

PHÂN TÍCH QUAN HỆ DI TRUYỀN MỘT SỐ GIỐNG LẠC BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR

Lưu Minh Cúc, Phạm Thị Minh Hiền,
Nguyễn Thị Trang, Lưu Thị Ngọc Huyền,
Đồng Thị Kim Cúc

SUMMARY

Application of SSR markers in groundnut diversity assessment

The genetic relationship analysis of local and imported groundnut varieties in Vietnam is very important for genetic management, conservation and breeding purpose. In this study, sixty four groundnut varieties were selected for the study with 50 SSR markers. A total of 78 alleles were detected. Of the 50 markers used for screening, only 9 polymorphic markers. Polymorphic information content (PIC) values ranged from 0.0 to 0.75, with an average of 0.18. Genetic similarity coefficient of 64 studied groundnut varieties ranging from 0.57 to 0.97. Two varieties Sen Nghe An and *A.hypogea* **A.cardenasii* (5274) had the lowest genetic similarity coefficient. There were several varieties having high genetic similarity coefficient up to 0.97. The results of this study provide important informations for the the study and development of quality and disease resistance groundnut varieties by conventional and molecular breeding.

Keywords: Genetics, diversity, groundnut, SSR marker.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) ($2n = 4x = 40$) là một trong những cây lấy dầu quan trọng nhất trên thế giới, được trồng phổ biến ở nhiều khu vực, từ châu Mỹ, châu Phi và châu Á với diện tích canh tác hàng năm tính trên toàn cầu lên tới gần 22,2 triệu ha, với sản lượng xấp xỉ 35 triệu tấn, năng suất bình quân đạt 15,5 tạ/ha. Ở Việt Nam, lạc là một trong những cây trồng chính. Lạc vừa là cây thực phẩm lại vừa là cây làm tốt đất. Lạc là cây xuất khẩu đem lại thu nhập cao cho nông dân. Trong số 100 nước trồng lạc trên thế giới, Việt Nam đứng thứ 10 về diện tích. Còn trong số 25 nước trồng lạc ở châu Á, Việt Nam đứng thứ 5 về diện tích gieo trồng sau Ấn Độ, Trung Quốc, Myanma

và Indonesia. Cây lạc được trồng khắp cả nước từ các tỉnh miền Đông Nam Bộ đến các vùng núi phía Bắc. Diện tích lạc chiếm 28% tổng diện tích cây công nghiệp hàng năm (Lưu Minh Cúc, 2009). Trong nghiên cứu này, chỉ thị SSR được sử dụng để nghiên cứu đa dạng nguồn gen của các giống lạc địa phương và những giống chất lượng nhập nội, gieo trồng phổ biến ở Việt Nam, giúp cung cấp thông tin hữu ích cho công tác chọn tạo giống lạc kháng bệnh, chất lượng cao.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Tập đoàn các dòng, giống lạc bao gồm: 64 giống lạc được liệt kê trong bảng 1:

Bảng 1. Nguồn gốc các mẫu giống lạc dùng trong nghiên cứu

TT	SDK	Tên giống	Nguồn gốc	Màu hạt
1	3770	Sen Nghệ An	Việt Nam	Hồng
2	3772	Cumga Đắc Lắc	Việt Nam	Hồng
3	3775	Lạc Nghĩa Đàn	Việt Nam	Hồng
4	3781	Lạc Đắc Lắc	Việt Nam	Hồng
5	3786	Sẻ Gia Lai	Việt Nam	Hồng
6		CNC3	Trung Quốc	Hồng
7	3790	Sẻ Kon Tum	Việt Nam	Hồng
8	3798	Lạc 4329	Việt Nam	Hồng
9		TB25	Việt Nam	Hồng
10	3800	Lạc Nghệ An d2	Việt Nam	Hồng
11	3801	V 79	Việt Nam	Hồng
12	3806	Lạc Lụa Nam Hà	Việt Nam	Hồng
13	3808	Lạc Chiềng Đen	Việt Nam	Đỏ
14	4047	203-7VB	Nhập nội	Hồng
15	4048	302-10VB	Nhập nội	Hồng
16	4060	202-VB	Nhập nội	Hồng
17	4061	207-9SB	Nhập nội	Trắng
18	4063	101-5C	Nhập nội	Hồng
19	4065	205	Nhập nội	Hồng
20	5232	Maniblan.ca 61	Nhập nội	Tím
21	5239	AH 7338	Nhập nội	Hồng
22	5245	Maniblancci	Nhập nội	Hồng
23	5246	AH 6910	Nhập nội	Trắng
24	5249	U 1-47-3	Nhập nội	Tím
25	5260	RCM 4491	Nhập nội	Trắng
26	5270	GKB	Nhập nội	Hồng
27	5274	A.hypoyca *A.cardenasii	Nhập nội	Đỏ
28	5275	A.hypoyca *A.cardenasii	Nhập nội	Đỏ
29	5281	TL 24	Nhập nội	Hồng
30	5286	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
31	5288	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
32	5294	Lạc chùm	Việt Nam	Hồng
33	6535	Lạc chống dù	Việt Nam	Hồng
34	7794	Lạc gai	Việt Nam	Hồng
35	7797	Đạo địa tập	Việt Nam	Đỏ
36	8326	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
37	8327	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
38	8331	Lạc Trung Quốc	Nhập nội	Hồng
39	8335	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
40	8340	Lạc Sen Nghệ An	Việt Nam	Hồng
41	9698	Chay trắng	Việt Nam	Hồng
42		CNC1	Trung Quốc	Tím
43		CNC2	Trung Quốc	Hồng
44	3787	Sẻ Quảng Ngãi	Việt Nam	Hồng
45		L23	Việt Nam	Hồng
46	3799	Lạc Nghệ An d1	Việt Nam	Hồng

TT	SDK	Tên giống	Nguồn gốc	Màu hạt
47	4054	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
48	5243	202- 7VB	Việt Nam	Hồng
49	5268	A.hypoyca *A.cardenasii	Việt Nam	Hồng
50	5273	RCM 2572	Việt Nam	Hồng
51	5286	AH 4766	Việt Nam	Hồng
52	7802	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
53		MD07	Việt Nam	Hồng
54		SG99	Việt Nam	Hồng
55	4048	302-10VD	Việt Nam	Hồng
56	4054	212-4SB	Việt Nam	Hồng
57	7792	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
58	7794	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng
59	6530	106-13SB	Việt Nam	Hồng
60	6531	Lạc 3 nhân	Việt Nam	Hồng
61	6532	Lạc thơm	Việt Nam	Hồng
62	8829	Lạc đỏ địa phương	Việt Nam	Hồng
63	8830	Lạc 3 tháng	Việt Nam	Hồng
64	8833	Lạc địa phương	Việt Nam	Hồng

2. Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số của các giống lạc nghiên cứu được tách chiết và tinh sạch

theo phương pháp CTAB của Saghai-Marooof et al. (1984) có cải tiến cho phù hợp với cây lạc. Phản ứng PCR được thực hiện như sau:

Bảng 2. Các công thức thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Công thức 1	Công thức 2	Công thức 3	Công thức 4	Công thức 5
Primer F and R (100pM)	0,2 µl	0,2 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,5 µl
DNA (25ng/ µl)	1 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	1 µl	2 µl	1,5 µl	2 µl	2 µl
dNTPs (5mM)	0,1 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,1 µl	0,2 µl
Taq DNA polymerase 1U/µl	0,2 µl	0,2 µl	0,5 µl	0,3 µl	0,5 µl

- Chương trình Touch down PCR bao gồm các bước: 94°C trong 2 phút, 30 chu kỳ với 94°C trong 45 giây, nhiệt độ gắn môi thay đổi (65-55°C/ 60-55°C/55-45°C) trong 1 phút, 72°C trong 1 phút và thời gian kéo dài 10 phút ở 72°C.

- Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% và tiếp tục được phân tích trên gel polyacrylamide 4,5% trong dung dịch đệm 1 X TBE ở 1500V, thời gian chạy phụ thuộc vào kích thước của sản phẩm PCR, dao động từ 1 đến 2 giờ.

- Kết quả phân tích dựa trên sự xuất hiện (đánh số '1') và không xuất hiện (đánh số '0') của các băng ADN. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC - Polymorphic Information Content) được tính toán theo phương pháp của Saal & Wricke (1999).

$$PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$$

Trong đó, P_{ij} là tần số xuất hiện của alen thứ j của kiểu gen i được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

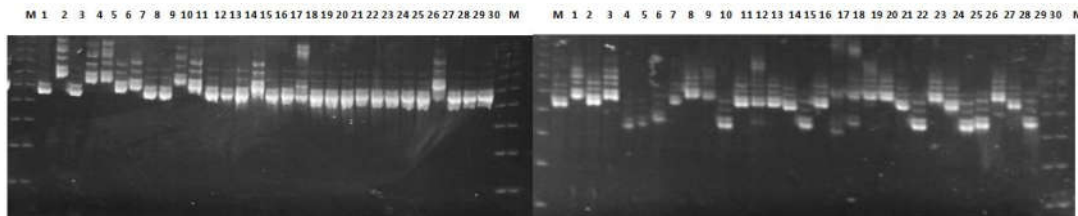
Xác định hệ số tương đồng di truyền Jaccard, thiết lập sơ đồ hình cây để so sánh

hệ số tương đồng di truyền giữa 64 giống lạc dựa theo phương pháp UPGMA trong NTSYSpc 2.1.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá đa dạng di truyền của 64 giống dùng trong nghiên cứu, tổng số thu được 78 alen với số alen biến động từ 1-5 alen, rất nhiều chỉ thị đơn hình đối với tập đoàn locus khảo sát. Trong số đó, chỉ thị cho nhiều alen đa hình nhất là Lec1 (6 alen). Hàm lượng thông tin đa hình của các chỉ thị nghiên cứu biến động từ 0,00 ở các

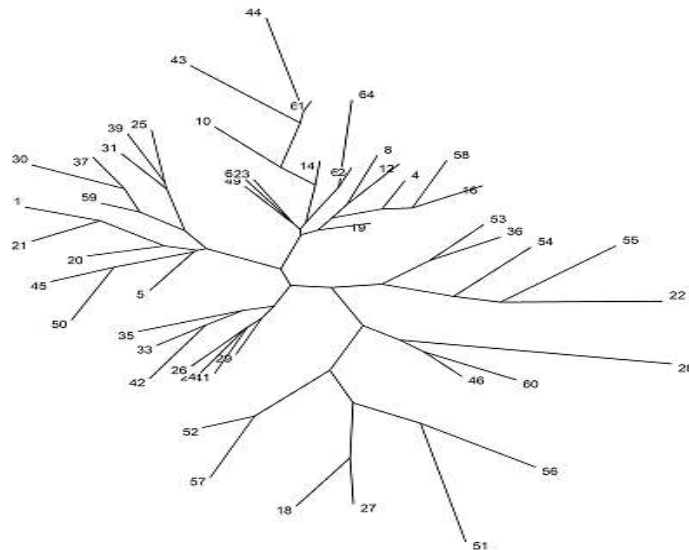
chỉ thị đơn hình đến 0,75 đối với chỉ thị Lec1. Sử dụng các chỉ thị vi vệ tinh, các tác giả đã nghiên cứu sâu hơn về bản đồ di truyền và đánh giá đa dạng giữa các loài mang kiểu nhân AA- và BB-. Tuy nhiên giữa các giống lạc trồng, những chỉ thị này lại cho độ đa hình rất thấp (Varshney R.K. và ctv, 2007). Điều này được khẳng định thêm khi phân tích các giống lạc trong nghiên cứu này. Số liệu được ghi nhận đưa vào xử lý trên chương trình NTSYS 2.1. để đánh giá mức độ đa dạng di truyền giữa các giống lạc dùng trong nghiên cứu.



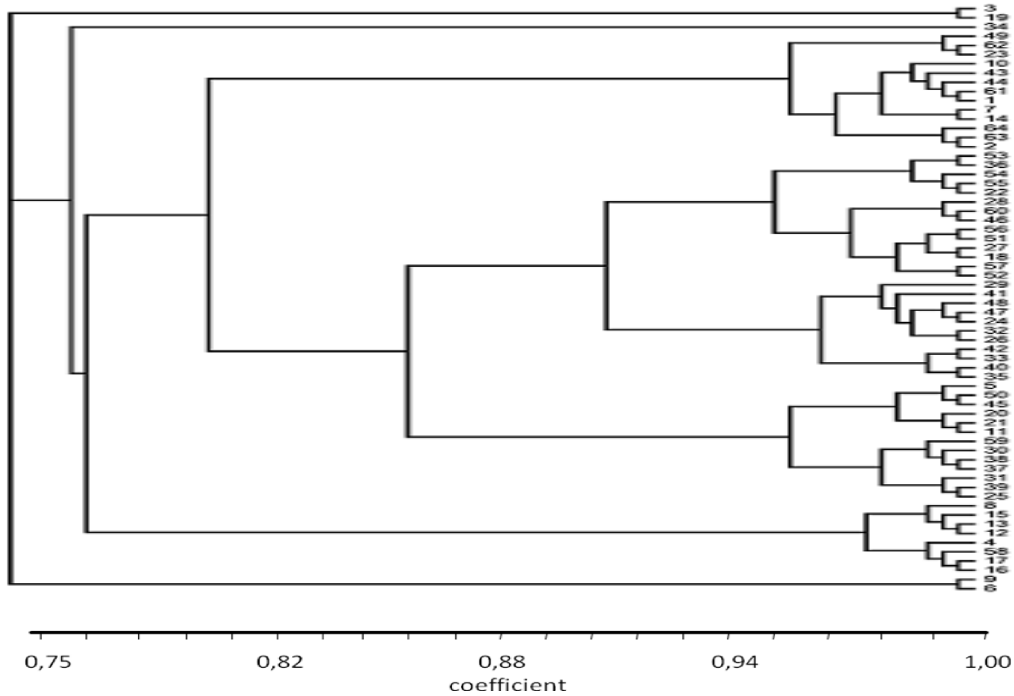
Hình 1: Ảnh điện di đánh giá đa hình các giống lạc với chỉ thị Lec1 và pSeq13E6 trên gel polyacrylamide 6%. Thứ tự trong ảnh: M: 25bp ladder; 1-30: các giống lạc trong nghiên cứu

Quan hệ di truyền giữa các giống lạc nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm NTSYS 2.1, từ đó xác định được hệ số

tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống lạc (Hình 2-3).



Hình 2: Mức độ phân nhóm chủng loại phát sinh của 64 giống lạc nghiên cứu khi đánh giá với 50 chỉ thị trong chương trình NTSYS 2.1



Hình 3: Mức độ phân nhóm của 64 giống lạc nghiên cứu khi phân tích số liệu trong chương trình NTSYS 2.1

Dựa vào sơ đồ hình cây ở hình 2, 3 và bảng ma trận thể hiện mức độ tương đồng giữa các giống lạc trong khoảng từ 0,57 đến 0,97. Có thể chia nhóm các giống lạc nghiên cứu thành 5 nhóm ở mức độ tương đồng 0,77. Nhóm 1 gồm giống số 3 và 19; Nhóm 2 gồm giống số 34; Nhóm 4 gồm giống số 8, 15, 13, 12, 4, 5, 8, 17 và 16; Nhóm 5 gồm hai giống 9 và 6. Nhóm 3 chiếm phần lớn các giống dùng trong nghiên cứu. Nhìn chung, sơ đồ quan hệ di truyền của 64 giống lạc chia ra rất nhiều nhánh nhỏ khác nhau. Đa số các giống nghiên cứu có mức tương đồng cao. Một số cặp cao nhất tới 97% mặc dù tập đoàn nghiên cứu đã bao gồm nhiều giống địa phương và nhập nội từ các nguồn khác nhau. Điều này cho thấy các giống lạc ở Việt Nam nói chung nhập nội nói riêng có nền di truyền hẹp, tương tự như nhận định

của một số tác giả khác đã tiến hành đánh giá đa dạng di truyền và nền gen đối với cây lạc. Có thể thấy rằng, nếu các tổ hợp lai tiến hành giữa các giống khác nhóm với nhau sẽ thu được ưu thế lai cao. Các giống trong nhóm 3 lai với các giống thuộc nhóm 1, 4, 5 và ngược lại.

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng 50 chỉ thị SSR đã đánh giá mức độ tương đồng giữa 64 giống lạc, tổng số thu được 78 alen với số alen biến động từ 1-5 alen, rất nhiều chỉ thị đơn hình đối với tập đoàn locus khảo sát. Hệ số tương đồng di truyền trong khoảng từ 0,57 đến 0,97. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) của các chỉ thị nghiên cứu biến động từ 0,00 đến 0,75 với mức trung bình là 0,18. Có thể chia nhóm các giống lạc nghiên cứu thành 5 nhóm ở mức độ tương đồng 0,77.

Nhóm 1 gồm giống số 3 và 19; Nhóm 2 gồm giống số 34; Nhóm 4 gồm giống số 8, 15, 13, 12, 4, 5, 8, 17 và 16; Nhóm 5 gồm hai giống 9 và 6. Nhóm 3 chiếm phần lớn các giống dùng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lưu Minh Cúc, 2009. *Sử dụng chỉ thị vi vệ tinh trong lập bản đồ gen kháng bệnh đốm lá muộn ở lạc (Arachis hypogaea L.) phục vụ công tác chọn tạo giống*. Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp. 159 trang.
2. Saal B., Wricke G., 1999. *Development of simple sequence repeat makers in rye (Secale cereale L.)*. Genome, 42(5): 964-972.
3. Saghai-Marouf M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W., 1984. *Ribosomal DNA spacer-length*

polymorphisms in barley: Medelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:8014-8018.

4. Varshney R.K., Hoisington D.A., Upadhyaya H.D., Gaur P.M., Nigam S.N., Saxena K., Vadez V., Sethy N.K., Bhatia S., Aruna R., Gowda M.V.C., Singh N.K. (2007), *Molecular genetics and breeding of grain legume crops for the semi-arid tropics*. In: Genomic Assisted Crop Improvement Vol II: Genomics Applications in Crops Edited by: Varshney RK, Tuberosa R. Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 207-242.

Ngày nhận bài: 115/4/2013

Người phản biện: TS. Lã Tuấn Nghĩa,
ngày 8/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

NGHIÊN CỨU TÁI SINH GIỐNG ĐẬU TƯƠNG DT2008 VÀ ĐT26 PHỤC VỤ CHO CÔNG TÁC CHỌN TẠO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN

Đặng Trọng Lượng, Trần Minh Hoa,
Nguyễn Thúy Điệp, Trần Thị Thúy, Nguyễn Thị Liễu

SUMMARY

Study on plant regeneration from cotyledon and hypocotyls of two soybean cultivars, DT2008 and ĐT26 for gen transformation purpose

Regeneration from cotyledon and hypocotyl of two soybean cultivars, DT2008 and ĐT26, were studied. Regeneration ratio, shoot induction, shoot elongation and root induction were evaluated on MS media (Murashige Skoog, 1962) supplemented with different concentrations and combinations of phytohormons. MS medium supplemented with 2mg/l BAP and 0,1 mg/l IBA was the most effective on shoot induction of both DT2008 and ĐT26. The regeneration ratio of cotyledon material was 86% with DT2008 cultivar and 88% with ĐT26 cultivar. Regeneration of hypocotyls has ratio of 78,33% and 81,67% for DT2008 and ĐT26, respectively. The induced shoots of the two cultivars were elongated best in MS medium adding 0,5 mg/l GA3 and 0,1 mg/l IAA. Healthy and uniform shoots were rooted in MS medium supplemented with 0,5 mg/l α -NAA.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merr., soybean, cotyledon, hypocotyls, regeneration, *in vitro*.