

Phân tích đa dạng di truyền của tập đoàn giống bông bằng kỹ thuật SSR

ThS. THÁI THỊ LÊ HẰNG, KS. TRỊNH MINH HỢP, KS. LÊ THỊ TƯƠI, KS. NGÔ THỊ MAI

Viện Nghiên cứu Bông và Nông nghiệp Nha Hồ

1. MỞ ĐẦU

Chọn giống là một khâu kỹ thuật quan trọng trong nghiên cứu cây trồng nói chung và cây bông nói riêng. Trong những năm gần đây sử dụng giống bông lai đã mang lại nhiều thành tựu to lớn cho ngành bông như năng suất, chất lượng được cải thiện rõ rệt, chống chịu với điều kiện ngoại cảnh, kháng sâu... Tuy nhiên, để tạo được các giống bông đạt được những yêu cầu của sản xuất bằng con đường lai tạo và chọn lọc truyền thống phải được tiến hành trên quy mô lớn, tốn rất nhiều thời gian và chi phí lớn. Hơn nữa, sử dụng các chỉ thị hình thái đôi lúc còn mang tính chủ quan và các đặc tính này biến động lớn trong các điều kiện ngoại cảnh, canh tác khác nhau vì thế hiệu quả đạt được chưa cao.

Hiện nay, nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn giống cây trồng đã được nhiều nhà khoa học quan tâm. Việc sử dụng các chỉ thị phân tử khác nhau được nghiên cứu và phát triển đã trở thành công cụ mạnh mẽ để phân tích đa dạng di truyền và xác định các mối quan hệ giữa các giống cây trồng, vật nuôi như RAPD, SSR, RFLP, AFLP... Trong đó, chỉ thị SSR (Simple Sequence Repeats) là một loại chỉ thị được sử dụng khá phổ biến, chính xác và hữu hiệu trong nghiên cứu đa dạng di truyền, xây dựng bản đồ liên kết, phân lập (gen), xác định quan hệ di truyền giữa các giống, dòng cây trồng, vật nuôi và chẩn đoán cặp lai cho ưu thế lai (Muhanaad Walid Akash, 2003). Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành "phân tích đa dạng di truyền của tập đoàn giống bông bằng kỹ thuật SSR" nhằm mục đích xác lập được đa dạng di truyền của vật liệu khởi đầu, dự đoán các tổ hợp lai.

Từ khóa:

- RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA): Đa hình các đoạn



Cánh đồng bông

ADN nhân ngẫu nhiên.

- SSR (Simple Sequence Repeats): Đa hình các lặp lại đơn giản.
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms): Đa hình độ dài các đoạn cắt hạn chế.
- AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms): Đa hình độ dài các đoạn nhân chọn lọc.

2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Gồm 50 giống có nguồn gốc khác nhau
- 20 cặp mồi SSR sử dụng để đánh giá tính đa hình ADN
- Các vật tư và dụng cụ cần thiết cho các thí nghiệm.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Xác định hệ số tương đồng di truyền và xây dựng cây phát sinh

chủng loại của các giống bông;

- Phân tích đa dạng di truyền của tập đoàn giống bông thông qua đánh giá tính đa hình ADN và lập sơ đồ các cặp lai giữa các giống bông.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tiến hành PCR-SSR

Thành phần PCR-SSR gồm buffer 10X, MgCl₂ 2,5mM, dNTP2,5mM, primers, Taq DNA polymerase 5u/μl, DNA 25ng và H₂O.

Các thông số nhiệt độ và thời gian cho PCR-SSR: 94°C trong 7 phút; 55°C trong 1 phút; 72°C trong 7 phút; 94°C trong 30 giây; 72°C trong 1 phút; Lưu giữ ở 4°C.

2.3.2. Phương pháp phân tích số liệu SSR

- Dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn ADN khi điện di sản phẩm SSR với các cặp mồi để làm cơ sở cho việc phân tích số liệu.

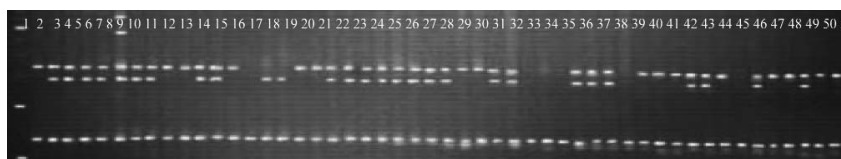


Hình 1. Kết quả điện di ADN tổng số

(1): λ=50ng; (2-20): hàm lượng ADN của các giống bông

Bảng 3.1. Trình tự, tổng số phân đoạn nhân được và số đoạn đa hình của các cặp môi

Ký hiệu	Số alen thể hiện	Số alen đa hình	Tỷ lệ đa hình (%)	Ký hiệu	Số alen thể hiện	Số alen đa hình	Tỷ lệ đa hình (%)
BNL1160	2	2	100,0	BNL3563	3	2	66,7
BNL2632	4	3	75,0	BNL4029	4	4	100,0
BNL2650	2	1	50,0	CIR086	4	1	25,0
BNL2882	2	2	50,0	CIR119	2	1	50,0
BNL3008	2	2	100,0	CIR165	7	6	85,7
BNL3241	5	4	80,0	CIR234	3	2	66,7
BNL3347	4	4	100,0	CIR240	6	6	100,0
BNL3348	2	1	50,0	CIR288	6	4	66,7
BNL3442	6	6	100,0	CIR388	4	3	75,0
BNL3558	2	1	50,0	CIR398	2	2	100,0
Tổng cộng	31	26			41	31	



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR-SSR

- Tiêu chuẩn hoá sản phẩm SSR theo qui ước:

Số 1: Xuất hiện phân đoạn ADN;

Số 0: Không xuất hiện phân đoạn ADN

- Các số liệu được xử lý trên máy vi tính theo chương trình NTSYSp version 2.1

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Hàm lượng ADN tổng số

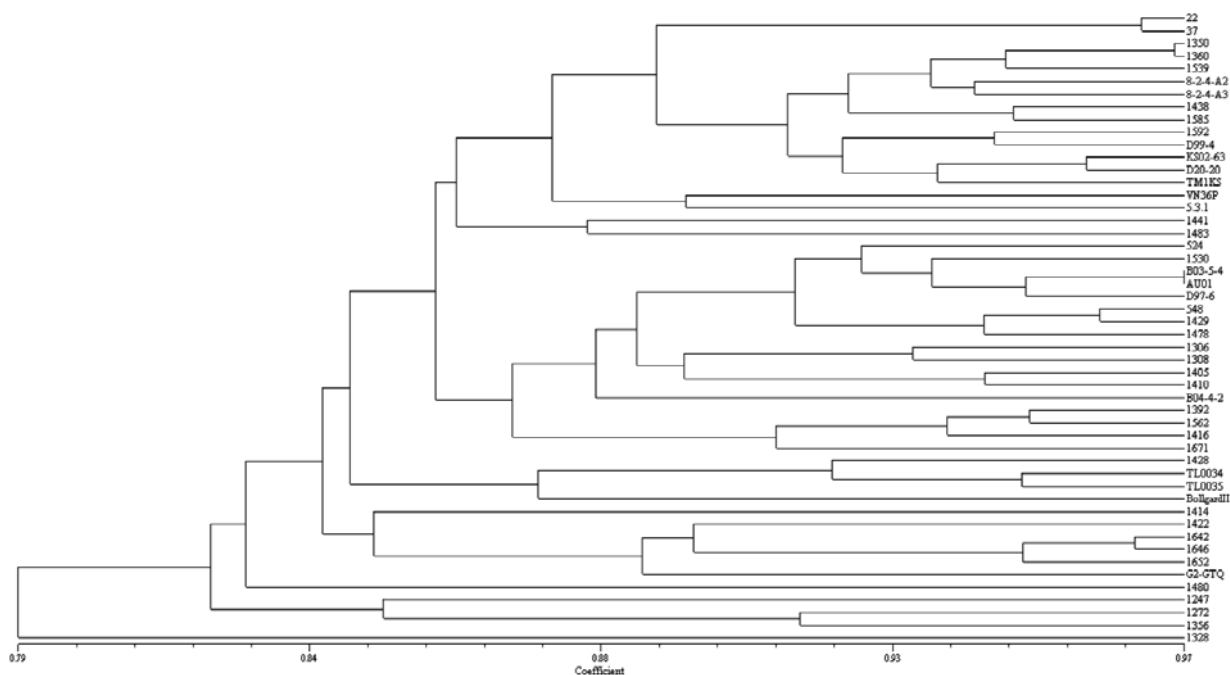
Kết quả điện di ADN tổng số trên agarose 1,0 % thu được hàm lượng ADN khá lớn, sạch không bị đứt gãy, các băng rõ nét và đảm bảo đủ điều kiện để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Sử dụng 20 cặp môi SSR đánh giá đa dạng di truyền của 50 giống bông cho thấy, tất cả các cặp môi đều xuất hiện băng DNA và cho đa hình với kích thước khoảng 250 đến 450 bp. Kết

quả thu được tổng số 72 alen/20 locus với giá trị trung bình là 3,6 alen/locus. Số lượng alen/locus dao động từ 2 đến 7. Trong đó, locus CIR165 được phát hiện có số alen lớn nhất là 7 alen/locus.

3.2. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào hệ số di truyền và cây phát sinh chủng loại

Trên cơ sở đa hình của 50 giống bông nghiên cứu chúng tôi sử dụng hệ số tương đồng Jaccard và phương pháp UPGMA trong NTSYSp 2.1 để nghiên cứu mức độ đa dạng và phân ánh mối tương quan di truyền giữa



Hình 3.3. Sơ đồ phân nhóm di truyền của các giống thí nghiệm

các giống bông. Kết quả cho thấy, tương đồng di truyền của tập đoàn giống bông nghiên cứu khá cao, biến động từ 0,71 đến 0,97 (trung bình 0,84) và phân thành 2 nhóm chính (hình 3.3). Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây của Iqbal và cs (1997); Samina N. Qureshi và cs (2004); M. K. Rana và K. V. Bhat (2005); Jinfa Zhang và cs (2005) khi nghiên cứu đa hình của tập đoàn giống bông Luồi, với mức tương đồng di truyền giữa các giống bông luồi tương ứng 89,1%; 74%; 74% và 80%.

Nhóm chính 1: chỉ có giống 1328 và có sự khác biệt về di truyền với các giống còn lại trong nhóm 2 với khoảng cách từ 18% - 29%.

Nhóm chính 2: bao gồm 49 giống còn lại với sự khác biệt di truyền giữa các giống trong nhóm từ 3% - 18%. Nếu cắt ở tương đồng di truyền 85% có thể chia thành 8 nhóm phụ như sau:

Nhóm phụ 1: có 14 giống bao gồm 22, 37, 1350, 1360, 1539, 8-2-4-A2, 8-2-4-A3, 1438, 1585, 1592, D99-4, KS02-63, D20-20, TM1KS với sự khác biệt di truyền giữa các giống trong nhóm từ 4 - 13%. Những giống này chủ yếu có khối lượng quả lớn và kháng sâu có nguồn gốc từ Trung Quốc và được chọn tạo ở Việt Nam trong những năm gần đây.

Nhóm phụ 2: gồm có 2 giống là VN36P và 5-3-1 với mức tương đồng di truyền là 90%. Đây là 2 giống được lai tạo và chọn lọc trong nước.

Nhóm phụ 3: gồm có 2 giống là 1441 và 1483 với mức tương đồng di

truyền là 82% và hai giống này đều có nguồn gốc từ Thái Lan.

Nhóm phụ 4: gồm có 17 giống là 524, 1530, B03-5-4, AU01, D97-6, 548, 1429, 1478, 1306, 1308, 1405, 1410, B04-4-2, 1392, 1562, 1416 và 1671 với khác biệt di truyền trong nhóm từ 3 đến 15%.

Nhóm phụ 5: gồm có 4 giống là 1428, TL0034, TL0035 và Bollgard II. Những giống này chủ yếu là có tỷ lệ xơ cao và kháng rầy.

Nhóm phụ 6: gồm có 5 giống là 1414, 1422, 1642, 1646 và 1652. Đây là những giống có nguồn gốc từ Pháp và Trung Quốc.

Nhóm phụ 7: chỉ có duy nhất một giống là G2-GTQ.

Nhóm phụ 8: gồm có 3 giống là 1247, 1272 và 1356.

4. KẾT LUẬN

1. Sử dụng 20 cặp mồi SSR đánh giá đa dạng di truyền của 50 giống bông đều xuất hiện bằng DNA và cho đa hình với kích thước khoảng 250 đến 450 bp.

2. Kết quả phân tích SSR thu được tổng số 72 alen/20 locus với giá trị trung bình là 3,6 alen/locus. Số lượng alen/locus dao động từ 2 đến 7. Trong đó, locus CIR165 được phát hiện có số alen lớn nhất là 7 alen/locus.

3. Phân nhóm di truyền dựa vào đa hình ADN đã phân thành 02 nhóm chính và 08 nhóm phụ với hệ số tương đồng di truyền từ 0,71 đến 0,97. Kết quả đã chọn được 60 cặp lai dự kiến có triển vọng để đưa vào so sánh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gerard R. Lazo, Yong-Ha Park and Russell J. Kohel (1994), Identification of RAPD Markers Linkers to Fiber Strength in of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* Interspecific Crosses. *Biochemistry of Cotton Workshop*, September 1994.
2. Hussein, Ebtissam H. A., A. M. Amina, A. M. Soltan and S. S. Adawy (2006), Molecular characterization and genetic relationship among cotton genotypes 1-RAPD, ISSR and SSR analysis. *Arab J. Biotech.*, 9(2):222-229.
3. Hussein, Ebtissam H. A., M. Sh. Al-Said, A. E. Hanaiya and Madkour (2002), Genotyping Egyptain cotton varieties (*G. barbadense*) using molecular marker. *Biotechnology and Sustainable Development Voices of the South and North Conf. Held at the Bibliotheca Alexandrina Conference Centre, March 16-20 (2002), Alexandria, Egypt*
4. Hussein, Ebtissam H. A., Marwa H. A. Osman, Mona H. Hussein and Sami S. Adawy (2007), Molecular characterization of cotton genotypes using PCR-based marker. *Journal of Applied Sciences Research* 3(10):1156-1169.
5. Iqbal, M.J., N. Aziz, N. A. Saeed, Y. Zafar and K. A. Malik (1997), Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet* 94:139-144.
6. Ivan Schuster, Tocio Sediya et al (2006), Characterization and genetic diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites. *Genetic and molecular biology* 29, 2:321-329.
7. Jinfa Zhang, Y. Lu, R. G. Cantrell and E. Hughs (2005), Molecular marker diversity and field performance in commercial cotton cultivars evaluated in the Southwestern USA. *Crop Sci* 45:1483-1490.
8. Muhanad Walid Akash et al (2003), Quantitative trait loci mapping for agronomic and fiber quantity traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using molecular marker. *Louisiana State University, USA*.
9. Samina N. Qureshi, Sukumar Saha, Ramesh V. Kantety and J. N. Jenkins (2004), Molecular biology and physiology - EST-SSR: A new class of genetic marker in cotton. *The Journal of cotton science* 8:112-113, <http://journal.cotton.org>, © The cotton foundation 2004.

PHÊ DUYỆT DANH MỤC CÁC DỰ ÁN THUỘC CHƯƠNG TRÌNH HỖ TRỢ PHÁT TRIỂN TÀI SẢN TRÍ TUỆ

Ngày 23/3/2012, Bộ Khoa học và Công nghệ đã ra Quyết định số 474/QĐ-BKHCN về việc Phê duyệt Danh mục các dự án thuộc Chương trình hỗ trợ phát triển tài sản trí tuệ để tuyển chọn cho thực hiện trong 2 năm 2012-2013.

Danh mục các dự án được chia thành 2 loại. Dự án do Trung ương quản lý, bao gồm: Áp dụng sáng chế/giải pháp hữu ích; Xây dựng, quản lý và phát triển chỉ dẫn địa lý; Ứng dụng kết quả nghiên cứu khoa học phục vụ việc quản lý và nâng cao chất lượng sản phẩm được bảo hộ sở hữu trí tuệ; Xây dựng, vận hành "Tổ chức quản lý và hoạt động sở hữu trí tuệ"; Và một số dự án khác. Loại thứ hai là Dự án do trung ương ủy quyền cho địa phương quản lý, bao gồm: Tạo lập, quản lý và phát triển nhãn hiệu chứng nhận; Xây dựng, quản lý và phát triển nhãn hiệu tập thể; Dự án tuyên truyền, phổ biến kiến thức về sở hữu trí tuệ trên đài truyền hình địa phương của 24 tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương sau đây: An Giang, Bình Định, Cà Mau, Cao Bằng, Điện Biên, Hoà Bình, Hưng Yên, Hải Dương, Lào Cai, Lạng Sơn, Nam Định, Nghệ An, Phú Yên, Quảng Bình, Quảng Nam, Quảng Ngãi, Quảng Ninh, Quảng Trị, Tây Ninh, Thái Nguyên, Thanh Hóa, Thừa Thiên - Huế, Tuyên Quang và Trà Vinh.

HN