

# NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN TẬP ĐOÀN BÍ ĐỎ ĐỊA PHƯƠNG BẰNG CHỈ THỊ SSR

Hà Minh Loan<sup>1</sup>, Trần Danh Sừ<sup>2</sup>, Ngô Thị Hạnh<sup>3</sup>

## TÓM TẮT

Nghiên cứu sử dụng 41 chỉ thị phân tử SSR để đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn 100 mẫu giống bí đỏ địa phương. Kết quả cho thấy, trong số 41 chỉ thị SSR có 23 chỉ thị cho đa hình; các băng đa hình nằm trong khoảng từ 109 - 256 bp. Trong số 23 chỉ thị cho đa hình có 9 locut nhận dạng alen đặc trưng của 13 giống bí đỏ, các locut này có thể được sử dụng làm chỉ thị để nhận dạng các giống bí đỏ. Hệ số tương đồng di truyền của các mẫu giống bí đỏ nghiên cứu dao động từ 0,48 đến 0,99. Hai cặp giống là B76 (Bí đỏ - SĐK 6559) với B42 (Bí đỏ - SĐK 6740); B76 (Bí đỏ - SĐK 6559) với B71 (Bí đỏ - SĐK 3826) có quan hệ di truyền xa nhất (hệ số tương đồng di truyền là 0,48) có thể sử dụng tạo tổ hợp lai trong tạo giống bí đỏ sau này.

**Từ khóa:** Bí đỏ địa phương, đa dạng di truyền, chỉ thị phân tử SSR

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bí đỏ là một trong những cây rau có giá trị dinh dưỡng cao, thuộc chi *Cucurbita*, họ bầu bí (*Cucurbitaceae*). Ở Việt Nam, bí đỏ đang dần trở thành một loại rau hàng hoá quan trọng trên thị trường mang lại giá trị kinh tế cho người nông dân (Lê Tuấn Phong và *ctv.*, 2011). Tuy nhiên cũng như các cây họ bầu bí khác, nguồn gen bí đỏ địa phương đang có nguy cơ bị xói mòn do chuyển đổi mục đích sử dụng đất và sự du nhập ồ ạt của các giống bí lai thương mại có năng suất cao. Do đó, vài năm trở lại đây công tác thu thập, lưu giữ, đánh giá và khai thác nguồn gen bí đỏ phục vụ sản xuất đã bắt đầu được quan tâm hơn trước. Hiện tại, Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia đã thu thập được khoảng trên 1000 giống thuộc chi *Cucurbita*.

Nghiên cứu đa dạng di truyền là chìa khóa cho công tác chọn tạo giống và quản lý, khai thác nguồn gen. Tuy nhiên, công tác nghiên cứu về cây bí đỏ vẫn còn rất khiêm tốn, chưa tương xứng với giá trị tiềm năng mà nguồn gen bí đỏ đem lại. Nghiên cứu đa dạng di truyền ngoài mục đích phân loại đúng nguồn gen phục vụ công tác bảo tồn, khai thác sử dụng, còn xác định được nguồn vật liệu di truyền phục vụ chọn tạo giống cây bí đỏ.

Trong những năm qua, SSR được xem là chỉ thị phân tử hiệu quả nhất để nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen cây trồng do tính đồng trội và độ chính xác cao (Guichoux *et al.*, 2011). Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chỉ thị SSR được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của 100 mẫu giống bí đỏ đang được lưu giữ tại Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia - An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- 100 mẫu giống bí đỏ địa phương đang còn phổ biến ở các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam (Bảng 1).

- 41 chỉ thị SSR được chọn lọc từ cơ sở dữ liệu hệ thống genome cây bí đỏ đã công bố được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn bí đỏ nghiên cứu (Gong *et al.*, 2008).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN từ lá non của các giống bí đỏ và tinh sạch theo phương pháp CTAB của Doyle (Doyle and Doyle, 1987). Phản ứng PCR với mỗi SSR được thực hiện với bộ kit PCR KAPA2G™ của hãng KAPA Biosystems. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 95°C (3 phút), 30 chu kỳ [94°C (20s), 54°C (30s), 62°C (30s)], 3 chu kỳ [94°C (20s), 49°C (10s), 72°C (5s)] và kết thúc ở 72°C (10 phút).

Sản phẩm PCR được đưa vào máy phân tích ADN tự động (Sequencing 3130xl) với phần mềm GeneScan™ 600LIZ Size Standard và GeneMapper v 4.0 để đọc kích thước các đoạn alen.

Phân tích và xử lý số liệu: Kết quả được thống kê dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng ADN (các alen). Số liệu được xử lý, phân tích bằng phần mềm Excel 2010 và phần mềm NTSYSpc 2.1 đưa ra hệ số tương đồng di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại (Rohlf, 2000).

Hệ số PIC (Polymorphism Information Content) được tính theo công thức của Mohammadi (Mohammadi and Prasanna, 2003) như sau:

$$PIC = 1 - \sum h_k^2$$
 ( $h_k$ : tần số xuất hiện của alen thứ k).

<sup>1</sup> Trung tâm Tài nguyên thực vật; <sup>2</sup> Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup> Viện Nghiên cứu Rau Quả

**Bảng 1.** Danh sách các mẫu giống bí đỏ nghiên cứu

Kí hiệu	SDK*	Tên giống	Nguồn gốc	Kí hiệu	SDK*	Tên giống	Nguồn gốc	Kí hiệu	SDK*	Tên giống	Nguồn gốc
B1	T23265	Bí đỏ	Hòa Bình	B34	3639	Bí nậm	Tuyên Quang	B67	15115	Mắc ứ	Sơn La
B2	T23266	Tàu đà	Điện Biên	B35	3724	Bí đỏ	Quảng Ninh	B68	15119	Tàu đà	Sơn La
B3	T23267	Tàu	Điện Biên	B36	3830	Bí ngô hình nậm	Sơn La	B69	6742	Bí đỏ	Lạng Sơn
B4	T23268	Má Ứ	Điện Biên	B37	3833	Bí đỏ	Lào Cai	B70	3630	Bí đỏ gáo	Thái Nguyên
B5	T23269	Tàu đà	Điện Biên	B38	5353	Bi nep	Thái Nguyên	B71	3826	Bí đỏ	Sơn La
B6	T23270	Tàu đà	Điện Biên	B39	5354	Cà đéng nú	Lạng Sơn	B72	9079	Nhum	Sơn La
B7	T23271	Tàu đà	Điện Biên	B40	6553	Bí đỏ	Tuyên Quang	B73	5356	Bí đỏ	Sơn La
B8	T23272	Tàu đà	Điện Biên	B41	6554	Bí đỏ nương	Hà Giang	B74	5363	Nung làng cao	Bắc Giang
B9	T23273	Tàu đà	Điện Biên	B42	6740	Bí đỏ	Lạng Sơn	B75	6551	Nhung nhĩm dạng 2	Tuyên Quang
B10	T23274	Tàu đà	Điện Biên	B43	6741	Bí tẻ	Lạng Sơn	B76	6559	Bí đỏ	Lạng Sơn
B11	T23275	Tàu đà	Điện Biên	B44	7955	Bí đỏ quả tròn	Bắc Giang	B77	6564	Tầu héo	Bắc Giang
B12	T23276	Tàu đà	Điện Biên	B45	8386	Mã ức đạnh	Sơn La	B78	9075	Mạc ức	Sơn La
B13	T23277	Tàu đà	Điện Biên	B46	8391	Mạc ức	Sơn La	B79	T23298	Mắc ứ	Sơn La
B14	T23278	Tàu đà	Sơn La	B47	8396	Pin tò	Sơn La	B80	T23299	Mắc ứ	Sơn La
B15	T23279	Tàu đà	Sơn La	B48	8578	Chum quả méng	Bắc Giang	B81	T23300	Mắc ứ	Sơn La
B16	T23280	Tàu đà	Sơn La	B49	9078	Mạc ức	Sơn La	B82	T23301	Bí đỏ	Sơn La
B17	T23281	Tàu đà	Sơn La	B50	9079	Nhum	Sơn La	B83	T23302	Bí ngô	Sơn La
B18	T23282	Bi do	Lào Cai	B51	9294	Qua đéng	Bắc Giang	B84	T23303	Bí ngô	Sơn La
B19	T23283	Lăng cua	Lào Cai	B52	15084	Nhum nhĩm	Hoà Bình	B85	T23304	Tàu đà	Sơn La
B20	T23284	Lăng cua	Lào Cai	B53	15088	Má ự	Điện Biên	B86	T23305	Tàu đà	Sơn La
B21	T23285	Lăng cua	Lào Cai	B54	15089	Mắc ự	Điện Biên	B87	T23306	Tàu đà	Sơn La
B22	T23286	Kiêng quá	Lào Cai	B55	15091	Tàu	Sơn La	B88	T23307	Tàu đà	Sơn La
B23	T23287	Kiêng quá	Lào Cai	B56	15092	Làng gua	Sơn La	B89	T23308	Tàu đà	Sơn La
B24	T23288	Kiêng quá	Lào Cai	B57	15095	Phụ nhum vàng	Tuyên Quang	B90	T23309	Tàu đà	Sơn La
B25	T23289	Ne qua	Lào Cai	B58	15096	Pặc đéng	Tuyên Quang	B91	T23310	Tàu đà	Sơn La
B26	T23290	Ne qua	Lào Cai	B59	15097	Tầu đà	Sơn La	B92	T23311	Tàu đà	Sơn La
B27	T23291	Nấm tấu	Lào Cai	B60	15100	Mắc ứ	Sơn La	B93	T23312	Tàu đà	Sơn La
B28	T23292	Nấm tấu	Lào Cai	B61	15102	Mắc ứ	Sơn La	B94	T23313	Tàu đà	Sơn La
B29	T23293	Cung qua	Hà Giang	B62	15103	Lông tau	Sơn La	B95	T23314	Tàu đà	Sơn La
B30	T23294	Cung qua	Hà Giang	B63	15105	Má ứ	Sơn La	B96	T23315	Tàu đà	Sơn La
B31	T23295	Cung qua	Hà Giang	B64	15106	Mợ ứ	Điện Biên	B97	T23316	Tàu đà	Sơn La
B32	T23296	Tàu đà	Hà Giang	B65	15112	Tàu	Điện Biên	B98	T23318	Tàu đà	Sơn La
B33	T23297	Tàu đà	Hà Giang	B66	15114	Má ứ	Lai Châu	B99	T23319	Mắc ức	Sơn La
								B100	T23324	Mắc ức	Sơn La

\*Ghi chú: SDK là số đăng ký Ngân hàng gen.

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ năm 2017 - 2018 tại Trung tâm Tài nguyên thực vật - An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội và Đại học Tsukuba, Nhật Bản.

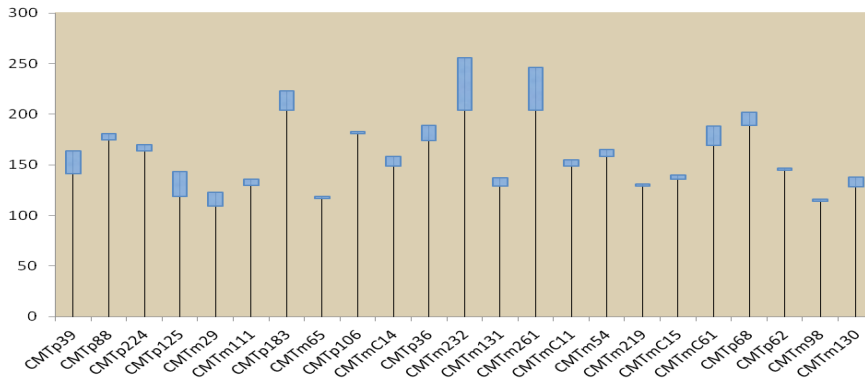
## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân tích đa hình các mẫu giống bí đỏ bằng chỉ thị SSR

Trong nghiên cứu này, 41 chỉ thị SSR được sử dụng

cho phản ứng PCR của 100 mẫu giống bí đỏ, trong đó 18 chỉ thị không đa hình và 23 chỉ thị đa hình.

Sản phẩm PCR thống kê trên 23 chỉ thị SSR cho đa hình với kích thước các băng ADN nằm trong khoảng từ 109 - 256 bp. Tại mỗi locus đa hình, biến thiên giữa các alen đa hình dao động trong khoảng từ 2 bp (CMTm65, CMTp106, CMTp62, CMTm98) cho đến 52 bp (CMTm232) (Hình 1).



Hình 1. Biến động kích thước alen tại các locus SSR

Bảng 2. Thông tin đa hình tại các locus SSR của các giống bí đỏ

STT	Locus	Số alen	Kích thước alen (bp)	Số alen đặc trưng	Giống xuất hiện alen đặc trưng và kích thước sản phẩm	PIC
1	CMTp39	6	141 - 164	2	B62 (143bp), B46(150bp)	0,32
2	CMTp88	2	175 - 181			<b>0,02</b>
3	CMTp224	3	164 - 170			0,48
4	CMTp125	5	119 - 143			<b>0,67</b>
5	CMTm29	3	109 - 123			0,06
6	CMTm111	2	130 - 136			0,04
7	CMTp183	4	204 - 223			0,32
8	CMTm65	2	117 - 119			0,49
9	CMTp106	2	181 - 183			0,26
10	CMTmC14	3	149 - 158	1	B32 (158bp)	0,05
11	CMTp36	2	174 - 189			0,40
12	CMTm232	3	204 - 256			0,47
13	CMTm131	2	129 - 137			0,33
14	CMTm261	8	204 - 246	2	B57 (204bp), B2 (246bp)	0,65
15	CMTmC11	3	149 - 155	2	B37 (155bp), B36 (153bp)	0,04
16	CMTm54	4	158 - 165	3	B76 (158), B22 (164bp), B72 (165bp)	0,05
17	CMTm219	3	129 - 131	1	B52 (130bp)	0,41
18	CMTmC15	2	136 - 140			0,03
19	CMTmC61	5	169 - 188	1	B5 (171bp)	0,20
20	CMTp68	2	189 - 202			0,50
21	CMTp62	2	145 - 147	1	B35 (147bp)	<b>0,02</b>
22	CMTm98	2	114 - 116			0,49
23	CMTm130	5	128 - 138	2	B22 (128bp, 136bp)	0,60
	<i>TB</i>	3,25				0,29
	<b>Tổng số</b>	<b>74</b>		<b>15</b>		

Ghi chú: PIC: Hệ số đa hình.

Tổng số alen được phát hiện tại 23 locut là 74 alen. Số alen đa hình tại mỗi locut biến động từ 2 alen đến 8 alen, trung bình đạt 3,25 alen/locut. Có 3 cặp mỗi cho 5 alen (CMTp125, CMTmC61, CMTm130); 1 cặp mỗi cho 6 alen (CMTp39); riêng cặp mỗi CMTm261 cho 8 alen.

Trong số 23 locut cho đa hình, có 9 locut nhận dạng các alen đặc trưng (CMTp39, CMTmC14, CMTm261, CMTmC11, CMTm54, CMTm219, CMTmC61, CMTp62, CMTm130) của 13 giống bí đỏ: B62 (Lông tau - SĐK 15103), B46 (Mạc úc - SĐK 8391), B32 (Tàu đà - T23296), B57 (Phụ nhum vàng - SĐK 15095), B2 (Tàu đà - T23266), B37 (Bí đỏ - SĐK 3833), B36 (Bí ngô hình nậm - SĐK 3830), B76 (Bí đỏ - SĐK 6559), B22 (Kiếng quá - T23286), B72 (Nhum - SĐK 9079), B52 (Nhum nghim - SĐK 15084), B5 (Tàu đà - T23269), B35 (Bí đỏ - SĐK 3724).

Các alen đặc trưng được phát hiện sẽ giúp nhận dạng các giống trên nhờ xuất hiện các băng ADN có kích thước khác nhau, như giống B22 (Kiếng quá - T23286) có nguồn gốc ở Lào Cai được nhận dạng bằng 2 chỉ thị CMTm54 và CMTm130. Cũng ở giống B22 (Kiếng quá - T23286) chỉ thị CMTm130 xuất hiện 2 alen đặc trưng tại kích thước 128bp và 136bp.

Hệ số PIC thu được tại 23 locut SSR nghiên cứu dao động từ 0,02 (CMTp88, CMTp62) đến 0,67 (CMTp125). Hệ số PIC trong nghiên cứu trung bình đạt được là 0,29 (Bảng 2).

### 3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống bí đỏ bằng chỉ thị SSR

Số liệu thu được từ sản phẩm PCR của 23 chỉ thị SSR đa hình của 100 mẫu giống bí đỏ đã được thống kê và phân tích bằng phần mềm NTSYS 2.1, từ đó thiết lập bảng hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống bí đỏ nghiên cứu (Hình 2).

Kết quả phân tích cho thấy hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống bí đỏ nghiên cứu dao động từ 0,48 đến 0,99, điều này chứng tỏ các mẫu giống bí đỏ có sự đa dạng khá cao về mặt di truyền. Có 2 cặp giống có mức tương đồng di truyền 0,48 (hệ số khác biệt 0,52); cặp thứ nhất là mẫu giống bí đỏ (B76 - SĐK6559 có nguồn gốc tại Bắc Sơn, Lạng Sơn) và mẫu giống bí đỏ (B42 - SĐK6740 có nguồn gốc tại Chi Lăng, Lạng Sơn); cặp thứ hai là mẫu giống bí đỏ B76 nêu trên và mẫu giống bí đỏ (B71 - SĐK 3826, có nguồn gốc Mộc Châu, Sơn La).

Tại mức tương đồng di truyền 0,73 phân chia 100 mẫu giống bí đỏ thành 2 nhóm chính:

- Nhóm A: gồm 76 mẫu giống, với hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống biến thiên trong

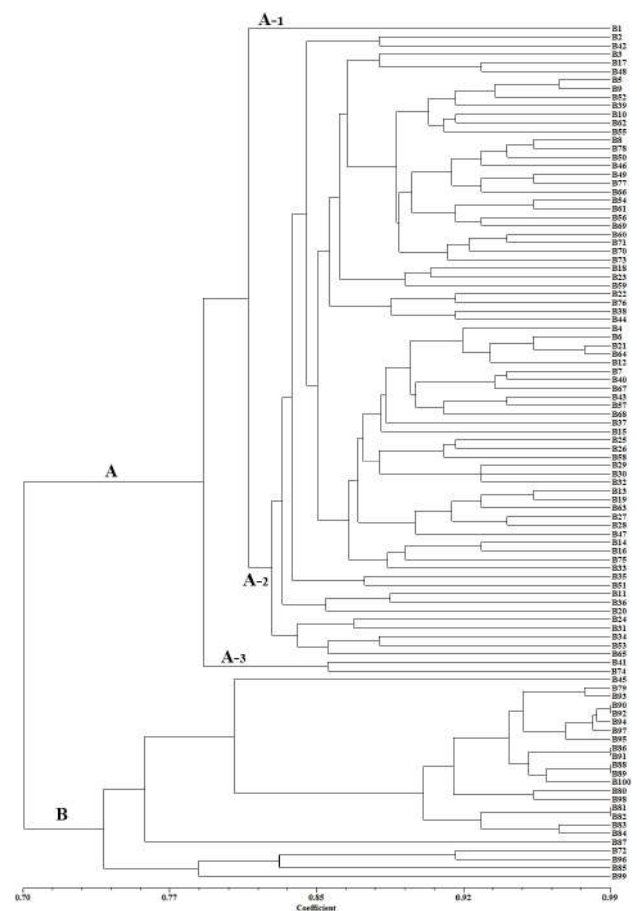
khoảng 0,79 đến 0,99. Trong đó, tại mức tương đồng di truyền 0,79 các mẫu giống phân tách thành 3 nhóm phụ (A-1, A-2, A-3).

+ Tại phân nhóm A-1 chỉ có duy nhất 1 mẫu giống B1, đó là mẫu giống bí đỏ - SĐK 23265 có nguồn gốc tại Hòa Bình;

+ Tại phân nhóm A-2 là phân nhóm lớn gồm 73 mẫu giống các mẫu giống của phân nhóm này có nguồn gốc từ nhiều địa phương khác nhau và hệ số tương đồng di truyền của phân nhóm dao động từ 0,82 đến 0,99.

+ Tại phân nhóm A-3 gồm 02 mẫu giống B74 (Nung làng cao - SĐK 5363 nguồn gốc Bắc Giang) và B41 (Bí đỏ nương - SĐK 6554 nguồn gốc Hà Giang) có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,86 đến 0,99.

Nhóm B: bao gồm 24 mẫu giống, các giống này đều có nguồn gốc tại Sơn La, tại hệ số tương đồng di truyền 0,99 có 4 cặp mẫu giống, cặp thứ nhất là B90 (Tàu đà - T23309) với B92 (Tàu đà - T23311); cặp thứ 2 B86 (Tàu đà - T23305) với B91 (Tàu đà - T23310); cặp thứ 3 B88 (Tàu đà - T23307) với B89 (Tàu đà - T23308) và cặp thứ 4 là B81 (Mắc úc - T23300) với B82 (Bí đỏ - T23301).



Hình 2. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền của 100 mẫu giống bí đỏ sử dụng 23 chỉ thị SSR

#### IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền 100 mẫu giống bí đỏ bằng 41 chỉ thị SSR đã ghi nhận 23 chỉ thị cho các băng đa hình với số lượng alen cao (từ 2 đến 8 alen/locut). Biến động kích thước của các alen từ 109 - 256 bp. Có 9 locut nhận dạng alen đặc trưng ở 13 mẫu giống bí đỏ (CMTp39, CMTmC14, CMTm261, CMTmC11, CMTm54, CMTm219, CMTmC61, CMTp62, CMTm130). Các locut này có thể sử dụng làm các chỉ thị để xác định các giống bí đỏ.

Hệ số tương đồng di truyền của các mẫu giống bí đỏ nghiên cứu dao động từ 0,48 đến 0,99. Cặp mẫu giống bí đỏ (B76 - SĐK 6559) và mẫu giống bí đỏ (B42 - SĐK 6740); cặp mẫu giống bí đỏ (B76 - SĐK 6559) và mẫu giống bí đỏ (B71 - SĐK 3826) có quan hệ di truyền xa nhất (hệ số tương đồng di truyền là 0,48) có thể sử dụng tạo tổ hợp lai trong chọn tạo mẫu giống bí đỏ sau này.

##### 4.2. Đề nghị

Sử dụng 9 locut phát hiện các alen đặc trưng làm chỉ thị xác định các giống bí đỏ phục vụ công tác bảo tồn và chọn tạo giống.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Tuấn Phong, Lê Khả Tường, Đinh Văn Đạo, 2011. Sản xuất bí đỏ, tiềm năng và thách thức. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 2/2011, trang 46-50.
- Doyle J.J. and J.L. Doyle, 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-15.
- Gong L, Stift G, Kofler R, Pachner M, Lelley T., 2008. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. Crossref, Medline, ISI, Google Scholar. *Theor. Appl. Genet.* 117, pp. 37-48.
- Guichoux E1, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ, 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 591-611.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant- Salient statistical tool and considerations. *Crop Sci*, 43, 1235-1248.
- Rohlf, F.J., 2000. *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Exeter Publications, 1, Version 2.1, New York, USA.

### Study on genetic diversity of local pumpkin collection using molecular markers SSR

Ha Minh Loan, Tran Danh Suu, Ngo Thi Hanh

#### Abstract

Forty one SSR markers were used to evaluate genetic diversity of 100 local pumpkin accessions. The result showed that 23 of 41 studied SSR markers had polymorphic bands and the band size ranged from 109 - 256 bp. 9 loci were recorded among 23 SSR markers that generated specific alleles for 13 pumpkin accessions and this loci could be used as markers for identifying pumpkin accessions. Genetic similarity coefficient of pumpkin accessions ranged from 0.48 to 0.99. Two pairs of accessions, including B76 (Bí đỏ - SĐK 6559) and B42 (Bí đỏ - SĐK 6740); B76 (Bí đỏ - SĐK 6559) and B71 (Bí đỏ - SĐK 3826) which had the farthest genetic relationship (with genetic similarity coefficient of 0.48) could be used to create the cross combination for further pumpkin breeding.

**Keywords:** Local pumpkin accessions, genetic diversity, SSR markers

Ngày nhận bài: 12/3/2020  
Ngày phản biện: 19/3/2020

Người phản biện: PGS. TS. Lê Hùng Lĩnh  
Ngày duyệt đăng: 23/3/2020