

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 2001-2004

ĐỀ TÀI NHÁNH

XÁC ĐỊNH CHỈ THỊ PHÂN TỬ CHO ĐẬU ĐỎ

Thuộc đề tài KC.04.08

Chủ nhiệm đề tài nhánh: **TS. Trần Thị Phương Liên**

Cơ quan thực hiện: **Viện Công nghệ Sinh học,**

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Hà Nội 2004

BÁO CÁO TỔNG KẾT 2001-2004

ĐỀ TÀI NHÁNH: “XÁC ĐỊNH CHỈ THỊ PHÂN TỬ CHO ĐẬU ĐỎ”

Tên đề tài :”**Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống cây trồng “**

Mã số : **KC 04-08.**

Chủ nhiệm : **PSG.TSKH. Lê Thị Muội**

Cơ quan thực hiện: Viện Công nghệ Sinh học,
Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Tên đề tài nhánh : **Xác định chỉ thị phân tử cho đậu đỏ**

Chủ nhiệm đề tài nhánh: **TS. Trần Thị Phương Liên**

Cơ quan thực hiện : Viện Công nghệ Sinh học,
Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2. Cán bộ tham gia:

- TS Nông Văn Hải - Viện Công nghệ Sinh học
- TS Trần Thị Phương Liên- Viện Công nghệ Sinh học
- ThS Huỳnh Thị Thu Huệ – Viện Công nghệ Sinh học
- CN Lương Thị Thu Hường- Viện Công nghệ Sinh học và ctv.

3. Thời gian thực hiện:

Từ 11-2001 đến 2004

1. MỤC ĐÍCH :

Thiết lập các chỉ thị phân tử hữu hiệu để chọn tạo các dòng đậu đỗ có năng suất cao, phẩm chất tốt, chống chịu sâu bệnh và điều kiện bất lợi.

2. NỘI DUNG ĐĂNG KÝ NGHIÊN CỨU:

- Khai thác các chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt, chịu hạn từ các ngân hàng gen quốc tế như EMBL/Genbank/DDBJ.
- Thiết kế các môi ngẫu nhiên RAPD và SSR để tìm kiếm các dòng giống kháng bệnh trong tập đoàn đậu tương Việt Nam.
- Đánh giá tuyển chọn các tổ hợp lai theo định hướng tính kháng bệnh và chịu hạn. Đánh giá sớm tính chịu hạn và kháng bệnh ở các thế hệ F₂, F₃ bằng chỉ thị phân tử.

3. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Đậu tương là cây trồng truyền thống lâu đời ở nước ta. Do nhu cầu sử dụng đậu tương cũng như các sản phẩm của chúng ngày càng tăng nên việc chọn giống và sản xuất đậu tương trên thế giới cũng như ở nước ta đã được thúc đẩy mạnh mẽ (Ngô Thế Dân *et al.*, 2000). Thành tựu gần đây nhất là việc thiết lập được bản đồ liên kết gen ở đậu tương trên cơ sở kết hợp các tính trạng hình thái sinh lý truyền thống và đặc biệt là các chỉ thị phân tử (RFLP-Restriction fragment length polymorphism, RAPD- Random amplified polymorphism DNA, AFLP- Amplified fragment length polymorphism, SSR- simple sequence repeat...) (Cregan *et al.*, 1999). Nhiều QTL (quantitative trait loci - locus tính trạng số lượng) đã được nghiên cứu dựa trên bản đồ này. Một trong những chỉ thị phân tử thành công nhất ở đậu tương là chỉ thị SSR (simple sequence repeats – trình tự lặp lại đơn giản). SSR là đoạn DNA ở genome hoặc lục lạp, mà trong đó, trình tự từ 1-6 bp lặp lại với tần số từ 10-60 lần và tần số này được di truyền theo Mendel như tính trạng đồng trội. Nhờ có các trình tự bảo thủ giới hạn ở hai đầu của đoạn trình tự lặp lại này mà chúng được nhân lên bằng PCR và xác định trên điện di các allele SSR. Ngày nay, các nhà khoa học đã phát hiện được trên 600 chỉ thị SSR trong 20 nhóm liên kết ở đậu tương. Chỉ thị SSR cho độ đa hình rất cao ở đậu tương nên được sử dụng để nghiên cứu đa dạng sinh học, sự liên kết các tính trạng số lượng như chịu hạn, phẩm chất hạt,... nhằm mục đích chọn giống cây trồng.

Nghiên cứu chọn tạo giống được tiến hành nhiều năm nay. Tuy nhiên vấn đề chọn tạo bộ giống đậu tương phù hợp với các vùng sinh thái nước ta là rất cấp bách. Nhất là khi nước ta không chỉ có nhiều vùng địa hình khí hậu khác nhau mà còn hay xảy ra bão lụt, gió mùa, nóng, hạn kéo dài. Việc chọn giống dựa trên các chỉ tiêu sinh lý nông học thường đòi hỏi thời gian gần 10 năm mà các giống vẫn không biết được tường tận về bản chất di truyền.

Vì vậy, xuất phát từ yêu cầu thực tế, chúng tôi kết hợp với Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm đậu đỗ, tiến hành một nhánh trong đề tài KC04.08: “Xác định

chỉ thị phân tử cho đậu đỗ” với mục đích chọn lọc và thiết lập được các chỉ thị phân tử cho các tính trạng cần thiết như chịu hạn... để tạo giống đậu tương có năng suất cao, phẩm chất tốt chống chịu sâu bệnh ... thích hợp với vùng địa hình khí hậu khác nhau ở nước ta.

4. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP:

Nguyên liệu:

Nguyên liệu bao gồm các giống đậu tương và các tổ hợp lai do Trung tâm Nghiên cứu và Thực nghiệm đậu đỗ (TTNC và TN Đậu đỗ) cung cấp theo tiến độ cùng thực hiện đề tài KC04-08. (Đề tài nhánh của đề tài KC04.08 do TS Trần Thị Trường chủ nhiệm)

Đó là bảy giống đậu tương : Cúc Vàng, ĐT12, ĐT80, ĐT2000, VX91, V74, CM60 được chọn làm nguyên liệu khởi đầu để tạo giống chịu hạn, kháng bệnh gỉ sắt đồng thời có năng suất cao. Trong đó, các giống vụ hè: giống địa phương Cúc Vàng (còn gọi là Cúc Lục Ngạn, Cúc Hà Bắc); ĐT80 (giống lai giữa Vàng Mộc Châu và V70) ; ĐT12 (còn gọi là TN12- giống nhập nội từ Trung Quốc, chống chịu sâu bệnh khá). Giống kháng bệnh gỉ sắt: ĐT2000 (giống nhập nội từ AVRDC) và VX91. Giống năng suất cao: CM60 và ĐT2000. Giống miễn cảm với bệnh gỉ sắt: V74.

Bảy giống trong các tổ hợp lai của ba giống bố mẹ là Cúc Vàng, M103, V74 được chọn để nghiên cứu bản chất di truyền ở các giống lai đã được thuần hóa và khu vực hóa chúng tôi nghiên cứu bằng chỉ thị phân tử SSR. Đó là các giống đậu tương M103, V74, MV1, MV4, MV1-C; Cúc Vàng, ĐT93. Trong đó, tổ hợp lai M103♀ X V74♂ và 2 giống lai MV1, MV4; tổ hợp MV1 X Cúc Vàng và giống lai MV1-C; giống ĐT93 là giống lai giữa giống 821 có hệ gen Cúc Vàng và giống 134 của Nhật Bản.

Tổ hợp lai ĐT2000 X Cúc Vàng: giống mẹ là giống ĐT2000 có năng suất cao, kháng bệnh gỉ sắt, nhập nội từ Trung tâm Rau Mầm Châu Á -AVRDC (Đài

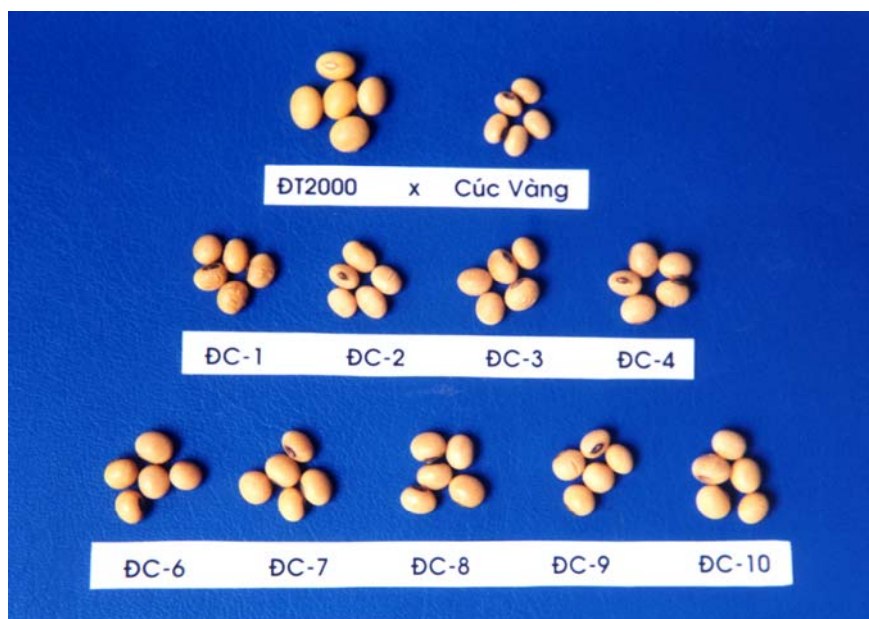
Loan); giống bố là giống địa phương Cúc Vàng (còn gọi là Cúc Lục Ngạn, Cúc Hà Bắc) thích hợp với vụ Hè và 10 dòng lai F3 của chúng: ĐC1(ĐC21.2- Ký hiệu dòng lai tại TTNC&TN Đậu đỗ); ĐC2 (ĐC42.1); ĐC3 (ĐC43.4); ĐC4 (ĐC51.4); ĐC5 (ĐC72.1); ĐC6 (ĐC72.2); ĐC7 (ĐC79.2); ĐC8 (ĐC90.1); ĐC9 (ĐC92.2); ĐC10 (ĐC98.1)



Hình 1: Bảy giống đậu tương làm nguyên liệu khởi đầu

Tổ hợp lai ĐT2000 và ĐT12 (TN12): giống mẹ là ĐT2000, giống bố là ĐT12 và 10 dòng lai F3: ĐT1 (ĐT147.3- Ký hiệu dòng lai tại TTNC&TN Đậu đỗ); ĐT2 (199.1); ĐT3 (203.1); ĐT4 (213.4); ĐT5 (213.5); ĐT6 (283.1); ĐT7 (320.2); ĐT8 (328.1); ĐT9 (340.1); ĐT10 (ĐT356.1).

Các giống đậu tương có khả năng kháng bệnh gỉ sắt khác nhau: G1,G2,G3 là các giống mẫn cảm với bệnh gỉ sắt; G4,G7 - kháng bệnh ở mức trung bình; G8,G9,G10 - kháng bệnh gỉ sắt tốt. Trong đó, G1- V74(tên giống tại TTNC&TN Đậu đỗ); G2- ĐH4; G3- AGS332; G4- ĐT2000; G7-GC 104.28; G8- GC58; G9- GC8586; G10-8600.49.



Hình 2: Tổ hợp lai DT2000- Cúc Vàng



Hình 3: Các giống đậu tương với tính kháng bệnh gỉ sắt khác nhau

Phương pháp:

Tách chiết DNA tổng số từ lá non của các giống đậu tương theo phương pháp CTAB (Keim *et al.*, 1988) với một số cải tiến nhỏ cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Phương pháp PCR sử dụng các cặp môi SSR được tiến hành trong thể tích 25µl. Phản ứng bao gồm: 20ng DNA; 10pmole môi tổng số; 1,6mM MgCl₂; 250µM dNTP; 10mM Tris-HCl pH 8,8; 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1 đơn vị Taq DNA polymerase. Chu trình nhiệt của phản ứng: 95°C: 8 phút, 35 chu kỳ gồm ba bước 95°C: 45 giây, 50°C (tới 50°C - 55°C phụ thuộc vào các SSR khác nhau): 45 giây, 72°C: 60 giây; sau đó 72°C: 8 phút và kết thúc ở 4°C trên máy PCT-100™ (MJ Research, Inc.)

Kết quả PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% và độ đa dạng được theo dõi trên gel agarose từ 2,4-3%, và 12% polyacrylamide nhuộm bằng ethidium bromide và phát hiện bằng DNA trên đèn UV.

Các enzyme và hoá chất chuyên dụng được mua từ các hãng Fermentas, Sigma, Merk. Các cặp môi SSR được đặt tổng hợp tại hãng Invitrogen.

Số liệu được xử lý bằng chương trình NTSYS 2.0 và phân tích bằng cách tính hệ số đa dạng di truyền – genetic diversity index (Nei, 1987) cho mỗi chỉ thị phân tử:

$$H=1- \sum P_i^2 \text{ (} P_i \text{ là tần xuất gặp allele thứ } i \text{ của mỗi chỉ thị phân tử)}$$

5. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU:

5.1. Nghiên cứu chọn một số môi RAPD và các cặp môi SSR:

Đậu tương là cây trồng được tập trung nghiên cứu có hệ thống tại Mỹ. Gần đây đậu tương còn được chú trọng nghiên cứu tại Trung Quốc, Australia, Thái Lan... Dự án nghiên cứu đậu tương lớn nhất tại Bộ nông nghiệp Mỹ đã đầu tư thu thập tập đoàn giống đậu tương khắp thế giới làm nguyên liệu chọn tạo và giữ nguồn gen quý của đậu tương. Tại đây cũng tiến hành xác định, định vị sự liên kết các tính trạng với các tính trạng số lượng liên quan đến phẩm chất và năng suất hạt, khả năng chống chịu với các điều kiện ngoại cảnh bất lợi như: hạn, nóng...

- Nghiên cứu chọn một số cặp môi RAPD:

Một số nghiên cứu trên đậu tương cho thấy sử dụng một số môi RAPD có thể phát hiện được sự đa dạng giữa các giống đậu tương khi bị tác động của môi trường (Shatter et al, 1995). Trên cơ sở đó chúng tôi chọn 10 môi 10 nucleotide và 2 cặp môi 20 nucleotide. Nghiên cứu với 10 cặp môi RAPD cho thấy khả năng sử dụng không cao, khả năng lặp lại yếu, lượng mẫu hạt của các dòng lai lại thường rất ít không đủ cho những thí nghiệm này.

- Nghiên cứu chọn một số cặp môi SSR:

Việc quan trọng đầu tiên là tìm được các cặp môi SSR thích hợp trong số trên 600 chỉ thị SSR để nghiên cứu sự đa dạng của những giống đậu tương sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu với mục đích chọn dòng chịu hạn và chọn dòng kháng bệnh gỉ sắt.

Tính chịu hạn là tính trạng được nghiên cứu rất sâu để chọn giống đậu tương có khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường. Đây là tính trạng do nhiều gen quyết định theo các hướng như tránh hạn, tránh mất nước và chịu mất nước. Specht và cộng sự (2001) đã phân tích QTL của tính chịu hạn ở đậu tương trên cơ sở thí nghiệm về chế độ tưới nước khác nhau, kiểm tra sự chuyển hoá carbon và cuối cùng là đánh giá năng suất, khối lượng và phẩm chất hạt khi sử

dụng 665 chỉ thị phân tử (RFLP, SSR) nghiên cứu tổ hợp lai gồm có 265 dòng lai trên 20 nhóm liên kết. Các tác giả đã tìm thấy các chỉ thị phân tử SSR và RFLP có QTL biểu thị rõ nhất đối với tính chịu hạn ở các nhóm liên kết: C2, L, M. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã chọn ra 5 cặp mỗi SSR trong vùng mạnh nhất của các nhóm liên kết kể trên đối với tính chịu hạn, trình tự của chúng được liệt kê trên bảng 1. Kích thước allele được tính là kích thước đoạn SSR của giống đậu tương Williams (Mỹ). Ký hiệu Satt dùng để chỉ SSR có đoạn nucleotit lặp lại là (ATT)_n.

Bảng 1: Chỉ thị SSR liên quan đến tính chịu hạn

Stt	SSR	Trình tự mỗi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Kích thước allele
1	Satt557	F- GCGGGATCCACCATGTAATATGTG R- GCGCACTAACCCTTTATTGAA	C2	207 bp
2	Satt 489	F- CGTGTGCTTGCTTCTCTTAGACTGACT R-GCGTACTACTTACCCTGTTTGTCTAAAA	C2	261 bp
3	Satt373	F- TCCGCAGATAATTCGTAAAAT R-GGCCAGATACCCAAGTTGTACTTGT	L	248 bp
4	Satt567	F-GGCTAACCCGCTCTATGT R- GGGCCATGCACCTGCTACT	M	113 bp
5	Satt150	F-AAGCTTGAGGTTATTCGAAAATGAC R-TGCCATCAGGTTGTGTAAGTGT	M	201 bp

Vì chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh gỉ sắt chưa được nghiên cứu nên chúng tôi tìm hiểu các chỉ thị phân tử liên quan đến tính đa dạng để kết hợp bổ sung chọn nguyên liệu khởi đầu cho hướng này. SSR sử dụng để nghiên cứu đa dạng sinh học ở các tập đoàn đậu tương tại Mỹ, Nhật Bản, Trung Quốc...: Narvel và cộng sự (2000) phát hiện thấy 397 allele khi nghiên cứu 79 giống đậu tương ở

Mỹ trên 74 locus SSR. Như vậy, mỗi locus SSR có từ 2 đến 11 allele khác nhau. Trong khi đó, sử dụng chỉ thị phân tử khác hoặc chỉ thị isozyme cho sự đa dạng ít hơn hẳn (ví dụ: RFLP chỉ cho 2 allele cho mỗi locus). Abe và cộng sự (2003), đã chỉ ra sự đa dạng khi nghiên cứu 131 giống từ 14 nước châu Á bằng 20 chỉ thị SSR. Trung bình mỗi locus SSR cho 11,9 allele với hệ số đa dạng gen là 0,772 và cho thấy rằng các tập đoàn giống đậu tương Trung Quốc và Nhật Bản có nguồn gốc khác nhau.

Dựa vào những phân tích trên, 7 cặp môi SSR cho tính đa dạng trên các nhóm liên kết và có trình tự trên bảng 2 đã được chọn để thiết kế.

Bảng 2: Chỉ thị SSR liên quan đến tính đa dạng

Stt	SSR	Trình tự môi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Kích thước allele
1	Satt 042	F- GACTTAATTGCTTGCTAT R- GTGGTGCACACTCACTT	A1	172 bp
2	Satt 005	F- TATCCTAGAGAAGAATAAAAAA R- GTCGATTAGGCTTGAAATA	D1b	141 bp
3	Satt146	F-AAGGGATCCCTCAACTGACTG R-GTGGTGGTGGTGAAAACCTATTAGAA	F	287 bp
4	Satt175	F-GACCTCGCTCTCTGTTTCTCA R- GGTGACCACCCCTATTCCTTAT	M	163 bp
5	Satt173	F-TGCGCCATTTATTCTTCA R-AAGCGAAATCACCTCCTCT	O	198 bp
6	Satt009	F- CCA ACT TGA AAT TAC TAG AGA AA R- CTT ACT AGC GTA TTA ACC CTT	N	158 bp (Att) ₁₄
7	Satt 431	F- GCG TGG CAC CCT TGA TAA ATA A R- GCG CAC GAA AGT TTT TCT GTA A	J	230 bp (Att) ₂₁

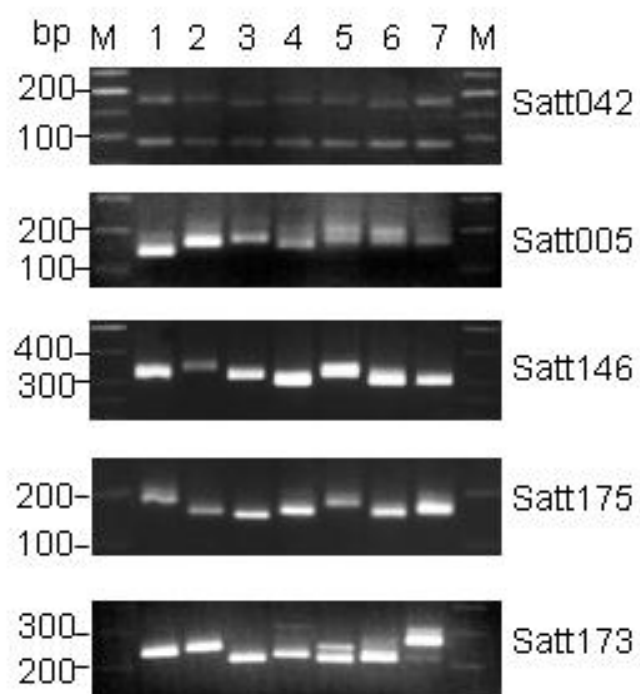
Đây là những chỉ thị SSR có hệ số đa dạng di truyền cao. Như vậy, việc phát hiện ra khả năng di truyền các tính trạng liên kết cùng các chỉ thị này dễ dàng hơn.

- **Sự đa dạng di truyền của nguyên liệu khởi đầu:**

Bảy giống đậu tương : Cúc Vàng, ĐT12, ĐT80, ĐT2000, VX91, V74, CM60 được chọn làm nguyên liệu khởi đầu để tạo giống chịu hạn, kháng bệnh rỉ sắt đồng thời có năng suất cao. Trong đó, các giống vụ hè: giống địa phương Cúc Vàng (còn gọi là Cúc Lục Ngạn, Cúc Hà Bắc); ĐT80 (giống lai giữa Vàng Mộc Châu và V70); ĐT12 (còn gọi là TN12- giống nhập nội từ Trung Quốc, chống chịu sâu bệnh khá). Giống kháng bệnh rỉ sắt: ĐT2000 (giống nhập nội từ AVDC) và VX91. Giống năng suất cao: CM60 và ĐT2000. Giống miễn cảm với bệnh rỉ sắt: V74.

Đã phát hiện được 38 allele trong số các kiểu gen được nghiên cứu. Tất cả các cặp môi đều cho sự đa hình giữa các giống đậu tương kể trên. Như vậy, trung bình 3,7 allele cho mỗi locus và hệ số đa dạng di truyền trung bình là 0,6326. Phần mềm NTSYS 2.0 được sử dụng để nghiên cứu khoảng cách di truyền giữa các giống. Kết quả cho thấy bảy giống đậu tương trên chia thành 3 nhóm: Cúc Vàng tách riêng một nhóm, hai giống đậu tương ĐT12 và VX91 cũng tách thành nhóm riêng so với 4 giống còn lại- ĐT2000, V74, ĐT80, CM60. Như vậy, với mục đích chọn giống để lai với giống đậu tương ĐT2000 (giống có năng suất cao, có khả năng kháng bệnh rỉ sắt) theo hướng chịu nóng, hạn cho vụ hè, chúng tôi nhận thấy hai giống đậu tương vụ hè – Cúc Vàng và ĐT12 - có khoảng cách di truyền xa ĐT2000 so với các giống khác và có thể chọn để lai tạo giống như mong muốn (hình 1, hình 2).

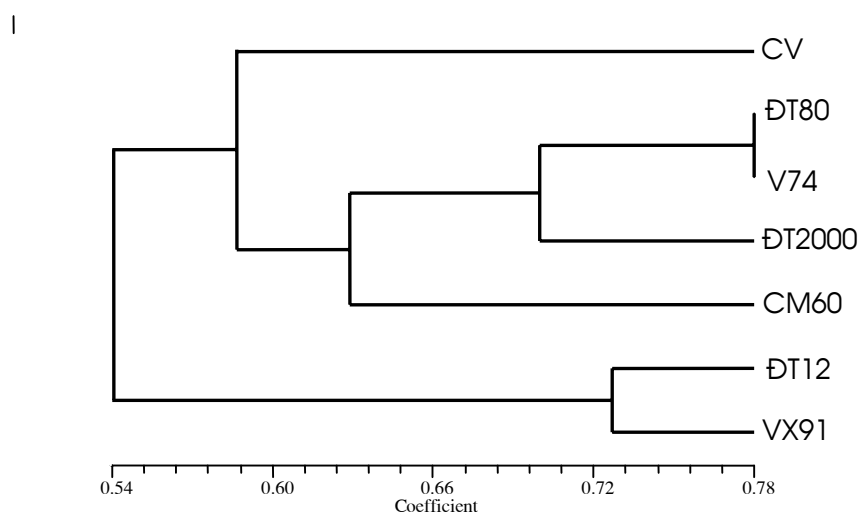
Như vậy, có thể chọn 2 cặp lai là ĐT2000 X Cúc vàng và ĐT2000 X ĐT12 (hay còn ký hiệu là TN12).



Hình 4: Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng các cặp mồi SSR liên quan đến tính đa dạng của các giống đậu tương: 1- Cúc Vàng; 2- ĐT80; 3- ĐT12; 4- V74; 5- VX91; 6- ĐT2000; 7- CM60

Bảng 3: Kết quả phân tích sự đa dạng sử dụng các SSR

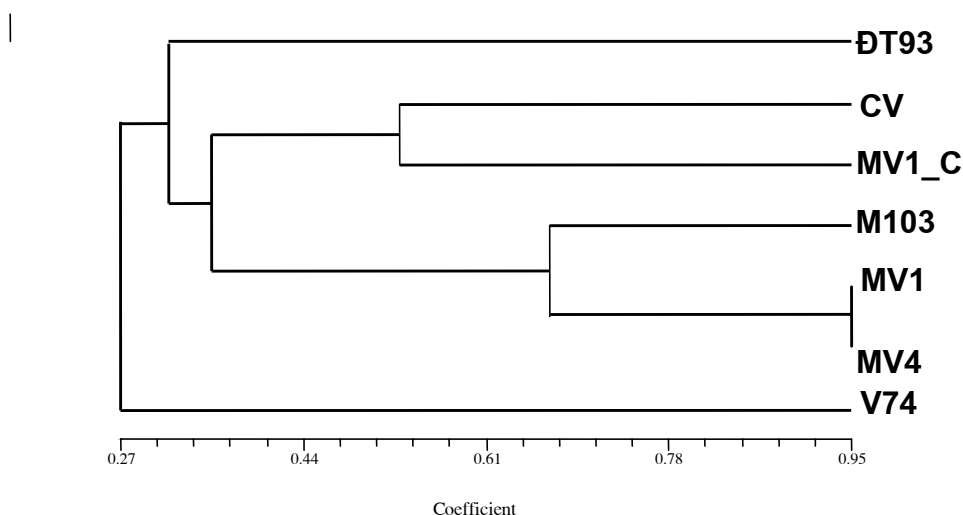
Stt	SSR	Dạng SSR	Số allele	Hệ số đa dạng (H)
1	Satt 042	(Att) ₂₇	3	0,6531
2	Satt 005	(Att) ₁₉	3	0,5715
3	Satt146	(Att) ₁₇	4	0,6939
4	Satt175	(Att) ₁₆	5	0,7347
5	Satt173	(Att) ₁₈	4	0,7348
6	Satt 557	(Att) ₁₇ GAT	2	0,4897
7	Satt 489	(Att) ₂₃ GTT	4	0,6938
8	Satt373	(Att) ₂₁	5	0,7756
9	Satt567	(Att) ₁₃	2	0,245
10	Satt150	(Att) ₂₀	5	0,7347



Hình 5: Sự đa dạng của các giống đậu tương được chọn làm nguyên liệu khởi đầu.

- Nghiên cứu các giống lai đã được thuần hóa và khu vực hóa: Qua phân tích thăm dò ba giống bố mẹ là Cúc vàng, M103, V74 bằng SSR cho thấy chúng có sự đa dạng, vì vậy chúng tôi đã nghiên cứu 7 giống trong các tổ hợp lai của chúng: M103, V74, MV1, MV4, MV1-C; Cúc Vàng, ĐT93. Trong đó, tổ hợp lai M103♀X V74♂ và 2 giống lai MV1, MV4; tổ hợp MV1 X Cúc Vàng và giống lai MV1-C; giống ĐT93 là giống lai giữa giống 821 có hệ gen Cúc vàng và giống 134 của Nhật Bản. Việc nghiên cứu bản chất di truyền và sự ổn định các tính trạng quý được di truyền từ bố mẹ ở các giống lai sau nhiều năm thuần hóa và khu vực hóa là điều rất cần thiết.

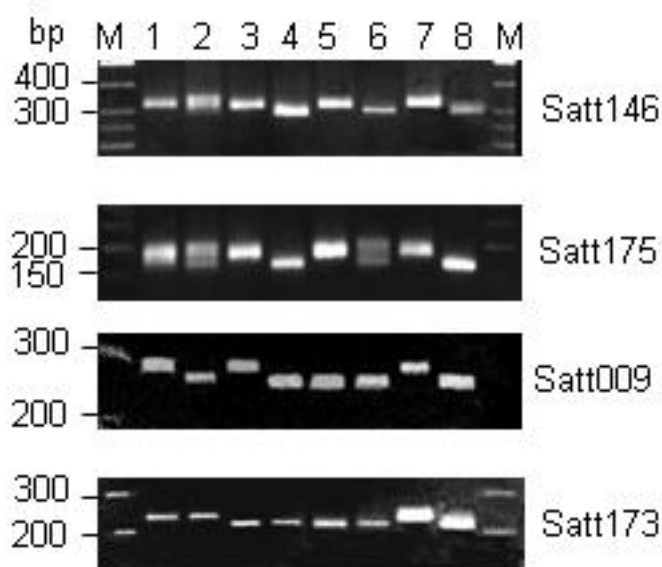
Kết quả cho thấy trong 12 cặp môi SSR, có 9 cặp còn lại cho đa hình rõ rệt. Phát hiện tổng số 25 allele trên 9 cặp môi này (trung bình là 2,7 allele/locus). ĐT93 mang nhiều ưu điểm của Cúc Vàng, MV1 và MV4 mang đặc điểm của M103- giống đột biến chịu nóng, hạt to, năng suất cao. MV1-C trung gian, có đồng thời đặc điểm của bố và mẹ. Đây là giống có thể sử dụng gieo trồng tất cả các vụ trong năm (hình3).



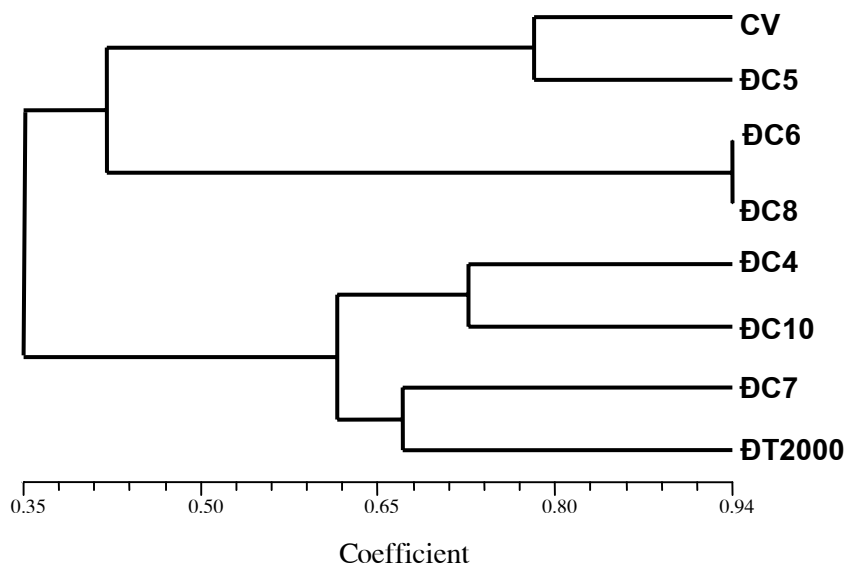
Hình 3: Sơ đồ hình cây về độ tương đồng di truyền giữa các giống đậu tương

- Sự phân ly các chỉ thị SSR trong các tổ hợp lai ĐT2000 X Cúc Vàng và tổ hợp ĐT2000 X ĐT12:

Khảo sát các dòng F3 trong tổ hợp lai ĐT2000 X Cúc Vàng bằng 12 cặp môi SSR cho thấy chín cặp môi cho sự đa dạng giữa các dòng F3, các dòng đều mang tính trạng của bố và mẹ ở các mức độ khác nhau. Các dòng lai mang các chỉ thị di truyền của Cúc Vàng và ĐT2000 có thể chia thành hai nhóm: Cúc Vàng và các dòng lai ĐC5, ĐC6, ĐC8 thuộc nhóm 1; ĐT2000 và các dòng lai ĐC4, ĐC7, ĐC10 thuộc nhóm 2. Khảo sát một số locus SSR liên quan đến QTL (quantitative trait loci - locus tính trạng số lượng) về tính chịu hạn cho thấy các dòng lai ĐC4, ĐC7, ĐC10 mang các allele SSR này của ĐT2000. Nghiên cứu các SSR liên quan đến tính đa dạng còn cho thấy các dòng ĐC4, ĐC5, ĐC7, ĐC10 mang tính di truyền của cả Cúc Vàng. Như vậy, các dòng ĐC4, ĐC5, ĐC7, ĐC10 có thể được chọn để theo dõi tiếp về sự ổn định di truyền trong các thế hệ sau (hình 6, hình 7).



Hình 4: Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng các cặp môi SSR của các giống đậu tương. Cúc Vàng(1), ĐT2000(8), và các dòng lai F3: 2- ĐC4; 3-ĐC5; 4-ĐC6; 5-ĐC7; 6-ĐC8; 7-ĐC10.

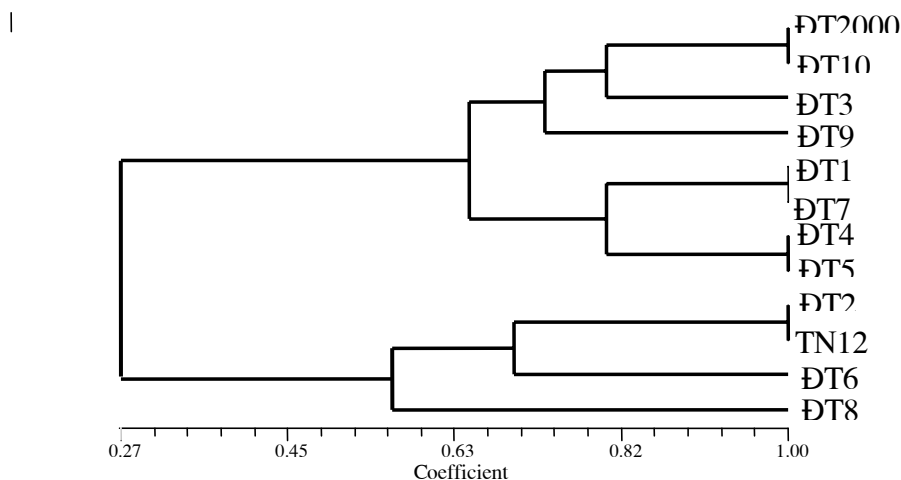


Hình 5: Khoảng cách di truyền của các dòng đậu tương F3 so với bố mẹ.

Trong tổ hợp lai ĐT2000- ĐT12, các dòng đều mang tính di truyền của cả giống bố mẹ. Kết quả phân tích bằng chương trình NTSYS cho thấy chúng chia thành 2 nhóm: nhóm 1 gồm có ĐT12 và các dòng lai ĐT2, ĐT6 và ĐT8; nhóm 2 gồm có ĐT2000 và các dòng còn lại: ĐT1, ĐT3, ĐT4, ĐT5, ĐT7, ĐT9, ĐT10. Trong nhóm 2, ĐT10 có tính di truyền gần với ĐT2000 nhất, sau đó đến ĐT3, ĐT9; còn bốn dòng ĐT1,4,5,7 tách thành nhóm riêng, có khoảng cách xa hơn. Các dòng ĐT1, ĐT4, ĐT5, ĐT7 đều cần lưu ý để nghiên cứu tiếp.

- **Nghiên cứu đa dạng di truyền giữa một số giống đậu tương có khả năng kháng bệnh gỉ sắt khác nhau:** G1,G2,G3 là các giống mẫn cảm với bệnh gỉ sắt; G4,G7 – kháng bệnh ở mức trung bình; G8,G9,G10 – kháng bệnh gỉ sắt tốt. Sử dụng 12 chỉ thị SSR để khảo sát sự khác nhau giữa các giống này đã cho kết quả bước đầu: tám giống nghiên cứu có thể chia thành 2 nhóm: nhóm 1: gồm các giống đậu tương G1, G2, G3; nhóm 2: G4, G7, G8, G9, G10 và Đt2000. Trong nhóm 2 lại có thể chia thành 2 nhóm: G8,G9 tách riêng so với 4 giống đậu tương còn lại. Gen kháng bệnh gỉ sắt ở đậu tương chưa được nghiên cứu kỹ, chưa định vị trên

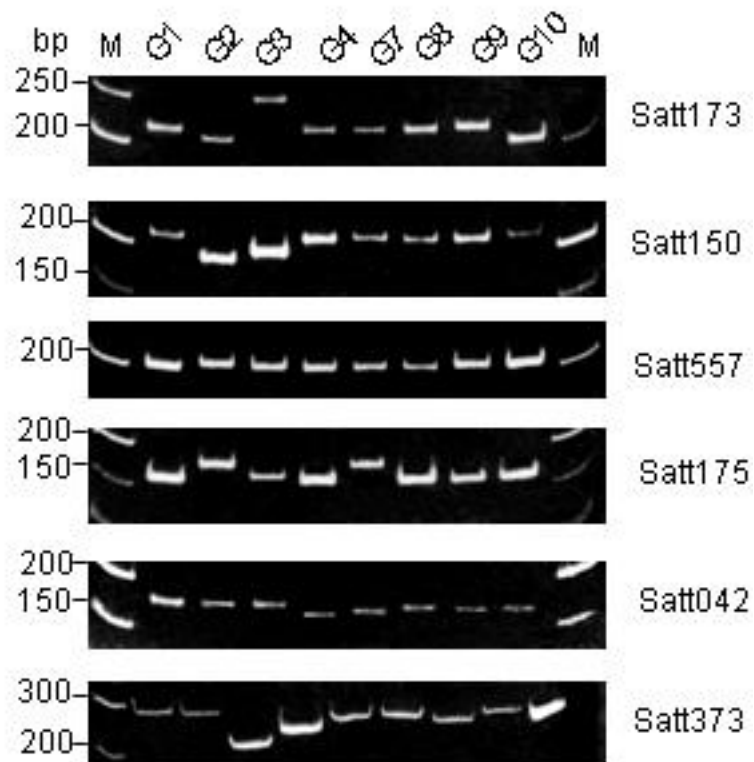
genom, vì vậy những kết quả này bước đầu góp phần tìm kiếm các chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng này (hình 6, hình 7)



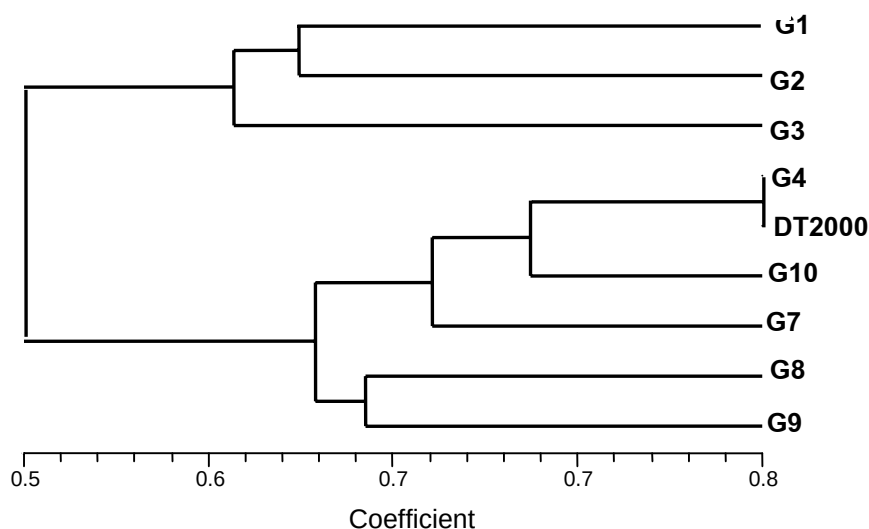
Hình 5: Khoảng cách di truyền của các dòng đậu tương F3 so với bố mẹ.

KẾT LUẬN:

- Chọn được các chỉ thị phân tử SSR để nghiên cứu tính đa dạng và liên quan đến tính chịu hạn: Satt005, Satt042, Satt146, Satt175, Satt173, Satt 009; Satt431, Satt150; Satt373; Satt489, Satt557, Satt567.
- Các chỉ thị phân tử: Satt489, Satt373, Satt150 có thể sử dụng để chọn dòng có khả năng chịu hạn.
- Các chỉ thị Satt042, Satt173 có thể có liên quan đến gen kháng bệnh gỉ sắt và có thể chọn để nghiên cứu định vị gen này trong bộ gen.
- Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của 7 nguyên liệu khởi đầu đã tìm ra các giống có khoảng cách di truyền xa hơn các giống khác để sử dụng trong lai tạo: tổ hợp DT2000 và Cúc vàng; tổ hợp DT2000 và DT12.
- Nghiên cứu sự phân ly và di truyền các chỉ thị SSR trong tổ hợp lai DT2000 và Cúc Vàng có thể dự đoán các dòng ĐC4, ĐC5, ĐC7 ĐC10 có triển vọng để nghiên cứu theo dõi tiếp; còn tổ hợp lai DT2000 và DT12 có thể lưu ý đến các dòng DT1, DT4, DT5, DT7.



Hình6: Phổ điện di SSR của các giống đậu tương với khả năng kháng bệnh gỉ sắt khác nhau.



Hình 7: Đa dạng di truyền một số giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt.

Ý NGHĨA KHOA HỌC, THỰC TIỄN VÀ TRIỂN VỌNG:

SSR là chỉ thị phân tử được nghiên cứu sử dụng rất hiệu quả ở đậu tương. 12 chỉ thị phân tử SSR trên tám nhóm liên kết gen trong số 600 chỉ thị phân tử SSR của đậu tương là một con số rất khiêm tốn, nhưng nó cho phép chúng tôi đánh giá sơ bộ mức độ đa dạng di truyền của các giống đậu tương với những mục đích nghiên cứu khác nhau như sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu cho lai tạo, nghiên cứu bệnh gỉ sắt..., đánh giá sự phân ly các SSR trong các thế hệ tiếp theo. Trên cơ sở đó cho phép dự đoán khả năng chọn giống lai tạo, chọn dòng lai có triển vọng để theo dõi tiếp trong các thế hệ sau để tạo giống ổn định về di truyền.

5. ĐÀO TẠO: đã tham gia đào tạo 01 cử nhân năm 2003 :

Đề tài khoá luận: Nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử SSR để chọn dòng chịu nóng, chịu hạn ở đậu tương.

6. CÁC BÀI BÁO ĐÃ ĐĂNG:

Trần Thị Phương Liên, Lê Thị Muội, 2003, “Nghiên cứu sự đa dạng di truyền một số giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử SSR” . Tạp Chí Công nghệ sinh học, 1(3): 347-354.

- Các bài báo đang gửi đăng:

Trần Thị Phương Liên, Lương Thị Thu Hương, Trần Thị Trường, Lê Thị Muội, 2004, “Sự phân ly các chỉ thị SSR trong thế hệ F3 của tổ hợp lai giữa hai giống đậu tương Cúc Vàng và ĐT2000”, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2(1):1-8.

7. Kinh phí:

Tổng số 3 năm: 60 triệu đồng

Đã thanh quyết toán đầy đủ.

Hà Nội, ngày 1 tháng 9 năm 2004

Chủ nhiệm đề tài nhánh

TS Trần Thị Phương Liên

	Trình tự		Trình tự
P1	ccgacagctt	P6	caatcgccgt
P2	ggcggactgt	P7	cagcacccac

P3	gcaccacca	P8	ggactggagt
P4	catcggccct	P9	ggtgacgcag
P5	tggccactga	P10	ctgcgctgga
L1		C1	