

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT RAPD ĐỂ PHỤC TRÁNG GIỐNG LÚA ĐỊA PHƯƠNG (HÈO NÚP) PHỤC VỤ SẢN XUẤT Ở VÙNG ĐÀM PHÁ TAM GIANG - THỪA THIÊN - HUẾ

Trần Thị Lệ¹, Nguyễn Ngọc Truyền²,
Trần Thị Hoàng Đông², Hồ Công Hưng²

TÓM TẮT

Hèo Núp là giống lúa địa phương, được trồng dọc theo phá Tam Giang ở các xã thuộc huyện Quảng Điền và Phú Vang, Thừa Thiên - Huế. Là giống lúa mặc dù năng suất không cao, nhưng có khả năng thích ứng tốt với vùng đất ngập úng và mặn. Do trồng trọt từ lâu đời nên giống đã bị thoái hóa, lẫn tạp nhiều với các giống địa phương khác như giống Hèo Chùm, giống Nước Mặn, ... Vì vậy, vấn đề đặt ra rất cấp thiết là phục tráng giống này để phục vụ cho sản xuất và bảo tồn đa dạng nguồn gen cây lúa. Mẫu giống được thu thập ở Quảng Lợi, Quảng Điền là giống Hèo Núp, đã được chọn lọc trên đồng ruộng có sự tham gia của các nông hộ sản xuất. Sau khi gieo trồng ở năm thứ nhất đã chọn lựa được 100 cây theo đặc điểm của giống. Ở năm thứ hai gieo 50 dòng để đánh giá dòng lần thứ nhất, đã chọn được 13 dòng có độ đồng đều cao nhất về một số chỉ tiêu chính (chiều cao cây, số hạt/bông, thời gian trổ). Để rút ngắn thời gian phục tráng và đạt độ chính xác cao, đã tiến hành phân tích hệ gen bằng phương pháp RAPD. Kết quả đã chọn được 7 dòng đạt độ đồng nhất di truyền cao nhất (100%). Bài báo này giới thiệu kết quả ứng dụng kỹ thuật RAPD để phân tích các dòng đã được lựa chọn sau 2 vụ đánh giá trên đồng ruộng.

Từ khóa: Phục tráng giống, Hèo Núp, ADN đa hình phóng đại ngẫu nhiên (RAPD), giống lúa địa phương, phá Tam Giang.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với nhiều vùng khác trên cả nước, ở Thừa Thiên - Huế, một dải đất miền Trung thường chịu nhiều bất lợi của điều kiện tự nhiên, năng suất của cây trồng chưa cao. Hiện nay, đã có nhiều giống lúa cho năng suất cao nhưng chưa thích ứng được với điều kiện sinh thái của vùng nên khả năng chống chịu và năng suất thấp hơn tiềm năng của giống, trong khi đó một số giống lúa địa phương lại đáp ứng được yêu cầu đó. Tuy nhiên, do được trồng từ lâu nên các giống lúa địa phương thường bị lẫn tạp, thoái hóa. Với lý do trên đề tài "Phục tráng giống lúa địa phương Hèo Núp ở Thừa Thiên - Huế" đã được thực hiện để phục vụ cho sản xuất, đồng thời duy trì bảo tồn nguồn gen quý đang có nguy cơ bị mất hẳn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa địa phương (Hèo Núp) đã được tuyển lựa bởi các nông hộ xã Quảng Lợi, Quảng Điền, Thừa Thiên - Huế. Giống Hèo ký hiệu là H1 (nguồn nhập: Phong Chương, Phong Điền, Thừa Thiên - Huế và giống Hèo (nguồn nhập: Đại học Nông lâm Huế) được cung cấp từ Trung tâm Tài nguyên Thực vật,

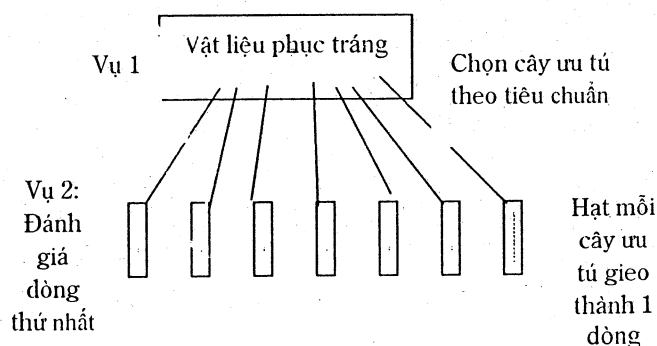
Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam để so sánh trong phân tích RAPD (random amplified polymorphic DNA - ADN đa hình phóng đại ngẫu nhiên).

2. Phương pháp nghiên cứu

Phục tráng giống lúa theo quy trình của Viện Nghiên cứu Lúa - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội [3].

Năm thứ nhất: Vụ đông xuân 2007-2008 gieo 250 m² giống lúa Hèo Núp đã được tuyển lựa, chọn được 100 cây theo đặc điểm của giống.

Năm thứ hai: Vụ đông xuân 2008-2009: Gieo 50 dòng để đánh giá dòng lần thứ nhất.



¹PGS.TS. ² Trường Đại học Nông lâm Huế.

Thí nghiệm được tiến hành trên đất độc canh lúa. Bố trí thí nghiệm theo các dòng, không nhắc lại, mỗi dòng theo đôi 10 cây.

Ở vụ 1 và vụ 2 đã đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và khả năng chống chịu sâu, bệnh và khả năng thích ứng, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của các dòng lúa thí nghiệm.

Phương pháp RAPD: ADN được tách chiết từ lá lúa non của 13 dòng (4, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 và 24) và 2 giống (H1 và H2) theo phương pháp của Ahmed và cs (2009) có cải tiến [8].

Phân tích chất lượng các dòng sau khi phục tráng: Xác định hàm lượng protein tổng số theo phương pháp Bradford, độ bền gel, hàm lượng amyloza và độ trở hồ.

9 primers ngẫu nhiên đã được sử dụng để khuếch đại ADN các mẫu lá lúa theo phương pháp của Rao và cs (2009). Tên và trình tự các primer như sau:

A09: AGAATTGGACGA; A26: GGTGAGGATTCA; A31: GGTGGTGGTATC; A39: CCTGAGGTA ACT; B71: GGACCTCCATCG; E01: CCCAAGGTCC; E07: AGATGCAGCC; F04: GTGACATGCC; F07: AGATGCAGCC

Khuếch đại PCR (Polymerise chain reaction - Phản ứng chuỗi trùng hợp) theo quy trình: 94°C/5 phút; 46 chu kỳ gồm: 94°C/30 giây; 35°C/30 giây; 72°C/2 phút và cuối cùng 72°C/5 phút. Điện di sản phẩm PCR-RAPD trên gel và nhuộm bằng Ethidium bromua [9].

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Microsoft Office Excel và phần mềm statistic.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Xây dựng tiêu chuẩn phục tráng giống Hèo Núp

Nguồn giống sử dụng để phục tráng là giống Hèo Núp đã được các nông hộ ở xã Quảng Lợi, Quảng Điền kết hợp với cán bộ kỹ thuật và Khoa Khuyến nông và PTNT, Đại học Nông lâm Huế tuyển chọn. Các giống hiện còn đang được gieo cấy thuộc nhóm này là nếp rần, hèo rần, chùm dàu, nước mặn, hèo núp.

Đặc điểm chung của các giống này là có thời gian sinh trưởng tương đối dài, hầu hết trên 150 ngày; ít chịu phân, cao cây, khả năng chống đổ kém, năng suất thường đạt thấp, trung bình khoảng 30 tạ/ha. Đặc biệt, các giống lúa địa phương có những

đặc điểm thích nghi tốt với điều kiện canh tác của vùng như khả năng chống chịu cao (chịu phèn, mặn, úng...), ít sâu bệnh, chi phí đầu tư thấp, chất lượng gạo trung bình.

Ở những vùng đất trũng ven phá Tam Giang thì diện tích trồng lúa địa phương tương đối nhiều do điều kiện đất đai ở đây thường xuyên bị ngập nước, nhất là nước mặn; hệ thống thủy lợi còn hạn chế. Các xã ven phá Tam Giang như Quảng Lợi, Quảng Thành (Quảng Điền), Hương Phong (Hương Trà); Phú Thành, Phú An (Phú Vang),... có các giống lúa địa phương được sử dụng chủ yếu là Hèo, Nước Mặn, Chiêm Đen, Chùm Dàu.

Bảng 1. Đặc điểm sinh học của một số giống lúa địa phương ở Thừa Thiên - Huế

Chi tiêu \ Giống	Hèo Chùm	Hèo Núp	Nước mặn
Màu sắc thân	Tím	Xanh	Xanh
Màu sắc lá	Xanh	Xanh	Xanh
Dạng khóm	Hơi xòe	Gọn	Gọn
Dạng trở	Khoe bông	Dấu bông	Khoe bông
Màu sắc hạt	Vàng sáng	Vàng sáng	Nâu sẫm
Hình dạng hạt	Thon dài	Bầu tròn	Bầu, có râu
Góc độ lá dòng	70°-90°	10°-25°	20°-35°

(Nguồn: Phỏng vấn hộ gia đình, 2006)

2. Hệ số biến động của một số tính trạng nghiên cứu của các dòng lúa thí nghiệm (vụ thứ 2)

Trong công tác nghiên cứu về giống, độ đồng đều các tính trạng của các giống được các nhà chọn tạo giống đặc biệt chú ý. Hệ số biến động là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá mức độ đồng đều, ổn định các tính trạng của quần thể cây trồng và là một trong những chỉ tiêu đánh giá giống tốt hay xấu. Hệ số biến động càng nhỏ thì biểu hiện độ đồng đều càng cao và ngược lại thì độ đồng đều càng thấp. Đã tiến hành nghiên cứu một số tính trạng chủ yếu như chiều cao cây, chiều dài bông, số hạt trên bông và số hạt chắc trên bông.

- Hệ số biến động về chiều cao cây của các dòng lúa thí nghiệm nhìn chung là thấp, dao động trong khoảng 1,17-6,7%. Điều này cho thấy các dòng lúa thí nghiệm có chiều cao đã tương đối đồng đều.

- Hệ số biến động về chiều dài bông của các dòng lúa thí nghiệm khá thấp (1,48-5,26%), cao nhất là dòng 30 với hệ số biến động là 5,26%, thấp nhất là dòng 5 với hệ số biến động là 1,48%.

- Hệ số biến động về số hạt/bông của các dòng lúa biến động 3,11-9,02%. Trong đó, dòng 7 có hệ số

biến động thấp nhất là 3,11% và dòng 29 có hệ số biến động cao nhất là 9,02%.

- Hệ số biến động về số hạt chắc/bông của các dòng lúa cao hơn so với các tính trạng khác, dao động từ 2,37% đến 10,23%.

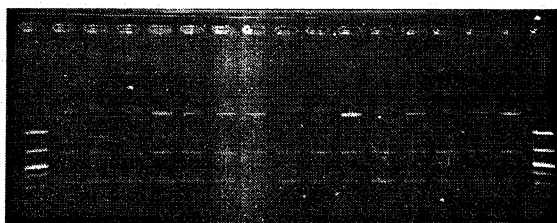
Tóm lại, hệ số biến động của các tính trạng chiều cao cây, chiều dài bông, số hạt/bông, số hạt chắc/bông nhìn chung là thấp, đa số các dòng đã đạt độ đồng đều cao.

Dựa vào hệ số biến động của một số chỉ tiêu chính đã lựa chọn được 13 dòng (4, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) để tiếp tục nghiên cứu.

3. Kết quả phân tích ADN của các dòng được tuyển chọn bằng kỹ thuật RAPD

Sản phẩm tách chiết ADN tổng số được điện di trên gel agarosa 0,8% trong thời gian là 60 phút và đo OD_{260/280} để kiểm tra chất lượng và nồng độ.

M 4 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 24 H1 H2

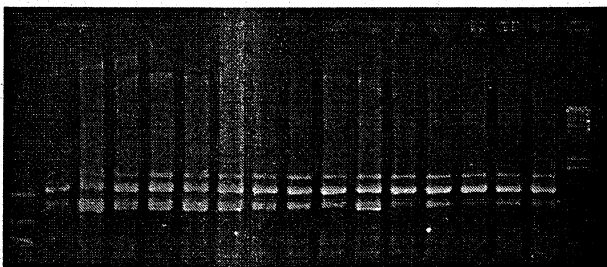


Hình 1. Hình ảnh điện di PCR-RAPD với primer A26

Nhận xét: Hầu hết ở các dòng đều xuất hiện 4 băng, có độ lớn như nhau. Băng thứ nhất > 1517 bp, băng thứ 2 < 1517 bp, băng thứ 3 khoảng 1200 bp và băng thứ 4 khoảng 800 bp, trừ dòng 4 (không có băng 2), 12, 18 và 19 (không có băng 1) và giống H1 và H2 chỉ có 3 băng (không có băng thứ 2)

M: marker: 100 bp ladder DNA:

M 4 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 24 H1 H2 M

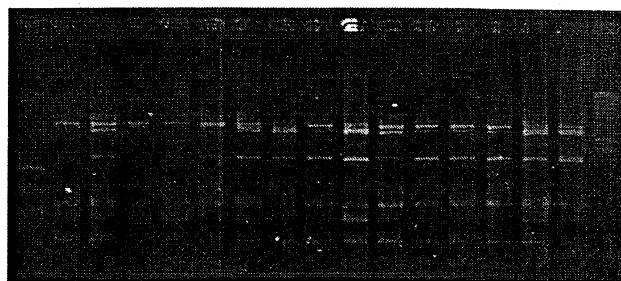


Hình 2. Hình ảnh điện di PCR-RAPD với primer A31

Nhận xét: Ở 2 giống và tất cả các dòng đều xuất hiện 3 băng, các băng này đều có độ lớn như nhau và đều nhỏ hơn 2.027 bp.

M: Lamda DNA/*EcoRI* + *HindIII*:

M 4 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 24 H1 H2 M

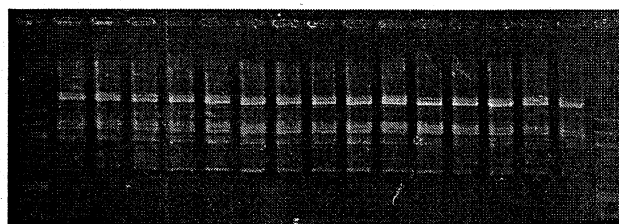


Hình 3. Hình ảnh điện di PCR-RAPD với primer A39

Nhận xét: Ở 2 giống và hầu hết các dòng đều xuất hiện số lượng băng (5) như nhau, các băng này đều có độ lớn tương đương nhau, trừ dòng số 4 (không có băng 2) và dòng 13 và 14 (không có băng 4).

M: Lamda DNA/*EcoRI* + *HindIII*:

M 4 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 24 H1 H2 M

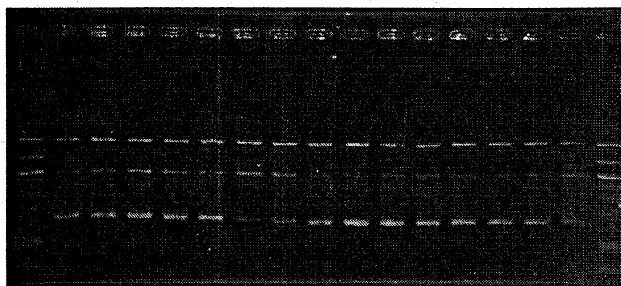


Hình 4. Hình ảnh điện di PCR-RAPD với primer B71

Nhận xét: Ở 2 giống và tất cả các dòng đều xuất hiện số lượng băng, và các băng này đều có độ lớn như nhau.

M: marker: 100 bp ladder DNA:

M 4 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 24 H1 H2 M



Hình 5. Hình ảnh điện di PCR-RAPD với primer F04

Nhận xét: Ở 2 giống và tất cả các dòng đều xuất hiện 3 băng (băng thứ 1: khoảng 1517 bp, băng thứ 2: khoảng 1000 bp và băng thứ 3: trong khoảng 600-700 bp).

M: marker: 100 bp ladder DNA

Nhận xét chung: Trong 9 primer ngẫu nhiên được sử dụng, kết quả cho thấy 7 dòng khảo sát đã có sự đồng nhất về mặt di truyền, trừ các dòng số 4, 12, 13, 14, 18 và 19. Hai giống H1 và H2 là giống nhau và có khác biệt so với 13 dòng khảo sát.

IV. KẾT LUẬN

Sau 2 vụ đánh giá dòng trên đồng ruộng và phân tích hệ gen của 13 dòng được tuyển chọn xin rút ra một số kết luận sau:

- Dựa vào đặc trưng hình thái, chiều cao cây, độ dài giai đoạn trỗ và hệ số biến động của một số chỉ tiêu chính của các dòng đã lựa chọn được 13 dòng có độ đồng đều cao nhất.

- Kết quả phân tích sự tương đồng về kiểu gen bằng kỹ thuật RAPD cho thấy 7 dòng có sự đồng nhất tuyệt đối (100%) về mặt di truyền, đó là: dòng số 15, 16, 17, 20, 21, 22 và 24. Hai giống Hèo (H1 và H2) là giống nhau và khác biệt so với tất cả các dòng khảo sát.

+ Phân tích hệ gen bằng RAPD đã rút ngắn được thời gian phục tráng giống trên đồng ruộng so với quy trình phục tráng phổ biến hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Lê Trần Bình, Đinh Kim Xuyên (2004). Đánh giá đồng đều mức độ di truyền các dòng vài thiều (*Litchi chinensis* Sonn) Thanh Hà, Hải Dương

bằng kỹ thuật RAPD. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2 (3) tr. 345-358.

[3]. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. *Kết quả bảo tồn tài nguyên di truyền nông nghiệp*. NXB Nông nghiệp Hà Nội, 2002.

[4]. Sổ tay phương pháp nghiên cứu khoa học ngành nông học. Trường Đại học Nông lâm Huế, 1998.

[5]. Trung tâm Tài nguyên Thực vật. *Các giống lúa địa phương đang phổ biến tại một số vùng sinh thái Việt Nam*. NXB Lao động, 2007.

[6]. Ahmed, I., Islam M., Arshad W., Mannan A., Ahmad W., Mirz B. (2009). High – quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *Appl. Genet.*, 50 (2), pp. 105-107.

[7]. Rao M. N., Soneji J. R., Chen C., Huang S. and Gmitter F. G. J. (2008). Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like Citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genetics & Genomics* 4, pp 113-124.

[8]. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18, pp. 6531-6535.

USING RAPD FOR RENEWING THE LOCAL RICE VARIETY (HEO NUP) SERVE RICE PRODUCTION IN TAM GIANG LAGOON THUA THIEN - HUE

Tran Thi Le, Nguyen Ngoc Truyen, Tran Thi Hoang Dong, Ho Cong Hung
Summary

Heo Nup is the local rice variety, which has been planted along Tam Giang Lagoon, in the communes of Quang Dien and Phu Vang districts. Although this variety has low grain yield, it is capable of adapting well to waterlogged and saline wetlands. This variety has low identity because of planting seeds for a long time and being mixed with other local varieties such as Heo Chum, Nuoc Man... Therefore renewing this rice variety is very important to serve rice production and diversify the conservation of rice genetic resources. Heo Nup samples, which have been collected in Quang Loi, Quang Dien, Thua Thien - Hue, have been selected on the fields with the participation of farmers. In the first year have been chosed 100 rice plants according to the standard characteristic of Heo Nup. In the second year 50 lines have been planted to evaluate the first time's line, have been selected 13 lines with the highest level based on key indicators (eg. plant height, number of seeds per flower, flowering time). To shorten the renewable time and achieve high accuracy, their genome analysis (13 lines) have been conducted by RAPD method. As a result 7 lines been chosed that have achieved at the highest genetic homogeneity (100%).

Keywords: *Renewing, local rice variety, Heo Nup, Tam Giang lagoon, random amplified polymorphic DNA (RAPD).*

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý.