

KHẢO SÁT TÍNH CHỊU HẠN CỦA TẬP ĐOÀN LÚA RỸ MIỀN TRUNG VIỆT NAM DỰA VÀO ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TÍCH DNA

Ông Huỳnh Nguyệt Ánh¹, Lê Việt Dũng² và Huỳnh Quang Tín¹

ABSTRACT

A collection of 292 upland rice accessions from the Central of Viet Nam were evaluated of adaptive characteristics to drought by examining the morphological traits and DNA analysis. All upland rice accessions were screened for drought tolerance at seedling stage and were grouped by using 1986 IRRI's standard. A regression function between soil moisture stress and wilt degree is also studied. Fourty six accessions were taken randomly from these groups and were analysed DNA with eighty primers by Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR).

Results indicate that the collection were classified as very tolerant (12.32 %), moderately tolerant (39.04 %), moderately susceptible (32.19 %) and susceptible (16.43 %) in drought tolerant ability. Thai Hong, KeKo, Ba Phok accessions showed the best drought tolerant ability. Seven primers OPC06, OPE01, OPL19, OPJ01, OPA09, RTG02 and RTG03 yielded good amplified products. Of which, the primer RTG03 and OPE01 showed more polymorphism than others and can be used to distinguish the test accessions.

Keywords: *upland rice, drought tolerance, DNA, RAPD-PCR.*

Title: *Studies on drought tolerance of the central Viet nam upland rice collection based on morphological traits and DNA analysis*

1 MỞ ĐẦU

Lúa rẫy, nhóm lúa sinh trưởng trong điều kiện đất cao không tưới tiêu là nguồn tài nguyên vô cùng quý giá trong nguồn quỹ gen cây lúa. Hiện nay, sự thất thoát và xói mòn nguồn gen lúa rẫy đang ngày càng nghiêm trọng nên vấn đề sưu tập, bảo quản và đánh giá nguồn tài nguyên này đã được đặt ra (Huỳnh Quang Tín và Võ Tông Xuân, 1996). Lúa rẫy, trong đó tính chống chịu hạn là một đặc tính quý hiếm, được xem là phức tạp và do đa gen quy định (Yoshiaki Koga, 1993). Để quản lý và khai thác có hiệu quả đặc tính này, đề tài thực hiện nhằm mục đích đánh giá tính chịu hạn của tập đoàn lúa rẫy Trung bộ Việt Nam dựa vào đặc điểm hình thái và phân tích phân tử DNA bằng phương pháp Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR).

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

Đề tài được thực hiện hai giai đoạn: (1) thanh lọc tính chịu hạn của tập đoàn lúa rẫy ngoài đồng và (2) khảo sát sự đa dạng di truyền tính chịu hạn bằng phân tích DNA trong phòng thí nghiệm.

2.1 Thí nghiệm ngoài đồng

- **Thanh lọc tính chịu hạn của tập đoàn lúa rẫy Trung bộ:** được thực hiện tại Nông trại thực nghiệm Khu II trường Đại Học Cần Thơ trên 292 mẫu giống lúa rẫy thuộc các tỉnh Trung bộ Việt Nam. Thí nghiệm được bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Xử lý khô hạn lúc lúa được 14 ngày sau khi gieo. Đánh giá tính chịu hạn ở các giai đoạn ẩm

¹ Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Hệ Thống Canh tác, Đại học Cần Thơ

² Phòng Hợp tác Quốc tế & QLDA, Đại Học Cần Thơ

độ đất: bão hòa, 50%, 30%, 23.5% và 10%. Sử dụng Bảng đánh giá mức độ chịu hạn cây lúa của IRRI, 1986 (Bảng 1).

Bảng 1: Bảng đánh giá mức độ chịu hạn cây lúa theo IRRI, 1986

| Cấp | Biểu hiện của cây lúa |
|-----|---------------------------------------|
| 0 | Cây và lá chưa bị ảnh hưởng |
| 1 | Đầu lá hơi khô |
| 3 | Từ đầu đến ¼ lá của tổng số lá bị khô |
| 5 | ½ của tổng số lá bị khô |
| 7 | 2/3 số lá bị khô |
| 9 | Tất cả các cây đều chết |

- **Phân nhóm mẫu giống theo bốn mức độ chịu hạn:** tốt, khá, trung bình và yếu theo bộ giống chuẩn IRRI, 1986 (Bảng 2).

Bảng 2: Phân cấp tính chịu hạn theo bộ giống chuẩn IRRI, 1986.

| STT | Nhóm | Tên giống | Cấp kháng hạn | Diễn giải |
|-----|--------|------------|---------------|---------------------|
| 1 | Nhóm A | Salumpikit | 0-3 | Chịu hạn tốt |
| 2 | Nhóm B | IR442 | >3-5 | Chịu hạn khá |
| 3 | Nhóm C | IR20 | >5-7 | Chịu hạn trung bình |
| 4 | Nhóm D | IRAT9 | >7-9 | Chịu hạn kém |

Quan sát động thái phát triển rễ trong ống nghiệm dưới áp lực hạn: 32 mẫu giống lúa đại diện cho bốn mức độ chống chịu hạn tốt, khá, trung bình và yếu được gieo trong ống nghiệm dài 50 cm và được quan sát tốc độ phát triển rễ dưới áp lực hạn theo thời gian.

2.2 Thí nghiệm trong phòng

- **Ly trích DNA lúa rẫy:** hạt gạo của 40 mẫu giống lúa rẫy lấy ngẫu nhiên từ bốn mức độ chịu hạn tốt, khá, trung bình và yếu được ly trích DNA bằng phương pháp của Võ Công Thành và Hirata (2002). Hạt gạo được ngâm trong nước cất 30 phút, sử dụng 2-3 hạt cho mỗi mẫu giống. Nghiền mịn hạt gạo trong 300 µl dung dịch ly trích, sau đó thêm vào 380 µl dung dịch ly trích và 20 µl proteinase K. Ủ các ống tube có đựng mẫu ở 70oC trong 30 phút, sau đó ủ tiếp ở 37oC trong 2 giờ. Ly tâm 13.000 vòng trong 15 phút, lấy phần dung dịch phía trên sang ống tube mới, thêm vào 700 µl hỗn hợp phenol:chloroform (1:1) và trộn đều. Lặp lại bước trên. Lần 3 cho 700 µl chloroform vào tube, ly tâm 13.000 vòng trong 10 phút, chuyển phần dung dịch trên sang ống tube mới. Tiếp tục thêm isopropanol vào dung dịch với tỷ lệ 1:1, trộn đều rồi để ổn định trong 10 phút. Ly tâm 13.000 vòng trong 10 phút, đổ nhẹ bỏ phần dung dịch, giữ lại DNA là phần có màu trắng mờ ở đáy ống. Rửa lại DNA bằng ethanol 70% và phơi khô ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Thêm vào DNA 30 µl 0.1 TE và tồn trữ ở -20oC.

Nồng độ DNA trong mẫu trích được kiểm tra bằng cách điện di 5 µl dịch trích DNA trên gel agarose 1% với điện thế 100 V. Nhuộm gel với ethidium bromide trong thời gian 60 phút và quan sát dưới tia tử ngoại của máy đọc gel Mini-Transilluminator.

- **Khuếch đại DNA bằng kỹ thuật RAPD-PCR:** dịch trích DNA của từng mẫu giống lúa rẫy được cho phản ứng với 80 đoạn mỗi 10 nucleotit ngẫu nhiên. Mục đích để tìm ra đoạn mỗi tương hợp với sự phân nhóm ngoài đồng trên cơ sở đa dạng hình.

Cho 5 µl mẫu DNA vào hỗn hợp gồm 10xPCR buffer, 0.5 µl đoạn mồi, 0.13 µl Taq DNA polymerase, 150 µm bốn loại nucleotit tự do và nước cất đến thể tích 25 µl và sử dụng máy điều nhiệt tuần hoàn tự động Thermocycle để thực hiện phản ứng PCR. Sản phẩm khuếch đại được trộn với thuốc nhuộm đến thể tích 10 µl được phân tách trên gel agarose

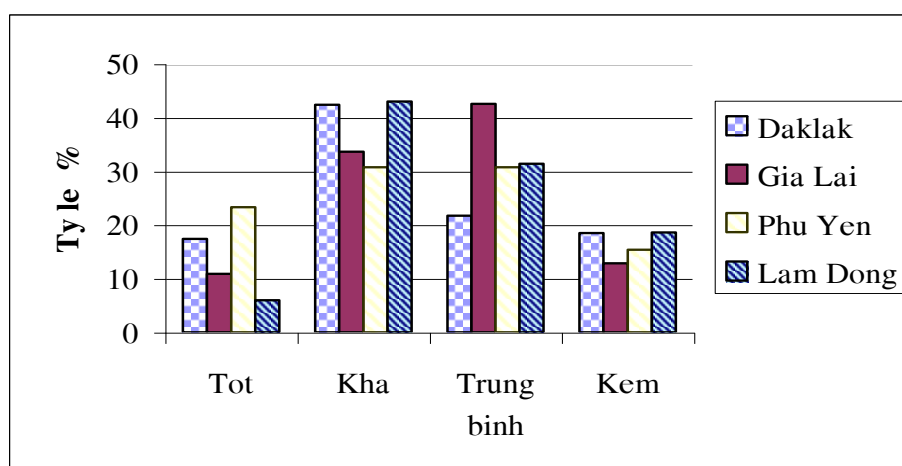
1,5% với điện thế 50 V. Nhuộm gel với ethidium bromide và quan sát thể đa hình dưới tia tử ngoại. Sử dụng ladder chuẩn 1 Kb.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thí nghiệm ngoài đồng

3.1.1 Thanh lọc tính chịu hạn của tập đoàn lúa rẫy Trung bộ Việt Nam

Tập đoàn lúa rẫy Trung bộ gồm 292 mẫu giống được sưu tập từ các tỉnh Trung bộ Việt Nam. Gia Lai có 101 mẫu giống, Đaklak có 92 mẫu giống, Lâm Đồng có 86 mẫu giống và Phú Yên có 13 mẫu giống. Tất cả được đánh giá, thanh lọc và phân thành bốn nhóm theo các mức độ chịu hạn tốt, khá, trung bình và kém (Hình 1)



Hình 1: Tỷ lệ phần trăm mẫu giống theo mức độ chịu hạn của tập đoàn lúa rẫy Trung bộ Việt Nam

Có 36 mẫu giống chịu hạn rất tốt, chiếm tỷ lệ 12,32%. 114 mẫu giống chịu hạn khá đạt tỷ lệ 39,04% 94 mẫu giống chịu hạn trung bình, chiếm tỷ lệ 32,19%. Điều đó cho thấy đa phần mẫu giống của tập đoàn lúa rẫy chịu được hạn. Do tập quán canh tác du canh du cư của đồng bào miền núi chỉ sử dụng những giống lúa cổ truyền và canh tác nhờ vào nước trời, chính quá trình chọn lọc tự nhiên này đã giải thích cho tính chịu hạn cao của tập đoàn giống lúa. Tuy nhiên, vẫn còn một tỷ lệ 16,43% mẫu giống không chịu được hạn. Sự tiên bộ chủ động được nước để sử dụng những giống lúa rẫy cải tiến có năng suất cao và một số vùng cao nguyên Trung bộ còn trồng lúa trên ruộng có nước chân (Huỳnh Quang Tín và Võ Tòng Xuân, 1996), đây là những giống lúa không thể hiện được tính chịu hạn khi trải nghiệm ngoài đồng.

3.1.2 Tương quan giữa biến thiên ẩm độ đất và tính chịu hạn

Ẩm độ đất là một yếu tố ảnh hưởng trực tiếp và rõ rệt đến cây trồng, nhất là những loại cây ngắn ngày như cây lúa. Kết quả thí nghiệm cho thấy các giống lúa khác nhau có phản ứng với động thái ẩm độ đất khác nhau. Khi xử lý ẩm độ đất giảm dần theo các tỷ lệ nước bão hòa, 50%, 30%, 23,5% và 10%, chúng tôi nhận thấy tốc độ phản ứng héo lá của các mẫu giống trong các nhóm thể hiện nhanh chậm rất khác nhau (Bảng 3). Đến thời điểm IRAT9 héo khô và chết hoàn toàn thì cấp độ héo trung bình của nhóm A là 2,6; nhóm B là 4,3; nhóm C là 6,6 và nhóm D là 8,3.

Khả năng phục hồi của tập đoàn lúa rẫy cũng được đánh giá 3 ngày sau khi cung cấp nước trở lại. Ở tất cả các nhóm cây lúa đều có sự phục hồi, riêng IRAT9 và những giống héo cấp 9 chết hoàn toàn. Các giống có khả năng phục hồi tốt trong thực nghiệm này

được ghi nhận là Thái Hồng (ký hiệu mẫu 398/95), Media Kniruot (347/95), Jrai (69/00) và Chống Đói (255/95).

Bảng 3: Tương quan giữa cấp độ héo của bốn nhóm giống: chịu hạn tốt, chịu hạn khá, chịu hạn trung bình và chịu hạn kém và ẩm độ đất

| Âm độ đất (%) | Cấp độ héo | | | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Nhóm A | Nhóm B | Nhóm C | Nhóm D | IRAT9 |
| Bão hòa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 % | 0.84 | 0.80 | 1.0 | 0.9 | 1.0 |
| 23.5 % | 1.75 | 2.50 | 4.0 | 6.3 | 7 |
| 10 % | 2.64 | 4.31 | 6.6 | 8.3 | 9 |
| Phương trình hồi quy | Y=2.21-0.03X | Y=3.35-0.04X | Y=5.14-0.07X | Y=6.85-0.09X | Y=7.12-0.09X |
| Hệ số tương quan | r=-0.6896 | r=-0.6122 | r=-0.5977 | r=-0.5798 | r=-0.5807 |

* Nhóm A: nhóm mẫu giống lúa chịu hạn tốt; Nhóm B: nhóm mẫu giống lúa chịu hạn khá; Nhóm C: nhóm mẫu giống lúa chịu hạn trung bình; Nhóm D: nhóm mẫu giống lúa không chịu hạn; IRAT9: giống đối chứng.

3.1.3 Quan sát ảnh hưởng của khô hạn lên động thái phát triển rễ

Đối với hệ thống rễ chùm của cây lúa, sự vươn dài của bộ rễ là một đặc tính đáp ứng của những giống lúa khác nhau để tìm nguồn nước khi hàm lượng nước trong đất giảm dần (Chang et al., 1975)¹. Lấy ngẫu nhiên 7 mẫu giống lúa trong mỗi nhóm để quan sát ảnh hưởng của sự khô hạn lên sự phát triển rễ.

Kết quả thực nghiệm cho thấy sự ra rễ của các giống tương đương nhau trong điều kiện ẩm độ đất đầy đủ đến 15 ngày sau khi gieo. Lúc 17 ngày sau khi gieo, tức 2 ngày sau khi cắt nước, nhóm chịu hạn tốt có rễ vươn dài khác biệt với 3 nhóm còn lại.

Bảng 4: Động thái phát triển rễ của bốn nhóm lúa theo các thời điểm dưới áp lực hạn

| Nhóm | Độ biến thiên chiều dài rễ (cm) ở các thời điểm (NSKG)* | | | | | | | |
|-------|---|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| | 11 | 15 | 17 | 21 | 23 | 25 | 27 | 29 |
| A | 22.57a | 27.62a | 29.50a | 36.05a | 38.77a | 40.28a | 41.31a | 41.67a |
| B | 18.78b | 23.31b | 24.93b | 29.00b | 33.67b | 33.71b | 36.16ab | 37.85a |
| C | 17.76b | 21.78b | 23.49b | 25.43b | 28.62b | 29.51b | 30.19c | 31.13b |
| D | 19.94ab | 24.27ab | 26.65b | 27.70b | 30.76b | 33.08b | 32.07bc | 32.32b |
| CV(%) | 14.9 | 15.2 | 15.1 | 13.9 | 13.4 | 13.1 | 14.3 | 13.9 |

*NSKG: ngày sau khi gieo.

Những chữ số có những chữ tận cùng theo sau giống nhau không khác biệt mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Đến thời điểm 29 ngày sau khi gieo, hai nhóm mẫu giống chịu hạn tốt và khá đã thể hiện rất rõ khả năng ra rễ mạnh, chiều dài rễ trung bình là lần lượt là 41,67 cm và 37,85 cm, khác biệt rõ với hai nhóm chịu hạn trung bình và kém ở mức ý nghĩa 5% (Bảng 4)

Ngoài ra, kết quả thống kê từng mẫu giống trong nhóm chịu hạn tốt cho thấy giống Thái Hồng (398/95) thuộc huyện Krông Buk tỉnh Đaklak có sự vươn dài rễ tốt nhất, rễ vươn đến đáy ống nghiệm vào thời điểm 27 ngày sau khi gieo, sớm hơn thời gian rễ chạm đáy ống của những giống khác 4 ngày.

Những thực nghiệm khảo sát tính kháng hạn dựa trên tính héo khô của lá và sự phát triển chiều dài rễ của cây lúa cho thấy tập đoàn giống lúa rẫy miền Trung Việt Nam gồm 292

¹ được dẫn trích từ Yasuhiro Kono, 1993

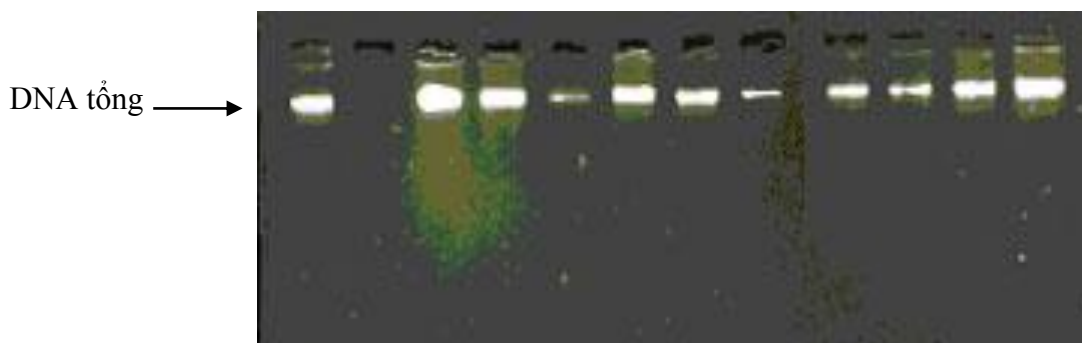
mẫu giống có sự đáp ứng với khô hạn khác nhau và được phân ra thành bốn mức độ chịu hạn. Ngoài trừ nhóm không chịu hạn bị héo vĩnh viễn ở giai đoạn ẩm độ đất 10%, ba nhóm còn lại chịu được hạn từ tốt đến trung bình đều phục hồi sự sinh trưởng khi cung cấp nước trở lại. Điều này phù hợp với định nghĩa chịu hạn của Sullivar et al. (1971)¹: cây trồng vượt qua được sự thiếu nước ở một giai đoạn nào đó của chu kỳ sống thì kháng được hạn.

3.2 Thí nghiệm trong phòng

3.2.1 Ly trích DNA

Sau thực nghiệm đánh giá để thanh lọc và phân nhóm tính chống chịu hạn, 40 mẫu giống trong tập đoàn được chọn ngẫu nhiên đại diện cho bốn mức độ chịu hạn được tiến hành phân tích DNA theo phương pháp RAPD-PCR nhằm tìm sự đa dạng hình trong các giống đem phân tích.

Lần đầu tiên ly trích DNA trên lúa được thực hiện tại phòng thí nghiệm Di truyền –Khoa Nông nghiệp trường Đại học Cần Thơ, áp dụng phương pháp ly trích nhanh trên hạt của Võ Công Thành và Hirata (2002) có cải tiến, kết quả cho những vạch DNA tinh sạch dưới tia UV (Hình 2).



Hình 2: Phổ điện di DNA ly trích trên hạt lúa thể hiện bằng rõ trên gel agarose 1%

3.2.2 Khuếch đại DNA bằng phản ứng RAPD-PCR

Để xác định đoạn mồi tạo đa dạng hình, 80 đoạn mồi thuộc kit OPA, OPC, OPJ, OPK và RTG được sử dụng cho phản ứng với DNA nhận được từ mô hạt của lúa rẫy. Đây là những đoạn mồi được nghiên cứu về đa dạng di truyền cây lúa thuộc kỹ thuật RAPD-PCR (Bùi Chí Bửu et al., 1999). Trong đó có 7 đoạn mồi cho sản phẩm khuếch đại tốt nhất (Bảng 5) với ít nhất 62 loci và kích thước các đoạn phân tử ghi nhận được biến động trong khoảng 250-2200 bp. Sử dụng ladder chuẩn 1 Kb.

Bảng 5: Bảy đoạn mồi và kết quả khuếch đại với DNA lúa rẫy

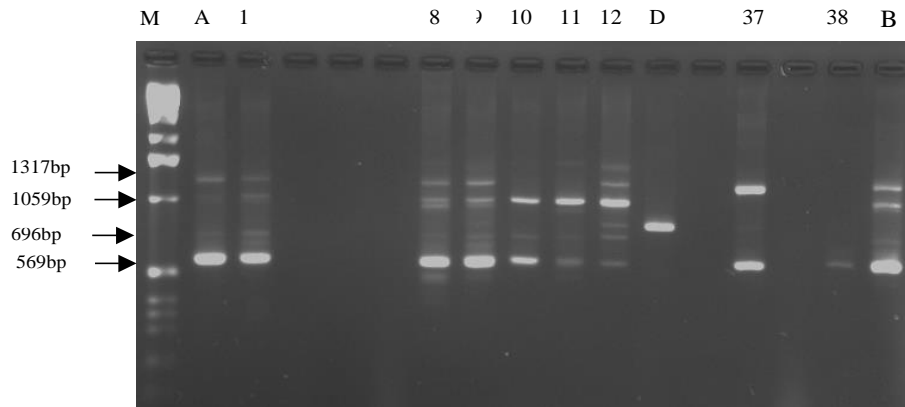
| STT | Đoạn mồi | Chuỗi ký tự | Số băng | T.L.Phân tử |
|-----|----------|-------------|---------|----------------|
| 1 | OPC06 | GAACGGACTC | 2 | 600 bp-1500 bp |
| 2 | OPJ01 | CCCGGCATAA | 4 | 500 bp-1800 bp |
| 3 | RTG02 | GTTTCGCTCC | 12 | 300 bp-1900 bp |
| 4 | RTG03 | GTAGACCCGT | 8 | 550 bp-1500 bp |
| 5 | OPO19 | GGTGCACGTT | 9 | 450 bp-2200 bp |
| 6 | OPE01 | CCAAGGTCC | 9 | 300 bp-2000 bp |
| 7 | OPL09 | TGCGAGAGTC | 7 | 250 bp-1500 bp |

Các đoạn mồi đều giúp phân biệt một số giống trong tổng số giống đem phân tích. Mồi RTG03 cho kết quả phân biệt được nhóm chịu hạn tốt với giống chuẩn không chịu hạn

¹ được dẫn trích từ Yoshida Koga, 1993

IRAT9, đặc biệt là kiểu đa hình giữa Salumpikit và IRAT khác nhau rất rõ ở các vị trí 569 bp, 696 bp và 1317 bp.

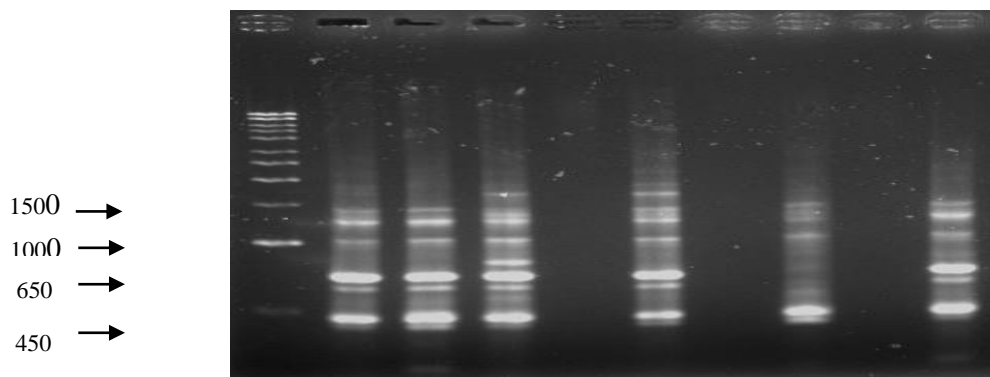
Môi OPO19 cho kết quả phân biệt được nhóm không chịu hạn với giống chuẩn chịu hạn tốt Salumpikit. Giống Thái Hồng có khả năng ra rễ mạnh nhất trong thực nghiệm hình thái có kiểu đa dạng khác với chuẩn Salumpikit ở vị trí 1500 bp.



Hình 3: Kết quả điện di DNA với đoạn môi RTG03 (5'GTAGACCCGT3')

M: marker chuẩn 1 Kb, A: giống chuẩn chịu hạn Salumpikit, D: giống chuẩn không chịu hạn IRAT9, B: giống chuẩn chịu hạn khá IR442. Kêko (1), Tyông (8), Jrai (9), Thái Lan Kdư (10), Không tên (11), Mdayton(12): các giống thuộc nhóm chịu hạn tốt. Ba Dréng (37), Rit (38): các giống thuộc nhóm chịu hạn kém.

M 33 34 35 37 39 D



Hình 11: Kết quả điện di nhóm giống chống chịu hạn kém với môi OPO19 (5'GGTGCACGTT3')

M: marker, D: giống chuẩn không chịu hạn IRAT9. Ba Me Brung (33), Thái Lan (34), Ba Krong (35), Ba Dréng (37), Rho But (39): các giống thuộc nhóm chịu hạn kém.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

- Tập đoàn lúa rẫy Trung bộ Việt Nam được thanh lọc và phân bốn nhóm 12,32% chịu hạn tốt, 39,04% mẫu giống chịu hạn khá, 32,19% mẫu giống chịu hạn trung bình và 16,43% mẫu giống chịu hạn kém. Trong đó, các giống Thái Hồng (398/95), Keko (303/95, Ba Phok và Jrai tỏ ra chống chịu được hạn rất tốt.
- Phân tích DNA lúa rẫy bằng phương pháp RAPD-PCR bước đầu cho thấy có sự đa dạng hình phân biệt được giữa các giống đem phân tích, tuy chưa có primer tương hợp với sự đánh giá hình thái tính chịu hạn ngoài đồng.

4.2 Đề nghị

Tiếp tục dò tìm đoạn môi cho kết quả tương hợp nhất với tính kháng hạn ngoài đồng, đồng thời sử dụng môi RTG03 và môi OPO19 để khảo sát di truyền tính kháng hạn của tập đoàn lúa rẫy qua các thế hệ phân ly.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999. Di truyền phân tử, những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng, tập 1. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh. Việt Nam. Trang 103-109, 195-203.
- Huỳnh Quang Tín và Võ Tông Xuân, 1996. Report on upland rice collection project in Viet Nam, dự án CBDC, Viện Hệ Thống Canh Tác Trường Đại học Cần Thơ. Việt Nam. Trang: 1-15.
- Võ Công Thành và Yutaka Hirata, 2002. Report on results of collaborative research project on plant bio diversity 1999-2002. Agricultural Faculty, Can Tho University, Viet Nam. Page: 21.
- Yasushiro Kono, 1993. Soil factors and root morphology. Science of the rice plant – Morphology. Food and Agriculture Policy Research Center. Volume 1. Pages: 507-512.
- Yoshida Koga, 1993. Drought resistance. Science of the rice plant – Genetic. Food and Agriculture Policy Research center. Volume 3. Pages: 554-562.