity Tolerance in Rice. *Rice* (2010) 3:148–160
- Yoshida, S.I., Forno, D.A., Cook, J.H. and Gomez, K.A., 1976. *Laboratory manual for physiological studies of rice*, Third Edition. International Rice Research Institute. Manila (Philippines): 82 pages