

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁC MẪU GIỐNG LÚA CẨM BẰNG CHỈ THỊ SSR

Ngô Thị Hồng Tươi^{*}, Phạm Văn Cường¹, Nguyễn Văn Hoan²

¹*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Dự án JICA-JST- Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email : nthtuoihua@gmail.com*

Ngày gửi bài: 29.04.2014

Ngày chấp nhận: 18.07.2014

TÓM TẮT

Thí nghiệm nhằm phân tích đa dạng di truyền của 46 dòng/giống lúa cẩm gồm cả lúa nếp và tẻ được thu thập từ các địa phương dựa vào sự có mặt và mức độ đa hình của chỉ thị phân tử SSR. Thí nghiệm sử dụng 35 chỉ thị phân tử SSR, trong đó có 9 chỉ thị đơn hình và 26 chỉ thị đa hình với tổng số 68 allel đa hình chiếm tỷ lệ trung bình 2,62 allel trên một locus. Hệ số đa dạng di truyền (PIC) dao động từ 0,08 đến 0,74 với giá trị trung bình là 0,46. Kết quả phân tích đã chia nguồn vật liệu nghiên cứu thành 2 nhóm chính. Ngoài ra thí nghiệm đánh giá hàm lượng anthocyanin của các mẫu lúa nghiên cứu, có 6 giống cho hàm lượng anthocyanin cao nhất là N14, N16, N18, N4, N22 và N20. Qua đánh giá một số chỉ tiêu nông sinh học cũng cho hai nhóm giống cây di truyền. Các số liệu thu được trong nghiên cứu này cung cấp những thông tin quan trọng cho việc nghiên cứu chọn tạo các giống lúa đặc sản và chất lượng bằng chỉ thị phân tử.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử SSR, đa dạng di truyền, lúa chất lượng

Analysis of Genetic Diversity in Black Rice by SSR Markers

ABSTRACT

The experiment aimed to analyze the genetic diversity of 46 local accessions of colored rice including glutinous and non-glutinous rice based on the presence and polymorphism level of SSR molecular markers. The experiment used 35 SSR molecular markers, including 9 monomorphic and 26 polymorphic markers with a total of 68 alleles, an average of 2.62 alleles per locus. Polymorphic Information Content (PIC) ranged from 0.08 to 0.74 with an average value of 0.46. The rice germplasm was divided into 2 main clusters. In addition, experiments also determined the anthocyanin content of varieties. Six varieties with highest anthocyanin content were N14, N16, N18, N4, N22 and N20. The data obtained in this study provide important information for breeding of specialty rice by molecular markers.

Keywords: Genetic Diversity, quality rice, SSR markers.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gạo nếp cẩm và tẻ cẩm có màu đen còn gọi là bồ huyết mẽ, là loại gạo có hàm lượng giá trị dinh dưỡng cao như: hàm lượng protein trong gạo nếp cẩm cao hơn 6,8%, chất béo cao hơn 20% so với gạo khác, ngoài ra trong gạo nếp cẩm còn chứa caroten, 8 loại axit amin (trong đó có Anthocyanin) và các nguyên tố vi lượng (sắt, kẽm) cần thiết cho cơ thể (United Press International - UPI, 2010). Lúa nếp cẩm là những giống lúa đặc sản được trồng từ lâu đời và

được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau trong đời sống của người dân. Các sản phẩm làm từ gạo nếp, nếp cẩm có mặt trong hầu hết các lễ hội và nó tạo lên nên văn minh mang bản sắc văn hóa của Việt Nam. Giống lúa cẩm được trồng ở nhiều địa phương, nhiều vùng sinh thái khác nhau và rất đa dạng về kiểu hình. Việc nghiên cứu đa dạng nguồn gen tập đoàn lúa cẩm không chỉ có ý nghĩa trong bảo tồn các giống lúa cẩm địa phương mà còn có ý nghĩa lựa chọn vật liệu cho chọn tạo giống lúa chất lượng cao ở Việt Nam.

Trình tự lặp lại đơn giản (SSR – simple sequence repeat markers) là công cụ để xác định sự đa dạng di truyền của nguồn gen (Ma và et al., 2011; Powel và et al., 1996). Phương pháp này có ưu điểm là đánh giá nhanh chóng, chính xác, cho đa hình cao và ổn định, vì vậy chỉ thị SSR được sử dụng rộng rãi và rất có hiệu quả trên nhiều đối tượng cây trồng.

Trong nghiên cứu này, chỉ thị SSR được sử dụng để nghiên cứu đa dạng nguồn gen của 46 mẫu giống lúa cẩm (nếp cẩm và tẻ cẩm). Qua phân tích SSR sẽ phân nhóm được nguồn vật liệu, từ đó làm dẫn liệu cho quá trình lai tạo giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu gồm 46 dòng/giống lúa cẩm có nguồn gốc khác nhau (Bảng 1) gồm: 32 giống nếp cẩm địa phương, 1 giống Asominori có nguồn gốc Nhật Bản (là giống lúa *Japonica*) và 1 giống IRBB21 (là giống lúa *Indica*) và 12 giống lúa cẩm thu thập tại các Viện nghiên cứu. Hạt của các dòng/giống lúa thí nghiệm được gieo trong khay đến khi 3 lá để thu mẫu lá tách ADN. 35 chỉ thị SSR nằm trên 12 NST của bộ gen lúa trên trang www.gramene.org và dưới sự hỗ trợ của phòng thí nghiệm Dự án JICA-JST, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (HVNNVN).

Bảng 1. Danh sách 46 dòng/giống lúa nghiên cứu

Ký hiệu	Tên địa phương	Nguồn gốc	Ký hiệu	Tên địa phương	Nguồn gốc
N1	Lúa lóc nếp cẩm	Nho Quan - Ninh Bình	N25	Nếp cẩm	Đà Bắc - Hòa Bình
N2	Lúa nếp cẩm	Yên Bình - Yên Bái	N26	Nếp cẩm dạng 1	Ngọc Lặc - Thanh Hóa
N3	Nếp cẩm dạng 1	Lục Yên - Yên Bái	N27	Nếp cẩm đen	Bá Thước - Thanh Hóa
N4	Nếp cẩm	Vị Xuyên - Hà Giang	N29	Nếp cẩm	Mai Châu - Hòa Bình
N5	Nếp cẩm	Bắc Quang - Hà Giang	N30	Nếp cẩm	Chiêm Hóa-Tuyên Quang
N6	Nếp cẩm dạng 2	Lục Yên - Yên Bái	N31	Nếp cẩm	Trung tâm TNĐT
N7	Nếp cẩm	Lục Ngạn - Bắc Giang	N32	Nếp cẩm	Lục Nam- Bắc Giang
N8	Nếp cẩm	Bắc Hà - Lào Cai	N33	Nếp cẩm	Như Xuân - Thanh Hóa
N9	Nếp cẩm nương	Than Uyên - Lào Cai	N34	Nếp cẩm	Trung tâm TNĐT
N10	Nếp cẩm đen	Bảo Thắng - Lào Cai	N36	Nếp cẩm	Viện clt và cây tp
N11	Nếp cẩm	Vị Xuyên - Hà Giang	N37	Tẻ cẩm	Viện clt và cây tp
N13	Nếp cẩm	Thạch Thành - Thanh Hóa	N38	Nếp cẩm	Viện clt và cây tp
N14	Nếp cẩm	Cẩm Thủy - Thanh Hóa	N39	Tẻ cẩm	Viện clt và cây tp
N15	Nếp cẩm nương	Cẩm Thủy - Thanh Hóa	N40	Nếp cẩm	Viện clt và cây tp
N16	Nếp cẩm	Bá Thước - Thanh Hóa	N41	Tẻ cẩm	Viện clt và cây tp
N17	Nếp cẩm đen	Sapa - Lào Cai	N42	Tẻ cẩm	Viện clt và cây tp
N18	Nếp cẩm riêu	Sapa - Lào Cai	N43	Nếp cẩm	Viện clt và cây tp
N19	Nếp cẩm dạng 2	Ngọc Lặc - Thanh Hóa	N44	Tẻ cẩm	Viện clt và cây tp
N20	Nếp cẩm	Văn Chấn - Yên Bái	N45	Nếp cẩm	Viện nghiên cứu và phát triển cây trồng
N21	Nếp cẩm	Nho Quan - Ninh Bình	N46	Nếp cẩm	HVNNVN
N22	Nếp cẩm	Bạch Thông - Bắc Cạn	T2	Nếp cẩm	HVNNVN
N23	Nếp cẩm	Hàm Yên - Tuyên Quang	Asominori	Tẻ	Nhật Bản
N24	Nếp cẩm có râu	Na Hang - Tuyên Quang	IRBB21	Tẻ	IRRI

Bảng 2. 35 chỉ thị SSR sử dụng trong nghiên cứu

Chỉ Thị SSR	NST	Mỗi xuôi	Mỗi ngược	Nhiệt độ gắn mỗi	Số chu kỳ PCR
<u>RM259</u>	1	tggagttgagaggagg	ctgttgcatggtgccatgt	55	30
<u>RM283</u>	1	gtctacatgtaccctgttggg	cggcatgagagtctgtgatg	61	30
<u>RM312</u>	1	gtatgcatattgataagag	aagtcaccgagtttaccttc	55	30
<u>RM5</u>	1	tgcaactctagctgctcga	gcatccgatcttgatggg	57	30
<u>RM154</u>	2	accctctccgctcgctcctc	ctcctcctctcgaccgctcc	61	30
<u>RM452</u>	2	ctgatcgagagcgttaagg	gggatcaaacaccggttctg	61	30
<u>RM514</u>	3	agattgatctccattcccc	cacgagcataactactagtgg	55	30
<u>RM338</u>	3	cacaggagcaggagaagagc	ggcaaaccgatcactcagtc	55	40
<u>OSR13</u>	3	cafttgctgctcaggagta	agccacagcgcccatctctc	53	40
<u>RM307</u>	4	gtactaccgacctaccgttcac	ctgctatgcatgaactgctc	55	30
<u>RM124</u>	4	atcgtctgcttgcggctgctg	catggatcaccgagctccccc	67	30
<u>RM413</u>	5	ggcgattcttgatgaagag	tcccaccaatcttctctc	53	30
<u>RM334</u>	5	gttcagtgctcagtgccacc	gacttgatcttggggacg	55	30
<u>RM122</u>	5	gagtcgatgtaatgcatcagtg	gaaggaggtatcgttggggac	55	35
<u>RM454</u>	6	ctcaagcttagctgctgctg	gtgatcagtgaccatagcg	55	30
<u>RM162</u>	6	gccagcaaaaccaggatccgg	caaggcttgtgctgctg	61	30
<u>RM133</u>	6	ttggattgtttgctgctgctc	ggaacacgggctggaagcgac	63	30
<u>RM5509</u>	6	tgatccatgcttggcc	ccagcagaaagaagacgc	53	35
<u>RM11</u>	7	tctcctctccccgatc	atagcggggcaggcttag	55	30
<u>RM125</u>	7	atcagcagccatggcagcgacc	aggggatcatgtgccgaaggcc	63	30
<u>RM455</u>	7	aacaaccaccacctgtctc	agaaggaaaaggctcgtatc	57	30
<u>RM25</u>	8	ggaaagaatgatctttcatgg	ctaccatcaaaaccaatgttc	53	40
<u>RM284</u>	8	atctctgatactccatccatcc	cctgtacgtgatccgaagc	55	30
<u>RM408</u>	8	caacgagctaactccgtcc	actgctactggtagctgacc	55	30
<u>RM447</u>	8	ccctgtgctgtctcctctc	acgggctcttctcctctc	55	30
<u>RM215</u>	9	caaaatggagcagcaagagc	tgagcacctcctctctgtag	55	30
<u>RM316</u>	9	ctagttggcatacagatggc	acgcttatatgttacgtcaac	55	30
<u>RM105</u>	9	gtcgtcgaccatcggagccac	tggtcgaggtggggatcgggtc	63	30
<u>RM474</u>	10	aagatgtacgggtggcattc	tatgagctggtgagcaatgg	55	30
<u>RM484</u>	10	tctcctcctcaccatgtc	tgctgccctctctctctc	55	30
<u>RM552</u>	11	cgcagttgtgatttcagtg	tgctcaacgcttgactgtcc	55	30
<u>RM536</u>	11	tctcctcttgttggctc	acacaccaacacgaccacac	55	30
<u>RM287</u>	11	ttccctgtaagagagaaatc	gtgtatttgggaaagcaac	55	30
<u>RM19</u>	12	caaaaacagagcagatgac	ctcaagatggacccaaga	55	30
<u>RM277</u>	12	cggcaaatcatcacctgac	caaggcttgaagggaag	55	30

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN:

ADN lá non của các dòng/ giống lúa được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) của Doyle et al. năm 1987 (có cải tiến theo Phòng thí nghiệm của JICA-JST):

Mẫu lá được nghiền nhỏ bằng máy Multi Bead-Shocker, thêm 700µl dung dịch đệm CTAB 2X. Ủ mẫu ở 65°C trong 90 phút, 15 phút lắc đều một lần. Bổ sung 500µl dung dịch CIA (Chloroform: Isoamylalcohol) tỷ lệ 24:1, trộn đều và lắc trong 30 phút. Ly tâm với 1400 vòng/phút trong 20 phút. Chuyển dịch nổi sang tube 2ml

mới, thêm 500µl dung dịch CIA, ly tâm với tốc độ 1400vòng/phút trong 20 phút. Hút dịch nổi sang tube 2ml mới, bổ sung isopropanol rồi giữ mẫu trong ngăn mát tủ lạnh 15 phút. Ly tâm ở 4°C trong 15 phút, tốc độ 1400 vòng/phút, để thu kết tủa. Tiếp tục bổ sung 500µl ethanol 70%, ly tâm 1400 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu kết tủa. Để khô ADN và bảo quản mẫu trong 50µl dung dịch TE 0,1X.

Phản ứng PCR:

Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 10µl hỗn hợp gồm 1µl ADN mẫu; 2µl H₂O; 5µl PCR Master Mix 2x; 2µl môi. Nồng độ ADN mẫu là 10ng và nồng độ môi là 1uM. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR như sau: (1) 95°C trong 3 phút, (2) 94°C trong 30 giây, (3) 53°C trong 30 giây, (4) 72°C trong 30 giây, 30 chu kỳ lặp lại từ (2) đến (4); (5) 72°C trong 7 phút và sau đó được giữ lạnh ở 4°C.

Điện di:

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 4% ở 250V, I = 400 mA, thời gian 50 phút trong dung dịch đệm 0,5X TBE (Tris - Bore - EDTA). Sau đó gel được nhuộm trong ethidium bromide 0,5g/ml và soi dưới đèn UV và chụp ảnh. Các băng trên gel được xác định: xuất hiện (đánh số 1), không xuất hiện (đánh số 0).

Xác định hàm lượng anthocyanin:

Sử dụng phương pháp pH vi sai, đo bằng máy quang phổ UV 2550. Công thức tính hàm lượng anthocyanin:

$$a = \frac{A.M.K.10^3}{\epsilon.l} (mg/L)$$

Trong đó:

$$A = (A_{\max, \text{pH}=1} - A_{700\text{nm}, \text{pH}=1}) - (A_{\max, \text{pH}=4,5} - A_{700\text{nm}, \text{pH}=4,5})$$

Với A_{max}, A_{700nm}: Độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và 700nm, ở pH = 1 và pH=4,5; a: Lượng anthocyanin; M: Khối lượng phân tử của anthocyanin (g/mol) l: Chiều dày cuvet (cm); K: Độ pha loãng; V: Thể tích dịch chiết; ε: 26900.

Xử lý số liệu:

Hàm lượng thông tin đa hình (PIC-Polymorphic Information Content) được tính toán theo phương pháp của Weir (1996).

$$PIC(i) = 1 - \sum P_{ij}^2$$

Trong đó: P_{ij} là tần xuất alen thứ j với locus SSR thứ i. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

Xác định hệ số tương đồng di truyền Jaccard, xây dựng sơ đồ hình cây để so sánh hệ số tương đồng của 46 mẫu giống dựa theo phương pháp UPGMA trong NTSYS 2.1.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự đa hình các chỉ thị SSR với 46 dòng/ giống lúa cẩm

Kết quả thu được dựa trên sự phân tích 46 dòng/ giống lúa cẩm sử dụng chỉ SSR cho đa hình được trình bày ở bảng 3:

Trong 35 chỉ thị sử dụng trong thí nghiệm có 9 chỉ thị RM 312, RM 452, RM 338, RM RM 124, RM 334, RM 133, RM 455, RM 105, RM 474 không xuất hiện băng ADN. 26 chỉ thị thể hiện trạng thái đa hình.

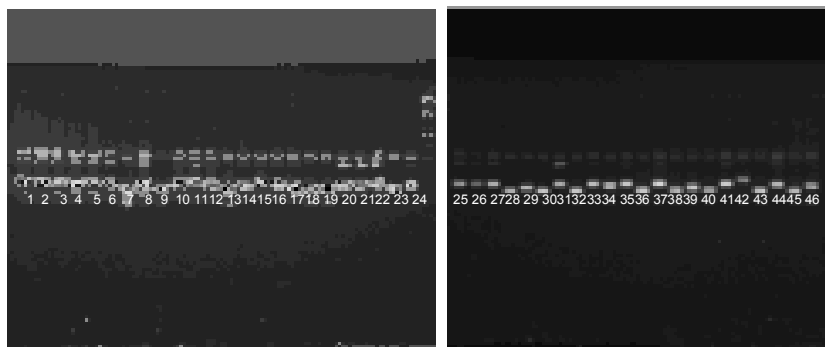
Số liệu bảng 3 cho thấy, số lượng alen khác nhau giữa các locus. Trong tổng số 35 chỉ thị SSR sử dụng trong nghiên cứu, có 26 (74,3%) chỉ thị cho đa hình với tổng cộng 68 alen. Số lượng alen dao động từ 2 đến 5 alen, cặp môi OSR13 cho 5 alen, có 4 cặp môi cho 4 alen (RM154, RM215, RM552) (Hình 1), 7 cặp môi cho 3 alen (RM413, RM122, RM454, RM162, RM5509, RM1, RM316, RM484) và 13 cặp môi còn lại cho 2 alen, giá trị trung bình là 2,62 alen/locus. Số lượng alen trung bình trên một locus thấp hơn so với các nghiên cứu trước đây như: 5,45; 3,6 tương ứng của các tác giả Trần Thị Lương và cs. (2013); Trần Danh Sửu và cs. (2011).

Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) của 26 chỉ thị SSR dao động từ 0,08 đến 0,74, trung bình đạt 0,46. Các chỉ thị có hệ số PIC lớn hơn hoặc bằng 0,5 sẽ cho sự phân biệt cao về tỷ lệ đa hình của chỉ thị đó (DeWoody et al., 1995). Kết quả thí nghiệm này thấp hơn so với một số nghiên cứu trước đây về lúa chất lượng như Lapitan et al.(2007) đánh giá mức độ đa dạng nguồn gen của các giống lúa chất lượng ở Philippin với hệ số PIC trung bình là 0,68; Ravi et al.(2003), Jain et al.(2004) cũng chỉ ra hệ số PIC trung bình là 0,48, 0,51; Shaptadvipa et al. (2009), Borba et al.(2009), Upadhyay et al.(2011) với hệ số PIC lần lượt là: 0,923; 0,75;

0,78. Trong thí nghiệm này hệ số PIC đạt cao hơn của Trần Danh Sửu (2008) và nghiên cứu đa dạng so với các nghiên cứu đa dạng về lúa tám (0,35) lúa temperate japonica (0,37) (Garris et al., 2005).

Bảng 3. Số alen và hệ số PIC của 35 cặp mỗi SSR

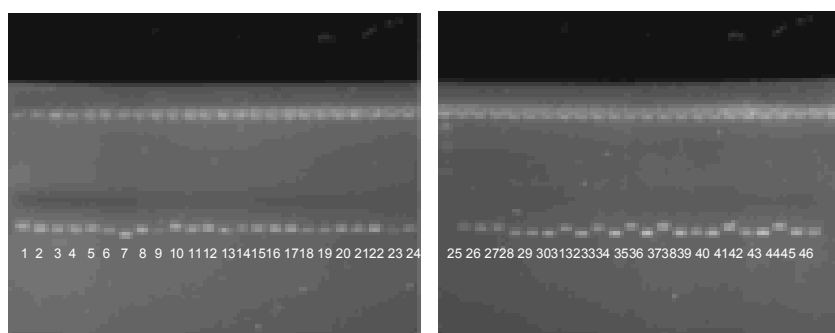
TT	Chỉ thị SSR	NST	Hệ số đa dạng		
			Tổng số alen	Số alen đa hình	PIC
1	<u>RM259</u>	1	2	2	0,42
2	<u>RM283</u>	1	2	2	0,48
3	<u>RM312</u>	1	0	0	-
4	<u>RM5</u>	1	2	2	0,26
5	<u>RM154</u>	2	4	4	0,54
6	<u>RM452</u>	2	0	0	-
7	<u>RM514</u>	3	2	2	0,34
8	<u>RM338</u>	3	0	0	-
9	<u>OSR13</u>	3	5	4	0,58
10	<u>RM307</u>	4	2	2	0,24
11	<u>RM124</u>	4	0	0	-
12	<u>RM413</u>	5	3	3	0,33
13	<u>RM334</u>	5	0	0	-
14	RM122	5	3	3	0,53
15	<u>RM454</u>	6	3	3	0,40
16	<u>RM162</u>	6	3	3	0,46
17	<u>RM133</u>	6	0	0	-
18	RM5509	6	3	3	0,59
19	<u>RM11</u>	7	3	3	0,53
20	<u>RM125</u>	7	2	2	0,08
21	<u>RM455</u>	7	0	0	-
22	<u>RM25</u>	8	2	1	0,47
23	<u>RM284</u>	8	2	2	0,48
24	<u>RM408</u>	8	2	2	0,45
25	<u>RM447</u>	8	3	3	0,66
26	<u>RM215</u>	9	4	4	0,74
27	<u>RM316</u>	9	3	3	0,55
28	<u>RM105</u>	9	0	0	-
29	<u>RM474</u>	10	0	0	-
30	<u>RM484</u>	10	3	3	0,48
31	<u>RM552</u>	11	4	4	0,58
32	<u>RM536</u>	11	2	2	0,50
33	<u>RM287</u>	11	2	2	0,36
34	<u>RM19</u>	12	2	2	0,45
35	<u>RM277</u>	12	2	2	0,47



Hình 1. Sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với cặp mồi RM154



Hình 2. Sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với cặp mồi RM162



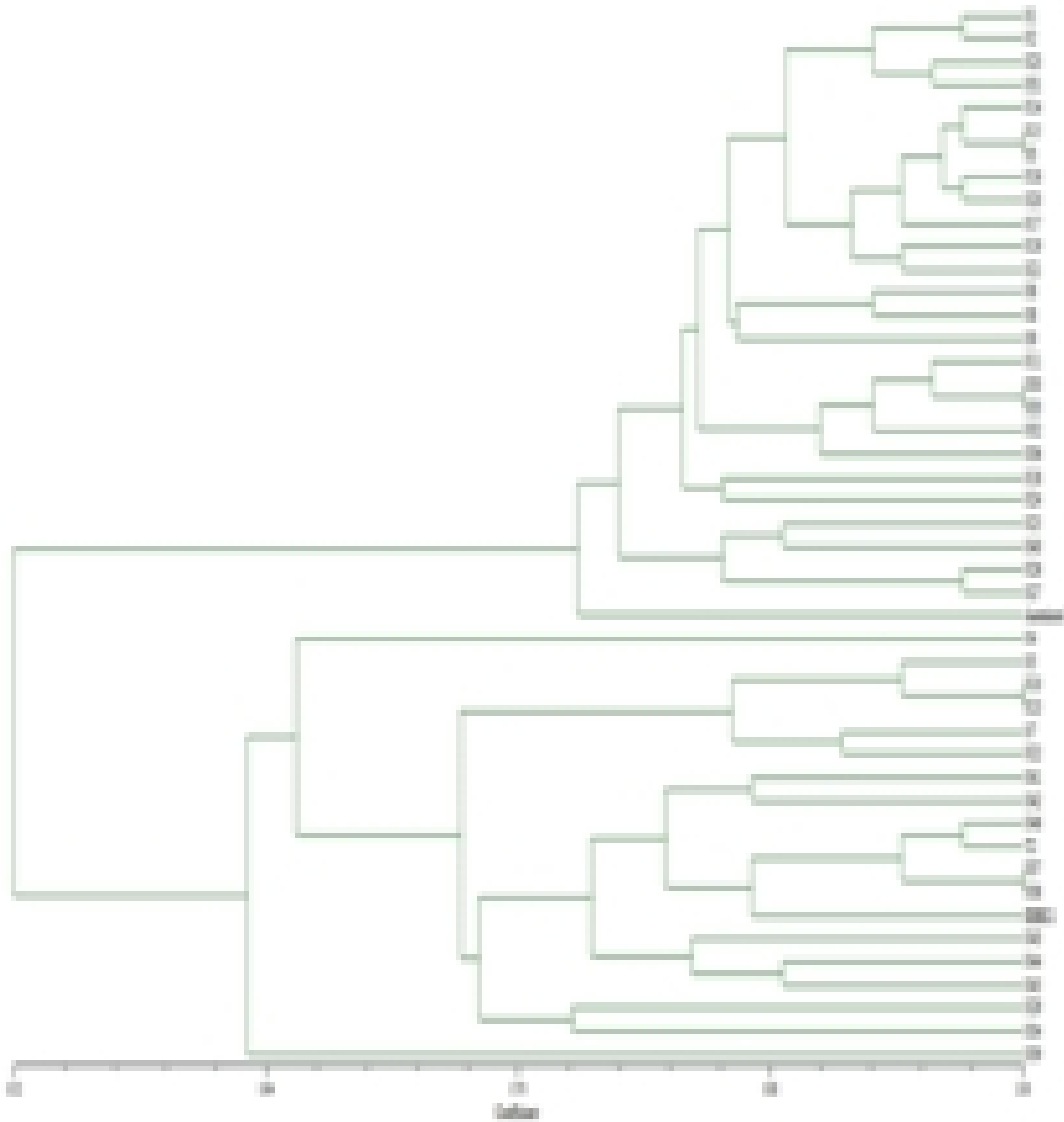
Hình 3. Sản phẩm PCR của các mẫu giống lúa nghiên cứu với cặp mồi RM259

Ghi chú: 1- N1; 2- N14; 3- N2; 4- N15; 6- N16; 7- N4; 8- N17; 9- N5; 10- N18; 11- N6; 12- N19; 13- N7; 14- N20; 15- N8; 16- N21; 17- N9; 18- N22; 19- N10; 20- N23; 21- N11; 22- N24; 23- N13; 24- N25; 26- N40; 27- N27; 28- N41; 29- N29; 30- N42; 31- N30; 32- N43; 33- N31; 34- N44; 35- N32; 36- N45; 37- N33; 38- N46; 39- N34; 40- T2; 41- N36; 42- IRBB21; 43- N37; 44- Asominori; 45- N38; 46- N39.

3.2. Quan hệ di truyền giữa các giống lúa cẩm nghiên cứu

Quan hệ di truyền giữa các giống lúa nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm NTSYS 2.1, từ đó xác định hệ số tương đồng di truyền và cây di truyền về các giống lúa (Hình 4). Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,52

đến 1,0. Sơ đồ hình cây cho thấy 46 dòng/ giống lúa cẩm phân thành 2 nhóm rõ rệt: Nhóm I gồm 26 giống lúa nếp cẩm và giống Asominori (lúa Japonica) có nguồn gốc Nhật Bản, giống này tách biệt với các giống địa phương, nhóm II gồm 18 giống lúa nếp cẩm và tẻ cẩm và giống IRBB21 (lúa Indica).



Hình 4. Phân nhóm di truyền của 46 dòng/giống lúa cẩm dựa trên phân tích ADN với 26 chỉ thị phân tử SSR

Nhóm I: ở mức tương đồng di truyền 78% phân thành 2 nhóm phụ: nhóm I.1 gồm 26 lúa nếp cẩm có hệ số tương đồng dao động từ 0,79 đến 1,0; hai giống có hệ số tương đồng thấp nhất là N18 và N24, bốn giống có hệ số tương đồng cao nhất là N15, N3, N30, N33. Nhóm phụ I.1 đều là các giống nếp cẩm địa phương của Việt Nam. Nhóm phụ I.2 chỉ có 1 giống là Asominori có nguồn gốc Nhật Bản.

Nhóm II: ở mức tương đồng 62% phân thành hai nhóm phụ: nhóm II.2: gồm 17

dòng/giống thuộc lúa *Indicacó* hệ số tương đồng dao động từ 0,77 đến 1,0. Hai giống có hệ số tương đồng thấp nhất là N39 và N24, hai giống có hệ số tương đồng cao nhất là N10 và N13. Nhóm phụ II.2 chỉ có 1 giống là N39.

Giống N3 và N15, N30 và N33 là các giống nếp cẩm địa phương có hệ số tương đồng bằng 1, có thể coi là cùng một giống nhưng được thu thập ở địa phương khác nhau.

Như vậy, sơ đồ quan hệ di truyền của 46 dòng/giống lúa nghiên cứu có mức độ tương đồng

khá cao. Đa phần các giống lúa nếp cấy địa phương nghiên cứu đều thuộc nhóm lúa *Japonica*. Còn lại các dòng tế cấy và một số ít lúa nếp cấy thuộc lúa *Indica*.

3.3. Hàm lượng Anthocyanine trong các dòng/giống lúa cấy nghiên cứu

Anthocyanin là một trong những chất rất quan trọng trong lúa cấy. Vì vậy, để giúp cho công tác chọn giống lúa cấy có hàm lượng anthocyanin cao thí nghiệm này đã xác định hàm lượng anthocyanin trong nguồn vật liệu nghiên cứu. Kết quả ở bảng 4.

Qua bảng 4 cho thấy, các giống có hàm lượng anthocyanin cao nhất là N20, N18, N16, N4, N22 và N14. Các dòng/giống ở nhóm I có hàm lượng anthocyanin cao hơn so với nhóm II. Nhóm II tập chung chủ yếu là các giống tế cấy nên có hàm lượng anthocyanin thấp hơn so với nhóm I là các giống nếp cấy địa phương.

3.4. Kết quả đánh giá một số tính trạng nông sinh học

Qua bảng 5 cho thấy, các dòng/giống thuộc nhóm I của cây di truyền có tỷ lệ D/R hạt thóc và D/R hạt gạo thấp hơn so với các dòng/ giống thuộc nhóm II của cây di truyền. Kết quả này phù hợp với đặc điểm của hai nhóm lúa *Japonica* và lúa *Indica*.

Kết quả cũng cho thấy nhóm I của cây di truyền có thời gian sinh trưởng dài hơn so với nhóm II, nhóm I tập trung chủ yếu các giống lúa nếp cấy địa phương. Còn về chiều cây cuối cùng các giống lúa cấy địa phương có chiều cao cây cao hơn so với các dòng/giống thuộc nhóm I (lúa *Indica*).

Như vậy, các kết quả về một số đặc điểm nông sinh học cũng tương ứng với phân nhóm về quan hệ di truyền thông qua phân tích ADN bằng chỉ thị phân tử SSR.

Bảng 4. Hàm lượng anthocyanin trong các dòng/giống lúa cấy nghiên cứu

Ký hiệu	Hàm lượng anthocyanin (%)	Ký hiệu	Hàm lượng anthocyanin (%)
N1	0,1800	N29	0,0461
N10	0,2520	N3	0,1567
N13	0,0360	N31	0,0693
N14	0,2843	N32	0,1920
N15	0,1126	N33	0,1379
N16	0,3253	N37	0,0448
N17	0,1443	N38	0,0044
N18	0,2879	N39	0,0556
N19	0,0630	N4	0,2805
N20	0,3791	N40	0,0053
N21	0,0637	N42	0,0685
N22	0,2751	N44	0,0521
N23	0,1440	N45	0,1404
N24	0,0327	N46	0,0409
N25	0,0024	N6	0,0131
N26	0,1408	N7	0,0765
N27	0,0940	N8	0,1948
N9	0,2008		

Bảng 5. Một số đặc điểm tính trạng của các dòng/giống lúa cảm nghiên cứu

Dòng	Dài hạt thóc (mm)	Rộng hạt thóc (mm)	D/R hạt thóc	Dài hạt gạo (mm)	Rộng hạt gạo (mm)	D/R hạt gạo	Chiều cao cây (cm)	TGST (ngày)
	TB ± STD	TB ± STD	TB ± STD	TB ± STD	TB ± STD	TB ± STD		
N1	9,22 ± 0,1	3,26 ± 0,2	2,82	7,05 ± 0,1	3,65 ± 0,1	1,93	134,7	145
N2	9,86 ± 0,1	3,58 ± 0,1	2,75	7,68 ± 0,1	3,32 ± 0,1	2,31	135,2	141
N3	8,68 ± 0,2	3,63 ± 0,2	2,39	6,91 ± 0,1	3,12 ± 0,1	2,21	121,8	140
N4	9,22 ± 0,1	3,14 ± 0,1	2,94	7,06 ± 0,1	2,63 ± 0,1	2,69	169,8	128
N5	7,25 ± 0,1	2,93 ± 0,1	2,48	5,62 ± 0,2	2,81 ± 0,1	2,00	133,2	128
N6	9,42 ± 0,1	2,68 ± 0,1	3,51	6,80 ± 0,1	1,95 ± 0,1	3,48	144,1	124
N7	7,85 ± 0,0	3,05 ± 0,1	2,57	6,05 ± 0,1	2,55 ± 0,1	2,38	130,5	117
N8	9,28 ± 0,1	2,32 ± 0,1	4,00	7,45 ± 0,1	2,67 ± 0,0	2,79	139,7	135
N9	8,79 ± 0,2	3,39 ± 0,3	2,59	6,43 ± 0,1	2,35 ± 0,1	2,74	101,5	142
N10	9,08 ± 0,1	3,73 ± 0,0	2,43	7,12 ± 0,1	3,28 ± 0,0	2,17	122,5	120
N11	9,42 ± 0,2	3,04 ± 0,3	3,10	6,65 ± 0,2	2,25 ± 0,1	2,96	118,1	123
N13	7,12 ± 0,1	2,73 ± 0,1	2,61	5,48 ± 0,2	2,41 ± 0,2	2,27	126,0	125
N14	9,41 ± 0,2	3,53 ± 0,1	2,67	7,23 ± 0,1	2,96 ± 0,1	2,45	118,4	123
N15	9,41 ± 0,2	3,50 ± 0,1	2,69	7,62 ± 0,0	3,08 ± 0,0	2,47	166,6	128
N16	9,47 ± 0,1	3,62 ± 0,1	2,62	7,44 ± 0,1	3,07 ± 0,1	2,42	113,6	123
N17	7,95 ± 0,0	3,18 ± 0,0	2,50	6,44 ± 0,0	2,52 ± 0,0	2,56	149,9	128
N18	8,64 ± 0,1	3,50 ± 0,1	2,47	6,53 ± 0,2	2,93 ± 0,1	2,23	113,4	137
N19	9,97 ± 0,1	3,61 ± 0,4	2,76	7,72 ± 0,2	3,03 ± 0,1	2,55	134,8	139
N20	9,42 ± 0,0	3,24 ± 0,0	2,91	7,13 ± 0,0	2,85 ± 0,0	2,50	132,8	123
N21	8,50 ± 0,1	3,15 ± 0,2	2,69	6,73 ± 0,2	2,72 ± 0,1	2,47	124,7	141
N22	8,08 ± 0,1	2,97 ± 0,1	2,72	6,13 ± 0,2	2,15 ± 0,2	2,86	140,1	127
N23	9,82 ± 0,1	3,42 ± 0,1	2,87	7,18 ± 0,1	2,67 ± 0,1	2,69	137,7	123
N24	9,62 ± 0,2	3,27 ± 0,1	2,94	7,25 ± 0,1	2,68 ± 0,1	2,71	120,9	134
N25	10,23 ± 0,2	3,53 ± 0,2	2,90	7,58 ± 0,2	2,75 ± 0,1	2,76	125,5	137
N26	9,31 ± 0,1	3,57 ± 0,1	2,61	7,22 ± 0,1	2,97 ± 0,1	2,43	147,3	132
N27	9,51 ± 0,1	3,47 ± 0,0	2,74	7,28 ± 0,0	2,98 ± 0,1	2,44	126,3	138
N29	7,50 ± 0,1	3,16 ± 0,1	2,37	5,59 ± 0,1	2,78 ± 0,1	2,01	141,8	143
N30	9,42 ± 0,2	3,63 ± 0,1	2,59	7,33 ± 0,2	3,06 ± 0,1	2,40	120,4	146
N31	9,25 ± 0,1	3,45 ± 0,1	2,64	6,52 ± 0,1	2,66 ± 0,1	2,45	149,2	127
N32	8,25 ± 0,1	3,23 ± 0,1	2,55	6,70 ± 0,1	2,98 ± 0,1	2,25	158,7	129
N33	8,92 ± 0,1	3,44 ± 0,1	2,59	6,73 ± 0,1	2,97 ± 0,1	2,27	151,1	122
N34	9,42 ± 0,0	3,24 ± 0,0	2,91	7,13 ± 0,0	2,85 ± 0,0	2,50	112,4	117
N36	8,50 ± 0,1	3,15 ± 0,2	2,69	6,73 ± 0,2	2,72 ± 0,1	2,47	110,5	118
N37	9,16 ± 0,2	3,15 ± 0,1	2,91	6,94 ± 0,1	2,57 ± 0,1	2,70	108,3	119
N38	8,15 ± 0,2	3,07 ± 0,1	2,65	6,24 ± 0,1	2,41 ± 0,1	2,59	112,6	110
N39	8,94 ± 0,3	2,56 ± 0,3	3,50	6,52 ± 0,3	2,22 ± 0,1	2,89	106,4	100
N40	9,01 ± 0,1	3,75 ± 0,1	2,41	7,08 ± 0,1	3,28 ± 0,1	2,16	143,0	123
N41	8,63 ± 0,1	2,55 ± 0,1	3,39	6,94 ± 0,1	1,87 ± 0,1	3,70	114,7	125
N42	9,40 ± 0,1	2,51 ± 0,1	3,74	6,49 ± 0,2	2,17 ± 0,2	2,99	106,5	117
N43	9,30 ± 0,2	2,56 ± 0,1	3,63	7,52 ± 0,2	2,19 ± 0,1	3,43	94,8	116
N44	10,34 ± 0,0	2,69 ± 0,1	3,85	7,12 ± 0,1	2,16 ± 0,1	3,30	111,2	116
N45	9,00 ± 0,1	2,72 ± 0,1	2,53	6,77 ± 0,1	2,31 ± 0,1	2,94	103,1	118
N46	9,18 ± 0,2	2,71 ± 0,2	3,39	6,57 ± 0,1	2,36 ± 0,1	2,79	107,5	117

4. KẾT LUẬN

Trong số 35 chỉ thị SSR sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền của 46 dòng/giống lúa cẩm thì có 26 chỉ thị cho đa hình với tổng số là 68 allel đa hình chiếm tỷ lệ trung bình 2,62 allel trên một locus. Hệ số đa dạng di truyền (PIC) dao động từ 0,08 đến 0,74 với giá trị trung bình là 0,46.

Kết quả phân tích chia thành 2 nhóm lớn, hầu hết các giống lúa nếp cẩm địa phương thuộc lúa *Japonica*.

Giống N20, N18, N16, N4, N22 và N14 cho hàm lượng chất Anthocyanin cao nhất.

Các đo đếm trên một số tính trạng nông sinh học của các dòng/giống lúa cẩm nghiên cứu cũng chia ra làm hai nhóm chính tương ứng với hai nhóm ở cây di truyền.

Các số liệu thu được trong nghiên cứu này cung cấp những thông tin quan trọng cho công việc nghiên cứu chọn tạo giống lúa chất lượng và đặc sản bằng phương pháp chỉ thị phân tử.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về các thiết bị của phòng thí nghiệm Dự án JICA-JST, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Borba T. C. O., Brondani R. P., Rangel P. H., Brondani C. (2009). Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA rice core collection genetic diversity. *Genetica*, 137(3): 293-304.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.

Fangli Houa, Ruifen Zhanga, Mingwei Zhanga, Dongxiao Sua, Zhencheng Weia, Yuanyuan Denga, Yan Zhanga, Jianwei Chia, Xiaojun Tanga (2013). Hepatoprotective and antioxidant activity of anthocyanins in black rice bran on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Journal of functional food* 5: 1705- 1713.

Garris J. Amanda, Thomas H. Tai, Jason Cburn, Steve Kresovich and Susan McCouch (2005). Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169: 1631-1638.

Gema Pereira-Caro, Shin Watanabe, Alan Crozier, Tatsuhito Fujimura, Takao Yokota, Hiroshi Ashihara (2013). Phytochemical profile of a Japanese black-purple rice. *Food Chemistry* 141: 2821-2827.

Lapitan C. V., Darshan S. B., Toshinori A., Redona D. E. (2007). Assessment of genetic diversity of Philippine rice cultivars carrying good quality traits using SSR markers. *Breed. Sci.*, 57: 263-270.

Ma H., Yin Y., Guo Z. F., Cheng L. J., Zhang L., Zhong M., Shao G. J. (2011). Establishment of DNA finger printing of Liaojing series of japonica rice. *MEJSR.*, 8(2): 384-392.

Powel W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. (1996). Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.*, 2(3): 225-238.

Ravi M., Geethanjali S., Sameeyafarheen F., Maheswaran M (2003). Molecular Marker based Genetic Diversity Analysis in Rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, 133: 243-252

Shaptadvipa B., Sarma N. R. (2009). Study on Apparent Amylose Content in Context of Polymorphism Information Content along with Indices of Genetic Relationship Derived through SSR Markers in Birain, Bora and Chokuwa Groups of Traditional Glutinous Rice (*Oryza sativa* L.) of Assam. *Asian J. Biochem.*, 4: 45-54.

Trần Danh Sứu, Nguyễn Thị Lan Hoa, Hà Minh Loan, Ngô Kim Hoài, Nguyễn Thị Vân Anh, Vũ Mạnh Hải (2010). Nghiên cứu đa dạng di truyền lúa nếp địa phương ở các tỉnh đồng bằng Bắc bộ bằng chỉ thị SSR. Kết quả nghiên cứu khoa học và công nghệ 2006 - 2010. Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

Trần Thị Lương, Lưu Minh Cúc, Nguyễn Đức Thành (2013). Phân tích quan hệ di truyền của một số giống lúa đặc sản, chất lượng, trồng phổ biến ở Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR. *Tạp chí sinh học*, số 35, trang 348- 356.

Upadhyay P., Singh V. K., Neeraja C. N. (2011). Identification of genotype specific alleles and molecular diversity assessment of popular rice (*Oryza sativa* L.) varieties of India. *Int. J. Plant Breed. Genet.*, 5(2): 130-140.

Weir B.S. (1996). *Genetic data analysis II*, 2nd ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates: 377.

Xu J. L., H. R. Lafitte, Y. M. Gao, B. Y. Fu, R. Torres, Z. K. Li (2005). QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theoretical Applied Genetics* 111, 1642 - 1650. accessed at http://archive.gramene.org/markers/microsat/50_ssr.html.