

Genetic diversity of lingzhi mushroom varieties based on ITS sequences

Nguyen Thi Giang, Le Huy Ham, Nguyen Xuan Canh, Kieu Thi Dung,
Mai Duc Chung, Khuat Huu Trung, Pham Xuan Hoi

Abstract

In this study, 13 samples of lingzhi mushrooms were investigated for genetic diversity based on the ITS (Internal Transcribed Spacer) of nuclear ribosomal gene. The mycelia of collected samples were isolated on PDA medium. ITS1 + 5.8S + ITS2 region was amplified by PCR with ITS4 / ITS5 primer pairs. ITS sequences of 13 samples were analyzed and used for building a phylogenetic tree. The result showed that the genetic similarity coefficient of 13 lingzhi mushroom samples ranged from 69.08% (between D3 and D10 strains) to 100% (between DT and D20 strains). The phylogenetic tree of 13 collected samples and references samples showed high diversity: D3 strain belongs to *Fomitopsis subtropica* species; D6 and D9 strains belong to *Ganoderma flexipes* species; D20, DT and Dk3 strains belong to *Ganoderma lingzhi* species; Dk and D18 strains belong to *Ganoderma sichuanense* species; D5 and D16 strains belong to *Amauroderma rugosum* species; D7, D8, D10 belong to *Ganoderma australe* species.

Keywords: Lingzhi mushroom, genetic diversity, sequencing, ITS (Internal transcribed spacer)

Ngày nhận bài: 11/10/2020

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Giang

Ngày phản biện: 03/11/2020

Ngày duyệt đăng: 22/12/2020

ĐÁNH GIÁ TÍNH CHỊU MẶN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA MÙA TỈNH KIÊN GIANG

Nguyễn Thị Pha¹, Trần Hoàng Thanh¹, Nguyễn Khắc Thăng²,
Nguyễn Hữu Minh² và Trần Đình Giới^{2*}

TÓM TẮT

Biến đổi khí hậu làm cho tình trạng xâm nhập mặn ngày một nghiêm trọng đe dọa sản xuất lúa ở đồng bằng sông Cửu Long. Nghiên cứu đánh giá tính chịu mặn của 22 giống lúa mùa thu thập từ tỉnh Kiên Giang so sánh với Pokkali và IR29 để chọn ra các giống lúa triển vọng. Các giống lúa này sau đó được phân tích kiểu gen sử dụng 03 chỉ thị SSR của vùng Saltol QTL (RM140, RM8094 và RM10793) và 01 chỉ thị SSR liên kết với gen tham gia chịu mặn trên nhiễm sắc thể số 8 (RM223). Kết quả đánh giá kiểu hình đã xác định được 06 giống lúa chịu mặn khá (điểm 3 - 5) gồm Nàng Sâu, Lúa Chuối, Nếp 10-2, Nếp 10-3, Tiêu Chệt và OM1352 và 10 giống lúa chịu mặn trung bình (điểm 5 - 7) ở nồng độ mặn 4‰. Phân tích kiểu gen sử dụng các chỉ thị phân tử RM8094, RM223 và RM10793 giúp chọn lọc được giống lúa có khả năng chịu mặn với tỷ lệ chính xác lần lượt là 90%; 81,8% và 76,9%; chỉ thị RM140 xác định được 4 giống lúa có kiểu gen chịu mặn khác với giống Pokkali là Móng Chim Rơi, Tiêu Chệt, Nếp 10-2 và Bằng Đỏ. Các giống lúa này đang được khảo nghiệm tại Kiên Giang để chọn ra những giống lúa triển vọng đưa vào sản xuất.

Từ khóa: Lúa mùa, chịu mặn, chỉ thị SSR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kiên Giang là tỉnh còn nhiều diện tích lúa mùa nhất ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) do được sử dụng trong các mô hình lúa - tôm, lúa - cá ở các huyện vùng U Minh Thượng với khoảng 50 - 60

ngàn ha/năm. Lúa - tôm được xem là mô hình sản xuất thông minh trên đồng đất ven biển tỉnh Kiên Giang trong điều kiện biến đổi khí hậu ngày càng diễn biến phức tạp hiện nay (Sở Khoa học và Công nghệ Kiên Giang, 2019). Tuy nhiên, lúa là một

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

* Tác giả liên hệ, e-mail: tdgioi@gmail.com

trong số các loài cây trồng mẫn cảm với mặn, chỉ thích hợp gieo trồng trong điều kiện nước ngọt có nồng độ muối < 1,5‰ (Grieve *et al.*, 2012). Trong khi đó, tôm sú lại thích sống trong nước lợ có nồng độ mặn trung bình khoảng 15 - 35‰ tùy theo loài (Ferraris *et al.*, 1986; Jiann *et al.*, 1996; Sang *et al.*, 2004; Kumlu and Jones, 1995; Kumlu *et al.*, 1999; Staples and Heales, 1991; Ponce *et al.*, 1997). Mặc dù vậy, trồng lúa trên đất nuôi tôm và ngược lại nuôi tôm trên đất lúa không xảy ra “xung đột mặn - ngọt” mà còn đem lại nguồn lợi cao cho nông dân và tạo môi trường sản xuất bền vững, ít rủi ro. Vào mùa khô, nước ngoài sông rạch mặn đưa vào nuôi tôm và khi mưa thì lấy nước ngọt trồng lúa. Những chất thải hữu cơ sau khi nuôi tôm làm cho đất màu mỡ, chỉ bón một lượng phân ít là đáp ứng nhu cầu phát triển của cây lúa. Ngược lại, nuôi tôm tiếp sau vụ lúa, các chất độc hại giảm đáng kể do khả năng làm sạch tự nhiên của đồng ruộng trong thời gian trồng lúa; đất không bị lão hóa, cắt mầm bệnh, môi trường ổn định, nguồn thức ăn tự nhiên dồi dào cho tôm nuôi. Để hạn chế sử dụng phân bón hóa học và thuốc bảo vệ thực vật, trong mô hình lúa -

tôm, nông dân chủ yếu sử dụng các giống lúa mùa chất lượng cao, chịu mặn tốt, thích ứng với điều kiện sản xuất ở địa phương. Cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ, hiện nay ứng dụng chỉ thị phân tử liên kết với gen mục tiêu trong chọn lọc giống cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng đang được sử dụng phổ biến. Vùng gen chịu mặn chủ yếu cho cây lúa đang được tập trung nghiên cứu là QTL *Saltol* ở vị trí 10,3 - 15,3 Mb trên nhiễm sắc thể số 1 (Thomson *et al.*, 2010) và vùng gen trên nhiễm sắc thể số 8 (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2003). Do vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các giống lúa mùa chất lượng cao chịu mặn phục vụ cho sản xuất lúa trong các mô hình lúa - tôm tỉnh Kiên Giang.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gồm 22 giống lúa mùa thu thập từ các huyện vùng U Minh Thượng tỉnh Kiên Giang so sánh với 2 giống chuẩn chống chịu Pokkali và chuẩn mẫn cảm IR29, có danh sách như trong bảng 1.

Bảng 1. Danh sách các giống lúa mùa khảo sát tính chịu mặn

TT	Tên giống	TT	Tên giống
1	Móng Chim Rơi	13	Nàng Sâu
2	Nếp Thơm	14	Lúa Chuối
3	Nếp Than	15	Nàng Nhen Thơm
4	Một Bụi Đỏ	16	Nếp 222
5	Trắng Tép	17	Nếp 10-3
6	Ba Bụi	18	Nếp 18
7	Một Bụi	19	Nếp 1
8	Nếp 14	20	Nếp 10-2
9	Nếp 4-1	21	OM1352
10	Nàng Tích	22	Bàng Đỏ
11	Tiêu Chệt	23	Pokkali (chuẩn chống chịu)
12	Tây Liêu	24	IR29 (Chuẩn mẫn cảm)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thanh lọc kiểu hình tính chịu mặn

Các giống lúa khảo sát được đánh giá tính chịu mặn theo quy trình thanh lọc mặn giai đoạn mạ của IRRI (2021). Thực hiện 2 thí nghiệm thanh lọc 22 giống lúa so sánh với hai giống đối chứng Pokkali và IR29 ở 2 nồng độ mặn là 4‰ và 8‰. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần

lặp lại. Chỉ tiêu theo dõi: Cấp chống chịu và tỷ lệ sống của các giống lúa khi giống IR29 (chuẩn mẫn cảm) chết hoàn toàn theo tiêu chuẩn đánh giá của IRRI (2013) như trong bảng 2. Số liệu được phân tích phương sai, đánh giá sự khác biệt bằng phần mềm Statgraphic và sử dụng NTSYSpc2.1 để vẽ sơ đồ phân nhánh mối tương quan giữa các giống lúa dựa trên số liệu chịu mặn.

Bảng 2. Tiêu chuẩn đánh giá (SES) ở giai đoạn tăng trưởng của cây (IRRI, 2013)

Điểm SES	Đặc điểm biểu hiện	Mức độ chịu mặn
1	Sinh trưởng bình thường, lá không có biểu hiện	Chống chịu tốt
3	Sinh trưởng gần như bình thường, nhưng đầu lá hoặc một vài lá hơi trắng và cuộn	Chống chịu khá
5	Sinh trưởng chậm lại, hầu hết các lá bị cuộn, chỉ có vài lá có thể mọc dài ra	Chống chịu trung bình
7	Ngừng sinh trưởng hoàn toàn, phần lớn lá bị khô, một vài chồi bị chết	Mẫn cảm
9	Tất cả các cây chết hoặc khô	Rất mẫn cảm

2.2.2. Phân tích kiểu gen chịu mặn của các giống lúa

Các giống lúa được ly trích ADN bằng phương pháp CTAB của Rogers and Bendich (1988). Các mẫu ADN sau khi ly trích được phân tích kiểu gen sử dụng 3 chỉ thị phân tử vùng QTL *Saltol* của Thomson và cộng tác viên (2010), và chỉ thị RM223

liên kết với gen tham gia chịu mặn trên nhiễm sắc thể số 8 (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2003) có trình tự mỗi xuôi, ngược và sản phẩm dự kiến như trong bảng 3. Thông tin chi tiết về các mối SSR được thu thập từ cơ sở dữ liệu Gramene (www.gramene.org).

Bảng 3. Các chỉ thị phân tử liên kết với các vùng gen chịu mặn của các giống lúa

TT	Chỉ thị	Trình tự (5' - 3')	NST	Vị trí (Mb)	Kiểu lặp	Kích thước (bp)
1	RM140	F: TGCCTCTTCCCTGGCTCCCCTG R: GGCATGCCGAATGAAATGCATG	1	12,2	(CT)12	261
2	RM223	F: GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC R: GAAGGCAAGTCTTGGCACTG	8	20,6	(CT)25	165
3	RM8094	F - AAGTTTGTACACATCGTATACA R - CGCGACCAGTACTACTACTA	1	11,5	(AT)31	209
4	RM10793	F: GACTTGCCAACTCCTTCAATTCG R: TCGTCGAGTAGCTTCCCTCTCTACC	1	12,5	(ATAG)7	123

Sản phẩm PCR được thực hiện theo phương pháp của Nguyễn Thị Lang (2002). Các thành phần hóa chất cho 15 µL mẫu phản ứng PCR được chuẩn bị bao gồm: 8,65 µL nước cất tiệt trùng 2 lần; 3 µL dung dịch đệm cho PCR (5X buffer), 1,2 µL dung dịch mỗi xuôi và mỗi ngược (10 pmol); 0,15 µL dung dịch Taq ADN polymerase (5unit/µL) và 2 µL ADN tổng số (~50 ng). Quy trình gia nhiệt được thực hiện bằng máy ADN thermal cycler - model: GeneAmp PCR System 9700 (USA) theo chương trình được thiết lập tự động bao gồm: giai đoạn khởi đầu biến tính ở 94°C trong 2 phút và 30 chu kỳ với các bước: biến tính, tách đo mạch kép ADN ở 94°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 55°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 45 giây và ổn định sản phẩm ở 72°C trong 5 phút, mẫu được trữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% bổ sung thuốc nhuộm safe view. Kích thước các băng ADN được tính toán bằng phần mềm GelAnalyzer (Istvan and Istvan, 2019).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 11 năm 2021 đến tháng 3 năm 2022 tại Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thanh lọc kiểu hình tính chịu mặn của các giống lúa

Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa ở giai đoạn mạ sau 16 ngày thanh lọc mặn nhân tạo được tổng hợp trong bảng 4.

Kết quả bảng 4 cho thấy, ở độ mặn 4‰ không có giống nào có cấp chịu mặn và tỷ lệ sống sót tương đương với giống chuẩn chống chịu Pokkali (2,7 và 100%). Trong số các giống khảo sát, có 6 giống chịu mặn khá (cấp 3 - 5, chiếm 27,3% tổng số 22 giống) gồm Nếp 10-2 và Lúa Chuối (cấp 3,7); OM1352 và Nếp 222 (4,0); Nàng Sâu và Tiêu Chệt (4,7). Các giống này có tỷ lệ sống sót cao (74 - 94%) và có sự

khác biệt có ý nghĩa thống kê cả về cấp chống chịu (0,5 - 0,7) và tỷ lệ sống sót (4,9 - 6,5%) so với giống chuẩn chống chịu Pokkali. Mười giống có khả năng chịu mặn trung bình (cấp 5,0 - 6,7; chiếm 45,5% số giống) gồm: Móng chim rơi, Nếp Thơm, Một Bụi Đỏ, Trắng Tép, Ba Bụi, Tây Liêu, Nếp 1, Nếp Than, Một Bụi và Bằng Đỏ. Các giống này có tỷ lệ sống sót trung bình (40 - 65%) và cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm các giống chống chịu và nhóm mặn cảm với mặn cả về cấp chống chịu và tỷ lệ sống sót. Các giống còn lại mặn cảm với mặn tương đương với giống chuẩn mặn cảm IR29 có cấp chống chịu từ 6,7 - 7,7, tỷ lệ sống thấp dao động từ 15,7 - 38,9%. Kết quả này cho thấy khả năng chịu

mặn của các giống lúa thấp hơn so với nghiên cứu của Lê Thị Thu Trang (2011) khảo sát tính chịu mặn của 40 giống lúa địa phương, chọn tạo ở các tỉnh phía bắc và nhập nội đã xác định được 45% số giống chịu mặn ở cấp 3; 35% chịu mặn ở cấp 5 và 10% mặn cảm ở cấp 7 nhưng ở nồng độ muối thấp hơn (3‰). Xét về tỷ lệ sống sót, kết quả này cũng thấp hơn so với nghiên cứu của Phan Chí Hiếu (2014) khảo sát tính chịu mặn của 12 giống lúa địa phương, lúa lai F1 và chọn tạo từ các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long đã xác định được 5/12 giống có tỷ lệ sống sót hơn 70% sau 14 ngày thanh lọc ở nồng độ muối 4‰ và 5/12 giống cho tỷ lệ sống sót từ 50 - 70%.

Bảng 4. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa ở độ mặn 4‰ và 8‰

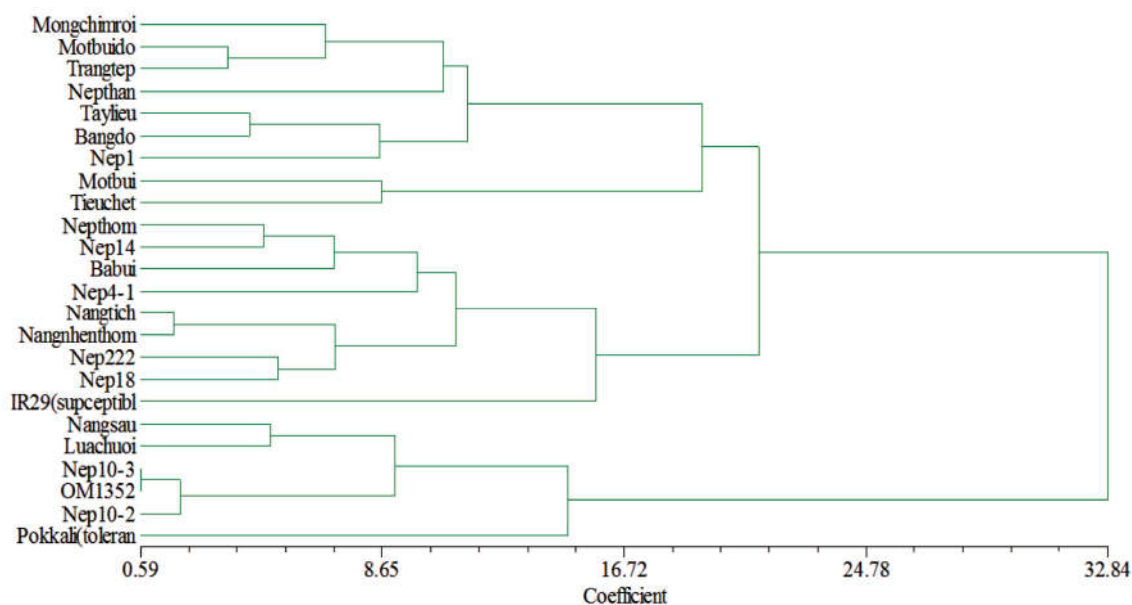
TT	Tên giống	4‰		8‰	
		Cấp chống chịu (1 - 9)	Tỷ lệ sống (%)	Cấp chống chịu (1 - 9)	Tỷ lệ sống (%)
1	Móng Chim Rơi	5,7	65,2	6,7	46,5
2	Nếp Thơm	6,0	43,8	7,0	27,1
3	Nếp Than	5,0	64,0	5,7	63,2
4	Một Bụi Đỏ	6,0	55,7	7,7	43,5
5	Trắng Tép	6,0	48,8	7,0	42,4
6	Ba Bụi	6,0	50,1	8,0	20,1
7	Một Bụi	5,0	74,1	8,0	22,4
8	Nếp 14	6,7	38,9	6,7	35,1
9	Nếp 4-1	6,7	31,3	6,7	42,2
10	Nàng Tích	7,0	31,3	7,7	16,7
11	Tiêu Chệt	4,7	83,8	7,7	36,7
12	Tây Liêu	6,0	48,0	6,7	58,5
13	Nàng Sâu	4,7	84,4	6,0	63,2
14	Lúa Chuối	3,7	93,8	5,0	60,4
15	Nàng Nhen Thơm	7,0	34,4	7,0	18,0
16	Nếp 222	7,7	24,4	7,7	24,3
17	Nếp 10-3	4,0	94,4	5,0	79,8
18	Nếp 18	7,7	15,7	8,0	18,8
19	Nếp 1	6,0	42,5	6,0	72,9
20	Nếp 10-2	3,7	90,7	4,7	77,5
21	OM1352	4,0	93,8	5,0	78,8
22	Bằng Đỏ	6,0	40,65	7,0	54,3
23	Pokkali (chuẩn chống chịu)	2,7	100	3,0	100,0
24	IR29 (chuẩn mặn cảm)	7,7	17,5	9,0	0,0
	TB	5,7	56,9	6,4	45,9
	CV (%)	11,82	10,44	8,01	6,43
	LSD _{0,05}	0,5	4,9	0,4	0,3
	LSD _{0,01}	0,7	6,5	0,6	0,5

Ở độ mặn 8‰, phản ứng chịu mặn của các giống lúa giảm đáng kể, chỉ có giống chuẩn chống chịu Pokkali là chống chịu tốt (cấp 3), chiếm 4,5% trên tổng số 22 giống; có 1 giống chịu mặn khá (cấp 3 - 5), chiếm 4,5% số giống là Nếp 10-2 (cấp 4,7); bốn giống chịu mặn trung bình là Nếp Than (cấp 5,7), Lúa Chuối, Nếp 10-3 và OM1352 (cấp 5,0) chiếm 18,2% số giống; các giống còn lại đều mẫn cảm ở cấp 7 - 8 nhưng đều chống chịu tốt hơn giống chuẩn mẫn cảm IR29 (cấp 9). Các nhóm giống đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhau về cấp chống chịu và tỷ lệ sống sót. Ở nồng độ muối 8‰ có 9/24 giống (chiếm 37,5%) cho tỷ lệ sống sót hơn 50% gồm: Nếp Than, Tây Liêu, Nàng Sâu, Lúa Chuối, Nếp 10-3, Nếp 1, Nếp 10-2, OM1352 và Bằng Đỏ. Kết quả này cũng cho thấy khả năng chịu mặn của các giống lúa thấp hơn so với nghiên cứu của Lê Thị Thu Trang (2011) với 7,5% số giống chịu mặn ở cấp 3; 35% chịu mặn ở cấp 5 và 32,5% mẫn cảm ở cấp 7 cùng ở nồng độ muối 8‰. Xét về tỷ lệ sống sót, kết quả này cũng thấp hơn so với nghiên cứu của Phan Chí Hiếu (2014) khi xác định được 6/12 giống (chiếm 50%) có tỷ lệ sống sót trên 50% sau 14 ngày thanh lọc ở nồng độ muối 6‰.

Kết quả phân nhóm các giống lúa dựa trên các

chỉ tiêu chịu mặn (Hình 1) cho thấy, các giống lúa được chia thành 3 nhóm, giống lúa chuẩn chống chịu Pokkali được xếp chung vào nhóm I với các giống lúa Nếp 10-2, Nếp 10-3, OM1352, Nàng Sâu và Lúa Chuối nhưng tách riêng 1 nhánh có độ tương đồng 85% (khác biệt 15%). Nhóm này có tỷ lệ tương đồng với 2 nhóm còn lại là 67,2% (khác biệt 32,8%). Giống lúa chuẩn mẫn cảm IR29 được xếp vào nhóm II với các giống lúa Nếp 18, Nếp 222, Nàng Nhen Thơm, Nàng Tích, Nếp 4-1, Ba Bụi, Nếp 14 và Nếp Thơm nhưng tách riêng một nhánh có độ tương đồng khoảng 84% (khác biệt 16%). Các giống còn lại nằm ở nhóm III trung gian giữa chống chịu và mẫn cảm với mặn gồm 9 giống có độ tương đồng với nhóm mẫn cảm khoảng 69,5% (khác biệt 31,5%) và tương đồng với nhóm chống chịu khoảng 67,2% (khác biệt 32,8%).

Như vậy, kết quả đánh giá tính chịu mặn của 22 giống lúa dựa trên điểm chống chịu (cấp) và tỷ lệ sống sót ở 2 nồng độ mặn là 4‰ và 8‰ đã xác định được giống lúa thuộc nhóm I có tính chịu mặn khá là giống Nếp 10-2; chín giống có khả năng chịu mặn trung bình nằm trong nhóm III gồm Móng Chim Rơi, Một Bụi Đỏ, Nếp Than, Tây Liêu, Bằng Đỏ Nếp 1, Một Bụi và Tiêu Chết.



Hình 1. Sơ đồ phân nhánh của các giống lúa dựa trên các chỉ tiêu chịu mặn

3.2. Kết quả phân tích kiểu gen chịu mặn của các giống lúa

Kết quả điện di sản phẩm PCR các mẫu ADN của giống lúa sử dụng 4 chỉ thị phân tử đều là các

chỉ thị phân tử có tính đa hình giữa các giống lúa là RM140, RM223, RM8094 và RM10793 (Hình 2, Hình 3, Hình 4 và Hình 5).

3.2.1. Kết quả phân tích kiểu gen sử dụng chỉ thị RM140

Kết quả hình 2 cho thấy, có sự đa hình giữa các giống lúa khi sử dụng chỉ thị RM140. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Lê Thị Thu Trang (2011) khi tiến hành sử dụng chỉ thị RM140 để nhận diện ở 40 giống lúa thì đều thể hiện alen đa hình ở tất cả 40 giống. Tuy nhiên, không phân biệt

được các giống chuẩn chống chịu Pokkali (lane 1) với giống chuẩn mẫn cảm IR29 (lane 2): Các giống số 4 (Móng Chim Rơi), 11 (Tiêu Trệt), 18 (Nếp 10-2) và 19 (Bằng Đỏ) có kích thước băng (355 bp) khác với các giống còn lại kể cả Pokkali và IR29 (350 bp) và chúng đều thuộc nhóm có kiểu hình chịu mặn trung bình đến khá (trong nhóm I hoặc III).



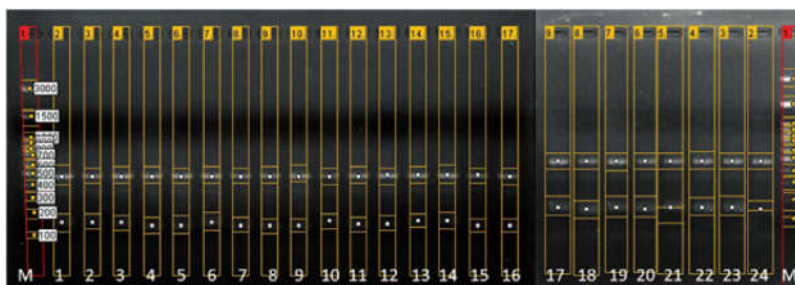
Hình 2. Sản phẩm PCR của các giống lúa sử dụng chỉ thị RM140.

Ghi chú: Các lane M: thang đo 100 bp; 1: Pokkali; 2: IR29; 3: Nếp 14; 4: Móng Chim Rơi; 5: Nếp Thơm; 6: Nếp Than; 7: Một Bụi đỏ; 8: Trắng Tép; 9: Ba Bụi; 10: Một Bụi; 11: Tiêu Trệt; 12: Nàng Tích; 13: Nàng Sâu; 14: Lúa Chuối; 15: Nếp 10-3; 16: Nếp 1; 17: Nếp 4-1; 18: Nếp 10-2; Bằng Đỏ; 19; 20: Tây Liêu; 21: Nàng Nhen Thơm; 22: Nếp 222; 23: Nếp 18; 24: OM1352.

3.2.2. Kết quả phân tích kiểu gen sử dụng chỉ thị RM223

Sản phẩm PCR của các giống lúa sử dụng chỉ thị RM223 (Hình 3) cho thấy có sự đa hình giữa các giống, tuy nhiên không phân biệt được các giống chuẩn chống chịu Pokkali (lane 1) với giống chuẩn mẫn cảm IR29 (lane 2). Các giống Móng Chim Rơi (lane 4), Nếp Thơm (lane 5), Một Bụi Đỏ (lane 7), Trắng Tép (lane 8), Ba Bụi (lane 9), Nàng Tích (lane 11), Tiêu Trệt (lane 12), Nếp 10-3 (lane 15), Nếp 1 (lane 16), Bằng Đỏ (lane 18), Tây Liêu (lane 20) và OM1352 (lane 24) có kích thước khoảng 180 bp

khác với giống lúa Pokkali và IR29 (190 bp). Các giống này chủ yếu nằm ở nhóm có kiểu hình chịu mặn khá (Nếp 10-3 và OM1352) và trung bình (7 giống thuộc nhóm III), chỉ có ba giống thuộc nhóm mẫn cảm (Nhóm II). Như vậy, tỷ lệ chọn được giống lúa chịu mặn là 9/11 tương đương với 81,8%. Kết quả này có phần thấp hơn so với nghiên cứu của Lang và cộng tác viên (2017), khi tiến hành thanh lọc mặn đã xác định được độ chính xác giữa kiểu gen và kiểu hình chịu mặn ở giai đoạn mạ lên đến 92% dựa theo chỉ thị RM223.



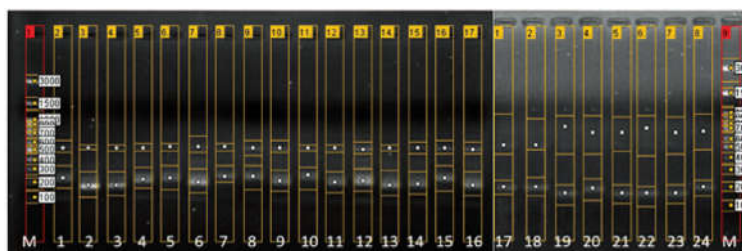
Hình 3. Sản phẩm PCR của các giống lúa sử dụng chỉ thị RM223

Ghi chú: Các lane M: thang đo 100 bp; 1: Pokkali; 2: IR29; 3: Nếp 14; 4: Móng Chim Rơi; 5: Nếp Thơm; 6: Nếp Than; 7: Một Bụi đỏ; 8: Trắng Tép; 9: Ba Bụi; 10: Một Bụi; 11: Nàng Tích; 12: Tiêu Trệt; 13: Nàng Sâu; 14: Lúa Chuối; 15: Nếp 10-3; 16: Nếp 1; 17: Nếp 10-2; 18: Bằng Đỏ; 19: Nếp 4-1; 20: Tây Liêu; 21: Nàng Nhen Thơm; 22: Nếp 222; 23: Nếp 18; 24: OM1352.

3.2.3. Kết quả phân tích kiểu gen sử dụng chỉ thị RM8094

Kết quả hình 4 sử dụng chỉ thị RM8094 cho thấy, có sự đa hình giữa các giống lúa chống chịu Pokkali (240 bp) và mẫn cảm IR29 (220 bp). Các giống Móng Chim Rơi (lane 4), Nếp Thơm (lane 5), Một Bụi Đỏ (lane 7), Trắng Tép (lane 8), Một Bụi (lane 10), Nếp 10-3 (lane 15), Nếp 10-2 (lane 17), Bằng Đỏ (lane 18), Tây Liêu (lane 20) và OM1352

(lane 24) có kích thước tương ứng với giống lúa Pokkali (240 bp). Các giống lúa còn lại cho băng ADN có kích thước tương đương giống chuẩn mẫn cảm IR29 (220 bp). Hầu hết các giống này đều nằm trong nhóm có kiểu hình chịu mặn trung bình đến khá (nhóm I và III), chỉ riêng giống Nếp Thơm là thuộc nhóm II cùng với giống chuẩn mẫn cảm nhưng được xếp riêng 1 nhánh có tỷ lệ tương đồng thấp nhất với giống chuẩn mẫn cảm.



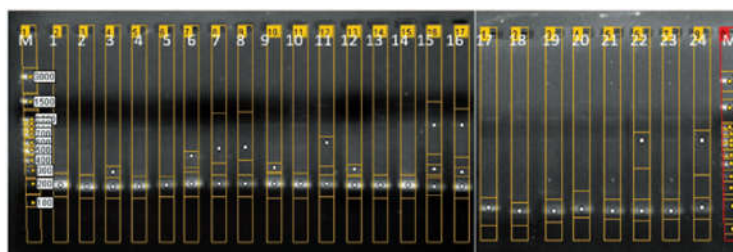
Hình 4. Sản phẩm PCR của các giống lúa sử dụng chỉ thị RM8094

Ghi chú: Các lane M: thang đo 100 bp; 1: Pokkali; 2: IR29; 3: Nếp 14; 4: Móng Chim Rơi; 5: Nếp Thơm; 6: Nếp Than; 7: Một Bụi đỏ; 8: Trắng Tép; 9: Ba Bụi; 10: Một Bụi; 11: Nàng Tích; 12: Tiêu Trệt; 13: Nàng Sâu; 14: Lúa Chuối; 15: Nếp 10-3; 16: Nếp 1; 17: Nếp 10-2; 18: Bằng Đỏ; 19: Nếp 4-1; 20: Tây Liêu; 21: Nàng Nhen Thơm; 22: Nếp 222; 23: Nếp 18; 24: OM1352

3.2.4. Kết quả phân tích kiểu gen sử dụng chỉ thị RM10793

Sản phẩm PCR của các giống lúa sử dụng chỉ thị RM10793 (Hình 5) cho thấy có sự đa hình giữa các giống lúa chống chịu Pokkali (215 bp) và mẫn cảm IR29 (205 bp). Các giống Nếp Thơm (lane 5), Tiêu Trệt (lane 12), Nàng Sâu (lane 13) và Lúa Chuối (lane 14), Nếp 10-2 (lane 17), Tây Liêu (lane 20) và OM1352 (lane 24) có kích thước bằng tương ứng với giống chuẩn chịu mặn Pokkali; Các giống Nếp Than, Một Bụi Đỏ, Trắng Tép, Ba Bụi, Một Bụi, Nàng Tích (lane 6 - 11) có kích thước khoảng 220 bp khác với giống lúa Pokkali (215 bp) và IR29 (205 bp). Các giống lúa còn lại cho băng ADN có kích thước tương đương giống chuẩn mẫn cảm IR29. Trong bảy giống có

kích thước bằng tương đương với Pokkali, năm giống là Nàng Sâu, Lúa Chuối, Nếp 10-2, Tây Liêu và OM1352 thuộc nhóm có kiểu hình chịu mặn khá (nhóm I); giống Tiêu Trệt thuộc nhóm có kiểu hình chịu mặn trung bình, chỉ có một giống mẫn cảm (Nếp Thơm). Các giống có kích thước bằng khác Pokkali và IR29 thì có bốn giống thuộc chịu mặn trung bình và hai giống thuộc nhóm mẫn cảm (Ba Bụi và Nàng Tích). Như vậy, tỷ lệ chọn được giống lúa chống chịu là 10/13, tương đương với 76,9%. Kết quả này có phần cao hơn so với nghiên cứu của Phan Chí Hiếu (2014) khi sử dụng chỉ thị RM10793 đã chọn được 7/12 giống lúa ở tỉnh Trà Vinh tương đương khoảng 58,3% là có khả năng chịu mặn.



Hình 5. Sản phẩm PCR của các giống lúa sử dụng chỉ thị RM10793

Ghi chú: Các lane M: thang đo 100 bp; 1: Pokkali; 2: IR29; 3: Nếp 14; 4: Móng Chim Rơi; 5: Nếp Thơm; 6: Nếp Than; 7: Một Bụi đỏ; 8: Trắng Tép; 9: Ba Bụi; 10: Một Bụi; 11: Nàng Tích; 12: Tiêu Trệt; 13: Nàng Sâu; 14: Lúa Chuối; 15: Nếp 10-3; 16: Nếp 1; 17: Nếp 10-2; 18: Bằng Đỏ; 19: Nếp 4-1; 20: Tây Liêu; 21: Nàng Nhen Thơm; 22: Nếp 222; 23: Nếp 18; 24: OM1352

Như vậy, chỉ thị RM8094 giúp tuyển chọn chính xác 9/10 giống chịu mặn tương đương với 90%, kết quả này tương đồng so với nghiên cứu của Ganie và cộng tác viên (2016) cũng đã chọn RM8094 là chỉ thị có phần ưu thế hơn so với 7 chỉ thị còn lại để phân biệt được kiểu gen chịu mặn với kiểu gen mẫn cảm với mặn. Trong khi đó chỉ thị RM140 chỉ xác định được 3 giống có kiểu gen chịu mặn khác với giống Pokkali. Chỉ thị RM223 và RM10793 cũng giúp xác định được giống lúa chịu mặn với độ chính xác là 76,9 - 81,8%. Trong đó, chỉ thị RM8094, RM10793 là các chỉ thị liên kết với QTL *Saltol* có vai trò chính giúp cây lúa chống chịu được mặn ở giai đoạn mạ trong quá trình sinh trưởng và phát triển (Yadav *et al.*, 2020).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả đánh giá kiểu gen và kiểu hình 22 giống lúa mùa Kiên Giang đã xác định được 5 giống lúa chịu mặn khá ở nồng độ mặn 4‰ (Nàng Sâu, Lúa Chuối, Nếp 10-2, Nếp 10-3 và OM1352), chín giống lúa chịu mặn trung bình (Móng Chim Rơi, Một Bụi Đỏ, Trắng Tép, Nếp Than, Tày Liêu, Bằng Đỏ, Trắng Tép, Nếp 1, Một Bụi và Tiều Chệt). Sử dụng chỉ thị phân tử RM8094, RM223 và RM10793 giúp chọn lọc được giống lúa có khả năng chịu mặn với tỷ lệ chính xác lần lượt là 90%; 81,8% và 76,9%; chỉ thị RM140 xác định được 4 giống lúa có kiểu gen chịu mặn khác với giống Pokkali là Móng Chim Rơi, Tiều Chệt, Nếp 10-2 và Bằng Đỏ.

4.2. Đề nghị

Đề nghị khảo sát khả năng chịu mặn và các đặc tính nông học khác trong điều kiện thực tế ngoài đồng ruộng của 14 giống lúa có khả năng chịu mặn khá và trung bình để tìm ra giống lúa có tiềm năng năng suất cao, chịu mặn và thích nghi với điều kiện canh tác lúa tại địa phương.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành gửi lời cảm ơn đến đề tài “Nghiên cứu phục tráng các giống lúa mùa đặc sản, hoàn thiện quy trình kỹ thuật canh tác và xây dựng thương hiệu gạo vùng U Minh Thượng, tỉnh Kiên Giang” đã cung cấp vật liệu, hóa chất và kinh phí cho nhóm thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang**, 2003. *Cơ sở di truyền tính chống chịu đối với thiệt hại do môi trường của cây lúa*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh, 193 trang.
- Phan Chí Hiếu**, 2014. Khảo sát và tuyển chọn một số giống lúa có khả năng chịu mặn tại các huyện ven biển của tỉnh Trà Vinh. Báo cáo Tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường. Trường Đại học Trà Vinh.
- Nguyễn Thị Lang**, 2002. *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu Công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh, 219 trang.
- Lê Thị Thu Trang**, 2011. *Nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen liên quan đến tính chịu mặn ở lúa Việt Nam*. Luận văn Thạc sĩ. Đại học Quốc gia Hà Nội. Việt Nam, 89 trang.
- Ferraris R.P., Parado-Estepa F.D., DeJesus E.G., and Ladja J.M.**, 1986. Osmotic and chloride regulation in the haemolymph of the tiger prawn *Penaeus monodon* during molting in various salinities. *Marine Biology*, 95: 377-385.
- Ganie, S.A., Borgohain, M.J., Kritika, K., Talukdar, A., Pani, D.R. and Mondal, T.K.**, 2016. Assessment of genetic diversity of Saltol QTL among the rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22 (1): 107-114.
- Grieve, C.M., Grattan, S.R., & Maas, E.V.**, 2012. *Plant salt tolerance*. In: W.W. Wallender & K.K. Tanji (2nd Eds.), *Agricultural Salinity Assessment and Management*: 405-459.
- IRRI**, 2013. Standard evaluation system for rice. *Genetic Resources Centre*, P.O. Box 933, Manila 1099, Philippines.
- IRRI**, 2021. Phenotyping protocols for abiotic stress tolerance in rice. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. Creative Commons - Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International - CC BY - NC - SA 4.0.
- Istvan, Lazar. Jr., & Istvan, Lazar. Sr.**, 2019. GelAnalyzer 19.1. Accessed on 21/02/2022. Available from: www.gelanalyzer.com.
- Giann-Chu C., Jin-Nien L., Chung-Tin C., and Min-Nan L.**, 1996. Survival, growth and intermolt period of juvenile *Penaeus chinensis* (Osbeck) reared at different combinations of salinity and temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 204: 169-178.
- Kumlu M. and Jones D.A.**, 1995. Salinity tolerance of hatchery-reared postlarvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards originating from India. *Aquaculture*, 130: 287-296.

- Kumlu M., Eroldogan O.T., and Aktas M.,** 1999. The effect of salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 51: 114-121.
- Lang, N.T., Phuoc, N.T., Ha, P.T.T., and Buu, B.C.,** 2017. Identifying QTLs Associated and Marker Assisted Selection for Salinity Tolerance at the Seedling, Vegetative and Reproductive Stages in Rice (*Oryza Sativa* L.). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2: 2928-2935.
- Ponce-Palafox J., Martinez-Palacios C.A., and Ross L.G.,** 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157: 107-115.
- Rogers S.O. and Bendich A.J.,** 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, A6: 1-10.
- Sang H.M. and Fotedar R.,** 2004. Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) reared at different salinity. *Aquaculture*, 234: 601-614.
- Staples D.J. and Heales D.S.,** 1991. Temperature and salinity optima for growth and survival of juvenile banana prawns *Penaeus merguensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 54: 251-274.
- Thomson, M.J., Ocampo, M., Egdane, J., Rahman, M.K., Sajise, A.G., Adorada, D.L., Tumimbang - Raiz E., Blumwald E., Seraj Z.I., Singh R.K., Gregorio G.B., & Ismail M.A.,** 2010. Characterizing the *Saltol* Quantitative Trait Locus for Salinity Tolerance in Rice. *Rice*, 3: 148-160.
- www.gramene.org.** Accessed on 01/1/2022 - 15/01/2022.
- Yadav, A.K., Kumar, A., Grover, N., Ellur, R.K., Krishnan, S.G., Bollinedi, H., Bhowmick, P.K., Vinod, K.K., Nagarajan, M., Krishnamurthy, S.L., & Singh, A.K.,** 2020. Marker aided introgression of 'Saltol', a major QTL for seedling stage salinity tolerance into an elite Basmati rice variety 'Pusa Basmati 1509'. *Scientific Reports*, 10 (1): 13877.

Salt tolerant assessment of Summer rice varieties collected from Kien Giang province

Nguyen Thi Pha, Tran Hoang Thanh, Nguyen Khac Thang,
Nguyen Huu Minh, Tran Dinh Gioi

Abstract

Climate change makes saltwater intrusion more and more serious, threatening rice production in the Mekong Delta. The study evaluated the salt tolerance of 22 Summer rice varieties collected from Kien Giang province, compared with Pokkali and IR29 to select promising rice varieties. These rice varieties were then genotyped using three SSR markers of the *Saltol* QTL region (RM140, RM8094, and RM10793) and one SSR marker associated with the salt tolerance gene on chromosome 8 (RM223). The results of the phenotypic assessment identified 6 good salt-tolerant rice varieties (scores 3 - 5) at 4‰ salinity, including Nang Sau, Lua Chua, Nep 10-2, Nep 10-3, OM1352 and 10 moderate salt tolerant varieties (scores 5 - 7) at 4‰ salinity. Genotyping analysis using SSR markers RM8094, RM223, and RM10793 could select salt tolerance rice varieties with an accuracy rate of 90%; 81.8% and 76.9%, respectively. The marker RM140 identified four rice varieties with salt tolerance genotypes different from Pokkali, namely Mong Chim Roi, Tieu Chet, Nep 10-2 and Bang Do. These rice varieties are being tested in Kien Giang province to select promising rice varieties for production.

Keywords: Summer rice varieties, salt tolerance, SSR marker

Ngày nhận bài: 24/5/2022
Ngày phản biện: 01/6/2022

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Minh Nguyệt
Ngày duyệt đăng: 30/6/2022

XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU TÁCH CHIẾT ANTHOCYANIN CÓ HỖ TRỢ SIÊU ÂM TỪ CỦ HÀNH TÍM SÓC TRẮNG

Đình Lê Khanh^{1,2}, Cung Thị Tố Quỳnh², Hoàng Thị Lệ Hằng^{1*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích xác định các thông số kỹ thuật thích hợp trong quá trình tách chiết anthocyanin từ củ hành tím Sóc Trăng bằng phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm. Trên cơ sở khảo sát các yếu tố chính như hệ dung môi, kích thước nguyên liệu, tỷ lệ giữa dung môi và nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian siêu âm; các thông số của quá trình trích ly đã được xác định gồm nguyên liệu được nghiền nhỏ với kích thước từ 1 - 2 mm, dung môi ethanol 50% bổ sung 1% HCl, tỷ lệ dung môi : nguyên liệu là 8 : 1. Quá trình tách chiết sử dụng siêu âm với tần số 37 kHz ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 40 phút. Với các điều kiện này hàm lượng anthocyanin thu được là cao nhất đạt 24,17 mg/100 g.

Từ khóa: Hành tím Sóc Trăng (*Allium ascalonium*), anthocyanin, trích ly, phương pháp hỗ trợ siêu âm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Anthocyanin là sắc tố tự nhiên, thuộc nhóm flavonoid, tạo ra màu sắc từ màu xanh, tím, tím đỏ, đỏ và da cam trong hoa, quả, lá, thân và rễ của nhiều loại thực vật bậc cao. Bên cạnh tính năng tạo màu sắc, anthocyanin còn được quan tâm nhiều hơn bởi tác dụng tốt đối với sức khỏe con người như khả năng chống oxy hóa, chống dị ứng, chống viêm,... (Robert *et al.*, 1987). Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu về vai trò, kỹ thuật tách chiết, thu nhận anthocyanin và sản phẩm được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau như dược phẩm, thực phẩm.

Hành tím (*Allium ascalonium*) không những là một loại rau gia vị còn được biết đến như vị thuốc cổ truyền với các lợi ích cho cơ thể thông qua việc cung cấp các hoạt chất sinh học có tác dụng hỗ trợ chống oxy hóa (anthocyanin, anthocyanidin), các chất kháng tiểu cầu và chống đông máu, trị hen suyễn và các hiệu ứng kháng sinh (Zhang Hua *et al.*, 2013). Ở Việt Nam, hành tím được trồng tập trung ở một số tỉnh thành, đặc biệt, thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng với diện tích và sản lượng ngày càng tăng. Vụ Mùa năm 2021, diện tích gieo trồng tăng so với năm trước 400 ha với năng suất bình quân khoảng 18 tấn/ha, nên sản lượng tăng cao. Hành tím Vĩnh Châu chủ yếu được tiêu thụ trong nước và chỉ xuất khẩu sang một số nước như: Thái Lan, Indonesia, Phillipines, Malaysia,... với khối lượng

nhỏ. Vì vậy, khi hành tím được thu hoạch đồng loạt sẽ không tiêu thụ hết nên đặt gánh nặng lên công đoạn bảo quản, do hành tím được sản xuất theo hộ gia đình nên trang thiết bị bảo quản hành chưa được chú trọng khiến chất lượng hành sau tồn trữ thấp, làm giảm giá trị sản phẩm. Trong những năm gần đây, do ảnh hưởng của dịch bệnh COVID-19 nên tình hình tiêu thụ càng gặp nhiều khó khăn (Khắc Tâm, 2021). Chính vì vậy, việc sử dụng hành tím như một nguồn nguyên liệu để thu nhận hợp chất anthocyanin tự nhiên được xem là giải pháp hữu hiệu vừa thu được nguồn hoạt chất sinh học quý tự nhiên, vừa góp phần giải quyết đầu ra và gia tăng giá trị cho loại nông sản này.

Chiết tách các hoạt chất sinh học có hỗ trợ siêu âm là kỹ thuật tách chiết nhanh chóng, đơn giản, có chi phí thấp và mang lại hiệu quả cao. Phương pháp này đã được ứng dụng tách chiết anthocyanin từ một số nguyên liệu khác nhau như vỏ cà tím (Todaro *et al.*, 2009), bắp cải tím (Chandrasekhar *et al.*, 2012), khoai lang tím (Ying *et al.*, 2011), củ cải đỏ (Patil *et al.*, 2009),... Vì vậy, trong nghiên cứu này, phương pháp hỗ trợ siêu âm để tách chiết anthocyanin từ củ hành tím được sử dụng. Nghiên cứu tập trung vào việc xác định ảnh hưởng của một số điều kiện tách chiết như hệ dung môi, kích thước nguyên liệu, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, nhiệt độ siêu âm và thời gian siêu âm nhằm tối ưu hóa quy trình tách chiết, thu hồi.

¹ Viện Nghiên cứu Rau quả

² Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

* Tác giả liên hệ, e-mail: hoangthilehang@yahoo.com