

Fertilizer (N, P, K) use efficiency of OM5451 rice variety in acid sulphate soil area of Hau Giang province

Mai Nguyet Lan, Chu Van Hach, Nguyen Van Bo,
Tran Van Phuc and Nguyen Thi Hong Nam

Abstract

Field experiments were carried out in 8 crop seasons (from Winter-Spring 2011-2012 to Summer-Autumn 2015) at the experimental site of the Agricultural Seed Center, Vi Thuy district, Hau Giang province. The objectives of this study were (i) to determine the use efficiency (nitrogen, phosphate and potassium) of rice in acid sulphate soils with double rice cropping system (ii) Inoculant was suitable for rice of the Mekong Delta. The experiment used OM5451 rice variety with randomized block design, 3 replications and 5 fertilizer treatments including -NPK, -N, -P, -K, NPK. Winter-Spring crop applied 90 N - 50 P₂O₅ - 30 K₂O formula (kg/ha) and Summer-Autumn crop applied 80 N - 60 P₂O₅ - 30 K₂O formula (kg/ha). The fertilizers used in the eight crops were urea (46% N), Van Dien fused phosphate (16% P₂O₅) and kalicloride (60% K₂O). The results showed that the efficiency of three nutrient types (N, P, K) was different for rice yield and varied by the seasons. The agronomic efficiency of N was highest with 23.8 kg of paddy/kg N in Winter-Spring crop and 20.1 kg of paddy/kg N in Summer-Autumn crop, followed by P with 16.9 kg paddy/kg P₂O₅ in Winter-Spring crop and 12.3 kg paddy/kg P₂O₅ in Summer-Autumn crop. The lowest was K with 4.8 kg of paddy/kg of K₂O in Winter-Spring crop and 1.9 kg of paddy/kg of K₂O in Summer-Autumn crop.

Keywords: Use efficiency, nitrogen, phosphorus, potassium, two rice crops land, Acid sulphate soil, rice yield

Ngày nhận bài: 12/2/2018

Ngày phản biện: 21/2/2018

Người phản biện: TS. Vũ Tiến Khang

Ngày duyệt đăng: 13/3/2018

ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG TÍNH CHỊU MẶN CỦA CÁC GIỐNG LÚA KẾT HỢP THANH LỌC KIỂU HÌNH VÀ CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Trần Ánh Nguyệt¹, Nguyễn Khắc Thắng¹, Trần Anh Thái¹,
Trần Thu Thảo¹, Trần Ngọc Thạch¹, Nguyễn Thúy Kiều Tiên¹

TÓM TẮT

Thanh lọc kiểu hình chống chịu mặn trong điều kiện nhân tạo của 128 giống lúa đã xác định nguồn vật liệu bố mẹ dùng trong nghiên cứu chọn lọc giống lúa chịu mặn cao tương đương FL478, Pokkali là 8 giống trong bộ nhập nội (IR15T1191, IR15T1112, IR15T1345, IR15T1387, IR15T1466, IR15T1335, IR15T1434, AB42) và 5 giống lúa Mùa địa phương (Trei May, Bắc Việt, nàng Quất Nhuyễn, Cấn Lùn, Ba Bụi Lùn), cho tính chống chịu cao khi thanh lọc ở nồng độ muối 6 và 8 g/l. Kết hợp sử dụng 19 chỉ thị phân tử SSR phân bố trong vùng QTL/*Saltol* 5,3 Mb (10,3 - 15,2 Mb) trên nhiễm sắc thể số 1 của 23 giống chống chịu cao, trung bình và hơi mặn cảm đã qua thanh lọc kiểu hình. Các giống không thể được xác định là kiểu gen có chứa *Saltol* mặc dù các giống này được đánh giá kiểu hình mang tính chống chịu cao (cấp chống chịu 3 - 5) ở giai đoạn cây mạ, cho thấy QTLs khác với *Saltol* có thể kiểm soát tính chống chịu mặn ở giai đoạn mạ. Nguồn vật liệu khởi đầu được sàng lọc trong nghiên cứu này có mang *Saltol*/QTL mới khai thác làm cây bố cho gen để phát triển các dòng/giống mới có mức độ chịu mặn cao hơn bằng cách kết hợp *Saltol* và các QTLs khác vào các giống lúa ưu tú phục vụ cho công tác lai tạo giống chống chịu mặn.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử SSR, chống chịu mặn, lúa, QTL mới, *Saltol*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực đóng vai trò quan trọng nuôi sống hơn 2/3 dân số thế giới. Tuy nhiên, do các yếu tố tác động như stress phi sinh học và sinh học, đã và đang làm giảm năng suất cây lúa và đang đe dọa nền an ninh lương thực của thế giới vì tốc độ dân số ngày càng tăng nhanh. Cây lúa được xem là cực kỳ nhạy cảm khi

có hiện diện của muối đặc biệt là trong giai đoạn cây con, giai đoạn sinh trưởng và thời kỳ trổ bông. Khi xâm ngập mặn xảy ra ở các giai đoạn này làm giảm đáng kể sự tăng trưởng và năng suất của cây lúa. Nghiên cứu về tính trạng chống chịu mặn trên cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng không dễ dàng thực hiện vì nó là tính trạng rất phức tạp bị kiểm soát bởi nhiều gen, kiểu hình của tính chống chịu

¹ Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

bị ảnh hưởng lớn của môi trường và hệ số di truyền thấp (Singh *et al.*, 2004). Chọn giống lúa chống chịu mặn bằng phương pháp truyền thống gặp nhiều khó khăn, do vậy việc áp dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống lúa kháng mặn là một giải pháp tối ưu nhằm hỗ trợ cho phương pháp truyền thống được nhanh và chuẩn xác hơn.

Năm 2016, Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là khu vực bị ảnh hưởng nặng nhất của hạn hán, xâm nhập mặn gây thiệt hại nặng nề ở 9/13 tỉnh ĐBSCL. Công tác chọn tạo giống chống chịu mặn còn nhiều hạn chế trong thời gian qua do thiếu hụt thông tin và nguồn vật liệu khởi đầu phục vụ tốt cho công tác lai tạo. Để cải thiện tính chống chịu mặn trước tiên phải có giống làm vật liệu chuyển gen chống chịu mặn tốt, để tạo ra các cặp lai tiềm năng chuyển gen chịu mặn từ các giống bố sang các giống làm mẹ có đặc tính nông học phong phú, cho năng suất chất lượng cao, cải thiện tính chống chịu. Công việc nghiên cứu sàng lọc các giống có gen/QTL chịu mặn mới là vấn đề cơ bản trong định hướng nghiên cứu chọn tạo giống chịu mặn cho năng suất, chất lượng cao. Hiện nay, hầu hết các giống cho gen chống chịu mặn được các nhà chọn giống sử dụng là Pokkali (Lúa Mùa có nhiều dòng phân ly của giống Pokkali không mang tính chịu mặn cao) và FL478 (IR66946-3R-178-1-1) được chọn lọc từ tổ hợp lai Pokkali/IR29 có chứa <1 Mb đoạn DNA của Pokkali được định vị tại vị trí 10,6-11,5 Mb trên nhiễm sắc thể số 1 (NST 1). Tuy nhiên, khi vùng DNA mang gen chống chịu của FL478 được chuyển vào các dòng ưu tú, thì thế hệ con cái của cặp lai này cho tính chống chịu không bằng so với FL478 (Kim *et al.*, 2009). Mặc khác, nhược điểm của hai giống này là có mang các đặc tính nông học không mong muốn là thời gian sinh trưởng dài, ảnh hưởng quang kỳ, cao cây, vỏ lụa màu đỏ, hạt có râu, chất lượng gạo thấp nên không thể sử dụng trực tiếp các giống này để nhân giống. Vì vậy, để tăng khả năng chịu mặn của giống lúa thì xác định các nguồn vật liệu mới có thể bổ sung các giống trên là việc hết sức cần thiết. Nghiên cứu của nhóm tác giả tập trung khai thác vật liệu là các giống nhập nội của IRRI, các giống lúa Mùa địa

phương và các giống cao sản của Việt Nam mà chưa từng được công bố của các nhóm nghiên cứu khác nhằm mục đích xác định rõ ràng các dòng/giống lúa chịu mặn có chứa vùng *Saltol* hoặc nguồn gen/QTL mới để làm phong phú cơ sở di truyền phục vụ cho chương trình chọn giống chống chịu mặn mới. Các thí nghiệm tập trung đánh giá tính chịu mặn bộ giống lúa nhập nội, các giống lúa mùa và giống lúa được trồng phổ biến bằng thanh lọc nhân tạo có bổ sung muối NaCl (6, 8 g/l). Mặc khác, xác định được các dòng/giống mang gen chịu mặn và thiết lập mối liên hệ di truyền của chúng bằng các chỉ thị phân tử SSR, nhằm hướng đến tạo các cặp lai tiềm năng cho chương trình chọn giống lúa chịu mặn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Bộ giống lúa thanh lọc 125 giống lúa bao gồm các giống lúa nhập nội từ viện lúa quốc tế IRRI, các giống cao sản ngăn ngừa các giống mùa địa phương, 3 giống chuẩn mẫn cảm và chống chịu (IR29, Pokkali, FL478) được sử dụng đánh giá thanh lọc mặn trong phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thanh lọc mặn trong điều kiện nhân tạo ở giai đoạn mạ

Thanh lọc mặn trong điều kiện nhân tạo theo phương pháp của Gregorio và cộng tác viên (Gregorio *et al.*, 1997). Các hạt lúa nảy mầm (mỗi giống lúa lập lại 3 lần) đặt vào miếng xốp trong khay chứa nước cất từ 3 - 4 ngày. Sau 4 ngày thay thế nước cất bằng dung dịch dinh dưỡng Yoshida có chuẩn độ muối với nồng độ tương ứng bằng ½ nồng độ cần quan sát. Sau ba ngày tiếp tục hiệu chỉnh muối về đúng nồng độ thanh lọc mong muốn (0, 6 và 8) g/l NaCl tinh khiết được dùng cho mỗi nghiệm thức. Điều chỉnh pH của dung dịch mỗi ngày và thay mới dung dịch dinh dưỡng sau 7 ngày. Sau 14 ngày quan sát khi giống chuẩn nhiễm chết gần như hoàn toàn, chuẩn chống chịu Pokkali tương đương cấp 3 tiến hành ghi nhận và đánh giá tỷ lệ sống sót của các dòng/giống thanh lọc và cặp chống chịu mặn.

Bảng 1. Tiêu chuẩn đánh giá mức chống chịu mặn giai đoạn tăng trưởng và phát triển (Gregorio *et al.*, 1997)

Cấp chống chịu mặn	Biểu hiện	Mức chống chịu
1	Tăng trưởng bình thường, không có vết cháy lá	Chịu mặn rất cao
3	Gần như bình thường, nhưng đầu lá hoặc vài lá có vết trắng, lá hơi cuộn lại	Chịu mặn
5	Tăng trưởng chậm lại, hầu hết lá bị khô, một vài chồi bị chết	Chịu mặn trung bình
7	Tăng trưởng bị ngưng lại hoàn toàn; hầu hết lá bị khô, một vài chồi chết	Nhiễm
9	Tất cả các cây bị chết hoặc khô	Rất nhiễm

2.2.2. Phương pháp ly trích DNA

DNA lá non của các dòng/giống lúa được ly trích theo phương pháp CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) của Doyle và Doyle (1990) (có cải tiến theo để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm trung tâm của Viện Lúa). Mẫu lá sau khi làm lạnh bằng nito lỏng được nghiền nhỏ bằng máy nghiền (Nhật Bản) thêm 700 µl dung dịch ly trích và 140 µl SDS 10%. Ủ mẫu ở 65°C trong 60 - 90 phút, 15 phút lắc đều một lần để dung dịch ly trích có thể thấm sâu vào màng tế bào. Bổ sung 700 µl dung dịch (Chloroform: Isoamylalcohol) tỷ lệ 24 : 1, trộn đều và lắc bằng tay trong vòng 2 - 5 phút. Ly tâm với 11000 vòng/phút trong 20 phút. Chuyển dịch 400 µl nổi sang tube 1,5 ml bổ sung 400 µl isopropanol rồi giữ mẫu trong tủ -20°C. Ly tâm ở 4°C trong 20 phút, tốc độ 11000 vòng/phút, để thu kết tủa. Tiếp tục bổ sung 500 µl ethanol 70%, ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu kết tủa. Làm khô DNA và bảo quản mẫu trong 50 µl dung dịch TE 1X. Chất lượng của DNA được kiểm tra gel agarose 0,8%, DNA còn nguyên vẹn sáng đồng đều, không đứt gãy hay lẫn tạp đủ tiêu chuẩn để thực hiện các phản ứng PCR và cho các thí nghiệm tiếp theo. Ngoài ra, nồng độ DNA cũng được đo bằng máy quang phổ (NanoDrop One 1000™, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Mỹ).

2.2.3. Phương pháp nhân PCR

Dựa vào các công bố của các tác giả Gregorio và cộng tác viên (2002), Thomson và cộng tác viên (2010), Islam và cộng tác viên (2012), 25 SSR marker liên kết chặt với vùng *Saltol* vị trí 10,3 đến 15,2 Mb trên NST1 được chọn lọc để phân tích. Các cặp mỗi chuỗi lặp lại đơn giản SSR (Simple Sequence Repeat), được thực hiện trên máy eppendorf™ 96 giếng (Applied Biosystems, USA), với tổng thể tích là 10 µl/phản ứng gồm những thành phần sau: DNA (100 ng/µl) 0,5 µl; 0,25 µl mỗi xuôi và mỗi ngược (10 pmol/µl), Taq (1U) 0,5 µl; 0,25 dNTP (10 mM), ddH₂O 7 µl. Trộn đều các thành phần của hỗn hợp rồi chuyển vào máy PCR sau đó chạy theo chương trình đã cài đặt sẵn với 35 chu kỳ gồm các bước sau: 94°C trong 4 phút; 94°C trong 45 giây, nhiệt độ bắt cặp 53°C - 62°C (tùy vào nhiệt độ bắt cặp của mỗi) trong 45 giây. Sản phẩm được kéo dài 72°C trong 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ và 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 2,5% ở 150V, I = 160 mA, thời gian 90 phút trong dung dịch đệm 1X TAE. Sau đó gel được nhuộm trong dung dịch TAE có chứa Safe View 0,5 g/ml và soi dưới đèn UV và chụp ảnh (UVIDoc, Anh). Các chi tiết trình tự

của mỗi SSR, vị trí và NST và kích thước sản phẩm dự kiến đã được tìm kiếm trong trang web Gramene (www.gramene.org).

2.2.4. Phân tích số liệu

Các số liệu thô được nhập và xử lý bằng phần mềm MS Excel. Đánh giá số liệu kiểu gen các sản phẩm PCR được ghi nhận so sánh với thang chuẩn 50 bp. Đoạn sản phẩm khuếch đại được đánh giá dựa kích thước của sản phẩm trên từng giống lúa. Sản phẩm có kích thước lớn nhất được ký hiệu A, kế đến là B... Hệ số PIC (Polymorphic Information Content) được tính theo công thức sau: $PIC = 1 - \sum P_i^2$ (P_i là tần số xuất hiện của alen thứ i). Đa dạng alen trên mỗi loci và haplotype được xử lý trong chương trình Graphical Genotyper (Van Berloo; 2008) như sau: Ghi nhận dữ liệu của từng chi thị SSR với các alen có kích thước khác nhau sau đó mã hóa bằng các chữ cái.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 9 năm 2017 đến tháng 2 năm 2018, tại các phòng thí nghiệm của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

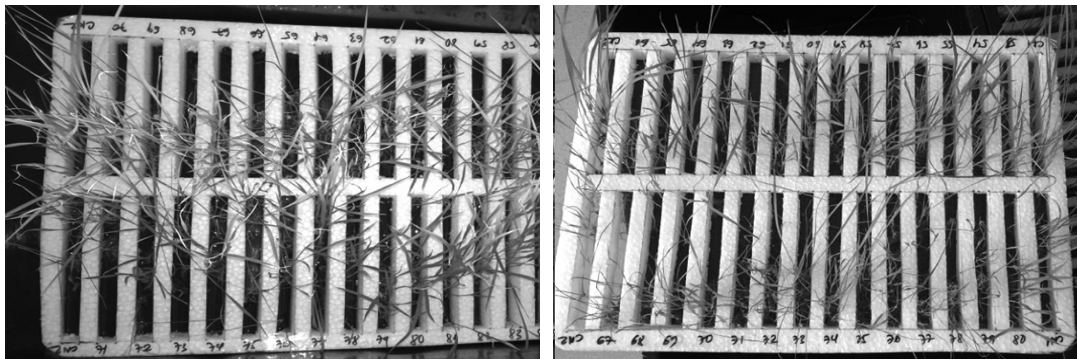
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thanh lọc mặn trong môi trường nhân tạo của 125 giống vật liệu ban đầu

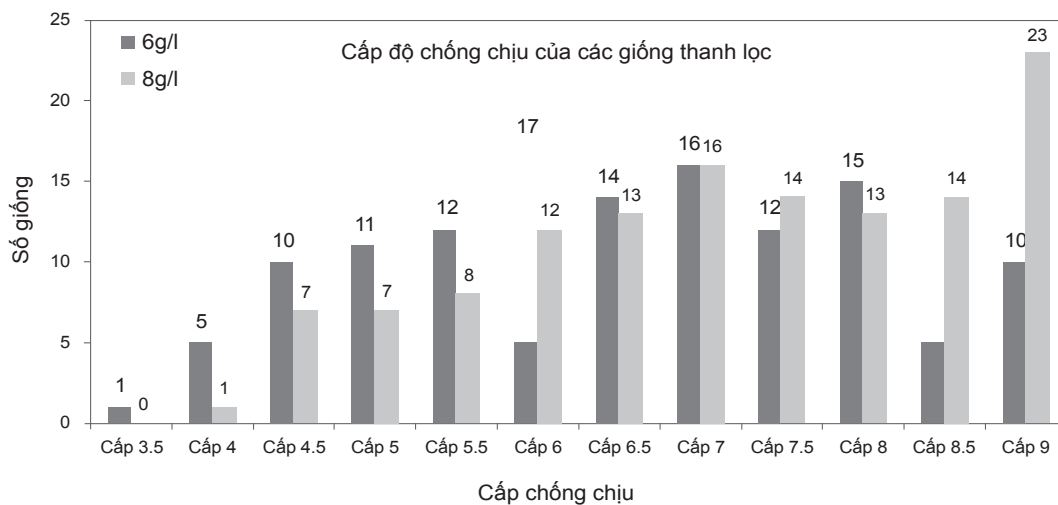
Phản ứng khác nhau của các giống lúa trong điều kiện thanh lọc mặn nhân tạo cho thấy sự biến thiên kiểu hình rất lớn trong số 125 giống lúa cộng với 3 giống đối chứng Pokkali, FL478 (chuẩn chống chịu) IR29 (chuẩn nhiễm). Các giống lúa phát triển tốt trong điều kiện không bổ sung muối, trong khi đó bổ sung muối 6 và 8 g/l NaCl, hầu hết các lá của các giống lúa gấp lại sau 1 - 3 ngày sau khi cho sốc muối đủ nồng độ. Sau 10 ngày, giống chuẩn nhiễm IR29 và nhiều giống khác biểu hiện đầu lá hoặc vài lá có vết trắng, lá hơi cuộn lại. Sau 2 tuần xử lý mặn ở nồng độ NaCl 6 và 8 (g/l), giống IR29 sinh trưởng bị ngưng lại hoàn toàn, hầu hết các lá bị khô (điểm 9) trong khi đó giống Pokkali và FL478 vẫn sinh trưởng bình thường, chỉ xuất hiện một vài lá có vết trắng, lá hơi cuộn lại (điểm 3 - 4). Kết quả thanh lọc nhân tạo 125 giống lúa khảo sát (Hình 2) cho thấy, 15 giống lúa được xác định có tính chống chịu mặn (điểm 3,5 - 5,0) ở nồng độ 8 g/l và 26 giống lúa chống chịu mặn ở nồng độ 6 g/l. Các giống có mức chống chịu tương đương với đối chứng Pokkali và FL478 bao gồm: 7 giống nhập nội IR15T1112, IR15T1354, IR15T1387, IR15T1466, IR15T1335, IR15T1434, AB42), 5 giống lúa Mùa (Trei May, Bắc Việt, Nàng

Quất Nhuyễn, Cấn Lùn, Ba Bụi Lùn) và giống lúa OM442. Trong khi đó các giống triển vọng có năng suất cao như OM4900, OM5451, OM384 hầu hết các cây tăng trưởng chậm lại, lá bị khô và xuất hiện một

vài chồi bị chết (Hình 1 và 2). Trong 128 giống lúa quan sát được 13 giống lúa có khả năng chịu mặn tốt chiếm 10,4%, hầu hết các giống còn lại khả năng mẫn cảm tương đương với giống mẫn cảm IR29.



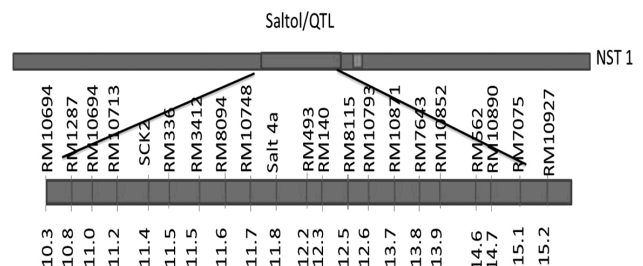
Hình 1. Thanh lọc mặn của các giống giai đoạn mạ 14 ngày bên trái trong dung dịch Yoshida không có bổ sung muối, bên phải có bổ sung muối NaCl (8 g/l)



Hình 2. Sơ đồ biểu diễn cấp chống chịu mặn của 128 giống lúa (25 cây cho mỗi nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần) trong dung dịch dinh dưỡng có bổ sung muối NaCl (6 và 8 g/l)

3.2. Phân tích sàng lọc kiểu gen chống chịu mặn bằng chỉ thị phân tử quanh vùng QTL *Saltol*

Sau khi sàng lọc về kiểu hình, tổng số 23 giống có cấp độ chống chịu khi thanh lọc mặn nhân tạo ở nồng độ muối (8 g/l), thấp hơn, bằng và cao hơn so với 2 chuẩn chống chịu phổ biến (FL478 và Pokkali) tiến hành ly trích DNA và chạy phản ứng PCR với 25 cặp mồi SSR phân bố trong vùng *Saltol* từ vị trí 10,3 đến 15,2 Mb trên NST 1 (Hình 3, 4). Vị trí của các chỉ thị phân tử được miêu tả sơ bộ trong (Hình 3) và thông tin về các cặp mồi, sản phẩm khuếch đại xem thêm trên trang web Gramene (www.gramene.org). Sau khi phân tích số liệu chỉ có 19 cặp mồi cho kết quả đa hình (Bảng 2). Sáu chỉ thị phân tử cho kết quả đơn hình là RM10713, SCK2, Salt4a, RM140, RM10871, RM7643.



Hình 3. Vị trí xác định của các dấu chuẩn phân tử của gen QTL/*Saltol* (10,3 đến 15,2) trên NST 1 của cây lúa.

Ghi chú: Bên trên là tên các chỉ thị phân tử, bên dưới là vị trí trên NST 1; Vùng màu đỏ: QTL/*Saltol*.

Năm mươi chín (59) alen đã được phát hiện với 19 cặp mồi đa hình (Bảng 2). Kích thước sản phẩm PCR dao động từ 95 bp (RM 10748) đến 444 bp (RM10649). Số alen dao động từ 2 đến 5, các chỉ thị có 2 alen (RM10649, RM10694, RM10748, RM493,

RM10843, RM10852, và RM562), 3 alen (RM1287, AP3206, RM336, RM8094, RM8115, RM10793, RM10890, RM7075), 4 alen bao gồm (SCK10, RM10720), 5 alen (RM10871) với trung bình alen trên một chỉ thị là 2,83. Theo Smith (1995) và Weir (1996), hệ số PIC (Polymorphic Information Content) được coi là thước đo tính đa dạng di truyền của các alen ở từng locus SSR do đó giá trị PIC được hiểu như là sự đa dạng di truyền của locus gen nghiên cứu. Giá trị PIC thu được tại các locus SSR biến động từ 0,69 (RM10843) đến 0,93 (RM10720, SKC10 và RM10871). Hệ số đa hình di truyền PIC trung bình thu được tại các locus đạt 0,82 cho thấy độ đa dạng gen tồn tại trong 23 giống lúa khảo sát này ở mức rất cao có thể khai thác vật liệu này làm bố mẹ và tạo được các cặp lai tiềm năng. Kết quả này phù hợp với nhiều công bố quốc tế (Islam *et al.*, 2012, Krishnamurthy *et al.*, 2014).

Bảng 2. Hệ số PIC, số allele và tổng số băng ADN thể hiện trên từng cặp mỗi SSR

STT	Tên chỉ thị	Vị trí	Sản phẩm khuếch đại (bp)	Số alen	PIC
1	RM10649	10,3	444	2	0,71
2	RM1287	10,8	162	3	0,76
3	RM10694	11,0	194	2	0,77
4	AP3206	11,2	120	3	0,89
5	SCK10	11,4	204	4	0,93
6	RM10720	11,4	154	4	0,93
7	RM336	11,5	200	3	0,83
8	RM3412b	11,5	110	3	0,88
9	RM8094	11,6	209	3	0,89
10	RM10748	11,7	95	2	0,74
11	RM493	12,2	211	2	0,76
12	RM8115	12,5	112	3	0,89
13	RM10793	12,6	123	3	0,85
14	RM10871	13,7	234	5	0,93
15	RM10843	13,8	166	2	0,69
16	RM10852	13,9	188	2	0,71
17	RM562	14,6	243	2	0,77
18	RM10890	14,7	240	3	0,88
19	RM7075	15,1	155	3	0,81
			Tổng alen	54	
			TB alen	2,84	
			TB PIC		0,82

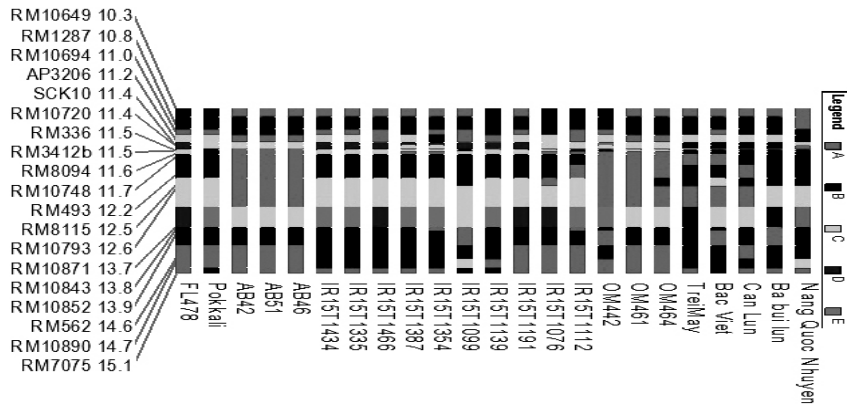
3.3. Phân tích các haplotype trong vùng QTL/Saltol

Những nghiên cứu về haplotype trong vùng QTL/Saltol liên quan tính chống chịu mặn bằng cách sử dụng FL478 và Pokkali làm giống tham chiếu gần

đây rất được chú ý. Các kiểu gen của các giống được phân tích với các chỉ thị phân tử phân bố trong vùng gen cần quan tâm, sự phân bố các alen của các chỉ thị phân tử này được so sánh với các alen của các giống tham chiếu FL478, Pokkali nhằm tìm ra các giống mới cho các kiểu hình mong muốn vượt trội hơn giống tham chiếu. Phân tích haplotype với QTL/Saltol chống chịu mặn đã được công bố bởi nhiều nhóm tác giả sử dụng chỉ thị phân tử SSR (Islam *et al.*, 2012; Niones, 2014, Krishnamurthy *et al.*, 2014). Sau khi chạy điện di sản phẩm PCR với các cặp môi so sánh kích thước với thang chuẩn DNA (50 bp) và xử lý số liệu thô trên phần mềm Excell, những cá thể có kích thước khác nhau được đánh dấu bằng các ký tự A (kích thước lớn nhất), B, C... Sau khi xử lý kết quả chạy điện di số liệu của từng giống bằng phần mềm Excell, số liệu thô này tiếp tục phân tích trên chương trình Graphical Genotyper (GGT2) kết quả đạt được như Hình 4.

Nhìn chung, các kiểu gen cho thấy sự đa dạng lớn trong vùng Saltol chỉ ra rằng Saltol vùng không được bảo tồn tốt trên các giống lúa mang tính chống chịu cao. Trong số các chỉ thị phân tử quan sát, SCK10, RM10871, RM336 cho thấy sự thay đổi lớn nhất trên toàn bộ vùng Saltol so với những giống khác. Các chỉ thị RM1287, RM7075, RM10852 ít biến đổi nhất trên các kiểu gen bởi vì các alen tương tự 21/23 giống và 19/23 giống. Đa dạng các alen của các haplotype của 23 giống chống chịu mặn so với giống tham chiếu FL478 đã tạo ra 9 nhóm haplotype khác nhau, nhóm haplotype tương tự với FL478 là IR15T1191, IR15T1335 và IR15T1434 trong khi đó nhóm haplotype số 9 (Hình 4) của các giống lúa TreiMey, Bắc Việt, Ba Bụi Lùn, Nàng Quốc Nhuyễn, AB42, AB51, AB46 không có sự tương đồng với giống FL478 là 68% (Tổng số alen khác với giống tham chiếu trên tổng số chỉ thị phân tử). Tiếp tục sử dụng nhóm này để khai thác các cá thể có mang tính chịu mặn mới, đáp ứng mục tiêu chọn giống lúa có khả năng chống chịu tốt.

Hai mươi ba giống lúa chống chịu tốt, trung bình (cấp 3 - 5) và hơi nhiễm trong 128 giống thanh lọc nhân tạo, đã được phân tích với các chỉ thị phân tử SSR để xác nhận các alen đặc trưng của FL478 và 22 giống còn lại tại các loci khác nhau trong vùng 10,3 - 15,2 Mb Saltol QTL trên NST1. Tuy nhiên, sự vắng mặt của các alen đặc trưng cho FL478 trong vùng Saltol của 7 giống lúa chống chịu tốt (Trei May, Bắc Việt, Ba Bụi Lùn, Nàng Quốc Nhuyễn, AB42, IR15T1387, IR15T1099, OM464) cho thấy rằng vùng Saltol đã không góp phần vào khả năng chịu mặn trong các giống này, tiếp tục khai thác các giống này cho các chương trình lai lúa mặn.



Hình 4. Kết quả phân tích sự đa dạng alen quanh vùng Saltol trên NST1 của các giống lúa chống chịu mặn bằng phần mềm GGT2

Màu sắc cho thấy các alen khác nhau thu được trong mỗi kiểu gen của các chỉ thị khác nhau, RM tên của chỉ thị phân tử, con số biểu thị vị trí trên NST1.

Tên marker	FL478	Pokkali	AB42	AB51	AB46	IR15T1434	IR15T1335	IR15T1466	IR15T1387	IR15T1354	IR15T1099	IR15T1139	IR15T1191	IR15T1076	IR15T1112	OM442	OM461	OM464	TreiMay	Bắc Việt	Cần Lùn	Ba bụi Lùn	Nàng Quế Nhuyễn	
RM10649	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	
RM1287	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A
RM10694	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	A	B	A	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B
AP3206	C	C	A	A	A	C	C	A	C	B	A	A	C	C	A	C	A	A	C	C	C	C	B	
SCK10	D	C	C	C	C	D	D	D	D	D	D	D	D	D	C	C	A	C	C	B	B	B	C	
RM10720	D	C	C	C	D	D	D	C	C	D	D	D	D	C	C	C	C	C	C	B	B	B	A	
RM336	B	B	A	A	A	B	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	
RM3412b	C	B	A	A	A	C	C	C	C	B	C	C	C	B	C	B	C	C	B	B	B	B	B	
RM8094	C	B	A	A	A	C	C	C	A	A	C	C	C	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	
RM10748	B	B	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	
RM493	B	B	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	B	B	C	B	B	
RM8115	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	B	C	C	A	C	A	A	B	B	C	B	B	B	
RM10793	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	C	
RM10871	D	E	C	C	C	E	E	D	E	E	C	E	D	D	E	E	C	C	B	C	C	B	A	
RM10843	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	A	
RM10852	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	A	B	B	B	A	B	A	B	A	
RM562	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	A	B	B	
RM10890	A	A	A	A	A	B	B	B	B	C	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	C	
RM10890	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	
RM7075	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	
Nhóm haplotype	1	4	9	9	9	3	3	3	5	6	7	4	2	4	6	8	8	8	9	9	8	9	9	

Hình 5. Haplotypes được phân tích bởi chỉ thị phân tử phủ đều trong vùng Saltol/QTL trên NST 1 bằng cách sử dụng FL 478 là giống tham chiếu.

Màu trắng cho thấy các alen có cùng kích thước với FL478, trong khi màu đen cho thấy các alen khác nhau về kích thước. (Ký hiệu A, B, C, D, E: kích thước khác nhau của các alen trên cùng locus).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả thanh lọc mặn 128 giống lúa ở giai đoạn mạ đã sàng lọc được 15 và 26 giống lúa cho tính chống chịu tốt và trung bình ở nồng độ 8 và 6 g/l. Đánh giá sự đa dạng các alen kết hợp với haplotype của 23 giống bằng sử dụng 19 chỉ thị phân tử SSR đã phân tách ra 9 nhóm haplotype khác nhau. Trong đó, các chỉ thị phân tử SCK10 và RM10720, RM336 có hiệu quả tốt nhất phân biệt giữa các loại kiểu gen chống chịu mặn khác nhau thông qua chỉ số đa dạng di truyền các alen. Trong số các kiểu gen, giống IR15T1191, IR15T1434, IR15T1335 có kiểu haplotype tương đồng cao nhất với giống FL478 nên có thể dùng làm cây cho gen (donor) để chuyển gen Saltol vào các giống ưu tú nhằm cải thiện tính chống chịu mặn ở giai đoạn mạ. Những giống khác thuộc

nhóm 9 có sự khác biệt nhiều so với FL478 có thể được sử dụng để tìm các vùng gen/QTL mới tạo ra khả năng chống chịu mặn cao.

Như vậy, từ việc đánh giá kiểu hình kết hợp với kiểu gen đã xác định được vật liệu sử dụng trong nghiên cứu chọn tạo giống lúa chịu mặn là các giống chuẩn quốc tế FL478, Pokkali, 8 giống triển vọng IR15T1191, IR15T1112, IR15T1345, IR15T1387, IR15T1466, IR15T1335, IR15T1434, AB42, 6 giống lúa mùa Trei May, Bắc Việt, nàng Quất Nhuyễn, Ba Chùm, Cần Lùn, Ba Bụi Lùn làm nguồn chuyển gen Saltol và các QTL khác.

4.2. Đề nghị

Đề nghị đánh giá các đặc điểm nông học, tiềm năng năng suất, năng suất của các giống trên để làm tiền đề cho các công tác chọn giống lúa mặn sau này.

Kiểm tra tính đa hình của bố mẹ bằng chỉ thị phân tử trên toàn bộ 12 NST và tiến hành lai hữu tính giữa giống cho gen và nhận gen, tiến đến bước lai hồi giao và chọn giống bằng chỉ thị phân tử.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu này là kết quả của đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật công nghệ sinh học trong chọn tạo giống lúa chịu mặn ứng phó với biến đổi khí hậu tại Việt Nam”. Tập thể nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Viện Lúa Quốc tế IRRI, Ngân hàng gen Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long đã cung cấp các giống nhập nội, các giống lúa mùa, các giống cao sản giúp cho công tác khai thác nguồn vật liệu ban đầu đạt kết quả tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Doyle, JJ and JL Doyle, 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus Cited*, 12: 13-15.

Gregorio, GB, D Senadhira, RD Mendoza, 1997. Screening rice for salinity tolerance. *IRRI Discussion Paper Series* No. 22. Manila (Philippines), International Rice Research Institute, pp. 30.

Gregorio, GB, D Senadhira, RD Mendoza, NL Manigbas, JP Roxas, CQ Guerta, 2002. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. *Field Crop Res.*, 76: 91-101.

Islam, MR, GB Gregorio, MA Salam, B C Y Collard, RK Singh, and L Hassan, 2012. Validation of SalTol Linked Markers and Haplotype Diversity on Chromosome 1 of Rice. *Molecular Plant Breed.*, 10: 103-114.

Kim, SH, PR Bhat, X Cui, Walia, H Xu, S Wanamaker, 2009. Detection and validation of single feature polymorphisms using RNA expression data from a rice genome array. *BMC Plant Biol.*, 9: 65-75.

Krishnamurthy, SL, S.K Sharma, V Kumar, S Tiwari, V Batra, N.K Singh, 2014. Assessment of genetic diversity in rice genotypes for salinity tolerance using Saltol markers of chromosome 1. *Indian J. Genet.*, 74: 243-247.

Niones, JM, 2004. *Fine mapping of the salinity tolerance gene on chromosome 1 of rice (Oryza sativa L.) using near isogenic lines*. MS dissertation, College, Laguna, Philippines: University of the Philippines Los Baños, Laguna.

Singh, RK., B Mishr, KN Singh, 2004. Salt tolerant rice varieties and their role in reclamation programme in Uttar Pradesh. *Indian Farming*, 2: 6-10.

Smith, JSC, 1995. Identification of cultivated varieties by nucleotide analysis. In: Wrigley CW (ed) Identification of food-grain varieties. *Am Assoc Cereal Chem*, St. Paul, Minnesota pp. 131.

Thomson, MJ, AM Ismail, SR McCouch, MJ Mackill, 2010. Marker assisted breeding. In: Pareek A, Sopory SK, Bohnert HJ, Govindjee (eds) Abiotic stress adaptation in plants, physiological, molecular and genomic foundation. *Springer*, New York, pp. 451-469.

Van, Berloo R, 2008. GGT 2.0: Versatile software for visualization and analysis of genetic data. *J Hered.*, 99: 232-236.

Weir, BS, 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, pp. 376.

Evaluation of rice salinity tolerance by combining phenotype screening and molecular markers

Tran Anh Nguyet, Nguyen Khac Thang, Tran Anh Thai, Tran Thu Thao, Tran Ngoc Thach, Nguyen Thuy Kieu Tien

Abstract

In this study, 128 rice varieties were screened based on performance for salinity tolerance at seedling stage using Yoshida nutrient solution by adding NaCl (6 and 8 g/l). Thirteen new varieties were found to be salinity tolerant and similar to FL478 and Pokkali. 8 introduced (IR15T1191, IR15T1112, IR15T1345, IR15T1387, IR15T1466, IR15T1335, IR15T1434, AB42) and 5 local varieties (Bac Viet, Nang Quat Nhuyen, Can Lun, Ba Bui Lun) were highly tolerant to salinity. Nineteen (19) polymorphism SSR molecular markers associated with *Saltol* region 5.3 Mb (10.3 - 15.6 Mb) on chromosome 1 were screened across the 23 rice genotypes. Based on haplotype analysis, 23 varieties were divided into 9 groups. Genotypes could not be identified as *Saltol*-containing genotypes; although these were evaluated as high tolerance of 3 - 5 (scores) by phenotypes at the seedling stage so may be new QTLs could control salt tolerance. These genetic materials with new novel QTL combinations could be used as a prerequisite donor for further studies in a selection of parents and markers assisted salinity breeding program.

Keywords: Novel QTL, Rice, salinity tolerance, SSR markers

Ngày nhận bài: 12/2/2018
Ngày phản biện: 16/2/2018

Người phản biện: TS. Trần Đình Giới
Ngày duyệt đăng: 13/3/2018