

THE EVALUATION OF THE DNA POLYMORPHISM OF SOME RICE LINES REPRODUCED FROM SALT TOLERANT CALLUS

Nguyen Thi Tam^{1*}, Nguyen Manh Quynh²

¹TNU - University of Education, ²Thai Nguyen Specialized High School

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/01/2022	Based on the agronomic characteristics, results of biochemical analysis, and assessment of salt tolerance at the germination stage and the 3-leaf seedling stage, we have selected 5 rice lines derived from NaCl 0.1 M salt-tolerant callus originated from CR203. These lines have superiorly different agronomic characteristics in comparison to the original CR203 variety, which is particularly related to rice yields such as panicle length, number of filled spikelets per panicle, and spikelet size. Additionally, their growing time is shorter than the original. These lines are then analyzed their genome by RAPD technique using 10 random primers. The results show that the 10 primers all are polymorphic among 6 rice samples. These results reveal the genetic difference between the selected lines and the original CR203. The genetic difference coefficients range from 0.2406 to 0.4051. Comparing the genetic difference coefficients among the lines shows that the largest difference is between the R3.CR3 line and the R3.CR14 line, at 0.4051. The genetic distance between the selected lines and the original variety is from 0.2785 to 0.3165.
Revised: 08/4/2022	
Published: 13/4/2022	
KEYWORDS	
<i>Oryza sativa</i> L.	
RAPD maker	
Selected line	
Polymorphism	
NaCl	

ĐÁNH GIÁ SỰ ĐA HÌNH ADN CỦA MỘT SỐ DÒNG LÚA CÓ NGUỒN GỐC TỪ MÔ SẴO CHỊU MẶN

Nguyễn Thị Tâm^{1*}, Nguyễn Mạnh Quỳnh²

¹Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

²Trường Trung học phổ thông Chuyên Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 14/01/2022	Qua theo dõi đặc điểm nông học, phân tích hóa sinh và đánh giá khả năng chịu mặn ở giai đoạn hạt nảy mầm, giai đoạn mạ 3 lá, chúng tôi đã chọn được 5 dòng lúa có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mặn NaCl 0,1M giống CR203. Đây là các dòng có đặc điểm nông học sai khác và vượt trội so với giống gốc; đặc biệt là các chỉ tiêu về năng suất như chiều dài bông, số hạt chắc/bông, kích thước hạt..., có thời gian sinh trưởng ngắn hơn giống gốc. Những dòng này được sử dụng để phân tích đặc điểm hệ gen bằng kỹ thuật RAPD. Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 6 mẫu lúa bằng chỉ thị RAPD với 10 môi ngẫu nhiên cho thấy cả 10 môi đều cho đa hình các phân đoạn ADN được nhân bản. Đã có sự sai khác di truyền giữa các dòng chọn lọc với giống gốc CR203. Tỷ lệ sai khác di truyền từ 0,2406 đến 0,4051. So sánh hệ số sai khác di truyền giữa các dòng cho thấy mức chênh lệch lớn nhất ở R3.CR3 với R3.CR14 là 0,4051. Khoảng cách di truyền giữa các dòng chọn lọc và giống gốc từ 0,2785 đến 0,3165.
Ngày hoàn thiện: 08/4/2022	
Ngày đăng: 13/4/2022	
TỪ KHÓA	
Lúa	
Chỉ thị RAPD	
Dòng chọn lọc	
Đa hình	
NaCl	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5456>

* Corresponding author. Email: tamnt@tnue.edu.vn

1. Giới thiệu

Hiện nay, có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử giúp các nhà khoa học dùng để phân tích, đánh giá hệ gen sinh vật. Trong đó, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) là một kỹ thuật được đánh giá là đơn giản, dễ sử dụng cho việc nghiên cứu mối quan hệ di truyền của các giống, loài khác nhau. RAPD là kỹ thuật phân tích sự đa hình các phân đoạn ADN được nhân bản ngẫu nhiên dựa trên các nguyên tắc cơ bản của kỹ thuật PCR, do nhóm nghiên cứu của Williams và cộng sự (1990) xây dựng. Kỹ thuật RAPD sử dụng các mẫu đơn ngẫu nhiên và ngắn từ 8 đến 12 nucleotit. Mỗi có thể bám vào các vị trí có trình tự nucleotit bổ sung trên ADN khuôn. Sự đa hình các sản phẩm của RAPD là kết quả của sự thay đổi các điểm gắn của mẫu (ví dụ: đột biến điểm) hoặc do thay đổi nhiễm sắc thể trong các vùng được nhân bản (ví dụ: thêm đoạn, mất đoạn hay đảo đoạn) sẽ gây ra sự thay đổi về kích thước hay ngăn cản sự nhân bản của ADN mẫu. Do đó, các đa hình thường được nhận ra do sự có mặt hay vắng mặt của một sản phẩm nhân bản từ một locus [1]. Kỹ thuật RAPD được nhiều nghiên cứu sử dụng để phân tích hệ gen với các mục đích khác nhau, như đánh giá quần thể đột biến gen [2], đánh giá các dòng chọn lọc [3], [4]; độ mặn cảm với độc tố môi trường [5], sự đa dạng di truyền kiểu gen cây lúa [6]-[8]. Nghiên cứu khả năng chịu mặn của 30 giống lúa kết hợp với đánh giá sự đa dạng di truyền bằng kỹ thuật RAPD với 20 mẫu ngẫu nhiên và 20 cặp mẫu SSR, Nantawan Kanawapee và cộng sự (2011) đã phân làm năm nhóm với khả năng chống chịu khác nhau cùng với 161 phân đoạn RAPD và 190 alen SSR được tạo ra. Hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,82 đối với RAPD và 0,70 đối với SSR. Việc đánh giá mức độ tương đồng di truyền và phân nhóm khả năng chịu mặn cung cấp các dẫn liệu hữu ích để hỗ trợ các nhà chọn tạo giống cây trồng trong việc lựa chọn các cặp bố mẹ đa dạng về mặt di truyền phù hợp cho chương trình lai tạo [3]. Rajani và cộng sự (2013) đã khảo sát sự đa dạng di truyền của 21 giống lúa (*Oryza sativa* L.) bằng kỹ thuật RAPD với 38 mẫu ngẫu nhiên thu được 405 phân đoạn ADN, trong đó 84,44% là đa hình. Điều này cho thấy, chỉ thị RAPD có thể cho thấy sự khác biệt trong mỗi giống, đặc biệt là các biến dị di truyền quan trọng và các đặc tính phân tử để duy trì, quan tâm trong chọn lọc giống lúa [4].

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực quan trọng nhất. Ở nhiều nước, gạo chiếm hơn 70% lượng calo của con người. Tuy nhiên, khoảng 35% diện tích trồng lúa ở châu Á phải đối mặt với các mức độ mặn khác nhau của đất, bắt nguồn từ sự tích tụ của vòm muối dưới lòng đất và trầm trọng hơn là do khai thác muối, phá rừng và thủy lợi [3]. Do đó, việc nâng cao khả năng chịu mặn đối với cây lúa, đặc biệt là ở các vùng ven biển và các khu vực miền núi được quan tâm.

Qua theo dõi đặc điểm nông học, phân tích hóa sinh và đánh giá khả năng chịu mặn ở giai đoạn hạt nảy mầm, giai đoạn mạ 3 lá, chúng tôi đã chọn được 5 dòng lúa từ giống gốc CR203 qua xử lý mô sẹo bằng dung dịch NaCl 0,1M. Đây là các dòng lúa có đặc điểm nông học sai khác và vượt trội so với giống gốc, đặc biệt là các chỉ tiêu về năng suất như chiều dài bông, số hạt chắc/bông, kích thước hạt..., có thời gian sinh trưởng ngắn hơn giống gốc. Những dòng này được phân tích đặc điểm hệ gen bằng kỹ thuật RAPD, làm cơ sở cho các nghiên cứu chọn lọc và khảo nghiệm giống tiếp theo. Trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả đánh giá sự đa hình ADN của một số dòng lúa chọn lọc từ mô sẹo chịu mặn NaCl 0,1M của giống gốc là CR203.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

6 mẫu lúa được nghiên cứu, trong đó có 5 dòng chọn lọc ở thế hệ R3 (ký hiệu: R3.CR1; R3.CR3; R3.CR8; R3.CR14; R3.CR15) có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mặn NaCl 0,1M của giống gốc là CR203 và giống gốc CR203.

2.2. Phương pháp

- Tách chiết ADN: Hạt của các mẫu nghiên cứu được bóc vỏ, khử trùng, sau đó cấy lên môi trường MS cơ bản, bổ sung sucrose 2%, agar 0,8%. Sau 10 ngày thu lá làm vật liệu tách chiết ADN. Quy trình tách chiết và làm sạch ADN theo mô tả của Foolad và cộng sự (1995) [9]. Sau đó, dung dịch ADN được pha loãng về nồng độ 50 ng/ml để sử dụng.

- Phản ứng RAPD được tiến hành theo phương pháp của William và cộng sự (1990) [1] với 10 mẫu ngẫu nhiên do Invitrogen tổng hợp, các mẫu có trình tự dài 10 nucleotit, thông tin về trình tự các mẫu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thông tin về trình tự của 10 mẫu ngẫu nhiên sử dụng trong nghiên cứu

Kí hiệu mẫu	Trình tự nucleotit	Kí hiệu mẫu	Trình tự mẫu
M1	5' AACCGACGGG 3'	M7	5' CAGCACCCAC 3'
M2	5' GGGGGTCGTT 3'	M8	5' GGAAGTCGCC 3'
M3	5' TACCACCCCG 3'	M10	5' CTATGCCGAC 3'
M4	5' GCGGACTGT 3'	M11	5' CGGCCACGT 3'
M6	5' GTGTCTCAGG 3'	M14	5' TAGGCGAACG 3'

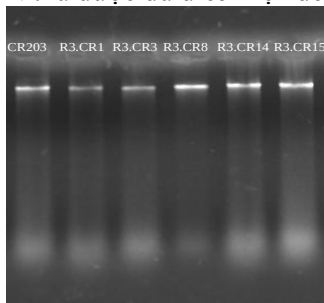
- Mỗi phản ứng có tổng thể tích 25 μ l dung dịch chứa 10 mM đệm PCR 1X; 1,9 mM $MgCl_2$; 25 μ M mỗi loại dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 100 nM primer; 50 ng ADN mẫu; 0,125 đơn vị Taq polymerase. Phản ứng RAPD được tiến hành trên máy PCR Amplified Bio Systems (Singapore) theo quy trình sau: bước 1: 94°C trong 3 phút; bước 2: 92°C trong 1 phút; bước 3: 35°C trong 1 phút; bước 4: 72°C trong 1 phút. Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ. Bước 5: 72°C trong 10 phút, lưu giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X. Sau đó, nhuộm gel trong dung dịch ethidium bromide 1% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím.

- Phân tích số liệu: Dựa trên sự có mặt hay không có mặt các phân đoạn ADN khi điện di sản phẩm RAPD với các mẫu ngẫu nhiên để làm cơ sở cho phân tích số liệu. Qui ước: số 1: có mặt các phân đoạn ADN; số 0: không có mặt phân đoạn ADN. Các số liệu được xử lý bằng chương trình NTSYpc version 2.0 (Applied Biostatistics Inc., USA., 1998) để lập ra sơ đồ so sánh mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu ở mức độ phân tử.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1 Kết quả tách chiết ADN tổng số

ADN được tách chiết từ lá lúa các dòng chọn lọc và giống gốc được kiểm tra hàm lượng và độ tinh sạch bằng cách đo phổ hấp thụ ở các bước sóng 260 nm, 280 nm trên máy quang phổ. Kết quả thu được tỷ lệ OD_{260}/OD_{280} dao động từ 1,80 – 1,96, hàm lượng ADN dao động trong khoảng từ 2863 ng/ml – 3521 ng/ml. Như vậy, các mẫu ADN tách chiết có độ sạch và hàm lượng cao. Ngoài ra, ADN tách chiết từ các mẫu nghiên cứu còn được điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 1). Hình ảnh điện di cho thấy, các mẫu ADN cho một băng duy nhất, gọn, ở gần giếng tra mẫu. Điều đó chứng tỏ ADN thu được đủ điều kiện để tiến hành phản ứng RAPD.



Hình 1. Hình ảnh điện di đồ ADN tổng số của các mẫu nghiên cứu

3.2. Phân tích đa hình ADN bằng kỹ thuật RAPD

3.2.1. Số phân đoạn và đa hình về phân đoạn ADN được nhân bản

Kết quả thống kê số phân đoạn ADN (phân đoạn) có mặt khi điện di sản phẩm RAPD được trình bày trong Bảng 2. Kết quả bảng 2 cho thấy, số lượng các phân đoạn được nhân bản với mỗi dao động từ 21 – 35 đoạn. Kích thước các phân đoạn trong khoảng từ 0,1 – 2,5 kb. Tổng số các phân đoạn được nhân bản với 10 mỗi ngẫu nhiên của 6 mẫu nghiên cứu là 280. Trong 10 mỗi phân tích, mỗi M1 là nhiều nhất với 35 phân đoạn, ít nhất là mỗi M14 với 21 phân đoạn. Tổng số phân đoạn được nhân bản của mỗi dòng chọn lọc và giống gốc CR203 có biến động không lớn, dao động từ 40 – 50 phân đoạn. Trong đó, nhiều nhất là dòng R3.CR15 có 50 phân đoạn và ít nhất là dòng R3.CR14 có 40 phân đoạn được nhân bản.

Bảng 2. Tổng số phân đoạn được nhân bản từ hệ gen của các mẫu nghiên cứu

Môi	CR203	R3.CR1	R3.CR3	R3.CR8	R3.CR14	R3.CR15	Tổng
M1	6	6	6	7	4	6	35
M2	6	4	5	5	3	5	28
M3	4	6	4	5	4	5	28
M4	4	4	4	6	4	4	26
M6	4	3	5	4	6	4	26
M7	6	7	6	5	4	6	34
M8	3	3	3	4	4	5	22
M10	4	6	5	4	4	5	29
M11	8	6	4	5	3	5	31
M14	3	4	3	3	4	4	21
Tổng số	48	49	45	48	40	50	280

Tính đa hình được thể hiện ở sự sai khác về các phân đoạn có mặt hay không khi so sánh kết quả điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu nghiên cứu trên cùng một môi. Điều này được tổng kết và thể hiện qua tỉ lệ phân đoạn đa hình ở mỗi môi nghiên cứu (Bảng 3).

Bảng 3. Phân tích đa hình phân đoạn được nhân bản với 10 mỗi ngẫu nhiên

Môi	Số phân đoạn ADN	Số phân đoạn đa hình	Số phân đoạn đơn hình	Tỉ lệ phân đoạn đa hình (%)
M1	7	3	4	42,85
M2	6	2	4	33,33
M3	6	3	3	50,00
M4	6	3	3	50,00
M6	6	2	4	33,33
M7	7	3	4	42,85
M8	5	2	3	40,00
M10	6	3	3	50,00
M11	8	4	4	50,00
M14	4	1	3	25,00
Tổng số	61	26	35	42,62

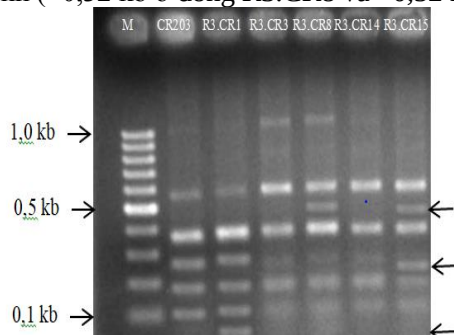
Kết quả cho thấy, có tổng số 61 phân đoạn được nhân bản, trong đó có 26 phân đoạn cho tính đa hình, chiếm 42,62% và số phân đoạn không đa hình là 35 chiếm 57,38%. Số lượng các phân đoạn tương ứng với mỗi môi nằm trong khoảng từ 4 – 8, trong đó mỗi M11 nhân được nhiều nhất là 8 phân đoạn. 2 môi M1, M7 đều nhân được 7 phân đoạn. Số phân đoạn được nhân thấp nhất ở môi M14 (5 phân đoạn), các môi còn lại đều nhân được 6 phân đoạn. Mức độ đa hình của các môi dao động từ 25,0 – 50,0%.

Kết quả điện di sản phẩm RAPD trên gel agarose 1,0% của 10 mỗi ngẫu nhiên cụ thể như sau:

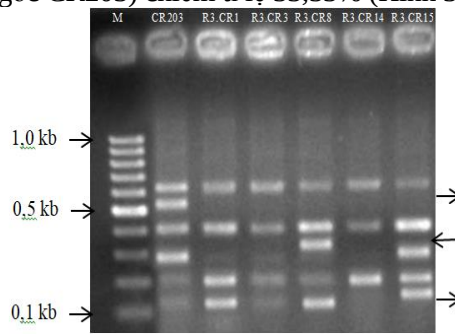
Môi M1: Số phân đoạn của 6 mẫu nghiên cứu dao động trong khoảng 4 – 7 phân đoạn, trong đó dòng R3.CR8 có số phân đoạn nhiều nhất là 7, dòng R3.CR14 thấp nhất (4 phân đoạn). Tổng số phân đoạn xuất hiện là nhiều nhất so với các môi khác (35 phân đoạn). Các phân đoạn dao động trong kích thước từ 0,1 – 1,0 kb. Ở kích thước ~0,22kb chỉ thấy xuất hiện một phân đoạn ở dòng

R3.CR15, các mẫu còn lại không xuất hiện. Phân đoạn đa hình cũng xuất hiện ở vị trí ~0,1kb ở dòng R3.CR1 và ~0,42kb ở dòng R3.CR8 và R3.CR14 (Hình 2).

Môi M2: Các phân đoạn được nhân bản nằm trong khoảng kích thước từ 0,1 – 0,65 kb, với 28 phân đoạn ADN xuất hiện. Số phân đoạn dao động từ 3 – 6, nhiều nhất là giống gốc CR203 với 6 phân đoạn, dòng R3.CR14 có số phân đoạn thấp nhất (3 phân đoạn). Môi M2 chỉ cho 2 phân đoạn đa hình (~0,32 kb ở dòng R3.CR8 và ~0,52 kb ở giống gốc CR203) chiếm tỉ lệ 33,33% (Hình 3).



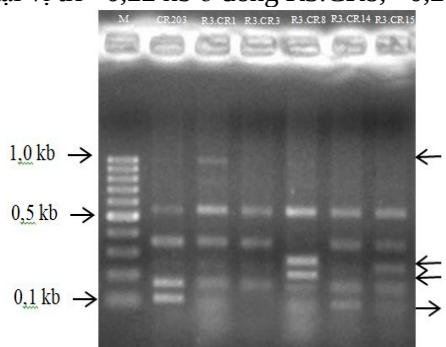
Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với môi M1 (M: maker 100 bp; ←: xuất hiện phân đoạn ADN; →: không xuất hiện phân đoạn ADN)



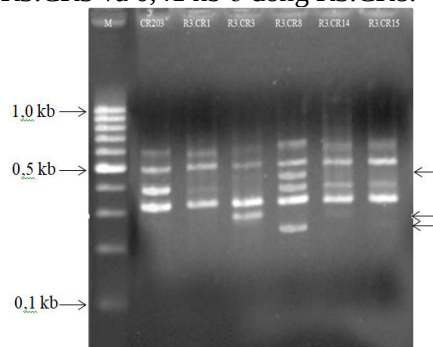
Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với môi M2 (M: maker 100 bp; ←: xuất hiện phân đoạn ADN; →: không xuất hiện phân đoạn ADN)

Môi M3: Phân tích kết quả phản ứng RAPD với môi M3 (Hình 4) cho thấy, tổng số phân đoạn xuất hiện là 28, trong đó dòng R3.CR1 cho nhiều nhất với 6 phân đoạn. Số phân đoạn dao động trong khoảng từ 4 – 6, tương ứng với kích thước trong khoảng 0,1 – 1,0 kb. Ở vị trí ~0,28kb R3.CR8 xuất hiện một phân đoạn đặc trưng khác hẳn so với giống gốc đối chứng. Ở dòng R3.CR1 tại vị trí khoảng 1,0 kb cũng xuất hiện phân đoạn đặc trưng, không thấy có ở các dòng còn lại và giống gốc.

Môi M4: Môi M4 cho tổng số phân đoạn là 26 (Hình 5). Trong khoảng kích thước từ 0,2 kb – 0,7 kb có 6 phân đoạn, có 3 phân đoạn cho tính đa hình chiếm tỉ lệ 50%. Phân đoạn đa hình xuất hiện tại vị trí ~0,22 kb ở dòng R3.CR8, ~0,28 kb ở dòng R3.CR3 và 0,41 kb ở dòng R3.CR8.



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với môi M3 (M: maker 100 bp; ←: xuất hiện phân đoạn ADN; →: không xuất hiện phân đoạn ADN)



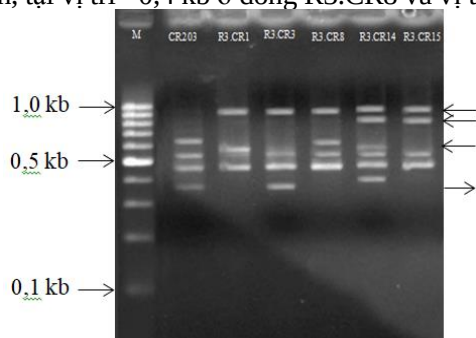
Hình 5. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với môi M4 (M: maker 100 bp; ←: xuất hiện phân đoạn ADN; →: không xuất hiện phân đoạn ADN)

Môi M6: Kết quả điện di cho thấy, tính đa hình thể hiện rõ ràng ở các mẫu lúa nghiên cứu. Trong khoảng kích thước 0,35kb – 1,0kb có 6 vạch ADN xuất hiện tương ứng với 26 phân đoạn ở cả 6 mẫu lúa nghiên cứu. Có 2 phân đoạn cho tính đa hình chiếm tỉ lệ 33,33% tổng số phân đoạn. Tại kích thước ~0,4 kb ở dòng R3.CR14, không thấy xuất hiện ở các dòng khác. Ở kích thước ~0,62 kb thấy xuất hiện vạch ADN đặc trưng ở giống gốc CR203, các dòng mới được tạo ra không thấy xuất hiện phân đoạn ở vị trí này (Hình 6).

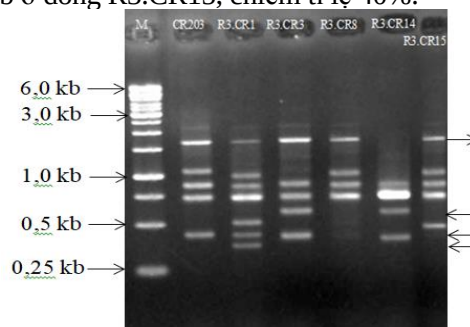
Môi M7: Tổng số phân đoạn xuất hiện ở môi M7 là nhiều nhất (35 phân đoạn). Số phân đoạn ở các mẫu dao động từ 4 – 8 phân đoạn, trong đó số phân đoạn nhiều nhất ở dòng R3.CR1 (8 phân đoạn), ít nhất là ở dòng R3.CR14 (4 phân đoạn). Có 2 phân đoạn đa hình xuất hiện ở dòng

R3.CR1 tại vị trí $\sim 0,3\text{kb}$ và $\sim 1,0\text{kb}$. Ở dòng R3.CR8 xuất hiện phân đoạn đặc trưng tại vị trí $\sim 1,1\text{kb}$, các dòng khác không thấy có phân đoạn này (Hình 7).

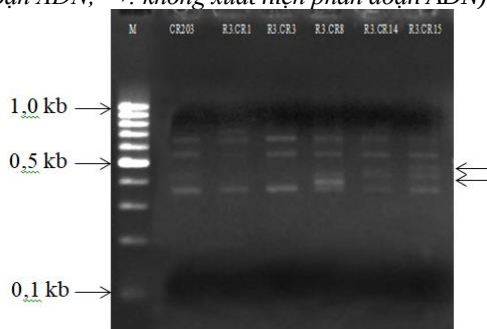
Môi M8: Kết quả phân tích sản phẩm RAPD cho thấy, có 22 phân đoạn xuất hiện nằm trong khoảng $\sim 0,32 - 0,7\text{kb}$ (Hình 8). Số phân đoạn xuất hiện ở các mẫu nghiên cứu dao động từ 3 – 5 phân đoạn, trong đó dòng R3.CR15 cho số phân đoạn nhiều nhất (5 phân đoạn), giống gốc CR203 với các dòng R3.CR1, R3.CR3 cho số phân đoạn ít nhất (3 phân đoạn). Có 2 phân đoạn cho tính đa hình, tại vị trí $\sim 0,4\text{kb}$ ở dòng R3.CR8 và vị trí $\sim 0,48\text{kb}$ ở dòng R3.CR15, chiếm tỉ lệ 40%.



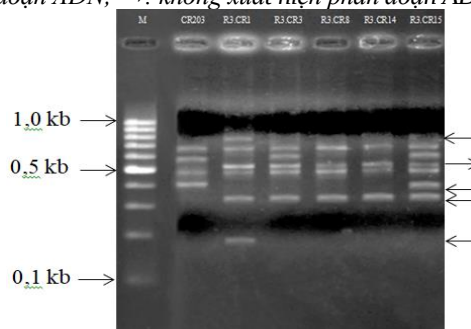
Hình 6. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với mỗi M6 (M: marker 100 bp; $\leftarrow$: xuất hiện phân đoạn ADN; $\rightarrow$: không xuất hiện phân đoạn ADN)



Hình 7. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với mỗi M7 (M: marker 250 bp; $\leftarrow$: xuất hiện phân đoạn ADN; $\rightarrow$: không xuất hiện phân đoạn ADN)



Hình 8. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với mỗi M8 (M: marker 100 bp; $\leftarrow$: xuất hiện phân đoạn ADN; $\rightarrow$: không xuất hiện phân đoạn ADN)

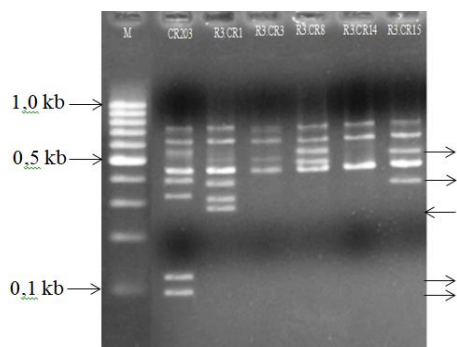


Hình 9. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với mỗi M10 (M: marker 100 bp; $\leftarrow$: xuất hiện phân đoạn ADN; $\rightarrow$: không xuất hiện phân đoạn ADN)

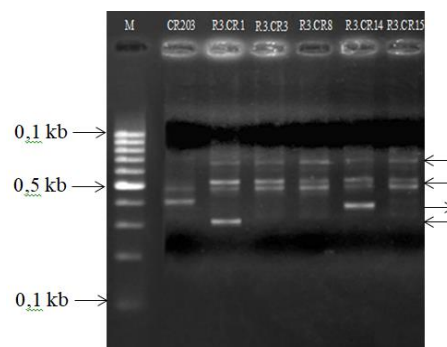
Môi M10: Trong khoảng kích thước từ $\sim 0,19\text{kb}$ – $\sim 0,8\text{kb}$ có 6 phân đoạn được nhân bản, trong đó có 3 phân đoạn cho tính đa hình (chiếm 50%). Cụ thể, tại vị trí $\sim 0,19\text{kb}$ và $\sim 0,81\text{kb}$ ở dòng R3.CR1 xuất hiện phân đoạn khác biệt hoàn toàn so với các dòng còn lại. Dòng R3.CR15 xuất hiện một phân đoạn $\sim 0,38\text{kb}$ mà các dòng và giống còn lại không có. Ở vị trí $\sim 0,3\text{kb}$, $\sim 0,5\text{kb}$, $\sim 0,7\text{kb}$ tất cả các mẫu nghiên cứu đều xuất hiện phân đoạn (Hình 9).

Môi M11: Số phân đoạn của 6 mẫu nghiên cứu dao động trong khoảng từ 3 – 8 phân đoạn, trong đó giống gốc CR203 cho nhiều nhất là 8 phân đoạn. Dòng R3.CR14 cho ít nhất với 3 phân đoạn ADN. Trong 8 phân đoạn xuất hiện có 4 phân đoạn cho tính đa hình chiếm 50%. Giống gốc CR203 cho 2 phân đoạn đa hình ở vị trí $\sim 0,10\text{kb}$ và $\sim 0,15\text{kb}$, phân đoạn đa hình còn lại xuất hiện ở dòng R3.CR1 tại vị trí $\sim 0,28\text{kb}$ và ở dòng R3.CR15 tại vị trí $\sim 0,32\text{kb}$ (Hình 10).

Môi M14: Trong khoảng $\sim 0,3\text{kb}$ – $\sim 0,7\text{kb}$ thấy xuất hiện 21 phân đoạn (số phân đoạn ít nhất trong các môi nghiên cứu). Trong đó có sự xuất hiện phân đoạn rất khác nhau giữa các mẫu. Cụ thể, ở vị trí $\sim 0,5$ và $\sim 0,7\text{kb}$ tất cả các dòng chọn lọc đều xuất hiện, ở vị trí $\sim 0,55\text{kb}$ chỉ có giống gốc CR203 là không xuất hiện, các mẫu còn lại đều có phân đoạn. Có 1 phân đoạn đa hình xuất hiện ở dòng R3.CR1 (vị trí $\sim 0,3\text{kb}$) chiếm tỉ lệ 25% so với tổng số phân đoạn xuất hiện (Hình 11).



Hình 10. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với mỗi M11 (M: maker 100 bp; ←: xuất hiện phân đoạn ADN; →: không xuất hiện phân đoạn ADN)



Hình 11. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD của 6 mẫu lúa với mỗi M14 (M: maker 100 bp; ←: xuất hiện phân đoạn ADN; →: không xuất hiện phân đoạn ADN)

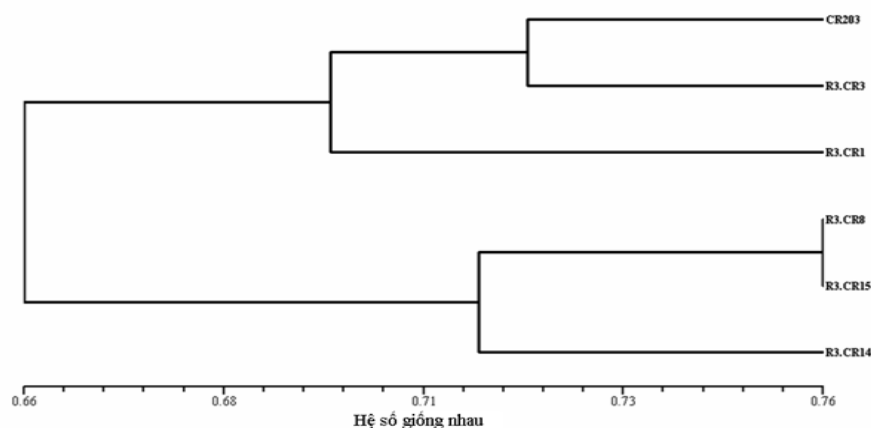
3.2.2. Phân tích sự khác nhau của các dòng chọn lọc so với giống gốc ở mức độ phân tử

Từ kết quả phân tích hình ảnh điện di sản phẩm RAPD, chúng tôi thống kê các băng điện di và xử lý số liệu phân tích RAPD bằng phần mềm NTSYSpc version 2.0i nhằm xác định khoảng cách di truyền giữa 6 mẫu lúa nghiên cứu thông qua hệ số sai khác di truyền và sơ đồ hình cây. Kết quả xác định hệ số sai khác di truyền được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Hệ số sai khác di truyền của các dòng chọn lọc và giống gốc

Giống/Dòng	CR203	R3.CR1	R3.CR3	R3.CR8	R3.CR14	R3.CR15
CR203	0,0000					
R3.CR1	0,2912	0,0000				
R3.CR3	0,2785	0,3365	0,0000			
R3.CR8	0,3038	0,2912	0,3798	0,0000		
R3.CR14	0,3112	0,3925	0,4051	0,3292	0,0000	
R3.CR15	0,3165	0,3038	0,3925	0,2406	0,2406	0,0000

Kết quả phân tích cho thấy, có sự sai khác di truyền giữa 5 dòng lúa chọn lọc so với giống gốc dao động từ 0,2406 – 0,4051. Dòng R3.CR1 có sự sai khác thấp nhất so với giống gốc là 0,2912, dòng R3.CR15 có sự sai khác lớn nhất so với giống gốc là 0,3165. Như vậy, cả 5 dòng chọn lọc đã thể hiện mức độ sai khác so với giống gốc. So sánh hệ số sai khác di truyền giữa các dòng cho thấy, sự khác biệt ít nhất tìm thấy ở dòng R3.CR15 và R3.CR8, hai dòng này có sự sai khác di truyền là 0,2406. Sự sai khác di truyền lớn nhất là ở dòng R3.CR3 với dòng R3.CR14, có sự sai khác là 0,4051.



Hình 12. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các dòng chọn lọc và giống gốc

Như vậy, bước đầu có thể khẳng định 5 dòng lúa chọn lọc đã có sự sai khác di truyền so với giống gốc, đồng thời giữa các dòng chọn lọc cũng có những sự sai khác nhất định. Các dòng có hệ số di truyền gần nhau được xếp vào một nhóm, sự liên hệ giữa các nhóm được thể hiện trên Hình 12. Kết quả cho thấy, 5 dòng chọn lọc và giống gốc được chia thành 2 nhóm chính.

- Nhóm chính thứ nhất gồm giống gốc CR203, 2 dòng R3.CR1, R3.CR3 và được chia thành hai nhóm phụ. Nhóm phụ I chỉ có dòng R3.CR1, nhóm phụ II gồm giống gốc CR203 với dòng R3.CR3, có khoảng cách di truyền so với nhóm phụ I là 0,295. Giống gốc với dòng R3.CR3 có hệ số giống nhau lớn nhất là 0,7215.

- Nhóm chính thứ hai bao gồm 3 dòng còn lại là R3.CR8, R3.CR14, R3.CR15, với khoảng cách di truyền so với nhóm chính thứ nhất là 0,34. Nhóm chính thứ hai chia thành hai nhóm phụ. Nhóm phụ III gồm 2 dòng R3.CR8 và R3.CR15 có hệ số giống nhau lớn nhất đạt 0,7594 và sai khác với dòng R3.CR14 (nhóm phụ IV) là 0,3292.

Những phân tích trên cho thấy, 5 dòng lúa chọn lọc đã thể hiện sự đa dạng di truyền rõ rệt so với giống gốc CR203.

4. Kết luận

Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 6 mẫu lúa bằng chỉ thị RAPD với 10 môi ngẫu nhiên cho thấy, cả 10 môi đều cho đa hình các phân đoạn ADN được nhân bản. Hệ số sai khác di truyền giữa các dòng chọn lọc so với giống gốc CR203 từ 0,2406 – 0,4051. So sánh hệ số sai khác di truyền giữa các dòng cho thấy, sự khác biệt lớn nhất ở dòng R3.CR3 với dòng R3.CR14 đạt 40,51%. Các dòng lúa chọn lọc đã có sự thay đổi ở mức độ phân tử trong bộ gen so với giống gốc CR203. Khoảng cách di truyền giữa các dòng chọn lọc với giống gốc là 0,2785 – 0,3165.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] J. G. William, A. R. Kubelik, K. J. Levark, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey, "DNA polymorphisms amplified by arbitray primer are useful as gennetic markers," *Nucleic Acids Res*, vol. 18, no. 22, pp. 6531-6525, 1990, doi: 10.1093/nar/18.22.6531.
- [2] A. Babaei, G. Ali Nematzadeh, and H. Hashemi, "Molecular RAPD Markers Analysis of Sange-tarom and Taromhashemi Cultivars (*Oryza sativa* L.) in M2 Population," *Annals of Biological Research*, vol. 2, no. 4, pp. 24-30, 2011.
- [3] N. Kanawapee, J. Sanitchon, P. Srihaban, and P. Theerakulpisut, "Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers," *Electronic Journal Biotechnology*, vol. 14, no. 6, pp. 1-17, 2011, doi: 10.2225/vol14-issue6-fulltext-4.
- [4] J. Rajani, V. Deepu, G. M. Nair, and A. J. Nair, "Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers," *International Food Research Journal*, vol. 20, no. 2, pp. 919-923, 2013.
- [5] M. A. Ahmad, R. Gaur, and M. Gupta, "Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 217, pp. 141-148, 2012, doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.03.005.
- [6] H. Bansal, R. Kumar, V. Vivek, and S. Sanjay, "Analysis of diversity in rice (*Oryza sativa* L.) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeats (SSR) markers," *African Journal of Biotechnology*, vol. 12, no. 35, pp. 5404-5412, 2016, doi: 10.5897/AJB12.2641.
- [7] N. M. Zakiyah, T. Handoyo, and K. -M. Kim, "Genetic Diversity Analysis of Indonesian Aromatic Rice Varieties (*Oryza sativa* L.) Using RAPD," *Journal of Science and Biotechnology*, vol. 22, no. 1, pp. 55-63, 2019, doi: 10.1007/s12892-018-0271-0.
- [8] M. Shawon, I. Tahmina, R. H. Sarker, and H. M. Imdadul, "RAPD Profile Analysis of Single and Multigrain Aman Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties Available in Bangladesh," *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, vol. 27, no. 2, pp. 195-205, 2017, doi: 10.3329/ptcb.v27i2.35025.
- [9] M. R. Foolad, A. Siva, and L. R. Rodrigues, *Application of polymerase chain reaction (PCR) to plant genome analysis. In: Tissue and organ cuture*, Fundamental mothod, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, pp. 281-298.