

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU NÀNH BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD VÀ SSR

Nguyễn Thị Lang¹, Nguyễn Đức Thuận², Bùi Chí Bửu³

¹Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long

²Trường Đại học Nông Lâm, thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam

TÓM TẮT

Sử dụng 30 giống đậu nành từ ngân hàng gen của Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long để nghiên cứu và đánh giá đa dạng nguồn gen. Dùng hai loại chỉ thị phân tử (chỉ thị RAPD và SSR), được thiết lập giữa các allele của SSR và của RAPD khoảng cách di truyền của RAPD lớn hơn so với phương pháp của SSR. Điều này cũng ghi nhận bằng các tần suất allele có tương quan giữa các giống của RAPD rất cao ($r = 0,64 - 0,98$). Sự tương quan giữa các locus lớn nhất là OMDN109 và OMDN87, và tương quan giữa các locus nhỏ nhất là OMDN1 và giống OMDN36. Sự tương quan các giống trong phương pháp SSR chỉ thị biến động ($r = 0,42$ đến $0,97$). Các giống có chỉ số allele giữa các locus cao là OMDN 118 và OMDN 34. Tương quan giữa các locus nhỏ nhất là OMDN113 và OMDN31. Thông qua các dữ liệu chỉ thị RAPD với 9 mỗi (mỗi) được sử dụng 30 giống được phân thành 4 nhóm chính. Trong phân nhóm của SSR trên 6 chỉ thị được ghi nhận với 3 nhóm khác biệt. Sơ đồ phân nhóm hình cây phối hợp hai phương pháp chỉ thị phân tử được thiết lập với ba nhóm khác nhau. Dựa vào chỉ thị phân tử để có thể đánh giá gián tiếp sự hiện diện hay không hiện diện của gen chọn lọc nhờ chỉ thị mà không bị ảnh hưởng của môi trường. Chỉ số đa dạng phân tích theo phương pháp SSR cao ($H = 0,312$) trong khi chỉ số đa dạng của RAPD chỉ thị phân tử rất thấp ($H = 0,124$). Tương tự tần số đa hình tách trên phương pháp chỉ thị SSR cũng cao hơn phương pháp chỉ thị RAPD. Cả hai phương pháp cho sự tương quan trong nhóm rất cao với biến động từ 0,59 cho chỉ thị SSR và 0,77 cho chỉ thị RAPD. Đề nghị có thể ứng dụng nhiều chỉ thị phân tử trong phân tích đa dạng, kết hợp với đánh giá tình trạng bằng kiểu hình để phục vụ cho vật liệu ban đầu trong công tác chọn giống.

Từ khóa: Đậu nành, RAPD, SSR, tương quan di truyền, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

MỞ ĐẦU

Cây đậu nành (*Glycine max* L. Merrill, *Glycine soja* Sieb et Zucc) là một trong số những cây trồng có lịch sử lâu đời nhất của loài người và ngày càng chiếm vị trí quan trọng trong ngành trồng trọt và chăn nuôi ở nước ta.

Trong tình hình hiện nay, khu vực Đồng bằng sông Cửu Long nói riêng và cả nước nói chung đều có xu hướng chuyển đổi cơ cấu cây trồng, ngày càng nhiều đối tượng cây hoa màu được đưa vào hệ thống luân canh với lúa. Trong đó, cây đậu nành được chú ý nhiều nhất vì có rất nhiều lợi ích như cung cấp một lượng đạm để cải tạo và làm tăng độ phì cho đất làm giảm được chi phí đầu tư cũng như nâng cao hiệu quả kinh tế, tăng thu nhập cho người dân. Không những thế, đậu nành còn là nguồn thức ăn giàu đạm vừa ngon vừa bổ dưỡng cho con người, đồng thời

cũng là nguồn nguyên liệu chính để phát triển công nghệ nuôi thủy sản với chất lượng cao. Những năm gần đây tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long, đậu nành đã và đang trở thành nguồn thức ăn rất cần thiết cho đẩy mạnh phát triển thủy sản tại các địa phương.

Nghiên cứu đa dạng nguồn gen nhằm chuẩn bị tốt vật liệu lai cho công tác chọn tạo giống sau này hiện là mục tiêu nghiên cứu quan trọng cần được đặt ra. Để có cơ sở khoa học và tạo đột phá mới trong chọn tạo giống đậu nành, đề tài tập trung khai thác vật liệu lai thông qua nghiên cứu đa dạng nguồn gen cây đậu nành bằng phương pháp chỉ thị RAPD và chỉ thị SSR.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu được sử dụng bao gồm 30 mẫu giống

đậu nành được sưu tập tại ngân hàng gen của Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

Đánh giá kiểu gen theo phương pháp Nguyễn Thị Lang (2002).

Tách chiết DNA

DNA phục vụ cho yêu cầu phân tích PCR được chuẩn bị theo quy trình tách chiết đơn giản. Một mẫu lá tươi, non được thu và đặt trong ống nghiệm 1,5 ml sau đó đặt ống vào trong đá lạnh. Mẫu lá sau đó được nghiền trong cối sứ (*Spot Test Plate -Thomas Scientific*) sau khi đã thêm vào 400 µl dung dịch đệm (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 300 mM NaCl and 1% SDS). Nghiền mẫu đến khi dung dịch đệm có màu xanh lá cây. Thêm 400 µl dung dịch đệm rồi trộn đều. Chuyển 400 µl lysate vào ống nghiệm có mẫu lá ban đầu. Lysate sẽ kích hoạt phản ứng tách protein nhờ thêm vào 400 µl chloroform. Dịch thể nổi (supernatant) được chuyển vào ống nghiệm mới (1,5 ml) và DNA được kết tụ nhờ sử dụng cồn ethanol. Mẫu DNA được làm khô nhờ gió và hòa tan trong 50 µl dung dịch đệm TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

Chúng tôi sử dụng 1 µl dung dịch DNA cho phân tích PCR. Các mẫu DNA được giữ trong tủ lạnh sâu -20°C để sử dụng về sau.

Xét nghiệm PCR

Khuếch đại PCR được thực hiện trong 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 unit *Taq*, 4 nmol dNTP, 10 pmol mỗi và 50ng genomic DNA. Chu kỳ PCR: tách dây đôi ở 94°C trong 5 phút, theo sau là 35 chu kỳ 94°C trong 60 giây, 36°C trong 60 giây và 72°C trong 120 giây. Quá trình kéo dài dây sau cùng là 72°C trong 5 phút. Cho thêm vào 13 µl dung dịch đệm (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol) sau khi PCR. Đa hình trong sản phẩm PCR được phát hiện nhờ thuốc nhuộm ethidium bromide sau khi điện di trên 1,5% và 3% agarose gel.

Sản phẩm phân ứng PCR với chỉ thị RAPD

Danh sách các mẫu được sử dụng trong phương pháp RAPD và SSR được trình bày trong bảng 2 và bảng 3.

Bảng 1. Danh sách tên và nguồn gốc các đậu nành.

STT	Tên giống	Nguồn gốc	STT	Tên giống	Nguồn gốc
1	OMĐN 64	CLRRI	16	OMĐN 62	CLRRI
2	ATF 15	IAS	17	OMĐN 111	CLRRI
3	OMĐN 32	CLRRI	18	OMĐN 36	CLRRI
4	OMĐN 83	CLRRI	19	OMĐN 117	CLRRI
5	OMĐN 31	CLRRI	20	OMĐN 14	CLRRI
6	OMĐN 87	CLRRI	21	OMĐN 29	CLRRI
7	NAM VANG	Địa phương	22	OMĐN 110	CLRRI
8	OMĐN 109	CLRRI	23	OMĐN 114	CLRRI
9	DT 84	AGI	24	OMĐN 85	CLRRI
10	OMĐN 118	CLRRI	25	OMĐN 112	CLRRI
11	OMĐN 116	CLRRI	26	OMĐN 33	CLRRI
12	OMĐN 86	CLRRI	27	OMĐN 176	CLRRI
13	OMĐN 59	CLRRI	28	MTD 176	CTU
14	OMĐN 115	CLRRI	29	TL 57	IAS
15	OMĐN 34	CLRRI	30	OMĐN 01	CLRRI

AGI: Agricultural Genetics Institute. CLRRI: Cuu Long Delta Rice Research Institute. IAS: Institute of Agricultural Sciences for Southern Vietnam. CTU: CanTho University.

Bảng 2. Danh sách các mồi sử dụng trong phương pháp chỉ thị RAPD.

STT	Primer (mồi)	Chuỗi mã di truyền 5'-----3'	Nguồn gốc
1	AA11	CAATCGCCGT	Công ty OPD TA
2	AC14	GTCGGTTGTC	
3	OPD03	GTCGCCGTCA	
4	OPD05	TGAGCGGACA	
5	OPD07	TTGGCACGGG	
6	OPD11	AGCGCCATTG	
7	OPD18	GAGAGCCAAC	
8	RAPD03	GTAGACCCGT	Viện lúa ĐBSCL
9	RAPD05	AACGCGCAAC	
10	RAPD02	GTTTCGCTCC	Viện lúa ĐBSCL
11	RAPD04	GTAACCCGT	Viện lúa ĐBSCL
12	RAPD06	CCCGTCAGCA	Viện lúa ĐBSCL
13	PC 11	AAAGCTGCGG	Công ty OPD TA

Bảng 3. Danh sách các mồi sử dụng trong phương pháp SSR chỉ thị.

STT	Primer	Chuỗi mã di truyền 5'-----3'	Nguồn gốc
1	LPF	TATAGCAATGTGTGCGCTGG	Viện lúa ĐBSCL
	LPR	GTTCCCTTCCAGCAGCTAAC	
2	S35F	GCTCCTACAAATGCCATCA	
	S35R	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	
3	SSVF	GTAATCT(TA)ACCACTGTGTGTG	
	SSVR	TGGTCTCCTTTGGA(AG)GCCCCC-	
4	Satt05F	TATCCTAGAGAAGAATAAAAAA	Trường Cornell (Mỹ)
	Satt05R	GTGATTAGGCTTCAAATA	
5	Satt20F	GAGAAAGAAATGTGTTAGTGTA	
	Satt20R	CTTTTCCTTCTTATTGTTTGA	
6	Satt83F	ACCATTGGAATGTTCTACA	
	Satt83R	TTGAAGTTATAAAAAAGTTTACATC	

Phân tích số liệu: dựa vào phần mềm NTSYS-pc version 2.1 (Rohlf, 1992).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sản phẩm phản ứng PCR với chỉ thị RAPD

Để phát hiện sự đa hình của các giống đậu nành,

13 mồi đã được sử dụng trong phản ứng PCR trên DNA genome thu được từ các mẫu lá của 30 giống đậu nành. Sản phẩm khuếch đại tạo ra từ những mồi này được quan sát trên gel agarose 1,5%. Kết quả quan sát cho thấy 9 mồi cho sản phẩm khuếch đại

trên 100% số mẫu, có 4 mẫu không thể hiện khuếch đại bất cứ băng hình nào (Bảng 4). Dựa vào sự khác biệt giữa các allele thể hiện qua các băng trên gel agarose ta có thể xác định được sự khác nhau giữa các giống về mặt di truyền. Đối với phương pháp chỉ thị phân tử RAPD do kích thước phân tử DNA quá dài, thí nghiệm dùng phân tử DNA đã được cắt bởi (*Hind*III) trên các allele khác nhau (Lang, 2006).

Đánh giá độ đa hình của chỉ thị RAPD để xem xét độ đa dạng của 30 giống đậu nành với 13 mẫu RAPD. Tuy nhiên chỉ có 9 mẫu ($P = 69\%$) cho sản phẩm đa hình còn lại các chỉ thị không ghi nhận sản phẩm bắt cặp của DNA hoặc các sản phẩm này cho thấy đơn hình trên các giống.

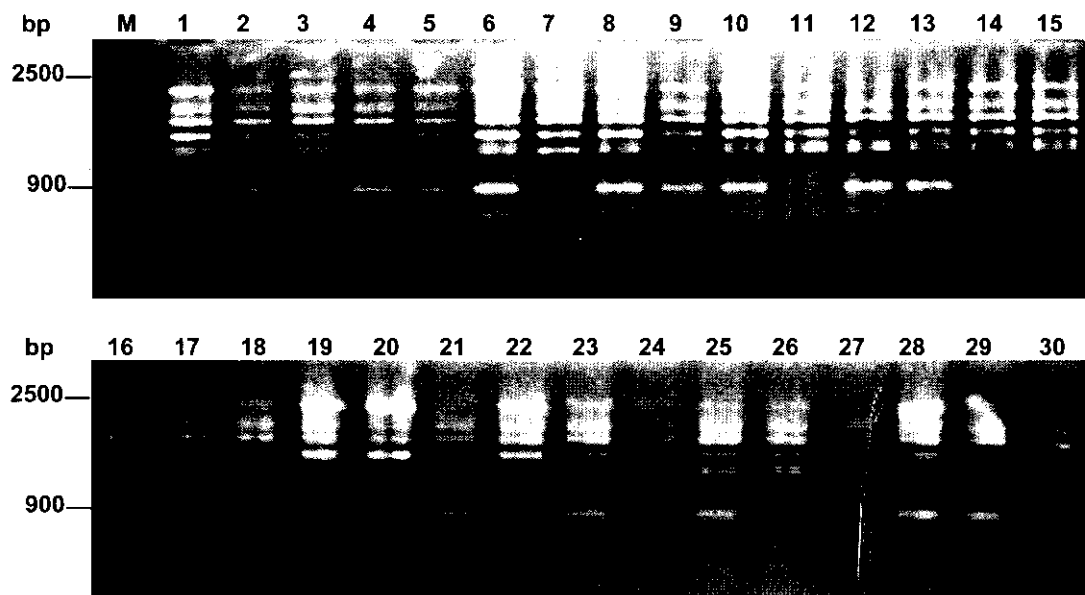
Đối với mẫu OPD07, số mẫu cho sản phẩm khuếch đại chiếm 100 % tổng số. Từ kết quả thu được trong hình 1 cho thấy số mẫu tạo băng giống

nhau nhiều với hai allele thường rõ ở vị trí kích thước (900 và 1200 bp) chỉ một số giống như 25: OMDN112, 27: OMDN113, 28: MTD176, 29: TL57, 30: OMDN01 có sự khác biệt rõ và cho thấy có 5 allele với kích thước (600, 700, 900, 1200 và 2000 bp). Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các băng có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống, đồng thời nhiều mẫu có cùng sự đa hình do chúng đều xuất phát từ cùng một giống chỉ khác nhau về mặt địa lý. Điều này thể hiện giống số 16: OMDN 62 và số 27: OMDN 27 có khác biệt rất xa với các giống khác trên thí nghiệm này (Nguyễn Đức Thuận, Nguyễn Thị Lang, 2006).

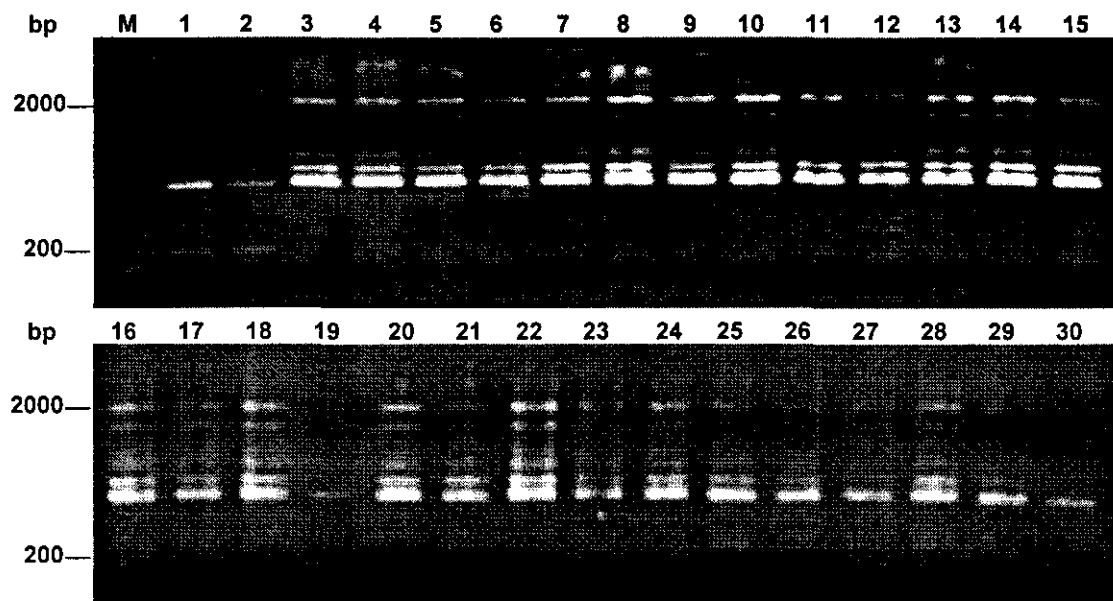
Đối với mẫu AC14, Sản phẩm tạo ra nhiều và đa hình rất rõ giữa các giống các giống này có kích thước biến động 6 allele khác nhau (900 - 2500 bp) (Hình 1).

Bảng 4. Kết quả sử dụng mẫu trong phương pháp chỉ thị RAPD.

STT	Primer (mẫu)	Số allele	STT	Primer (mẫu)	Số allele	STT	Primer (mẫu)	Số allele
1	AA11	4	4	OPD05	8	7	OPD18	6
2	AC14	6	5	OPD07	5	8	RAPD03	9
3	OPD03	5	6	OPD11	5	9	RAPD05	9



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR với mẫu AC14, trên gel agarose 1,5%. 1: OMDN64; 2: ATF15; 3: OMDN32; 4: OMDN83; 5: OMDN31; 6: OMDN87; 7: Nam Vàng; 8: OMDN109; 9: DT84; 10: OMDN118; 11: OMDN116; 12: OMDN86; 13: OMDN59; 14: OMDN115; 15: OMDN34; 16: OMDN62; 17: OMDN111; 18: OMDN36; 19: OMDN117; 20: OMDN14; 21: OMDN29; 22: OMDN110; 23: OMDN114; 24: OMDN85; 25: OMDN112; 26: OMDN33; 27: OMDN113; 28: MTD176; 29: TL57; 30: OMDN01.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR với mỗi RAPD05 trên gel agarose 1,5%.

Tương tự, qua quan sát sản phẩm điện di cho thấy mỗi RAPD05 có nhiều băng đa hình với 9 allele (200 - 300, 400, 500, 550, 600, 700, 1500, 2000 bp). Một số allele không rõ ràng có thể dễ bị nhầm lẫn với các tạp chất như RNA. Đồng thời, mỗi RAP05 với 2 sản phẩm được tạo ra cũng cho thấy sự phân biệt khá rõ về di truyền của một số giống ở mức độ nhóm nghĩa là có sự giống nhau về hình thái: số 19: OMDN117 và số 26: OMDN33 (Hình 2).

Các môi như môi OPD11 với sản phẩm khuếch đại được tạo ra 100%, kích thước phân tử được ghi nhận trên băng hình là 500 - 3200 bp. Kích thước trọng lượng phân tử dài không nhìn rõ. Các giống chỉ có 1 allele như giống số 2: ATF15, số 27: OMDN13, 29: TL57 và số 30: OMDN01. Sự khác nhau về số lượng và vị trí của các băng có thể cho biết được sự khác nhau về trình tự DNA giữa các giống, đồng thời nhiều mẫu có cùng sự đa hình do chúng đều xuất phát từ nhiều giống chỉ khác nhau về mặt địa lý. Allele nằm vị trí với phân tử nhỏ nhất là 500 bp.

Môi OPD18 với sản phẩm khuếch đại được tạo ra 100% , kích thước phân tử được ghi nhận trên băng hình là với 6 allele 600 - 3200 bp. Có 4 giống cho 1 allele là giống số 4: OMDN83, số 5: OMDN31, số 24: OMDN85 và số 30: OMDN01.

Đối với chi thị OPD03, sản phẩm khuếch đại của DNA trên các giống đạt 83,33%. Còn lại là các DNA

không ghi nhận bắt cặp trong giai đoạn lai giữa DNA của OMDN83, OMDN31, Nam Vang, OMDN85 và OMDN113. Điều này có thể giải thích do mỗi không có trình tự nucleotide phù hợp để gắn DNA trong hệ gene của các giống trên, cũng có thể do bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong phản ứng PCR như lượng DNA, và các yếu tố khác.

Riêng với môi OPD05, số lượng giống có trình tự DNA bắt cặp cao chiếm 100 % trên tổng số mẫu. Kích thước biến động của phân tử được ghi nhận với 8 allele (500 - 3000 bp), một số allele rất đậm và một số khác mờ. Các allele đậm điều tập trung vị trí allele 550 bp. Còn các allele khác đều rất mờ chỉ trừ allele vị trí 100 bp trên giống số 1: OMDN64 và số 19: OMDN117.

Đối với chi thị RAPD03 sự khuếch đại DNA cho sản phẩm đạt 93,3% và được ghi nhận với 9 allele trên các giống và biến động kích thước phân tử rất dài từ 300 tới 2800 bp. Chính chiều dài này cũng giúp cho mỗi RADP03 có sự bắt cặp DNA trên cây khác như lúa và dứa (Lang *et al.*, 2004). Tuy nhiên đối với cây dứa thì phân tích chỉ có 4 allele và cây lúa được 4 allele.

Môi AA11 là môi cho sản phẩm đạt 100%, các băng hình cho thấy rất rõ và cao. Mức độ đa hình không cao chỉ tách ra ba nhóm. Nhóm số 1 nằm trên giống số 1 có 1 allele: OMDN64, nhóm thứ hai có hai allele nằm trên giống số 5: OMDN31. Còn lại là

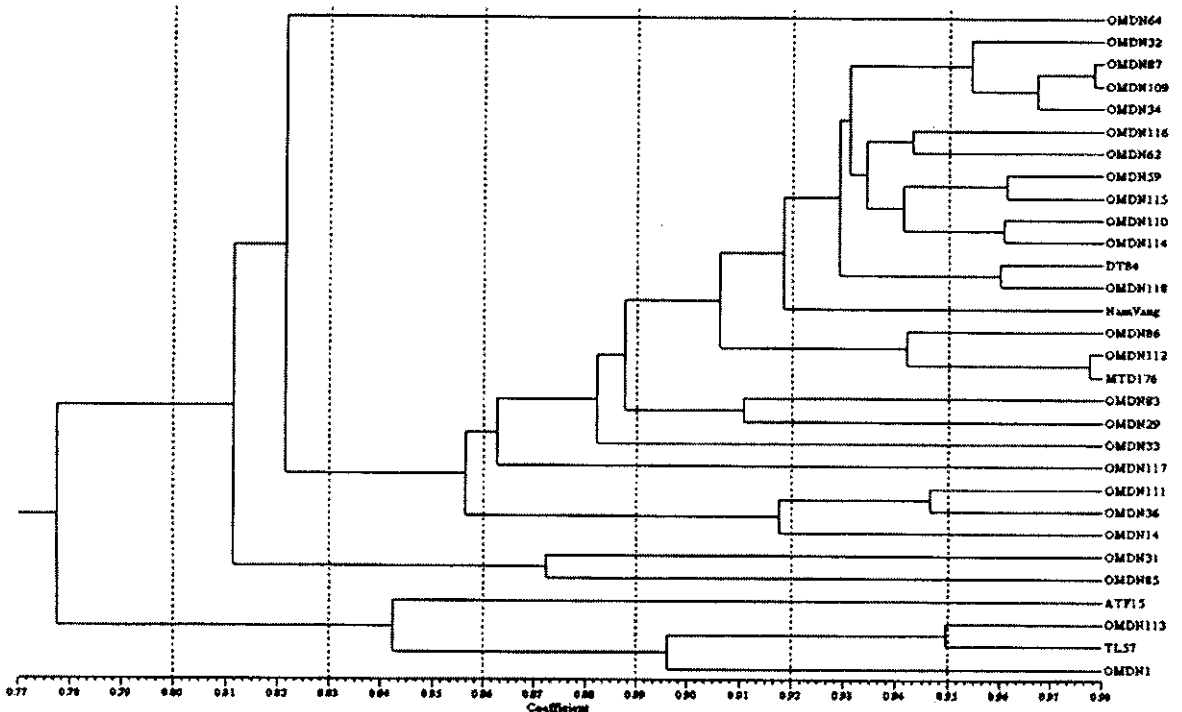
các giống có 4 allele (600, 1500, 2000, 2300 bp).

Qua phân tích sản phẩm PCR với 9 môi thì thấy phần lớn các giống đều cho sản phẩm khuếch đại. Số lượng sản phẩm PCR tạo ra đối với những môi thì còn phụ thuộc nhiều vào điều kiện phản ứng PCR (Ellsworth *et al.*, 1993) cho nên chỉ có một số môi cho ra các băng đa hình. Bên cạnh đó, một số sản phẩm PCR khó nhận diện trên gel do số lượng khuếch đại ít nên băng bị mờ vì vậy có thể sẽ ảnh

hưởng đến việc thu thập các dữ liệu để phân nhóm.

Phân tích nhóm của 30 giống đậu nành dựa trên dữ liệu sản phẩm PCR (Phương pháp chỉ thị RAPD)

Phân nhóm các giống đậu nành căn cứ vào kết quả của sản phẩm RAPD, chỉ số tương đồng gián đơn SM (simple matching coefficient) bằng phân tích nhóm theo phương pháp UPGMA



Hình 3. Sơ đồ hình cây thể hiện mối tương quan về di truyền giữa 30 giống đậu nành trên cơ sở kiểu gen (phương pháp chỉ thị RAPD).

Kết quả thu được dựa trên sơ đồ cây phân nhóm cho thấy nếu xét mức độ tương đồng di truyền của 30 giống đậu nành ở 0,77 thì sẽ được chia thành 4 nhóm chính và nhiều nhóm phụ như sau :

Nhóm A: Nhóm này gồm 1 giống OMDN64 có mức độ tương đồng nằm trong khoảng 0,82 - 0,83.

Nhóm B: Các giống thuộc gồm 23 giống có mức tương đồng từ 0,86 - 0,89. Trong nhóm B các giống lại được chia thành 2 nhóm phụ với khoảng cách di truyền gần hơn như sau:

Nhóm B1: Có mức độ tương đồng di truyền nằm trong khoảng 0,93-0,95 gồm các giống cải tiến: OMDN32, OMDN87, OMDN109, OMDN34,

OMDN116, OMDN62, OMDN59, OMDN115, OMDN110, OMDN114, DT84 và OMDN118. Trong đó giống DT84 có quan hệ chặt về di truyền với OMDN118. Qua phân tích các giống trong nhóm B1 cho thấy có sự giống nhau về di truyền giữa các giống với nhau.

Nhóm B2: Nằm trong khoảng tương đồng từ 0,91-0,92 bao gồm 4 giống: Giống Nam Vang, OMDN86, OMDN112 và MTD176. Trong nhóm này chia ra hai nhóm phụ:

Nhóm B2.1: Đó là giống Nam Vang đây là giống đậu địa phương năng suất cao được bà con Đồng bằng sông Cửu Long giữ giống rất lâu đời.

Nhóm B2.2: Chứa 3 giống OMDN86, OMDN112 và MTD176. Trong đó, giống MTD176 có tương đồng với OMDN112 điều này có thể cho biết khả năng lai tạo giữa các giống này sẽ ít ưu thế lai bởi có sự tương quan đến 98% về mặt di truyền.

Nhóm B3: Gồm có 7 giống: OMDN83, OMDN29, OMDN33, OMDN117, OMDN111, OMDN36, OMDN14 với mức tương đồng di truyền từ 0,86 - 0,89. Trong nhóm này chia ra các nhóm phụ:

Nhóm B3.1: Có 3 giống OMDN83, OMDN29, OMDN33, trên nhóm này trừ giống OMDN33 nằm riêng một nhánh mức độ dung hợp với hai giống kia khá xa, tuy nhiên về sự liên quan di truyền chiếm 85%.

Nhóm B3.2: Bao gồm có 4 giống OMDN117, OMDN111, OMDN36 và OMDN14. Trên 4 giống này có mức dung hợp từ 0,85 - 0,89 và ghi nhận hệ số tương quan di truyền khá gần nhau từ 0,78 tới 0,95.

Qua phân nhóm B, sự khác biệt về di truyền thể hiện rõ ở với mức độ tương đồng thấp nhất là 0,86 và cao nhất là OMDN112 và MTD176 là 0,98. Kết quả này nói lên được khả năng cho ưu thế lai của OMDN112 và MTD176 với các giống khác sẽ rất khả quan. Đồng thời, các giống đậu lai như OMDN29, OMDN117 cũng có sự khác nhau về mặt di truyền.

Nhóm C: Nhóm C chỉ có 2 giống OMDN31 và OMDN85 với mức tương đồng về di truyền đối với các nhóm khác nằm trong khoảng 0,80 - 0,89. Trong nhóm C thì giống OMDN31 là giống phát triển bằng chi thị phân tử nên không ảnh hưởng bởi môi trường.

Nhóm D: Với 4 giống còn lại nhóm D có hệ số tương đồng giữa các giống nằm trong khoảng từ 0,83 - 0,95. Trong nhóm này chia ra hai nhóm phụ:

Nhóm D1: Chỉ gồm có 1 giống ATF15 với mức độ tương đồng là 0,84.

Nhóm D2: Gồm 3 giống với khoảng cách tương đồng từ 0,89 - 0,95. Có thể chia nhóm này thành 2 nhóm phụ nhỏ sau:

Nhóm D2.1: Chứa hai giống OMDN113 và TL57 với độ tương đồng là 0,95.

Nhóm D2.2: Chỉ gồm 1 giống DMDN01 với hệ số tương đồng rất cao nằm trong khoảng 0,89.

Kết quả thu được từ phân tích nhóm D cho thấy sự khác biệt rất rõ giữa nhóm giống. Hơn nữa, kỹ thuật RAPD dựa trên các mẫu ngẫu nhiên cho nên xác

suất bắt cặp với DNA mẫu để khuếch đại tạo sản phẩm không cao dẫn đến ảnh hưởng sự đa dạng của các giống.

Như vậy, với 9 mỗi 30 giống được phân thành 4 nhóm chính và nhiều nhóm phụ trong đó mức độ tương quan giữa các giống dao động từ 0,63 - 0,99 cho thấy các giống có sự đa dạng về mặt di truyền cao. OMDN36 có mức độ tương đồng giữa các giống là thấp nhất 0,63 và một số giống trong nhóm B có mức độ tương đồng cao nhất gần 100%. Sự khác biệt về di truyền giữa các giống trong nhóm D cao hơn ở các giống trong nhóm C, A, và B. Hệ số tương đồng giữa nhóm D và nhóm C so với nhóm A và B là 0,77 và các giống trong nhóm B có thể được xem là giống trung gian giữa nhóm A và nhóm C. Điều này có nghĩa là nếu như đem các giống ở nhóm A và C lai tạo với nhóm B thì có thể tạo ra nhiều cá thể có nhiều đặc tính mong muốn bởi khoảng cách di truyền càng xa thì khả năng cho ưu thế lai càng cao.

Với 9 mỗi bắt cặp với genome của 30 giống đậu nành cho chúng ta nhận xét rằng khi ly trích DNA tạo sản phẩm cho PCR hoạt động thì mức độ phân tách của các giống đậu nành khác nhau phụ thuộc vào độ tinh khiết của DNA. Các nồng độ của dNTP, MgCl₂ nồng độ KCl và thể tích dung dịch cuối cùng để tạo ra sản phẩm cũng ảnh hưởng đến các kiểu băng trong phương pháp RAPD. Phân tích các mẫu trên tất cả các cây trồng trong đó có cây đậu nành đây cho chúng ta ghi nhận và xác định nguồn gốc khác nhau của các nhóm lai để tạo cơ hội trong việc tuyển lựa vật liệu lai tạo con lai sau này tốt hơn.

Sản phẩm PCR với phương pháp chỉ thị SSR

Dùng 6 mỗi SSR để tạo sự khuếch đại, các chuỗi mã của các trình tự được ghi trên bảng 3. Ghi nhận kết quả tất cả sản phẩm của SSR đều cho sự đa hình trên 30 giống đậu nành ($P = 100\%$) (Bảng 5).

Đối với mỗi Satt05 sự khuếch đại DNA cho sản phẩm đạt 83,33% và 2 allele với kích thước phân tử từ 190 bp đến 200 bp. Có giống số 1: OMDN61 và giống số 16: OMDN62 cho kích thước phân tử thấp.

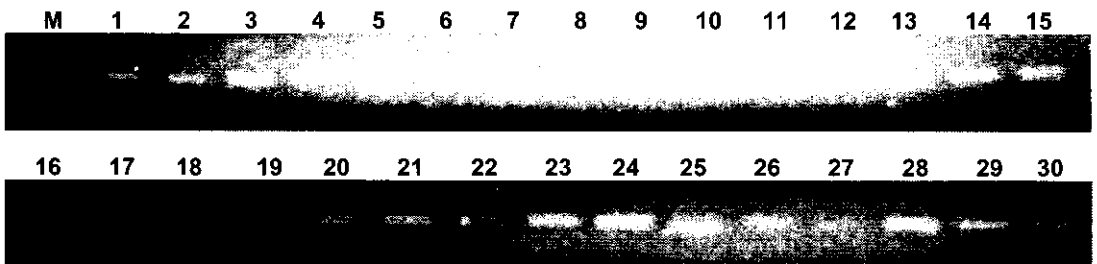
Đối với Satt20 được ghi nhận 86,66% sản phẩm được khuếch đại và cho đa hình. Các sản phẩm này không ghi nhận bắt cặp với các giống số 5: OMDN31, số 16: OMDN62, số 24: OMDN85 và số 25: OMDN112. Kích thước phân tử chênh lệch của các băng này rất gần nhau với mức 150, 120 và 100 bp.

Kích thước cao có giống số 7: Nam Vang, số 19: OMDN117, kể đến là số 27: OMDN113, số 28: MTD176, số 29: TL57. Ngoài ra, các giống còn lại do có trọng lượng phân tử quá thấp nên các sản phẩm mờ khó phân biệt các allele này.

Phân tích với mỗi Satt83 có sự đa hình trên mỗi với kích thước 280 - 300 bp hai giống có kích thước phân tử cao là OMDN31 và Nam Vang, ngoài ra kích thước phân tử của các giống khác đều cho kết quả bằng nhau trên gel agarose 3%.

Bảng 5. Kết quả sử dụng mỗi trong phương pháp chỉ thị SSR.

STT	Mỗi	Số allele	STT	Mỗi	Số allele	STT	Mỗi	Số allele
1	LPF LPR	2	3	SSVF SSVR	3	5	Satt20F Satt20R	3
2	S35F S35R	2	4	Satt05F Satt05R	2	6	Satt83F Satt83R	2



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR với mỗi Satt83 trên gel agarose 3%. 1: OMDN64; 2: ATF15; 3: OMDN32; 4: OMDN83; 5: OMDN31; 6: OMDN87; 7: Nam Vang; 8: OMDN109; 9: DT84; 10: OMDN118; 11: OMDN116; 12: OMDN86; 13: OMDN59; 14: OMDN115; 15: OMDN34; 16: OMDN62; 17: OMDN111; 18: OMDN36; 19: OMDN117; 20: OMDN14; 21: OMDN29; 22: OMDN110; 23: OMDN114; 24: OMDN85; 25: OMDN112; 26: OMDN33; 27: OMDN113; 28: MTD176; 29: TL57; 30: OMDN01.

Trương tự qua phân tích với chỉ thị SSR cho thấy khuếch đại 80,0% và các sản phẩm đa hình tách ra với kích thước phân tử là 300 và 280 bp. Nếu so sánh với chỉ thị phân tử trên các giống thì ghi nhận đa hình rất rõ.

Chỉ thị S35 cho sản phẩm tạo ra đạt 100% các giống ghi nhận bằng hình. Dựa trên hình các giống OMDN 64, OMDN 31, Nam Vang, OMDN 116, OMDN 115, OMDN 34 và OMDN 36, OMDN 14, OMDN112, OMDN85, OMDN33, OMDN113 và OMDN84 cho gen mang kích thước bằng cao hơn. Còn lại các giống khác có kích thước vị trí bằng thấp hơn

Đối với mỗi LP, sản phẩm khuếch đại trên mỗi này với các dòng đậu nành cho khuếch đại đạt 93%. Tuy nhiên sản phẩm cho thể hiện cá allele đa hình nhưng hệ di truyền là trội. Đối với tuân suất alele đa hình dạng trội không thuận lợi cho chọn giống. Các băng hình thể hiện các giống không đồng nhất mà ở vị trí dị hợp với giống số 2, số 3, số 8, số 28. Vị trí chỉ thị phân tử tách ra khá cao 700 - 1500 bp.

Phân tích nhóm của 30 giống đậu nành dựa trên dữ liệu sản phẩm PCR (Phương pháp chỉ thị SSR)

Nếu xét về góc độ phân tích di truyền trên đậu địa phương Nam Vang và các giống cải tiến thì khoảng cách di truyền giữa Nam Vang và giống cải tiến có khoảng cách di truyền thấp nhất biến động từ 0,57 và cao là 0,84 với giống OMDN85.

Kết quả thu được từ sơ đồ cây phân nhóm cho thấy nếu xét mức độ tương đồng di truyền của 30 giống ở 0,66 thì sẽ được chia thành 3 nhóm chính sau:

Nhóm A: Nhóm này gồm 22 giống có mức độ tương đồng nằm trong khoảng 0,83 - 0,86. Trong nhóm A các giống lại được chia thành 2 nhóm phụ với khoảng cách di truyền gần hơn như sau:

Nhóm A1: Có mức độ tương đồng di truyền nằm trong khoảng 0,85 - 1,0 gồm 10 giống. Trong nhóm này lại chia ra hai nhóm phụ

Nhóm A1.1: Bao gồm 8 giống có mức độ tương

đồng từ 0,88 - 0,95.

Nhóm A1.2: Chia ra hai giống OMDN32 và ATF15 mức dung hợp từ 0,95.

Nhóm A2: Nằm trong khoảng tương đồng từ 0,83 - 1,0 bao gồm 12 giống và phân thành 2 nhóm phụ:

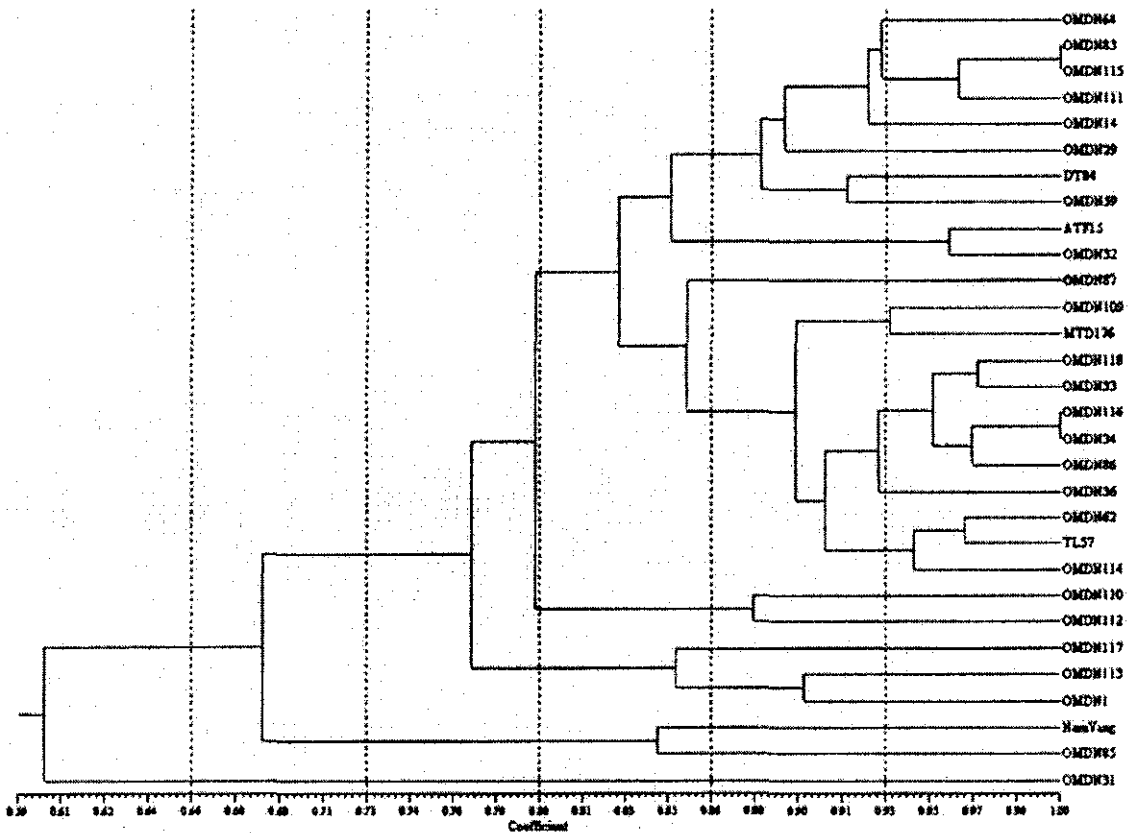
Nhóm A2.1: Chứa 1 giống OMDN87 với mức tương đồng 0,84.

Nhóm A2.2: Gồm các giống còn lại.

Qua phân nhóm A, sự khác biệt về di truyền thể hiện rõ ở ATF15 và OMDN32.

Nhóm B: Nhóm B chỉ có 7 giống OMDN114,

OMDN110, OMDN112, OMDN117, OMDN113, Nam Vang và OMDN85 với mức tương đồng về di truyền đối với các nhóm khác nằm trong khoảng 0,69 - 0,91. Trong 7 giống này cùng nhóm nhưng phân hóa và mức độ dung hợp di truyền khá xa nhau và rời rạc. Xét về mức độ tương đồng cho thấy nhóm B có thể là nhóm trung gian giữa nhóm A và nhóm C bởi khoảng cách di truyền tương đối xa so với các giống còn lại. Nếu xét về góc độ phân tích giữa các giống thì giống Nam Vang với các giống cải tiến khác có khoảng cách di truyền thấp nhất từ 0,57 đến 0,84. Điều này cũng ghi nhận với giống OMDN113 so với ma trận đảo với OMDN31 thì sự tương quan thấp nhất 0,42.



Hình 5. Sơ đồ hình cây thể hiện mối tương quan về di truyền giữa 30 giống đậu nành trên cơ sở kiểu gen (phương pháp chỉ thị SSR).

Nhóm C: Chỉ có 1 giống OMDN31, có hệ số tương đồng khoảng 0,60.

Như vậy, với 6 mỗi 30 giống được phân thành 3 nhóm chính trong đó mức độ tương quan giữa các giống biến thiên từ 0,59 - 1,0 cho thấy sự đa dạng về

mật di truyền cao giữa chúng. Giống OMDN31 có mức độ tương đồng giữa các giống là thấp nhất 0,60 và một số giống trong nhóm A có mức độ tương đồng cao nhất gần 1. Sự khác biệt về di truyền giữa các giống trong nhóm A cao hơn ở các giống trong nhóm C, hệ số tương đồng giữa nhóm A và nhóm B

so với nhóm C là 0,49 và các giống trong nhóm B có thể được xem là giống trung gian giữa nhóm A và nhóm C. Điều này có nghĩa là nếu như đem các giống ở nhóm A và C lai tạo với nhóm B thì có thể tạo ra nhiều cá thể có nhiều đặc tính mong muốn bởi khoảng cách di truyền càng xa thì khả năng cho ưu thế lai càng cao (Bùi Chí Bửu, 2002).

So sánh phân nhóm nguồn gen của kỹ thuật RAPD và SSR. Rõ ràng qua phân tích với phương pháp SSR thì mức độ tương đồng của các giống có khoảng cách tương đồng biến động từ 0,59 đến 1, trong khi hệ số tương đồng của phương pháp phân tích của RAPD từ 0,77 đến 0,98.

Kết quả đánh giá sự phân nhóm dựa trên kiểu gen RAPD và SSR chỉ thị phân tử

Nghiên cứu và phân nhóm dựa vào đặc tính kiểu gen có thể giúp đoán được sự tương quan di truyền của các giống đậu nành, từ đó giúp cho các nhà chọn giống định hướng sơ khởi về những vật liệu lai tạo, dự kiến các qui trình chọn lọc sao cho đạt hiệu quả cao nhất và rút ngắn thời gian. Tuy nhiên, các chỉ thị của SSR sử dụng trong nghiên cứu này còn ít nên sự đa dạng chỉ dừng lại một vài nhóm. Dù vậy sản phẩm tách đa hình trên đậu nành ghi nhận được độ đa dạng rất cao so với RAPD với chỉ số đa dạng của tuân suất allele của SSR là $H = 0,312$.

So sánh kết quả kiểu gen giữa chỉ thị RAPD và chỉ thị SSR

Phân nhóm di truyền thực vật là một phương pháp phổ biến để đánh giá mức độ đa dạng của đối tượng thực vật cần nghiên cứu. Nó được thực hiện dựa trên những lý thuyết thống kê và phân tích đã được xây dựng bởi nhiều nhà khoa học thuộc các lĩnh vực toán học và sinh học. Trong phân nhóm di truyền được chia thành phân nhóm đánh giá theo tính trạng kiểu hình và phân nhóm theo kiểu gen.

Tuy đánh giá đa dạng thông qua kiểu hình giúp cho nhà chọn giống có cái nhìn khá tổng quan về đối tượng nghiên cứu. Nhưng do những phát sinh kiểu hình chịu sự ảnh hưởng tổng hợp bởi kiểu gen và môi trường nên sự tương đồng hay khác biệt trong phân nhóm kiểu hình có thể là do những tác động khác nhau trong môi trường gây nên và điều này nhà chọn giống khó kiểm soát được. Chính vì thế kết quả đánh giá đa dạng thông qua kiểu hình chỉ có thể phát hiện một phần của đa dạng của kiểu gen nên cần phải kết hợp với các đánh giá đa dạng di truyền kiểu gen bằng các công cụ của sinh học phân tử như các chỉ thị phân

tử SSR, RAPD, AFLP... Các phương pháp đánh giá kiểu gen với sự trợ giúp của chỉ thị phân tử ngày nay rất được khuyến khích và tin cậy vì đã được chứng minh được hiệu quả cao, đáng tin cậy, số lượng chỉ thị lớn... (Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 2003). Hiện nay, đánh giá đa dạng di truyền thông qua kiểu gen được thực hiện bằng cách phân tích cây phân nhóm di truyền được xây dựng trên cơ sở sự tương đồng và khác biệt trong gen di truyền giữa các giống khá phổ biến.

Được thiết lập giữa các allele của SSR và của RAPD khoảng cách di truyền của RAPD lớn hơn so hơn so với phương pháp của SSR (kết quả phân nhóm bằng chỉ thị RAPD và SSR). Ghi nhận được các tần suất allele có tương quan giữa các giống của RAPD rất cao ($r = 0,64 - 0,98$). Sự tương quan giữa các locus lớn nhất là OMDN 109 và OMDN 87. Và tương quan giữa các locus: nhỏ nhất là OMDN 1 và OMDN 36. Sự tương quan các giống trong phương pháp SSR chỉ thị biến động ($r = 0,42 - 0,97$). Các giống có chỉ số allele giữa các locus cao là OMDN 118 và OMDN 34. Tương quan giữa các locus nhỏ nhất là OM DN 113 và OMDN 31.

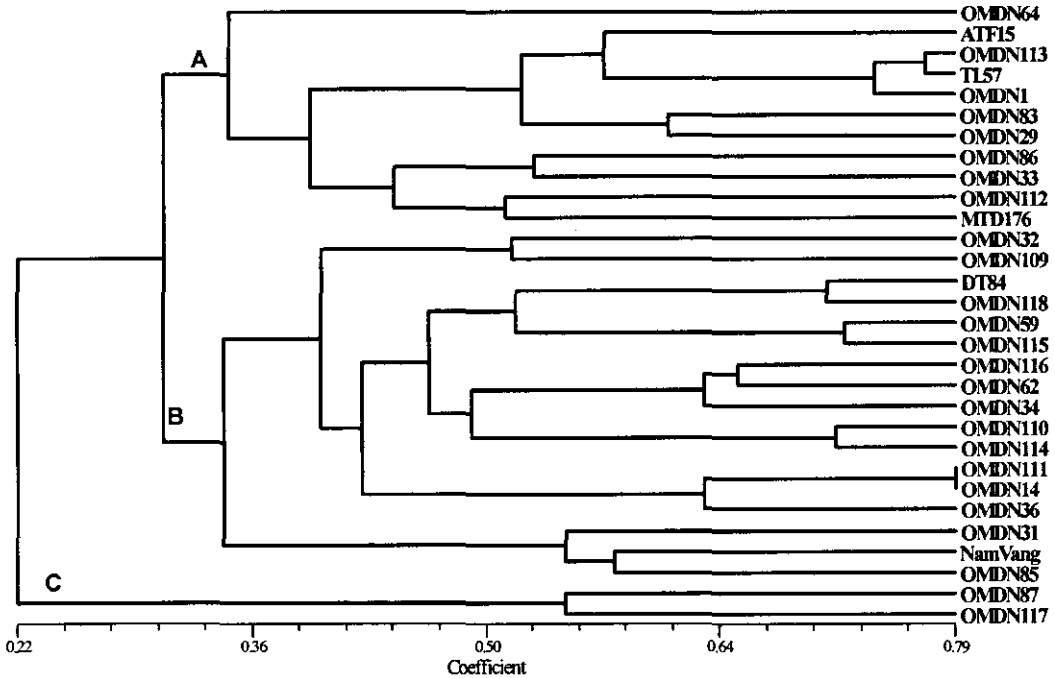
Trong phân tích đa dạng về di truyền chia ra các hợp phần quan trọng: tần số allele và tính đa hình trong nhóm. Đánh giá đa dạng di truyền giữa các giống/ dòng có nguồn gốc địa lý khác nhau trong tập đoàn giống qua đó tìm hiểu mức độ quan hệ thân thuộc giữa các nhóm giống này nhằm giúp cho việc chọn các giống có nhiều tính trạng phong phú và xác định khoảng cách di truyền nhằm thiết lập hợp lý cho vật liệu lai sau này. Đối với SSR cho tỷ lệ locus đa hình: ở mức độ ý nghĩa 1%, tỷ lệ locus đa hình giữa các nhóm giống biến động từ 59% đến 100%. Tính đa hình biểu hiện quan trọng nhất ở các nhóm giống khác nhau. Số allele trung bình ở mỗi locus: nhìn chung, ở hầu hết các locus đều có hai allele, ngoại trừ giống có 3 allele trên phân tử LP với chỉ số đa dạng di truyền (H) $H = 0,312$. Trong khi đó đối với RAPD, chỉ số đa dạng di truyền $H = 0,124$. Tỷ lệ đa dạng của RAPD thấp hơn so với phương pháp SSR.

Phối hợp cả hai phương pháp RAPD và SSR được đánh giá

Tóm lại tỷ lệ phân trăm đa hình và chỉ số đa dạng của gen khi dùng phân tích trên chỉ thị phân tử của nhóm RAPD phân tử thì thấp hơn khi phân tích bằng phương pháp của SSR. Tuy nhiên sự tương quan giữa các locus trong nhóm của RAPD chỉ thị thì cao hơn của phương pháp SSR (Bảng 6).

Bảng 6. Biến động di truyền của 30 giống đậu nành thông qua phương pháp RAPD và SSR chỉ thị.

Thông số	Chỉ thị RAPD	Chỉ thị SSR
Phần trăm các locus đa hình (P)	69,23	100
Chỉ số đa dạng của gen	0,124	0,312
Giá trị tương quan trong các locus	0,77	0,59



Hình 6. Sơ đồ hình cây thể hiện mối tương quan về di truyền giữa 30 giống đậu nành trên cơ sở kiểu gen (phương pháp chỉ thị RAPD và SSR).

Phối hợp cả hai phương pháp RAPD và SSR được đánh giá trên phân nhóm đa dạng di truyền ghi nhận cho thấy trên hình 6.

Để có cái nhìn tổng quát trên phân tử, sự đa dạng và phân nhóm di truyền được phối hợp trên hai phương pháp khác nhau với chiều dài phân tử biến động cao nhất là 3200 bp và thấp nhất là 100 bp. Dựa trên phân nhóm hệ số tương quan biến động từ 0,22 - 0,79. Được phân thành ba nhóm chính và nhiều nhóm phụ:

Nhóm A: Nhóm này gồm 11 giống có mức độ tương đồng nằm trong khoảng 0,36 - 0,79. Trong nhóm A các giống lại được chia nhiều nhóm phụ. Trong đó điểm chú ý là giống OMDN 64 là nhóm độc lập với các giống còn lại.

Nhóm B: Nhóm B bao gồm 17 giống. Nhóm này

biến động từ 0,36 đến 0,79. Nhóm này chia ra nhiều nhóm phụ đang vào nhau. Điều này cho thấy các nhóm này có cùng một gia phả gần nhau.

Nhóm C: Chỉ có 2 giống OMDN 87 và OMDN 117, có hệ số tương đồng 0,55.

Như vậy, với 9 mồi từ RAPD và 6 mồi từ SSR chỉ thị trên 30 giống được phân thành 3 nhóm chính trong đó mức độ tương quan giữa các giống dao động từ 0,22 - 0,79. Hệ số tương quan của các giống dựa trên tiên đoán và giá trị quan sát của các locus được ghi nhận trên (Bảng 6).

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Phân tích trên chỉ thị của RAPD: trong tổng số

13 mỗi tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền thì chỉ có 9 mỗi cho sản phẩm khuếch đại.

Thông qua các dữ liệu chi thị RAPD với 9 mỗi được sử dụng 30 giống được phân thành 4 nhóm chính.

Trong phân nhóm của SSR trên 6 chi thị được ghi nhận với 3 nhóm khác biệt.

Bản đồ phân nhóm phối hợp hai phương pháp chi thị phân tử cũng được thiết lập với ba nhóm khác nhau.

Dựa vào chi thị phân tử để có thể đánh giá gián tiếp sự hiện diện hay không hiện diện của gen chọn lọc nhờ chi thị mà không bị ảnh hưởng của môi trường.

Chỉ số đa dạng phân tích theo phương pháp SSR cao ($H = 0,312$) trong khi chỉ số đa dạng của RAPD chi thị phân tử rất thấp ($H = 0,124$). Tương tự tần số đa hình tách trên phương pháp SSR cũng cao hơn phương pháp RAPD chi thị. Cả hai phương pháp cho sự tương quan trong nhóm rất cao. Biến động từ 0,59 cho chi thị SSR và 0,77 cho chi thị RAPD

Ứng dụng các phương pháp chi thị phân tử trong phân tích đa dạng di truyền đòi hỏi có sự đầu tư lớn về trang thiết bị, máy móc cũng như sự kiên trì và lâu dài.

Đề nghị

Cần nghiên cứu và phân tích trên nhiều chi thị để có sự phân nhóm chính xác hơn. Từ đó, tìm hiểu những chi thị có đóng góp nhiều trong sự khác biệt di truyền để kiểm soát và khai thác dễ dàng hơn cũng như tìm mối liên kết giữa gen quy định về các tính trạng năng suất, thời gian sinh trưởng...

Thử nghiệm với số lượng giống nhiều hơn để tìm ra hệ thống mỗi thích hợp cho từng nhóm giống. Trên cơ sở đó tìm ra các gen chi thị chọn lọc để nhận

biết từng loại giống.

Có thể sử dụng phân tích nhóm dựa trên chi thị phân tử để xác định những cá thể có khả năng tạo ưu thế lai trong chọn tạo giống.

Tiếp tục ứng dụng phương pháp chi thị phân tử trên nhiều giống cây khác để nghiên cứu sự đa dạng di truyền và nhận diện giống.

Lời cảm ơn: *Tập thể tác giả chân thành cảm ơn Sở Khoa học Công nghệ (KH-CN) Thành phố Cần Thơ, Sở KH-CN tỉnh An Giang, Sở KH-CN tỉnh Trà Vinh đã tài trợ ngân sách khoa học phục vụ hoạt động nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Thị Ngọc Vi, Nguyễn Thị Lang (2006) Nghiên cứu gen kháng bệnh rỉ sắt trên cây đậu nành bằng phương pháp phân tử SSR. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn* 17(1): 36-39.

Nguyễn Đức Thuận, Nguyễn Thị Lang (2006) Đánh giá đa dạng di truyền của đậu nành bằng phương pháp RAPD chi thị phân tử. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 5(1): 65-68.

Nguyen Thi Lang, Ngo Cam Hang (2007) Random amplified polymorphic analysis of genetic relationships among peanut cultivars. *OMonRice* 15: 174-178 .

Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2002) *Những phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Nguyễn Thị Lang (2006) *Thực tập Sinh học Phân tử*. Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long: 47.

Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2003) *Giáo trình Di truyền số lượng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Rohlf FJ (1992) NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. *New York: Exeter Software*.

GENETIC DIVERSITY IN SOYBEAN GENOTYPES USING RAPDs AND SSRs

Nguyen Thi Lang^{1,*}, Nguyen Duc Thuan², Bui Chi Buu³

¹Cuulong Delta Rice Research Institute (CLRRI)

²University of Agriculture and Forestry

³Institute of Agricultural Sciences for Southern Vietnam (IAS)

SUMMARY

Two sets of 30 soybean accessions developed by Cuulong Delta Rice Research Institute and Institute of Agricultural Sciences for Southern Vietnam were analyzed to determine DNA fingerprints using PCR – based markers. In this study, random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) markers were used to investigate relationships among 30 varieties. After screening and analyzing with 13 RAPD markers and 8 SSR markers, all RAPDs and six polymorphic SSRs giving the best results were addressed. A total of 6 SSR bands and 9 RAPD marker sites were used to calculate Jaccard's distance coefficients for cluster analysis using a unweighted pair-group method and an arithmetic averaging (UPGMA) algorithm. The higher discriminatory power of SSRs over RAPDs were recognized in the analyse. The genetic relationships identified by SSR and RAPD were highly concordant, such that the correlation between SSR and RAPD genetic distance estimates was $r = 0.79$. The SSR and RAPD analysis of 30 accessions allowed for their grouping into three distinct groups. Dendrogram constructed by NTSYSpc program clearly separated 30 samples into three groups according to species. This would provide good information for breeding materials in the future.

Keywords: Jaccard' distanc, NTSYS-pc, RAPD, SSR, soybean, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

* Author for correspondence: Tel: 84-710-86138; Fax: 84-710-861954; E-mail: buichibuu@hcm.vnn.vn