

**VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NHÁNH

**ĐA DẠNG ADN TẬP ĐOÀN GIỐNG LẠC CÓ MỨC ĐỘ
KHÁNG KHÁC NHAU VỚI BỆNH GỈ SẮT VÀ HÉO XANH
VI KHUẨN VÀ XÁC ĐỊNH CHỈ THỊ LIÊN QUAN**

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

Mã số: KC.04.08

Đơn vị thực hiện: PHÒNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

Chủ nhiệm đề tài nhánh: ĐINH THỊ PHÒNG

HÀ NỘI, 10/2004

I. THÔNG TIN CHUNG

- Tên đề tài nhánh: **Đa dạng ADN tập đoàn giống lạc có mức độ kháng khác nhau với bệnh gỉ sắt và héo xanh vi khuẩn và xác định chỉ thị liên quan**

- Thời gian thực hiện: 10/2004-10/2004
- Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Đinh Thị Phòng
- Địa chỉ: Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học
- Những người tham gia chính:
 1. TS. Đinh Thị Phòng
 2. PGS.TSKH. Lê Thị Muội
 3. PGS.TS. Lê Trần Bình
 4. Ths. Nguyễn Văn Thắng
 5. Ths. Nguyễn Thị Yến
 6. CN. Nguyễn Văn Thắng
 7. CN. Trần Văn Dương

II. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1. Khai thác các chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh gỉ sắt, chịu hạn từ các ngân hàng gen quốc tế như EMBL/Genbank/DDBJ.
2. Thiết kế các môi ngẫu nhiên RAPD và SSR để xác định các nguồn giống có tính kháng bệnh gỉ sắt, héo xanh trong tập đoàn giống lạc.
3. Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lạc kháng bệnh gỉ sắt, héo xanh vi khuẩn bằng các chỉ thị RAPD, SSR
4. Đánh giá, tuyển chọn các nguồn bố mẹ cặp lai có tính kháng bệnh và năng suất phục vụ tạo giống.
5. Phối hợp với Trung tâm NC và TN đậu đỗ đánh giá sớm các dòng cây chọn được để phát triển thành giống.

III. KẾT QUẢ

III.1 Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lạc có mức độ chống chịu bệnh gỉ sắt khác nhau bằng kỹ thuật RAPD.

1. Nguyên liệu

Bao gồm 33 giống lạc có mức độ chống chịu bệnh gỉ sắt (*Puccinia arachidis*) khác nhau do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Nguồn gốc, mức độ chống chịu bệnh gỉ sắt của các giống lạc này được trình bày trong bảng 1 ở phần phụ lục (số liệu do TTNCĐĐ, Viện KHKTNNVN cung cấp).

Sử dụng 80 đoạn mỗi ngẫu nhiên với chiều dài 10 nucleotit để sàng lọc mỗi đa hình cho tập đoàn giống lạc trong nghiên cứu.

2. Phương pháp

* Tạo cây lạc để lấy nguyên liệu tách ADN: Hạt lạc được ngâm trong nước ấm khoảng 7-9 giờ. Sau đó, đặt hạt vào cốc trồng có chứa giấy giữ ẩm và ủ 37°C khoảng 12 giờ. Khi hạt lạc nảy mầm, rửa sạch nhớt bằng nước máy 3-4 lần và tiếp tục ủ cho đến khi có lá mầm thì chuyển ra nuôi ở điều kiện nhiệt độ bình thường trong 2 tuần, lúc này có thể thu lá và bảo quản ở tủ - 85°C.

* Phương pháp tách ADN từ lá lạc: Tách chiết theo phương pháp của Gawel và cs (1991) có cải tiến, trong đó tăng CTAB từ 2% lên 4%. Kiểm tra độ sạch và hàm lượng ADN bằng đo quang phổ hấp phụ kết hợp với điện di trên gel agarose 0,8%.

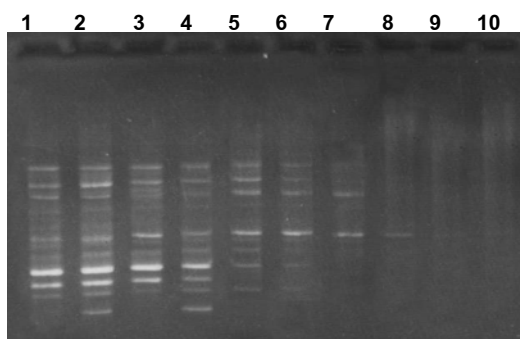
* Phản ứng RAPD: Dung tích mỗi phản ứng 25µl, trong đó có 1X đệm PCR, 3mM MgCl₂, 150µM 4dNTP (ATP, TTP, CTP và GTP), 300nM đoạn mỗi, 0,75 đơn vị Taq polymeraza và 5-10ng ADN khuôn. Chu trình nhiệt bao gồm: bước 1: 94°C - 3 phút, bước 2: 94°C - 1 phút, bước 3: 36°C - 45 giây, bước 4: 72°C - 2 phút, bước 5: 72°C - 20 phút và bước 6: lưu giữ ở 4°C. Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ. Điện di phân tích sản phẩm RAPD trên gel agarose 1,4%, nhuộm bản gel bằng Ethidium bromid và chụp ảnh.

* Phân tích số liệu: Dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn ADN khi điện di sản phẩm RAPD, để làm cơ sở cho việc phân tích số liệu (theo quy ước 1 = xuất hiện, 0 = không xuất hiện). Số liệu được xử lý trong chương trình NTSYSpc version 2.0 (Applied Biostatistics Inc., USA., 1998) để lập ra biểu đồ so sánh hệ số tương đồng di truyền giữa các giống lạc ở mức độ phân tử.

3. Kết quả và thảo luận

* Tối ưu phản ứng RAPD

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến kết quả của phản ứng RAPD như là nồng độ Taq polymerase $MgCl_2$, hàm lượng ADN khuôn, nhiệt độ bắt mồi. Nhưng trong phản ứng RAPD đối với ADN genom lạc, chúng tôi thấy việc tối ưu được hàm lượng ADN khuôn cho một phản ứng có tính chất quyết định đến sự thành công. Với kết quả thu được như ảnh 1 khi thực hiện phản ứng RAPD với các hàm lượng ADN khuôn khác nhau (5 ng, 25ng, 50 ng, 100ng và 150ng) nhận thấy ở hàm lượng ADN khuôn từ 5ng – 25 ng xuất hiện từ 8 - 9 phân đoạn ADN, ở hàm lượng 50 ng xuất hiện 7 phân đoạn ADN, ở hàm lượng 100 ng xuất hiện chỉ còn 1 - 2 phân đoạn ADN và hàm lượng 150 ng không có phân đoạn ADN xuất hiện. Độ nét của các băng cũng giảm dần theo chiều tăng hàm lượng ADN khuôn (Bảng 2).



Ảnh 1: Điện di kiểm tra sản phẩm PCR-RAPD với các hàm lượng ADN khác nhau.

Giếng 1,2 là 5ng; giếng 3,4 là 25ng; giếng 5,6 là 50 ng; giếng 7,8 là 100 ng và giếng 9,10 là 150 ng. 1,3,5,7 và 9 là cùng một mẫu = ICG950166; 2,4,6,8 và 10 là cùng một mẫu = ICG87165 .

Bảng 2: Số phân đoạn xuất hiện ở các hàm lượng ADN khác nhau

HL \ PD	5 ng		25 ng		50 ng		100 ng		150 ng	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Tổng	8 (+)	9 (+)	8 (+)	9 (+)	7 (+)	7 (+)	2 (+)	1 (+)	0 (+)	0 (+)

Ghi chú: HL = hàm lượng; PD = phân đoạn; + là xuất hiện phân đoạn; - không xuất hiện phân đoạn.

* phân tích tính đa hình ADN

Số liệu thu được trong bảng 3 cho thấy, khi sàng lọc 80 đoạn môi ngẫu nhiên với trình tự 10 nucleotit để nghiên cứu tính đa hình ADN của 33 giống lạc, kết quả

là chỉ 11 đoạn môi (RA31, RA36, RA40, RA45, RA142, RA143, RA159, UBC3, UBC776, OPL3 và OPH08) biểu hiện tính đa hình với tổng số 2651 phân đoạn ADN được nhân bản ngẫu nhiên. Số phân đoạn ADN nhân bản của mỗi đoạn môi cho từng giống dao động từ 2 (RA45) đến 15 (RA40), bình quân mỗi đoạn môi nhân bản được 7 phân đoạn ADN kính thước khoảng 0,5-3,0 Kb.

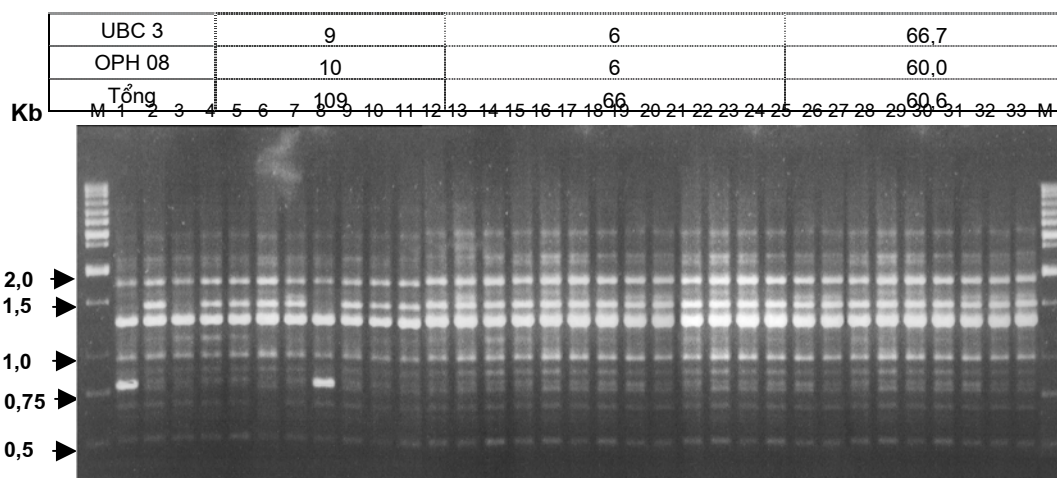
Bảng 3: Tổng số phân đoạn ADN nhân được khi phân tích với 11 đoạn môi ngẫu nhiên

Môi	Giống																																	Tổng	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
RA 45	4	4	3	3	3	4	4	4	4	1	3	7	1	3	3	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	117	
UBC776	6	6	7	6	7	6	6	5	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8	4	5	5	5	5	7	5	3	6	5	5	5	6	191
RA 31	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5	5	5	5	5	3	4	4	4	4	5	4	5	5	2	5	5	4	5	3	4	5	5	4	147	
RA36	8	8	8	7	6	8	8	8	9	8	8	9	8	8	8	8	8	8	8	10	9	8	10	7	8	9	9	8	8	5	8	7	8	265	
OPL 3	4	3	4	4	3	6	4	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	128	
RA159	10	5	10	11	10	7	10	10	10	10	8	11	11	10	11	11	10	11	11	8	10	10	8	10	10	11	11	10	11	8	8	8	10	320	
RA 40	11	14	13	13	13	13	13	11	13	13	14	14	14	14	14	13	13	13	14	10	13	15	13	11	13	11	12	12	13	12	11	11	13	420	
RA142	4	4	5	5	5	6	4	4	4	4	4	4	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	3	2	4	4	4	4	3	3	3	4	4	128	
RA143	13	13	13	12	12	13	13	13	14	14	13	13	14	15	15	14	14	14	13	12	12	13	12	12	13	13	12	12	12	12	12	13	13	428	
UBC 3	5	4	6	6	7	7	7	6	6	7	9	8	7	8	7	7	8	6	7	5	5	4	5	5	4	4	5	5	4	4	4	5	5	192	
OPH 08	10	10	10	10	7	10	10	10	10	10	9	9	10	10	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10	8	10	10	8	10	10	8	8	10	315	
Tổng	80	76	84	82	78	85	84	77	86	82	83	90	81	86	84	83	82	80	84	78	83	81	79	72	78	82	80	75	78	71	72	74	81	2651	

Trong số 109 phân đoạn xuất hiện với 11 đoạn môi (Bảng 4) thì có 66 phân đoạn đa hình chiếm 60,6%, chứng tỏ giữa 33 giống lạc nghiên cứu có sự khác nhau trong hệ gen. Đặc biệt môi RA40 cho thấy sự biểu hiện tính đa hình giữa các giống rất rõ rệt (Ảnh 2). Trong 33 giống lạc nghiên cứu, có 30 giống xuất hiện phân đoạn ADN tại vị trí 1,50 Kb so với thang ADN chuẩn, trừ 3 giống (ICG99001, ICG99004 và ICG99051) là không xuất hiện. Còn ở vị trí 0,76 Kb chỉ có 2 giống (ICG99001 và ICG99051) xuất hiện phân đoạn ADN. Tương tự như vậy tại các vị trí khác một số giống xuất hiện phân đoạn, một số giống khác lại không xuất hiện. Từ kết quả phân tích cho phép nhận xét giữa các giống lạc nghiên cứu đã có sự sai khác về mặt di truyền.

Bảng 4: Số phân đoạn ADN xuất hiện và số phân đoạn đa hình với mỗi đoạn môi

Môi	Số phân đoạn ADN	Số phân đoạn ADN đa hình	% phân đoạn đa hình
RA 45	7	6	85,7
UBC776	8	5	62,5
RA 31	5	3	60,0
RA36	10	5	50,0
OPL 3	8	4	50,0
RA159	14	13	92,9
RA 40	17	10	58,8
RA142	6	4	66,7
RA143	15	4	26,7

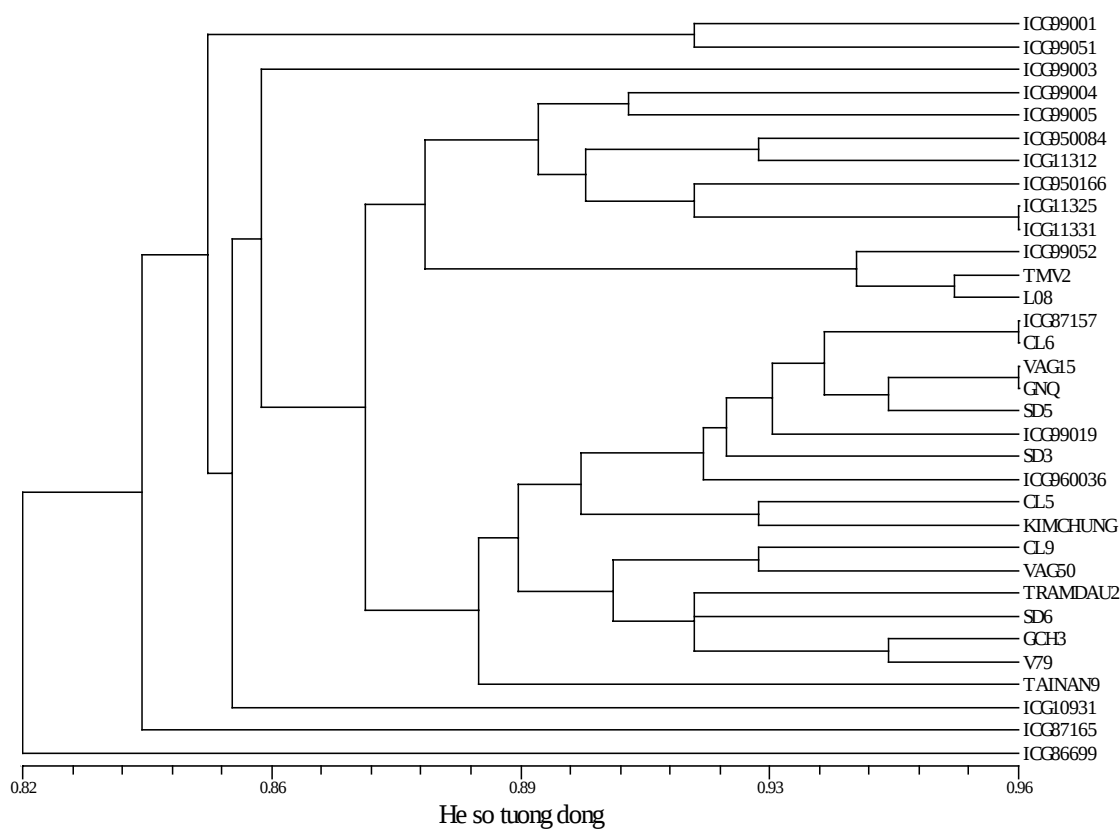


Ảnh 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR-RAPD của 33 giống lạc với môi RA134

Thứ tự các cột tương ứng với các giống như bảng 1; M: thang ADN chuẩn 1 Kb.

*** So sánh hệ số tương đồng giữa 33 giống lạc nghiên cứu**

Sau khi mã hoá các phân đoạn ADN được nhân bản với 11 đoạn mỗi ngẫu nhiên và xử lý số liệu trong chương trình NTSYSpc version 2.0, chúng tôi đã nhận được sơ đồ hình cây. Qua sơ đồ hình cây cho thấy, giữa các giống có hệ số đồng dạng di truyền khá cao nằm trong khoảng từ 0,82 đến 0,96.



Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ của 33 giống lạc nghiên cứu

Sơ đồ hình cây cũng cho thấy, có sự chia làm 2 nhánh chính, ở nhánh chính 1 đa số giống ở nhánh này có đặc tính kháng bệnh gỉ sắt, chúng đều thuộc tập đoàn giống của ICRISAT, trừ giống L08 là của Việt Nam. Trong đó, giống TMV2 là giống nhiễm bệnh và giống L08 kháng trung bình nằm trong một nhánh phụ thuộc nhánh chính 1 có hệ số sai khác di truyền với các giống từ 4,7%-11,6%; Ngược lại, ở nhánh chính 2 đa số các giống kháng bệnh gỉ sắt trung bình, thuộc tập đoàn giống của Việt Nam, Trung Quốc và Đài Loan. Còn 5 giống (ICG99001, ICG99003, ICG10931, ICG87165 và ICG86699) không thuộc 2 nhánh trên là do chúng có sự sai khác lớn về hệ số tương đồng di truyền với các giống ở 2 nhánh, đồng thời chúng cũng có những đặc điểm thực vật khác biệt so với các giống trong 2 nhánh, chẳng hạn như giống ICG86699 có kích thước hạt lớn hơn (rộng hạt 1,05 cm).

4. Kết luận và đề nghị

Phân tích hệ gen của 33 giống lạc với 11 đoạn mỗi ngẫu nhiên, nhận được 109 phân đoạn ADN. Trong đó có 66 phân đoạn đa hình chiếm 60,6%. Điều này cho thấy giữa 33 giống lạc nghiên cứu khác nhau về mặt di truyền, mức sai khác từ 4% (1 - 0,96) đến 18% (1 - 0,82).

Kết quả phân tích tính đa hình ADN cho thấy các giống lạc ở cùng một vùng địa lý, sinh thái được tập trung thành từng nhóm.

Giữa các giống chống chịu bệnh gỉ sắt của tập đoàn giống ICRISAT và các giống năng suất trong nước không nằm trong cùng một nhánh. Vì thế có thể lựa chọn các cặp bố mẹ mong muốn để phục vụ cho công tác chọn tạo giống mới.

5. Tài liệu tham khảo

Nguyễn Xuân Hồng, Đỗ Thị Dung, Nguyễn Thị Chính, Vũ Thị Đào, Phạm Văn Toàn, Trần Đình Long, C.I. I Gowda., 2000. *Kỹ thuật đạt năng suất lạc cao*. NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.

*A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting
ADN Other PCR Applications.*

http://dendrome.ucdavis.edu/protocols/rapid_ctabdna.html

Crops Gallery: *Groundnut* .

<http://www.icrisat.org/text/coolstuff/crops/gcrops4.html>

Foolad MR., & CS (1995). *Applications of polymerase chain reaction (PCR) to plant genome analysis*. In: Tissue ADN organism fundamental methods, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg.

Gawel ADNJarret., 1991. *Genomic DNA Isolation*,
<http://www.weihenstephan.de/pbpz/bambara/html/dna.htm>

Liao Boshou, Nguyen Xuan Hong, C Johansen ADNCLL Gowda. *Groundnut bacterial wilt in Asia*, S PADNe. International crops research Institute for the Semi-Arid Tropics, India, 1998+

Rust disease of groundnut. P. Subrahmanyam ADN.D.McDonald. International crops research Institute for the Semi-Arid Tropics, India, May 1983.

WilliamsJ.et al.,1990. *ADN polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acid Res. 18: 6531-3535.

Xingnong Wang, Peter Felker, Mark D. Burow ADNAndrew H. Paterson. *Comparison of RAPD Marker Patterns To Morphological ADNPhysiological Data In the Classification of Opuntia Accessions*.

III. 2. Nghiên cứu tính đa hình ADN tập đoàn giống lạc kháng bệnh héo xanh (*P. solanacoerum*) bằng kỹ thuật SSR

1. Nguyên liệu

Bao gồm 35 giống lạc có mức độ chống chịu bệnh héo xanh khác nhau do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Nguồn gốc, mức độ chống chịu bệnh héo xanh của các giống lạc này được trình bày trong bảng 2 ở phần phụ lục (số liệu do TTNCĐĐ, Viện KHKTNNVN cung cấp).

Sử dụng 20 cặp mồi SSR đặc hiệu (Ký hiệu L23, L24, L26, L28, L29, L31, L32, L33, L36,L37, L38, L39, L40, L41,L43, L44, L45, L47, L50, L51).

2. Phương pháp

* Tạo cây lạc để lấy nguyên liệu và tách chiết ADN giống như phần phương pháp trong mục I.

* Phản ứng SSR: Dung tích mỗi phản ứng 10µl, trong đó có 1X đệm PCR, 2,5 mM MgCl₂, 150µM 4dNTP (ATP, TTP, CTP và GTP), 300nM đoạn mồi (mồi xuôi và mồi ngược), 0,35 đơn vị Taq polymeraza và 5 ng ADN khuôn. Chu trình nhiệt bao gồm: bước 1: 94⁰C - phút, bước 2: 94⁰C – 45 giây, bước 3: X⁰C - 45 giây, bước 4: 72⁰C - 30 giây, bước 5: 72 ⁰C - 10 phút và bước 6: lưu giữ ở 4⁰C. Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 35 chu kỳ. Điện di phân tích sản phẩm SSR trên gel agarose 2%, và trên gel polyacrylamid 6% nhuộm bạc và phân tích kết quả.

* Chạy điện di và nhuộm bạc:

- Chuẩn bị các tấm kính gồm một tấm kính dài và một tấm kính ngắn, rửa sạch bằng nước cất và để khô 5 phút
- Lau tấm kính ngắn bằng dung dịch sigmacote và để khô trong 5 phút
- Lau tấm kính dài bằng dung dịch kết dính(dung dịch kết dính: thêm 4,5 µl Bind silane vào 1 ml dung dịch 95% etanol+ 0,5% axit acetic) và để khô trong 5 phút
- Chuẩn bị gel polyacrilamid 6%: nước 52,5ml+TBE 10X, 7,5ml+ Acrylamid+ Bis(29:1)+ 450µl APS 100ng/ml+ 100µl temed
- Rót dung dịch polyacrylamid 6% vào bơm tiêm, bơm vào khoảng giữa hai tấm kính sao cho dung dịch chảy đều và không có bọt khí. Cài tấm răng lược vào và để bản gel trong 1 giờ
- Chuẩn bị dung dịch để loading: Thêm 5 µl dye SSR 3X vào 10 µl sản phẩm PCR, sau đó đặt vào đá, cho vào mỗi going 6 µl mẫu
- Trước khi cho mẫu và ADN marker, cho chạy điện di ở 1000V trong 30 phút
- Nhuộm bản gel
 - + Sau khi điện di tách 2 tấm kính ra
 - + Đặt bản gel vào nước rửa 3 phút
 - + Nhuộm gel 20 phút trong dung dịch CTAB 0,1%(1g CTAB +1l H₂O)
 - + Nhuộm gel 15 phút trong dung dịch ammoniac 0,3%(13 ml ammoniac+ 1l H₂O)
 - + Nhuộm gel 15 phút trong bạc(1 g bạc+ 4 ml NaOH 1M+3,5 ml ammoniac)
 - + Rửa bản gel trong nước 10 giây
 - + Nhuộm bản gel trong dung dịch hiện hình(15g Na₂CO₃+ 200µl formaldehit) cho đến khi xuất hiện băng
 - + Rửa bản gel trong nước 10 giây
 - + Cố định bản gel trong glycerol trong 15 phút

3. Phân tích số liệu SSR

Để xác định quan hệ di truyền giữa các dòng lạc, các kết quả thu được từ quá trình điện di, sản phẩm PCR được thành lập dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng ADN nhờ khuếch đại bằng PCR

Các số liệu trên được nhập vào phần mềm Exel lần lượt theo từng môi. Sau đó tính:

- Hệ số PIC (polymorphic information content - Đa dạng di truyền) được tính theo công thức sau:

$$PIC=1-\sum P_i^2 \text{ trong đó } P_i \text{ là tần số xuất hiện alen thứ } i$$

- Phân nhóm quan hệ: số liệu được đưa vào phần mềm chuyên dụng NTYIS 2.0 để tìm ra sự sai khác giữa các giống lạc thông qua biểu đồ hình cây. Để khẳng định kết quả phân nhóm, chúng tôi đã tiến hành xác định giá trị tương quan kiểu hình

theo 3 phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau (phương pháp của Jaccard, của Dice và của Sokal) với 4 kiểu phân nhóm (WPGMA, UPGMA, liên kết hoàn toàn và liên kết đơn lẻ).

Sau đó số liệu được chuyển sang chương trình NTSYSpc 2.02 để phân tích tìm ra hệ số tương đồng di truyền (theo 3 cách), thành lập cây quan hệ chủng loại (theo DICE).

4. Kết quả và thảo luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng 20 cặp môi SSR, kết quả nhận được là 19 môi đa hình và duy nhất một môi không đa hình.

Bảng 1. Phân tích sản phẩm SSR của 35 giống lạc với 20 môi SSR

Môi TT	L23	L24	L26	L28	L29	L31	L32	L33	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L43	L44	L45	L47	L50	L51	TPD
1	1	3	1	1	4	1	3	1	3	4	6	2	1	2	1	1	1	4	4	3	47
2	1	3	1	2	4	1	2	2	3	3	7	1	1	2	2	1	1	5	4	3	49
3	1	3	1	1	4	1	3	4	1	4	7	2	1	2	2	3	1	6	4	3	54
4	1	3	1	1	4	1	3	1	2	3	5	1	1	2	1	1	1	4	3	3	42
5	1	3	1	1	4	1	3	1	2	3	8	1	1	2	1	2	1	5	4	3	48
6	1	3	1	1	4	1	3	1	0	3	8	1	1	2	1	3	1	5	3	3	46
7	1	3	1	1	4	1	4	1	1	4	9	1	1	2	1	3	1	4	4	3	50
8	1	3	1	1	4	1	4	1	1	3	6	0	1	1	1	3	1	4	4	3	44
9	1	3	1	1	4	2	4	1	1	4	9	3	2	2	1	1	1	5	4	3	53
10	1	3	1	1	4	1	3	1	2	3	4	2	1	2	1	1	1	4	4	3	43
11	1	3	1	1	4	1	3	2	0	4	6	3	1	2	1	1	1	5	4	3	47
12	1	4	1	1	4	1	4	1	1	4	5	2	1	2	2	1	1	5	3	3	47
13	1	3	1	1	4	1	4	4	1	4	8	2	1	2	1	1	1	6	4	3	53
14	1	3	1	1	4	1	3	1	1	4	5	3	1	2	1	1	1	5	3	3	45
15	1	3	1	1	4	1	3	1	1	3	5	2	1	1	2	3	1	5	4	3	46
16	1	3	1	1	4	1	2	1	1	4	6	3	1	2	1	2	1	5	3	3	46
17	1	3	1	1	4	1	2	3	1	4	6	3	1	2	1	1	1	5	3	3	47
18	1	3	1	1	4	1	3	2	2	4	4	2	2	2	1	1	1	5	3	3	46
19	1	3	1	1	4	1	3	2	2	3	5	2	2	1	1	1	1	5	3	3	45
20	1	3	1	1	4	1	4	3	3	4	4	2	1	2	1	1	1	5	3	3	48
21	1	3	1	1	4	1	4	2	3	4	6	3	1	2	1	1	1	5	3	3	50
22	1	3	1	1	4	1	1	2	3	3	7	3	1	2	2	1	1	6	4	3	50
23	1	3	1	1	4	1	3	3	3	4	7	2	1	2	1	1	1	5	3	3	50
24	1	3	1	1	4	1	4	1	2	4	7	3	1	1	1	1	1	5	3	3	48
25	1	3	1	1	4	1	1	1	3	4	7	2	1	1	1	3	1	5	4	3	48
26	1	3	1	1	4	1	3	1	3	3	4	3	1	2	1	1	1	5	3	3	45
27	1	3	1	1	4	1	3	2	3	4	6	3	1	2	1	1	1	5	3	3	49
28	1	3	1	1	4	1	3	1	1	4	6	3	1	2	1	1	1	5	3	3	46
29	1	3	1	1	4	1	3	2	1	4	6	3	1	2	1	2	1	5	4	3	49
30	1	3	1	1	4	1	3	2	3	4	7	3	1	2	1	1	1	5	3	3	50
31	1	3	1	1	4	1	3	2	1	4	5	2	1	2	2	3	1	5	4	3	49
32	1	3	1	1	4	1	2	2	3	2	5	2	1	2	1	1	1	5	4	3	45
33	1	3	1	1	4	1	3	2	1	4	5	3	1	2	1	1	1	5	3	3	46
34	1	3	1	1	4	1	1	1	3	3	6	2	1	2	1	2	1	5	3	3	45
35	1	3	1	1	4	1	4	2	3	3	5	2	1	2	1	2	1	5	3	3	48

Kết quả điện di sản phẩm SSR của 35 giống lạc với 20 môi SSR đã thu được 1664 phân đoạn ADN. Bình quân mỗi giống xuất hiện 47,5 phân đoạn ADN, trong

đó giống ICGV3704 (hàng 3) có phân đoạn ADN được nhân bản nhiều nhất là 54 phân đoạn và giống MDRF5-176 (Hàng 4) có số phân đoạn AND được nhân bản ít nhất là 42 phân đoạn. Như vậy việc sử dụng 20 môi SSR đã cho thấy có sự khác nhau giữa 35 giống lạc ở mức độ phân tử. Mức độ tương đồng được phân tích ở phần sau.

Để phân tích đa hình ADN một cách chính xác hơn, chúng tôi sử dụng cách phân tích giá trị PIC (polymorphism information content- đa dạng di truyền) của mỗi cặp môi xác định theo công thức $PIC = 1 - \sum P_i^2$, trong đó P_i là tần số của alen i của kiểu gen được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

Bảng 2. Số phân đoạn ADN nhân bản và giá trị PIC của tập đoàn 35 giống lạc kháng bệnh héo xanh

Tên môi	Cỡ alen lý thuyết (bp)	Cỡ alen quan sát (bp)	Số alen	Giá trị PIC	Tên môi	Cỡ alen lý thuyết (bp)	Cỡ alen quan sát (bp)	Số alen	Giá trị PIC
L23	290	260-300	5	0,575	L38	282	250-307	17	0,472
L24	299	299-310	9	0,440	L39	252	250-261	6	0,402
L26	152	160	1	0	L40	259	270-275	4	0,560
L28	298	330-334	3	0,421	L41	264	275-294	4	0,352
L29	198	195-213	7	0,284	L43	262	265-274	6	0,579
L31	203	205-207	2	0,297	L44	238	235-275	8	0,582
L32	281	305-326	9	0,495	L45	152	155-170	6	0,607
L33	225	220-240	6	0,505	L47	292	290-345	9	0,354
L36	285	260-340	10	0,615	L50	269	250-275	9	0,443
L37	265	290-360	13	0,530	L51	274	250-285	6	0,300

Kết quả 20 cặp mỗi cho giá trị PIC từ 0 (L26) đến 0,615 (L36). 8/20 cặp mỗi cho độ đa hình cao với giá trị $PIC \geq 0,5$ (40%). Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi sở dĩ các cặp mỗi cho đa hình cao vì đây chính là các cặp mỗi được thiết kế trên cơ sở genom của cây lạc. Số lượng các phân đoạn AND được nhân bản với mỗi cặp mỗi xê dịch từ 1 đến 17 trong phạm vi quan sát (Bảng 2). Kích thước của các phân đoạn AND nhân bản từ 155 bp đến 360 bp. Tổng số thu được 140 alen đã được nhân bản, trung bình số alen là 7/locut.

Dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn AND của các giống khi điện di sản phẩm SSR, chúng tôi thiết lập mối liên quan giữa các giống ở mức độ phân tử. Số liệu nhận được sẽ tính toán và phân tích theo chương trình NTSYSpc version 2.0 (Applied Biostatistics Inc.; USA.; 1998) (theo quy ước 1 = xuất hiện; 0 = không xuất hiện). Kết quả được trình bày ở bảng (3) về mối tương quan di truyền từng cặp và hình (1) dưới dạng một sơ đồ hình cây.

Kết quả nhận được ở bảng (3) cho thấy các giống có hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm ở khoảng từ 0,37 đến 0,88. Trong đó hệ số tương đồng di truyền thấp nhất là 0,37 khi so sánh giữa giống ICGV980127 và giống SĐ1, cao nhất là hai giống BW1 và BW9 có hệ số tương đồng di truyền là 0,88.

Hình cây chỉ ra sự sai khác giữa các giống lạc về di truyền. Mức độ khác nhau được biểu hiện bằng hệ số sai khác giữa các giống. Các giống có hệ số tương đồng di truyền cao được xếp vào một nhóm. Giữa các nhóm lại có sự liên hệ về mức độ giống nhau của hệ số tương đồng di truyền. Để khẳng định kết quả phân nhóm, chúng tôi đã tiến hành xác định giá trị tương quan kiểu hình theo ba phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau (phương pháp của Jaccard, của Dice và phương pháp của Sokal) với bốn kiểu phân nhóm (WPGMA, UPGMA, liên kết hoàn toàn và liên kết đơn lẻ) (Bảng 4). Biểu đồ hình cây được thiết lập dựa trên giá trị tương quan cao nhất với các giá trị khi $r \geq 0.9$: tương quan rất chặt, $r = 0.8-0.9$: tương quan chặt, $r = 0.7-0.8$: tương quan tương đối chặt, $r \leq 0.7$: tương quan không chặt. Kết quả trong phân tích đã chỉ ra hệ số tương quan theo phương pháp tính hệ số giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA là cao nhất ($r = 0.805$) so với các phương pháp khác. Tuy nhiên đối với phân tích với chỉ thị SSR thì DICE là tốt nhất bởi vì chỉ thị DICE là chỉ thị đồng trội. Kết quả phân nhóm của 35 giống lạc kháng bệnh héo xanh thiết lập theo hệ số giống nhau của DICE với kiểu phân nhóm UPGMA đã được kiểm tra trên biểu đồ hai chiều ở hình (2), biểu đồ đa chiều

ở hình (3) và biểu diễn theo sơ đồ hình cây ở hình (1) đều phân ra làm hai nhóm tập trung các giống và hai giống nằm riêng biệt.

Phân tích sự sai khác về hệ số di truyền của 35 giống lạc được chia thành 2 nhánh cây chính:

Nhánh 1 chỉ có một giống ICGV3704 (ICRISAT) có hệ số sai khác so với các giống khác là 49% ($1 - 0,51$). Đây là giống có hệ số sai khác so với các giống là nhiều nhất.

Nhánh 2 gồm 34 giống được chia thành hai nhánh phụ:

+ Nhánh phụ 1 chỉ có giống SD1 (Trung Quốc) có hệ số di truyền sai khác so với giống khác trong nhánh lớn nhất là 47% ($1 - 0,53$).

+ Nhánh phụ 2 lại được phân làm hai nhóm:

- Nhóm 1 gồm 12 giống trong đó giống ICGV980127 khác xa so với các giống trong nhóm. Mười một giống còn lại trong nhóm có nguồn gốc từ Trung Quốc, Việt Nam, ICRISAT và lai tạo nhưng chúng vẫn thể hiện được mối quan hệ về mặt di truyền. Nhóm này có 2 giống L12 và V79 có hệ số di truyền sai khác 14% ($1 - 0,86$), là hai giống có nhiều đặc điểm chung nhất trong nhóm. Trong đó giống L12 có nguồn gốc từ giống V79 (giống L12 là con lai của giống V79 với giống 87155).

- Nhóm 2 lại được chia thành 2 nhóm phụ:

Nhóm phụ một gồm 7 giống có nguồn gốc từ ICRISAT và đều bị nhiễm vi khuẩn héo xanh.

Nhóm phụ hai gồm 14 giống chủ yếu có nguồn gốc từ Trung Quốc, lai tạo (12 giống) và ICRISAT (3 giống). Trong đó 2 giống có nguồn gốc từ ICRISAT đều có hệ số tương đồng khác xa với các giống khác trong nhóm.

Trong nhóm này có 2 giống là MD7 và L14 có hệ số tương đồng giống khá cao. Hai giống này có nguồn gốc từ Trung Quốc và đều kháng héo xanh trung bình. Đặc biệt cho thấy hai giống BW1 và BW9 có hệ số sai khác là 12% ($1 - 0,88$). Là hai giống có nhiều đặc điểm chung nhất, đều là con lai của giống GNQ (là giống kháng héo xanh cao) và giống L08 (là giống cho năng suất cao). Hai giống lai này kháng héo xanh trung bình và có năng suất cao.

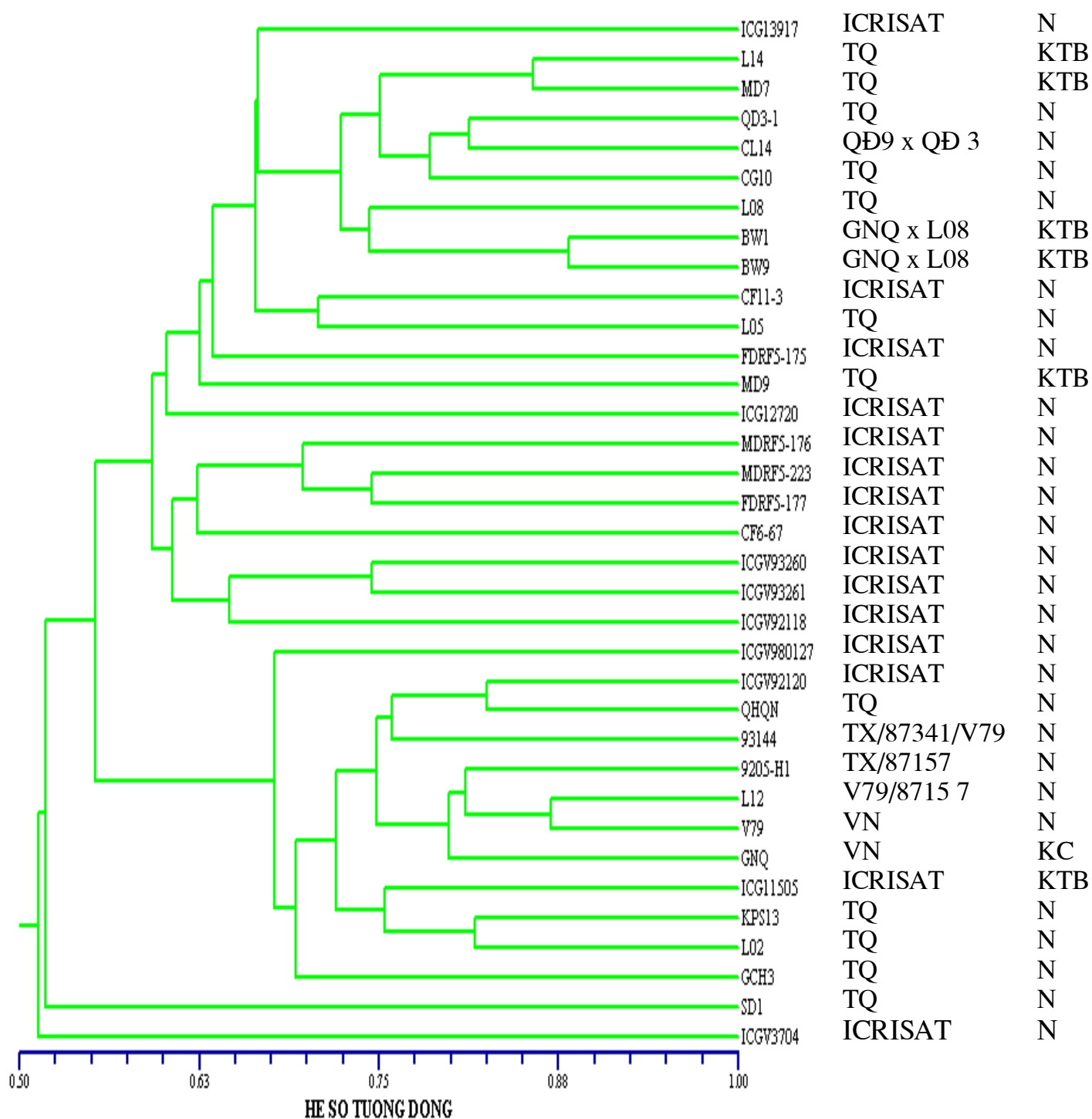
Như vậy khi phân tích tính đa hình 35 giống lạc bằng kỹ thuật SSR với 20 môi SSR đã cho ta thấy sự khác nhau giữa chúng ở mức độ phân tử. Trong một

nhóm ngoài các giống có quan hệ gần nhau, còn có các giống gần nhau về điểm bệnh héo xanh.

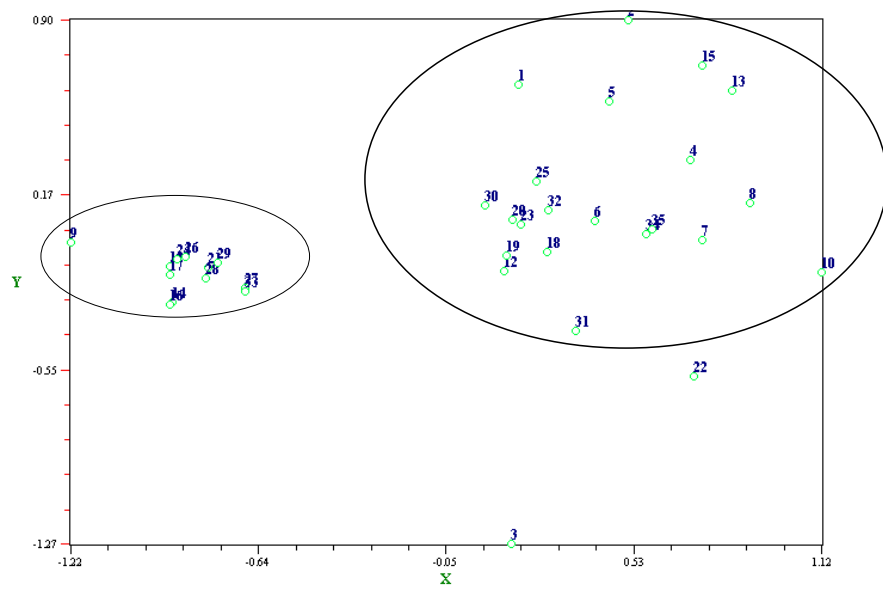
Bảng 4. Giá trị tương quan kiểu hình theo 3 phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau với 4 kiểu phân nhóm

	UPGMA	WPGMA	Liên kết hoàn toàn	Liên kết đơn lẻ
SM	0.78722	0.75322	0.54421	0.67773
DICE	0.77990	0.74044	0.68642	0.68197
JACCARD	0.80514	0.76520	0.71087	0.71461

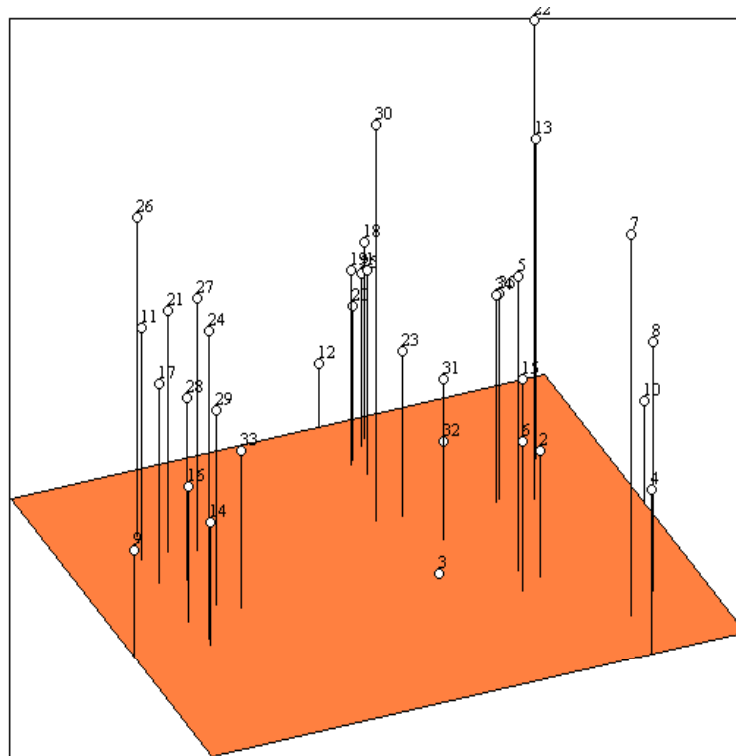
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
1	1.00																																			
2	0.60	1.00																																		
3	0.53	0.52	1.00																																	
4	0.54	0.55	0.42	1.00																																
5	0.72	0.66	0.47	0.67	1.00																															
6	0.67	0.65	0.58	0.73	0.74	1.00																														
7	0.52	0.53	0.42	0.63	0.57	0.65	1.00																													
8	0.55	0.60	0.45	0.65	0.57	0.67	0.74	1.00																												
9	0.50	0.53	0.52	0.42	0.50	0.53	0.43	0.45	1.00																											
10	0.58	0.57	0.49	0.59	0.57	0.61	0.60	0.69	0.52	1.00																										
11	0.60	0.48	0.53	0.40	0.57	0.52	0.52	0.48	0.74	0.49	1.00																									
12	0.66	0.46	0.51	0.52	0.59	0.58	0.43	0.51	0.54	0.60	0.62	1.00																								
13	0.66	0.53	0.52	0.61	0.63	0.63	0.58	0.62	0.45	0.58	0.60	0.62	1.00																							
14	0.52	0.51	0.48	0.57	0.49	0.62	0.44	0.54	0.73	0.55	0.67	0.61	0.51	1.00																						
15	0.62	0.59	0.54	0.57	0.55	0.61	0.52	0.64	0.48	0.56	0.45	0.62	0.61	0.51	1.00																					
16	0.54	0.51	0.60	0.50	0.51	0.63	0.46	0.49	0.73	0.47	0.67	0.58	0.44	0.77	0.52	1.00																				
17	0.60	0.50	0.51	0.49	0.59	0.60	0.47	0.44	0.68	0.42	0.81	0.60	0.58	0.74	0.52	0.82	1.00																			
18	0.67	0.55	0.48	0.48	0.55	0.59	0.52	0.56	0.53	0.63	0.69	0.71	0.65	0.53	0.57	0.52	0.67	1.00																		
19	0.67	0.57	0.53	0.48	0.60	0.64	0.53	0.54	0.51	0.64	0.67	0.74	0.63	0.56	0.57	0.59	0.65	0.86	1.00																	
20	0.72	0.60	0.53	0.51	0.56	0.66	0.45	0.54	0.48	0.57	0.57	0.74	0.61	0.56	0.66	0.57	0.63	0.77	0.80	1.00																
21	0.62	0.51	0.52	0.41	0.55	0.54	0.50	0.47	0.66	0.45	0.82	0.64	0.54	0.65	0.48	0.71	0.78	0.65	0.72	0.65	1.00															
22	0.58	0.57	0.46	0.48	0.55	0.48	0.58	0.57	0.37	0.47	0.49	0.52	0.62	0.42	0.54	0.42	0.49	0.54	0.55	0.55	0.50	1.00														
23	0.70	0.69	0.56	0.57	0.55	0.69	0.58	0.64	0.54	0.71	0.60	0.62	0.64	0.65	0.63	0.63	0.58	0.73	0.76	0.80	0.68	0.52	1.00													
24	0.59	0.52	0.51	0.47	0.58	0.53	0.57	0.54	0.63	0.46	0.65	0.53	0.42	0.67	0.51	0.74	0.69	0.49	0.56	0.52	0.76	0.53	0.57	1.00												
25	0.69	0.62	0.53	0.44	0.60	0.62	0.53	0.54	0.50	0.57	0.57	0.63	0.55	0.47	0.64	0.55	0.57	0.70	0.75	0.81	0.63	0.51	0.78	0.54	1.00											
26	0.57	0.43	0.42	0.39	0.49	0.48	0.48	0.49	0.57	0.45	0.72	0.52	0.47	0.62	0.57	0.62	0.67	0.57	0.60	0.62	0.80	0.55	0.61	0.65	0.60	1.00										
27	0.58	0.53	0.54	0.46	0.60	0.57	0.53	0.47	0.63	0.48	0.77	0.56	0.53	0.64	0.48	0.67	0.71	0.61	0.66	0.66	0.81	0.57	0.65	0.68	0.64	0.79	1.00									
28	0.58	0.53	0.50	0.50	0.57	0.59	0.46	0.51	0.67	0.47	0.73	0.60	0.48	0.75	0.50	0.76	0.77	0.59	0.62	0.66	0.79	0.50	0.65	0.66	0.60	0.75	0.86	1.00								
29	0.63	0.55	0.54	0.48	0.56	0.57	0.55	0.54	0.71	0.50	0.75	0.52	0.47	0.72	0.57	0.80	0.75	0.57	0.57	0.56	0.75	0.46	0.71	0.76	0.60	0.68	0.78	0.80	1.00							
30	0.56	0.59	0.40	0.54	0.57	0.60	0.62	0.55	0.50	0.54	0.58	0.54	0.56	0.53	0.63	0.54	0.56	0.60	0.63	0.63	0.68	0.60	0.68	0.67	0.63	0.67	0.63	0.54	0.59	1.00						
31	0.65	0.61	0.64	0.51	0.58	0.67	0.59	0.69	0.55	0.65	0.58	0.71	0.57	0.53	0.69	0.63	0.54	0.65	0.70	0.66	0.63	0.59	0.71	0.60	0.68	0.55	0.63	0.61	0.65	0.59	1.00					
32	0.65	0.66	0.57	0.64	0.60	0.73	0.57	0.63	0.55	0.64	0.54	0.65	0.59	0.62	0.68	0.64	0.61	0.66	0.67	0.75	0.55	0.51	0.78	0.54	0.69	0.51	0.55	0.64	0.66	0.61	0.66	1.00				
33	0.56	0.51	0.58	0.57	0.49	0.67	0.50	0.58	0.71	0.56	0.73	0.54	0.48	0.81	0.52	0.78	0.75	0.59	0.57	0.62	0.73	0.42	0.71	0.66	0.55	0.70	0.76	0.87	0.82	0.58	0.63	0.70	1.00			
34	0.61	0.68	0.53	0.60	0.69	0.68	0.63	0.61	0.47	0.70	0.54	0.59	0.57	0.51	0.64	0.55	0.57	0.73	0.76	0.67	0.57	0.55	0.76	0.56	0.73	0.53	0.64	0.62	0.62	0.67	0.66	0.73	0.62	1.00		
35	0.61	0.62	0.49	0.58	0.65	0.68	0.65	0.67	0.48	0.73	0.57	0.59	0.61	0.54	0.66	0.49	0.51	0.72	0.73	0.71	0.59	0.51	0.80	0.52	0.71	0.62	0.62	0.57	0.58	0.73	0.66	0.75	0.66	0.88	1.00	



Hình 1. Sơ đồ hình cây phát sinh của 35 giống lạc nghiên cứu



Hình 2. Sơ đồ mối tương quan giữa các cá thể theo hai chiều



Hình 3. Sơ đồ mối tương quan giữa các cá thể theo đa chiều

4. Kết luận và đề nghị

Khi phân tích 20 cặp mỗi SSR với với tập đoàn 35 giống lạc có tính kháng khác nhau đối với bệnh héo xanh vi khuẩn thì 19 cặp mỗi cho tính đa hình trừ cặp mỗi L26. Giá trị PIC từ dao động từ 0 đến 0,615 (L36). Trong đó 8/19 cặp mỗi cho tính đa hình phong phú nhất với giá trị $PIC \geq 0,5$.

Trong phạm vi vùng phân tích có 140 phân đoạn ADN được nhân bản, số lượng phân đoạn dao động từ 1 đến 17 đối với mỗi môi .

Phân tích trên hình cây: các giống chủ yếu tập trung vào 2 nhóm , có 2 giống là ICGV3704 và SĐ1 nằm riêng biệt. Hệ số di truyền sai khác dao động từ 18% đến 49%. Điều đáng lưu ý là các giống có cùng nguồn gốc hoặc cùng mức độ kháng bệnh đều lập thành một nhóm nhỏ. Ví dụ giống MD7 và giống L14 đều là hai giống của Trung Quốc và có mức độ kháng héo xanh trung bình lập thành một nhóm. Tương tự giống BW1 và BW9 là hai giống của Việt Nam, có khả năng kháng héo xanh cũng lập thành một nhóm.

Các giống có thể sử dụng làm bố mẹ cặp lai để tạo giống kháng bệnh héo xanh vi khuẩn , năng suất và chất lượng như GNQ (kháng cao) lai với giống L05, L08 (năng suất và chất lượng) có khoảng cách di truyền là 35% và 36% tương ứng

5. Tài liệu tham khảo

- Trần Văn Lại (1995), “Thu thập, đánh giá và bảo quản nguồn thực liệu di truyền đậu đỗ”, *Kết quả nghiên cứu khoa học cây đậu đỗ 1991-1995*, Hà nội, tr. 5-10.
- Vũ Triệu Mân, Lê lương Tề *Bệnh cây nông nghiệp*, Nxb Bộ giáo dục và đào tạo.
- FAO (2003) <http://www.fao.org>.
- V. Subranmanian, S. Gurtu, R. C. N. Rao, S. N. Nigam (2000), *Genome*, 43, pp. 656 -660.
- CRC press Inc. (1994), PCR technology: Current innovation, PCR in forensic science, pp. 209 – 306.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffels., Schary S. J., Higuchi R., Horn G. T., Muliss K. B., Ehlisch H. A. (1998), “Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase”, *Science*, 239, pp. 487 – 491.
- Aranzana M. J., Carbo J., Arus P. (2003), “Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (1) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure”, *Theor. Appl. Genet*, 106 (8), pp. 1341 – 1352.
- Diwan N., Cregan P. B (1997), “Automated sizing of fluorescentlabeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean”, *Theor. Appl. Genet*. 95, pp. 723 – 733.

He G., Meng R., Newman M., Gao G., Pittman R. N., Prakash C. (2003), "Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.), *BMC. Plan. Boil.*, 3 (1), pp. 3.

B. S. Weir – *Methods for discrete genetic data*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. Mass. (1990) 125.

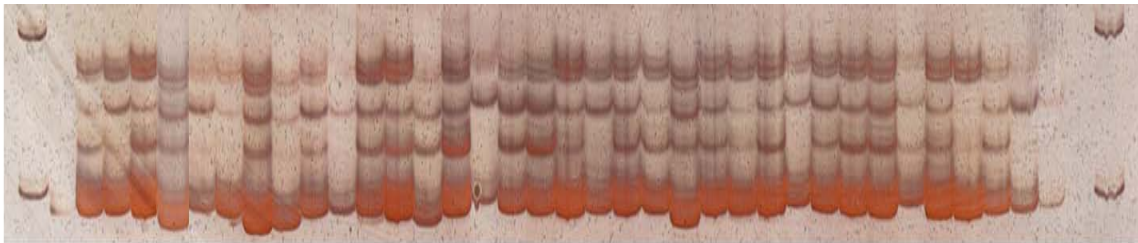
T. Panaud, O. X. Chen., S. McCouch – *Mol. Gen. Genet* 252 (1996) 597 -607.

M. Mohan., S. Nair., A. Bhagwat., T. G. Krishma., M. Yano., C. R. Bhatia – *Mol. Breed* 3 (1997) 87 – 103.

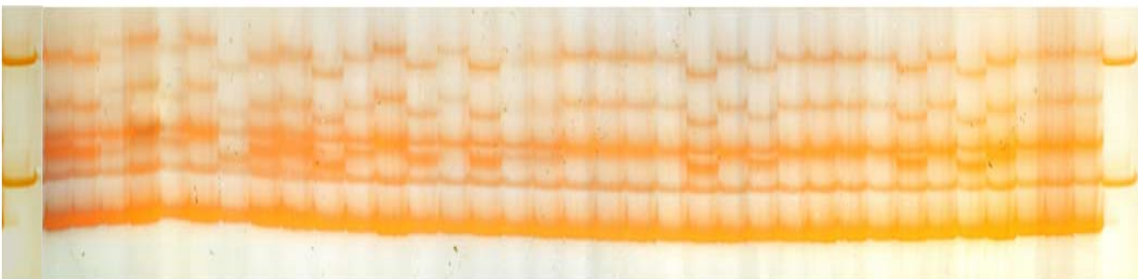
T. Halward., H. T. Stalker., G. Korchert – *Theor Appl Genet* 87 (1993) 379 – 384.

M. Nei., W. H. Li – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 5269 – 5273.

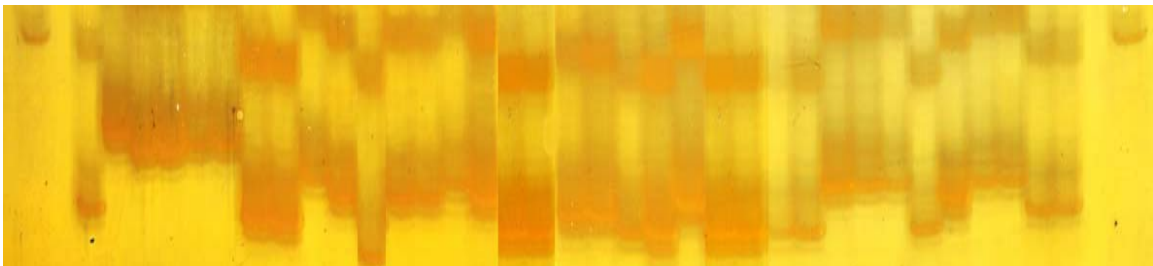
S. L. Dwivedi., J. H. Crouch – Proceeding of a Workshop for the Asian Development Bank supported Project on molecular breeding of sorghum, groundnut and chickpea, ICRISAT (2003) 28 – 43.



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR của cặp mồi L37 và nhuộm bạc



Hình 5. Điện di sản phẩm PCR của cặp mồi L50 và nhuộm bạc



Hình 6. Điện di sản phẩm PCR của cặp mồi L45 và nhuộm bạc

III.3. Sử dụng chỉ thị SSR để phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc (*Arachis hypogaea* L.) kháng bệnh rỉ sắt

1. Vật liệu thực vật: 42 giống lạc có nguồn gốc và tính kháng bệnh rỉ sắt khác nhau được sử dụng trong nghiên cứu như trình bày trong bảng 1. Hạt lạc của các giống do Trung tâm Nghiên cứu và Thực nghiệm đậu đỗ, Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Bảng 1: Mức độ phản ứng khác nhau của các giống đối với bệnh rỉ sắt đánh giá vụ đông năm 2001 tại Trung tâm Nghiên cứu và Thực nghiệm đậu đỗ. (Điểm từ 1 đến 9, 1= mức độ nhiễm bệnh <10% và 9= mức độ nhiễm bệnh từ 81 đến 100%, nd: chưa đánh giá)

TT	Giống	Nguồn gốc sinh thái	Điểm kháng bệnh rỉ sắt	TT	Giống	Nguồn gốc sinh thái	Điểm kháng bệnh rỉ sắt
1	ICGV99001	Tây Ban Nha	2	22	TMV2	Tây Ban Nha	5.7
2	ICGV99003	Virginia	1	23	L08	Việt Nam	5
3	ICGV99004	Tây Ban Nha	2.3	24	MDRF5-176	Ấn Độ	2.7
4	ICGV99005	Virginia	1	25	CL6	Việt Nam	3
5	ICGV86699	Virginia	1.3	26	CL5	Việt Nam	4
6	ICGV87165	Tây Ban Nha	4.3	27	ICG93261	Tây Ban Nha	nd
7	ICGV87157	Valencia	2.3	28	ICG960036	Tây Ban Nha	nd
8	ICGV99051	Virginia	1	29	VAG15	Việt Nam	3
9	ICGV99019	Tây Ban Nha	1	30	CF6-67	Ấn Độ	2
10	ICGx950084	Tây Ban Nha	1	31	CL9	Việt Nam	4
11	ICGx950166	Tây Ban Nha	1	32	TAINNAN9	Đài Loan	3
12	ICG 10931	Tây Ban Nha	2.7	33	TRAMDAU2	Trung Quốc	3
13	ICG 10975	Tây Ban Nha	2.6	34	9205-H1	Ấn Độ	nd
14	ICG 11185	Tây Ban Nha	1.7	35	ICG11505	Tây Ban Nha	nd
15	ICG 11312	Tây Ban Nha	1	36	KIMCHUNG	Việt Nam	4
16	ICG 11325	Tây Ban Nha	1.3	37	SD5	Trung Quốc	3
17	ICG 11331	Tây Ban Nha	2	38	SD6	Trung Quốc	3
18	ICG 11485	Tây Ban Nha	2.3	39	SD3	Trung Quốc	5
19	ICG 12720	Tây Ban Nha	2.3	40	FDRF5-175	Ấn Độ	4
20	ICG 13917	Tây Ban Nha	2.3	41	VAG50	Việt Nam	4
21	ICG 99052	Virginia	1	42	GCH3	Trung Quốc	5

2. Phương pháp

Tách chiết ADN: ADN tổng số đã được tách chiết từ lá non theo phương pháp của Egnin, (1996) [7]. Kiểm tra độ sạch và hàm lượng ADN bằng đo quang phổ hấp phụ kết hợp với điện di trên gel agarose 0,8%.

Các môi SSR: Hai mươi ba cặp môi SSR đã được cung cấp từ Viện Nghiên cứu cây trồng màu Quốc tế cho vùng nhiệt đới bán khô hạn (ICRISAT). Trình tự các môi dài từ 19 đến 25 nucleotit. Nhiệt độ gắn môi và trình tự lặp lại của các nucleotit như trong bảng 2. Trình tự các cặp môi như trong công bố của Ferguson (2004) [5]. (Tạp chí Euphytica thông báo sẽ đăng trong 2004).

Bảng 2: Các cặp môi SSR được sử dụng cho việc phân tích đa dạng ADN của 42

TT	Tên môi	Nhiệt độ gắn môi	Kiểu bazơ	TT	Tên môi	Nhiệt độ gắn môi	Kiểu bazơ
1	L45	64	taa ₍₂₀₎	13	L43	58	taa ₍₁₉₎
2	L29	59	ttg ₍₆₎ ,taa ₍₁₅₎	14	L23	57	taa ₍₁₂₎
3	L36	59	gt ₍₃₁₎	15	L25	61	ctt ₍₁₃₎
4	L49	60	ga ₍₉₎ ,gt ₍₉₎	16	L44	64	taa ₍₂₂₎
5	L26	58	ga ₍₃₅₎	17	L35	64	taa ₍₁₆₎
6	L37	58	taa ₍₁₀₎	18	L47	63	ga ₍₁₉₎ ,gt ₍₉₎
7	L27	57	taa ₍₁₂₎	19	L33	65	tatc ₍₁₂₎
8	L28	58	taa ₍₁₄₎	20	L34	65	ga ₍₁₈₎
9	L50	60	ga ₍₂₆₎ ,gt ₍₂₆₎	21	L31	62	ga ₍₂₄₎
10	L42	60	taa ₍₁₆₎	22	L30	60	taa ₍₁₉₎
11	L32	60	taa ₍₂₃₎	23	L38	64	Ga ₍₁₉₎
12	L40	58	taa ₍₁₆₎				

giống lạc Việt Nam

Phản ứng SSR_PCR

Phản ứng chuỗi polymerase được thực hiện trong 25 µl dung dịch chứa: 10 mM Tris-HCl (pH= 8,3; 50 mM KCl; 2-4 mM MgCl₂; 300-400µM của mỗi loại dATP, dCTP, dGTP và dTTP; 10-30 pmol của cặp môi; 0,8-1,2 đơn vị Taq polymerase và 5-15 ng ADN. Tiến hành phản ứng PCR trong máy Thermal cycler PTC-100TM. Chu trình nhiệt bao gồm bước 1: 94⁰C - 2 phút, bước 2: 94⁰C 45 giây, bước 3: 57⁰ - 65⁰C 1 phút, bước 4: 72⁰C 1 phút 30 giây. Lặp lại 45 chu kì từ bước 2 đến bước 4, bước 5: 72⁰C 10 phút và bước 6: lưu giữ ở 4⁰C. Điện di phân tích sản phẩm PCR trên gel 0,6% polyacrylamit không biến tính trong đệm TBE (89mM Tris, 89 mM boric acid và 2 mM EDTA). Sau đó nhuộm gel trong 1% dung dịch bạc theo phương pháp của Koldony (1984) [17].

Phân tích số liệu

Phân tích số liệu theo qui ước: 1= phân đoạn ADN xuất hiện và 0= phân đoạn ADN không xuất hiện. Xác định hệ số di truyền giống nhau theo 3 phương pháp: (1) phương pháp Dice [2]. được tính theo công thức $S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$, khi S_{ij} là hệ số giống nhau giữa hai cá thể i và j , a

là số phân đoạn ADN xuất hiện ở cả i và j , b là số phân đoạn ADN xuất hiện ở i và không xuất hiện ở j , và c là số phân đoạn ADN không xuất hiện ở i và xuất hiện ở j . (2) Jaccard, (1908) [16] theo công thức $S_{ij} = a/a+b+c$; và (3) phương pháp SM

(Simple Matching) của Sokal và Michener (1958) [32] theo công thức $S_{ij} = a+d/a+b+c+d$, khi đó d là số phân đoạn AND không xuất hiện cả ở i và j . Biểu đồ MDS (multidimension scaling) dựa trên việc xác định khoảng cách di truyền của Ktuskal and Wish (1978) [18]. Phân tích đánh giá hệ số tương quan kiểu hình theo 3 phương pháp: SM, Dice and Jaccard và 4 phương pháp phân nhóm UPGMA (phân tích các nhóm phân tử không cùng trọng lượng [32], WPGMA (Phân tích các nhóm phân tử có cùng trọng lượng [31], liên kết hoàn toàn [19], liên kết đơn lẻ [19] và lập biểu đồ hình cây dựa vào $PIC_i = 1 - \frac{\sum P_{ij}^2}{\sum P_{ij}}$ giá trị phân tích của giá trị tương quan kiểu hình cao nhất trong chương trình NTSYS 2.1 [28].

Hàm lượng thông tin tính đa hình (Polymorphism information content = PIC) của mỗi cặp mỗi xác định theo công thức:

trong đó P_{ij} là tần số của allel j của kiểu gen i được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn) [35]. Xác định chỉ thị SSR liên quan trong chương trình Genstat dựa trên sự tương quan giữa kiểu gen (chỉ thị SSR) và kiểu hình (điểm kháng bệnh).

3. Kết quả thảo luận

Đa hình ADN trong tập đoàn 42 giống lạc

Hai mươi ba cặp mỗi SSR được sử dụng cho phân tích đa dạng tập đoàn 42 giống lạc có mức độ kháng khác nhau với bệnh rỉ sắt. Kết quả tất cả 23 cặp mỗi SSR đều cho tính đa hình với giá trị PIC từ 0.239 (L47) đến 0.616 (L42). 12/23 cặp mỗi SSR cho tính đa hình cao với giá trị $PIC \geq 0.5$ (52%) (bảng 3). Số

lượng các phân đoạn ADN được nhân bản với mỗi cặp môi xê dịch từ 2 đến 10 trong phạm vi quan sát (bảng 3 và hình 1). Kích thước của các phân đoạn ADN nhân bản từ 152 bp đến 420 bp. Tổng số thu được 139 allen đã được nhân bản, trung bình số allen là 6,04/ locút.

Nghiên cứu tính đa dạng ADN ở lạc được tập trung nghiên cứu nhiều từ năm 1990 nhưng tính đa hình so với các cây trồng khác là rất thấp. Đối với các môi ngẫu nhiên (RAPD)

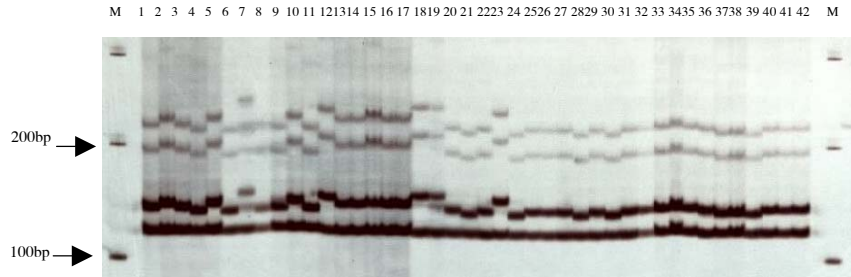
chỉ có 4,4 % cho tính đa hình [9, 20, 26], 4,1% bằng kỹ thuật AFLP [12] ; 25 % với kỹ thuật RFLP [11], và không chỉ ra một tính đa hình khi sử dụng các cặp môi SSR thiết kế trên cơ sở genome ở một số loại cây trồng khác [12]. Ngay ở Việt Nam, Bùi Văn Thắng và CS (2003) [1] đã sử dụng 82 đoạn môi RAPD mà các tác giả khác đã công bố là có tính đa hình cao ở lạc vậy mà khi dùng để phân tích với tập đoàn 33 giống lạc Việt Nam kháng bệnh rỉ sắt cũng chỉ có 11/82 đoạn môi là cho tính đa hình. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi sử dụng tất cả 23 cặp môi SSR đều có tính đa hình vì đây chính là các cặp môi SSR đã được thiết kế trên cơ sở genome của cây lạc. Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo bởi nhóm nghiên cứu của Phòng thí nghiệm hệ gen ứng dụng (Applied genomics Lab.), thuộc Viện Nghiên cứu Cây trồng

Bảng 3: Số phân đoạn AND nhân bản và giá trị PIC của tập đoàn 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt

Tên môi	Cỡ allen lý thuyết (bp)	Cỡ allen quan sát (bp)	Số allen	Giá trị PIC	Tên môi	Cỡ allen lý thuyết (bp)	Cỡ allen quan sát (bp)	Số allen	Giá trị PIC
L45	152	152-200	6	0.588	L43	262	270-300	4	0.510
L29	198	200-230	2	0.310	L23	290	230-270	5	0.602
L36	285	280-380	10	0.580	L25	132	120-170	6	0.501
L49	285	300-420	6	0.372	L44	238	250-300	6	0.443
L26	152	120-300	9	0.438	L35	203	220-300	7	0.559
L37	265	280-350	2	0.394	L47	292	290-300	6	0.239
L27	264	270-350	5	0.479	L33	225	220-280	4	0.522
L28	298	300-380	3	0.464	L34	230	250-300	4	0.392
L50	269	250-350	7	0.302	L31	203	200-300	8	0.511
L42	265	300-390	9	0.616	L30	194	230-290	7	0.569

L32	281	270-320	7	0.513	L38	282	260-340	8	0.399
L40	259	260-310	4	0.500					

màu Quốc tế cho vùng Nhiệt đới bán khô hạn (ICRISAT) khi phân tích đa dạng tập đoàn giống kháng bệnh héo xanh vi khuẩn và một số bệnh về lá ở lạc với các cặp môi SSR chuyên dụng cho cây lạc [4].



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt với cặp môi L25 trên gel polyarylamít (M: Thang phân tử, 1-42: thứ tự giống như trong bảng 1)

Kết quả phân nhóm

Kết quả phân tích tính đa hình ADN (sự xuất hiện hay biến mất phân đoạn ADN) của 23 cặp môi SSR với 42 giống lạc trong nghiên cứu được phân tích trong phần mềm chuyên dụng NTYSIS 2.1 để tìm ra sự sai khác giữa các giống lạc thông qua biểu đồ hình cây. Để khẳng định kết quả phân nhóm, chúng tôi đã tiến hành xác định giá trị tương quan kiểu hình theo ba phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau (phương pháp của Jaccard, của Dice và phương pháp của Sokal) với bốn kiểu phân nhóm (WPGMA, UPGMA, liên kết hoàn toàn và liên kết đơn lẻ). Biểu đồ hình cây được thiết lập dựa trên giá trị tương quan cao nhất với các giá trị khi $r > 0.9$: tương quan rất chặt; $r = 0.9 - 0.8$: tương quan chặt; $r < 0.8$ tương quan không chặt [28]. Kết quả trong phân tích đã chỉ ra hệ số tương quan theo phương pháp tính hệ số giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA là cao nhất ($r = 0.877$) so với các phương pháp khác. Kết quả phân nhóm của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt thiết lập theo hệ số

giống nhau của Jaccard với kiểu phân nhóm UPGMA đã được kiểm tra trên biểu đồ đa chiều ở hình 2 và biểu diễn theo sơ đồ hình cây ở hình 3 đều phân ra làm ba nhóm chính (các giống lạc trong các nhóm chính đều giống nhau) và có mức độ khác nhau về mặt di truyền giữa các giống là 70% (1-0,3).

Nhóm a: Bao gồm 3 giống ICGV99001, ICGV13917 và ICGV99004 có hệ số di truyền khác nhau về mặt di truyền là 75% (1-0,43). Cả ba giống đều của Spanish và có mức độ kháng khá bệnh rỉ sắt (điểm kháng bệnh từ 2 đến 2,3; bảng 1).

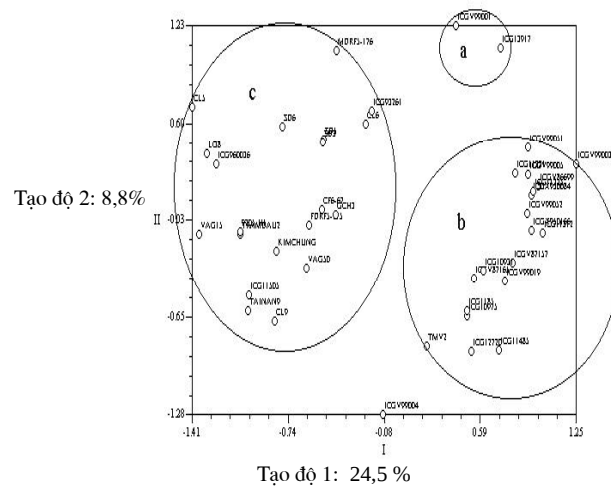
Nhóm b: Bao gồm 19 giống thuộc ba kiểu sinh thái Spanish, Valencia và Virginia có hệ số di truyền khác nhau là 60% (1-0,4). Trong nhóm này phân làm 02 nhóm phụ: nhóm 1 bao gồm 10 giống, và đều kháng với bệnh rỉ sắt (điểm kháng bệnh từ 1 đến 1,3; bảng 1); nhóm phụ 2 gồm 9 giống, trong đó 5/9 giống kháng khá với bệnh rỉ sắt (điểm kháng bệnh từ 1 đến 2,3; bảng 1). Giống TMV (giống mẫn cảm với bệnh rỉ sắt, điểm kháng bệnh là 5,7; bảng 1) cũng nằm trong nhóm này nhưng có mức độ khác nhau về di truyền với các thành viên trong nhóm là 57% (1-0,43).

Nhóm c: Bao gồm 20 giống, hầu hết các giống đều thuộc của Việt Nam, Trung Quốc, Đài Loan và Ấn Độ có mức độ khác nhau là 67% (1-0,33). Trừ giống MDRF5-176 (điểm kháng bệnh là 2, bảng 1) còn lại các giống là nhiễm với bệnh rỉ sắt (từ 3 đến 5 điểm, bảng 1).

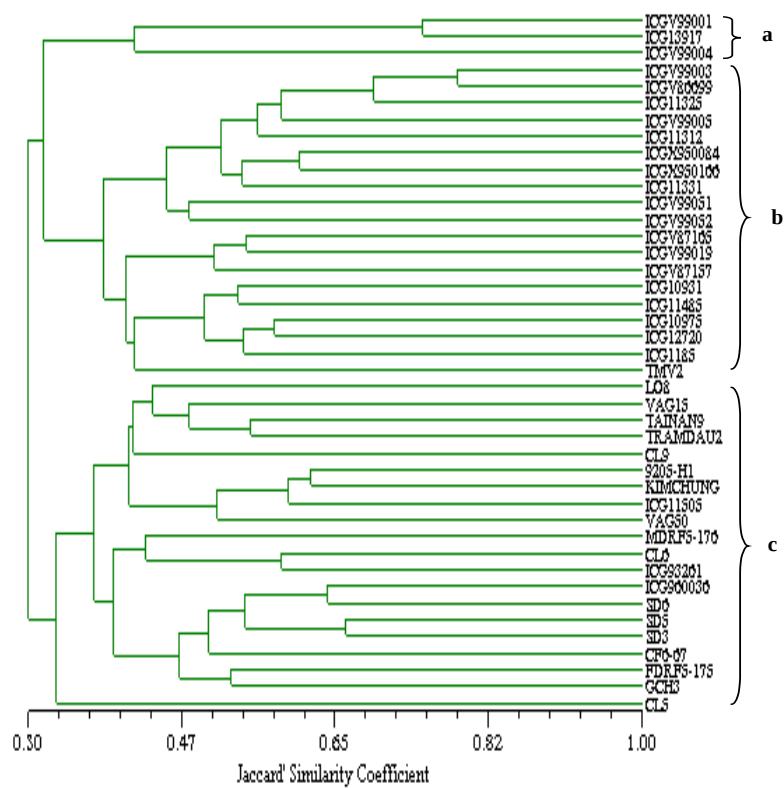
Mối liên quan giữa kiểu gen(chỉ thị SSR) và kiểu hình (điểm kháng bệnh rỉ sắt)

Để tìm ra các chỉ thị SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt, các số liệu phân tích SSR (sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn AND của 23 cặp mỗi SSR với 42 giống lạc) với tính kháng bệnh rỉ sắt của từng giống (điểm đánh giá tính kháng bệnh của từng giống) đã được phân tích trong chương trình phân mềm Genstat. Những chỉ thị được xem như là có liên quan đến tính kháng bệnh khi có giá trị $P < 0.05$. Kết quả phân tích nhận được ở bảng 4 đã chỉ ra 7 chỉ thị L26, L50, L40, L43, L44, L31 và L38 được xem như là có liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc. Trong các chỉ thị nhận biết ở đây có hai chỉ thị L43 và L38 cũng đã

Hình 2: Biểu đồ đa chiều (MDS) của 42 giống lạc kháng bệnh rỉ sắt



Hình 3: Biểu đồ hình cây của 42 giống lạc kháng/mẫn cảm với bệnh rỉ sắt theo hệ số của Jaccard và phương pháp phân nhóm UPGMA



Bảng 4. Các allen có liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

	Số vị trí của allen	Mỗi	Allele (bp)	Giá trị P
	25	L26	120	0.013
	27	L26	160	0.044
	48	L50	250	0.014
	70	L40	280	0.053
	73	L43	280	0.004
	75	L43	290	0.005
	91	L44	150	0.001
	123	L31	300	0.044
được	132	L38	280	0.032

nhận biết vị trí nhờ định

vị (QTLs) trong kết quả lập bản đồ tính kháng bệnh rỉ sắt trên quần thể F7 lai giữa giống kháng và giống nhiễm (số liệu chưa công bố). Tuy nhiên để xác định sự liên kết thực sự giữa kiểu gen (SSR) và kiểu hình (bệnh rỉ sắt) cần phải có thêm các nghiên cứu ở mức độ chính xác hơn như lập bản đồ liên kết phân tử và kiểm tra thực tiễn tính kháng bệnh của các dòng trên đồng ruộng.

Tương tự như phương pháp nghiên cứu của chúng tôi, Sun và CS (2003)[9] cũng đã sử dụng 160 đoạn môi RAPD để phân tích tính đa dạng ADN của 35 giống lúa mì kháng bệnh *FHB* (*Fusarium head blight*) và cũng đã phát hiện ra 03 chỉ thị RAPD liên quan đến tính kháng bệnh *FHB*. Hiện nay 3 chỉ thị RAPD này đang được sử dụng rất có hiệu quả trong phát hiện sớm các dòng/giống lúa mì có tính kháng bệnh *FHB*. Từ các kết quả nhận được trong nghiên cứu này có thể triển khai áp dụng để nhận biết chỉ thị liên quan đến một số tính trạng nông học quan trọng ở các loại cây trồng khác.

4. KẾT LUẬN

1. Tất cả hai mươi ba cặp môi SSR đều cho đa hình với giá trị PIC từ 0,2 đến 0,6 khi phân tích với tập đoàn 42 giống lạc Việt Nam có tính kháng khác nhau đối với bệnh rỉ sắt. Trong đó 12/23 (52%) cặp môi SSR là cho đa hình phong phú nhất với giá trị $PIC \geq 0.5$.

2. Tổng số 139 allen đã được nhân bản. Trung bình số allen được nhân bản là 6,04/locút. Khoảng cách khác nhau về mặt di truyền nhiều nhất giữa các giống là 70% (1-0,3).
3. Các cặp môi L26, L40, L50, L43, L41, L31 và L38 có thể sử dụng để kiểm tra trong nghiên cứu lập bản đồ tính kháng bệnh rỉ sắt.

Tài liệu tham khảo

1. A.K. Singh, K. Mehan, S.N - *Information Bulletin No 50*(1997), ICRISAT.
2. B.S. Weir - *Methods for discrete genetic data*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. Mass. (1990) 125.
3. Bùi Văn Thắng, Trần Văn Dương, Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Thắng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình - *Báo cáo khoa học*, Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội (2003) 805-809.
4. F.J. Rohlf - *Applied Biostatistics Inc.*, New York (2000).
5. FAO (2002) <http://www.fao.org>.
6. G. He, C.S. Prakash - *Euphitica* 97 (1997)143-149.
7. G. He, C.S. Prakash- *Genetic Resources And Crop Evolution* 48 (2001) 347-352.
8. G. He, R. Meng, M. Newman, G. Gao, R.N. Pittman, C.S. Prakash - *BMC Plant Biology* 3 (2003) 3-9.
9. G. Sun, M. Bond, H. Nass, R. Martin, Z. Dong -*Theor. Appl. Genet* 106(2003) 1059-1067.
10. G..N. Lance, W.T. Williams - *Computer J* 9 (1967) 373-380.
11. G.M. Kolodny - *Anal. Biochem* 138(1) (1984) 66-67.
12. J. Rongwen, M.S. Akkaya, A.A. Bhagwat, U. Lavi, P.B. Cregan - *Theor. Appl. Genet* 90(1995) 43-48.
13. J.B. Kruskal, M. Wish - *Multidimensional Scaling*. Sage, Newbury Park (1978).
14. K. Paramasivam, M. Jayasekhar, R. Rajasekharan - *Madras Agricultural Journal* 77(1990) 50-52.

15. L.R. Dice - *Ecology* 26(1945) 297-302.
16. M. Egnin - Protocol of DNA isolation. Plant biotechnology lab. Milbank Hall RM 104 (1996).
17. M. Litt, J.A. Luty - *Am J Hum Genet* 44(1989) 397-401.
18. M. Mohan, S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishma, M. Yano, C.R. Bhatia - *Mol. Breed* 3(1997) 87-103.
19. M. Nei, W.H. Li - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(1979) 5269-5273.
20. M.A. Gimenes, C.R. Lopes, J.F.M. Valls - *Genetics and Molecular Biology* 25(3) (2002) 349-353.
21. M.E. Ferguson, M. Burow, S. Schultz, P. Bramel, A. Paterson – *Euphytica*, Submitted (2003).
22. M.S. Hopkins, A.M. Casa, T. Wang, S.E. Mitchell, R.E. Dean - *Crop Sci.* 39 (1999) 1243-1247.
23. O.G Paik-Ro, R.L. Smith, D.A. Knauff - *Threo Appl Gene* 85(1992) 550-560.
24. P. Jaccard - *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44(1908) 223-270.
25. P.G. Lanham, S. Fennell, J.P. Moss, W. Powel - *Genome* 35(1992) 885-889.
26. P.H. Sneath, R.R. Sokal - *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Co. San Francisco (1973) 573.
27. R.R. Sokal, C.D. Michener - *Univ Kansas Sci Bull* 38(1958) 1409-1438.
28. S.L. Dwivedi, J.H. Crouch - Proceeding of a Workshop for the Asian Development Bank supported Project on molecular breeding of sorghum, groundnut and chickpea, ICRISAT(2003) 28-43.
29. S.L. Dwivedi, S. Gurtu, S. Chandra, W. Yuejin W, S.N Nigam - *Plant breeding* 120 (2001) 345-349.
30. T. Halward, H.T. Stalker, G. Korchert - *Plant Mol. Bio* 18 (1992) 315-325.
31. T. Halward, H.T. Stalker, G. Korchert - *Theor Appl Genet* 87 (1993) 379-384.

32. T. Panaud, O.X. Chen, S.R. McCouch - *Mol. Gen. Genet* 252(1996) 597-607.
33. T.M. Halward, H.T. Stalker, E. LaRue, G. Kochert - *Genome* 34 (1991) 1013-1020.
34. V. Subramanian, S. Gurtu, R.C.N. Rao, S.N. Nigam - *Genome* 43(2000) 656-660.

III.4. Đánh giá quan hệ di truyền các giống lạc để chọn các cặp lai phù hợp bằng chỉ thị phân tử.

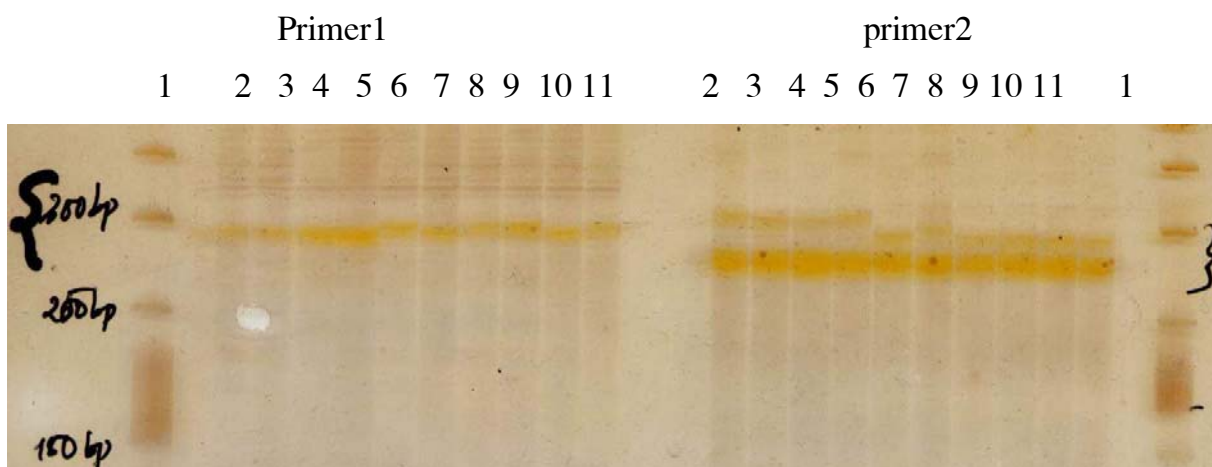
1. Nguyên liệu: là 10 giống lạc ICG11505 kháng héo xanh, ICG950166 kháng gỉ sắt, ICG99051 kháng vừa gỉ sắt, L12 năng suất và chất lượng, L08 năng suất và chất lượng, GNQ kháng héo xanh, ICG87165 kháng gỉ sắt, ICG99005 kháng gỉ sắt và V79, TMV2 nhiễm gỉ sắt.

Sử dụng 22 chỉ thị SSR để phân tích.

2. Phương pháp (giống như phần III).

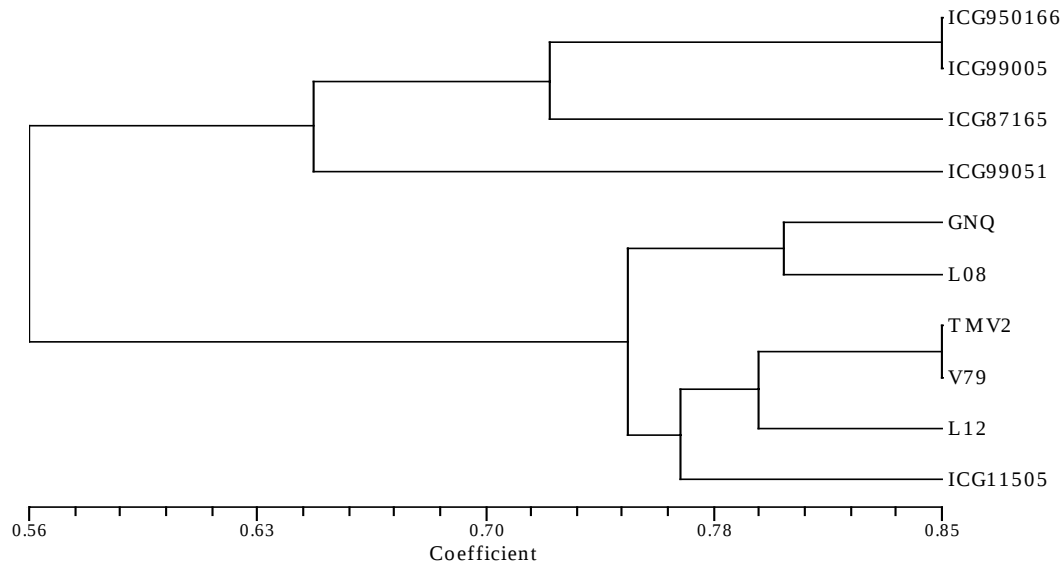
3. Kết quả và thảo luận

Sử dụng 22 cặp mồi SSR phân tích tính đa hình ADN 6 giống lạc sử dụng làm bố mẹ cặp lai. Kết quả thu được 60 phân đoạn ADN, trong đó tổng số phân đoạn đa hình 51 phân đoạn chiếm 85%.



Hình 1: ảnh điện di trên gel acrylamid 6% với primer1 và primer 2 (1: Maker100bp; 2: ICG950166; 3: ICG99051; 4: ICG87165; 5: ICG99005; 6: GNQ; 7:TMV2; 8: L08; 9: V79; 10: L12; 11: ICG11505)

Phân tích số liệu bằng phần mềm NTSYS 2.0 thu được sơ đồ hình cây phát sinh của 10 giống lạc nghiên cứu. Giữa các giống có hệ số di truyền sai khác từ 15% đến 44%



hình5: sơ đồ hình cây của 5 tổ hợp lai

4. Kết luận và kiến nghị

Bảng 22 chỉ thị SSR đã đánh giá được mức độ đa dạng về di truyền của 10 giống lạc. Với 60 phân đoạn ADN thu được, xử lý bằng chương trình phần mềm chuyên dụng đã chỉ ra được giá trị khác nhau về hệ số di truyền giữa các giống nghiên cứu từ 15% đến 44%.

Từ kết quả nghiên cứu, bước đầu chúng tôi có thể lựa chọn các cặp lai sau, theo hướng kháng gỉ sắt và héo xanh.

ICG11505 (kháng vừa héo xanh) x L12 (NS+CL)

ICG950166 (Kháng rỉ sắt) x L12 (NS+CL)

L12 x ICG950166 (Kháng rỉ sắt)

L08 x ICG99051(Kháng rỉ sắt)

III.5. Sử dụng chỉ thị SSR để Sàng lọc sớm các dòng lạc kháng bệnh gỉ sắt quần thể lạc tự thụ F3 của cặp lai ICG950166 x L12.

1. Nguyên liệu

Dòng ICG950166 có nguồn gốc ICRISAT, mang gen kháng bệnh gỉ sắt.

Dòng L12 có nguồn gốc ở Trung Quốc, năng suất cao và chất lượng.

Các dòng con lai tự thụ F3 của cặp bố mẹ ICG950166 x L12 gồm 51 dòng do Viện khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Để tiện sử dụng trong thí nghiệm chúng tôi ký hiệu các giống trong dòng lai F3 là : B. Tên số do Viện khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam đánh số ký hiệu gồm các dòng:

B24, B37, B38, B40, B41, B46, B47, B48, B53, B54, B59, B60, B63, B65, B67, B71, B72, B100, B108, B3, B4, B6, B7, B8, B12, B13, B17, B20, B21, B22, B23, B27, B32, B43, B45, B52, B55, B58, B61, B103, B105, B107, B110, B11, B32, B34, B35, B44, B106, B111.

Trong thí nghiệm này sử dụng 14 chỉ thị SSRs để nghiên cứu sàng lọc sớm các dòng con lai mang chỉ thị kháng bệnh.

Bảng 1: Các cặp môi dùng trong thí nghiệm SSR gồm 14 cặp môi có liên quan đến kháng bệnh gỉ sắt

STT	Tên môi	Nhiệt độ bắt môi (°C)	KTPT trên lý thuyết A/B (bp)
1	L23	57	289 / 292
2	L26	58	120 - 300
3	L28	58	301 / 298
4	L31	62	200 - 300
5	L32	60	264 / 274
6	L36	59	289 / 292
7	L37	58	262 / 259
8	L38	64	267 / 270
9	L40	58	256 / 262
10	L43	58	265 / 263
11	L44	64	250 -300
12	L50	60	262 / 266
13	L52	60	350 / 352
14	L54	60	310 /305

Chú ý: A là mẹ .B là bố của cặp lai ICG950166 x L12. KTPT: Kích thước phân tích trên lý thuyết A/B (bp)

2. Phương pháp

* Tách chiết AND, phản ứng PCR, điện di và nhuộm bạc như mục II

* Sàng lọc tính đa hình của bố mẹ cặp lai

* Sử dụng 14 môi đặc hiệu SSRs để chạy PCR trên mẫu ADN bố mẹ cặp lai (ICG950166 x L12), sàng lọc các chỉ thị đa hình.

*** Phân tích số liệu SSRs**

Dựa vào ảnh điện di sản phẩm PCR và sự xuất hiện các băng SSR với các chỉ thị để làm cơ sở cho việc phân tích số liệu:

Tiêu chuẩn hoá sản phẩm PCR:

A: Xuất hiện băng SSR tương đồng dòng mẹ.

B: Xuất hiện băng SSR tương đồng dòng bố.

H: Dị hợp tử.

U: Không giống cả dòng mẹ và dòng bố.

3. Kết quả nghiên cứu

* phân tích sự đa hình của bố và mẹ cặp lai với các cặp môi SSR liên quan tính kháng bệnh gỉ sắt ở lạc.

Trước khi tiến hành sàng lọc 51 dòng lạc lai tự thụ F3 mang chỉ thị tính kháng bệnh gỉ sắt thông qua phân tích các chỉ thị SSR, chúng tôi đã tiến hành phân tích tính đa hình của giống ICG950166 (mang chỉ thị kháng bệnh gỉ sắt) và giống L12 (không mang chỉ thị kháng bệnh gỉ sắt) với 8 cặp môi SSR đã được xác định là có liên kết với tính kháng bệnh gỉ sắt ở lạc.

Tính đa hình của giống ICG950166 và giống L12 được thể hiện ở sự khác nhau về kích thước phân đoạn ADN khi phân tích với các cặp môi SSR trên gel 0,6% polyacryamid. Kết quả điện di sản phẩm PCR của hai giống ICG950166 và L12 với 8 cặp môi SSR thì chỉ tìm thấy 4 cặp môi L32, L38, L52 và L54 là chỉ ra tính đa hình giữa hai giống bố mẹ cặp lai ICG950166 x L12 (Hình 1 và Bảng 2).

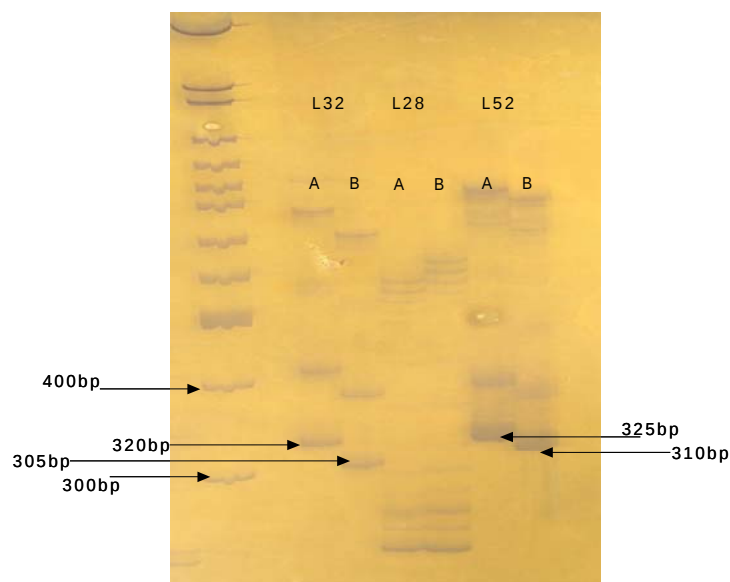
Bảng 2: Kết quả sàng lọc tính đa hình của giống ICG950166 và L12 với 8 cặp môi

STT	Tên môi	Nhiệt độ bắt mồi (^o C)	Kích thước phân đoạn ADN lý thuyết của A/B (bp)	Kết quả phân tích đa hình	Kích thước phân đoạn ADN quan sát A/B (bp)
1	L23	57	289 / 292	-	
2	L28	58	301 / 298	-	
3	L32	60	264 / 274	+	320 / 305
4	L36	59	289 / 292	-	
5	L38	64	260 / 265	+	260 / 265
6	L43	58	265 / 263	-	
7	L52	60	350 / 352	+	335 / 310
8	L54	60	310 / 300	+	310 / 300

Chú ý: A: Giống ICG950166 và B: giống L12

“+” là cho kết quả đa hình của cặp lai ICG950166 x L12 với cặp mỗi SSR.

“-” cho kết quả không đa hình của lai ICG950166 x L12 với cặp mỗi SSR.



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR của giống ICG950166 và L12 với các cặp mỗi liên quan đến tính kháng bệnh gỉ sắt ở lạc.

Ghi chú: M: marker 100 bp, A: giống ICG950166, B: giống L12. Mũi tên : chỉ phân đoạn ADN được phân tích.

Quan sát kích thước các phân đoạn ADN nhận được khi điện di sản phẩm PCR trên gel 0,6 % polyacryamid đối với giống ICG950166 và L12, chúng tôi nhận thấy chỉ có 2 cặp mỗi L38 và L54 là có kích thước của các chỉ thị được nhận bản đúng bằng với kích thước của lý thuyết (Bảng 2). Cụ thể độ dài phân đoạn ADN được nhận bản của hai giống bố mẹ với 4 cặp mỗi SSR như sau:

Với cặp mỗi L32: kích thước phân đoạn ADN là 320 bp đối với giống ICG960166 và 305 bp đối với giống L12.

Cặp mỗi L38: kích thước phân đoạn ADN là 265 bp đối với giống ICG950166 và 270 bp đối với giống L12.

Cặp mỗi L52: kích thước phân đoạn ADN là 335 bp đối với giống ICG950166 và 310 bp đối với giống L12.

Cặp môi L54: kích thước phân đoạn ADN là 310 bp đối với giống ICG950166 và 300 bp đối với giống L12.

Từ kết quả phân tích tính đa hình giữa hai giống bố mẹ của cặp lai ICG950166 và L12 trên đây, bốn cặp môi này được sử dụng cho phân tích với 51 dòng lạc lai tự thụ F3 để sàng lọc ra các dòng mang chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh gỉ sắt ở lạc.

* Kết quả sàng lọc tính kháng bệnh gỉ sắt của 51 dòng lạc tự Thụ F3 cặp lai ICG950166 x L12 với bốn cặp môi liên quan.

Chỉ thị SSR là chỉ thị đồng trội, vì vậy thông qua kết quả phân tích hình ảnh trên gel polyacryamid phát hiện chính xác các dòng mang chỉ thị giống mẹ (ICG950166) kháng bệnh gỉ sắt. Các dòng chỉ mang chỉ thị của bố (L12) sẽ không kháng bệnh gỉ sắt. Các dòng cùng mang cả chỉ thị của bố và mẹ (dị hợp tử) thì tính kháng bệnh cũng sẽ tốt hơn so với giống bố và các dòng không mang chỉ thị của cả bố và mẹ thì sẽ có phản ứng khác nhau với bệnh gỉ sắt.

ADN của 51 dòng lạc tự thụ F3 giống ICG950166 và giống L12 đã được sử dụng để phân tích với bốn cặp môi L32, L34, L52 và L54. Xác định sự có mặt của các chỉ thị liên quan bằng việc phân tích sản phẩm PCR trên gel 0,6% polyacryamid.

* Tổng hợp kết quả sàng lọc tính kháng bệnh gỉ sắt 51 dòng lạc F3 của cặp lai ICG950166 x L12.

Bảng 3 là tổng hợp kết quả sàng lọc tính kháng bệnh gỉ sắt của 51 dòng lạc tự thụ F3 với bốn cặp môi L32, L38, L52 và L54 đã được xác định là có liên kết với các gen liên kết tính kháng bệnh gỉ sắt. Kết quả như sau:

- 13 dòng lạc có ký hiệu là B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110 đều mang chỉ thị của mẹ (ICG950166) khi phân tích với hai cặp môi L38 và L54 (Hình 2).
- Bốn dòng lạc có ký hiệu là B46, B48, B17 và B27 mang chỉ thị của mẹ khi phân tích với cặp môi L32.
- Không có một dòng lạc nào là mang chỉ thị của mẹ khi phân tích với cặp môi L52.

Như vậy, thông qua phân tích phân tử chúng tôi đã chọn ra được 13 dòng B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110 được xem như là các dòng lạc có tính kháng tốt với bệnh gỉ sắt. Các dòng lạc dị hợp tử cũng sẽ có tính kháng bệnh khá hơn so với giống L12.

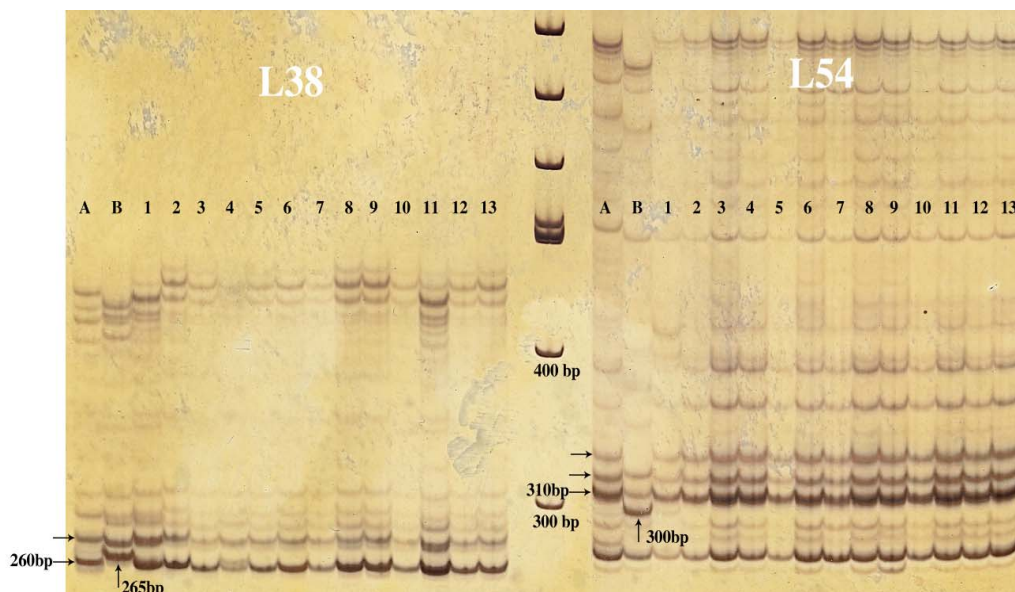
Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn tính kháng với bệnh gỉ sắt của các dòng lạc này thì cần phải kiểm chứng thông qua kết quả đánh giá kiểu hình tính kháng. Qua kết quả đánh giá đời 1 của Bộ môn miễn dịch học – Viện KHKTNN Việt Nam thì cả 13 dòng (B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110) đều có tính kháng cao với bệnh gỉ sắt.

Nhưng kết quả nhận được trong nghiên cứu này sẽ là những cơ sở cho việc áp dụng kỹ thuật chọn giống nhờ sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử (MAS) trong chọn tạo giống lạc năng suất chất lượng và kháng bệnh gỉ sắt.

Bảng 3: Tổng hợp kết quả sàng lọc phân tử của các dòng lạc F3 với bốn cặp môi liên quan tính kháng bệnh gỉ sắt ở lạc.

TT	Tên dòng	Tên cặp mỗi SSR				TT	Tên dòng	Tên cặp mỗi SSR			
		L38	L54	L32	L52			L38	L54	L32	L52
1	B24	A	A	U	B	27	B13	B	B	H	B
2	B37	A	A	U	B	28	B17	B	A	A	H
3	B38	B	A	B	B	29	B20	B	H	H	H
4	B40	A	B	H	B	30	B21	A	A	H	H
5	B41	A	A	H	B	31	B22	H	B	H	H
6	B46	A	A	A	H	32	B23	B	B	B	B
7	B47	B	B	B	B	33	B27	B	B	H	H
8	B48	H	B	A	B	34	B32	H	B	B	H
9	B53	B	B	B	B	35	B43	A	B	B	H
10	B54	H	B	B	B	36	B45	A	B	B	H
11	B59	H	B	H	B	37	B52	B	A	B	H
12	B60	A	A	H	H	38	B55	A	B	B	H
13	B63	A	H	H	B	39	B58	A	B	B	H
14	B65	H	H	H	B	40	B61	B	A	B	H
15	B67	B	B	B	B	41	B103	B	U	B	B
16	B71	B	B	B	B	42	B105	B	B	B	H
17	B72	A	B	H	B	43	B107	B	B	H	H
18	B100	H	B	H	B	44	B110	A	A	H	B
19	B102	A	A	H	B	45	B11	B	B	B	B
20	B108	A	A	H	B	46	B32	B	B	B	B
21	B3	A	A	H	B	47	B34	B	A	U	B
22	B4	A	B	H	B	48	B35	B	B	B	H
23	B6	A	A	B	B	49	B44	B	A	B	H
24	B7	A	A	U	B	50	B106	B	A	B	B
25	B8	B	B	B	B	51	B111	B	A	B	H
26	B12	A	A	H	B						

Ghi chú: A: mang chỉ thị của mẹ (giống ICG950166); B: mang chỉ thị của bố (giống L12); H: dị hợp tử; U: không mang chỉ thị của cả mẹ và bố.



Hình 2: 13 dòng lạc F3 mang chỉ thị SSR liên quan tính kháng bệnh gỉ sắt phân tích với mỗi L38 và L54.

Ghi chú: M là marker 100bp; A là giống ICG950166; B là giống L12; số thứ tự 1-13 tương ứng với các dòng B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21, B110 và dấu mũi tên chỉ tại phân đoạn ADN quan tâm.

4. Kết luận và đề nghị

Trong số 8 cặp mỗi SSR đã tìm thấy 4 cặp mỗi L32, L38, L52 và L54 cho tính đa hình giữa giống lạc sử dụng làm mẹ và giống lạc dùng làm bố của cặp lai ICG950166 và L12. Chỉ có cặp mỗi L38 và L54 là có kích thước của các chỉ thị tìm thấy đúng bằng với kích thước của lý thuyết.

Trong số 51 dòng lạc F3 cặp lai ICG950166 x L12 đã sàng lọc được 13 dòng B24, B37, B41, B46, B60, B102, B108, B3, B6, B7, B12, B21 và B110 có sự xuất hiện chỉ thị đặc trưng liên kết với tính kháng bệnh gỉ sắt ở cả hai cặp mỗi L38 với kích thước phân đoạn ADN là 265 bp và 310 bp đối với cặp mỗi L54.

Đánh giá kiểu hình tính kháng bệnh của 13 dòng lạc đã được xác định có mang các chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh gỉ sắt ở lạc.

5. Tài liệu tham khảo

Lê Thị Ánh Hồng (2002), *Bệnh học phân tử thực vật*, Nxb Nông Nghiệp, Hà Nội.

Bromfield K.R., Bail W.K. (1972), “Inheritance of resistance to *Puccinia arachidis* in peanut”, *Phytopathology*, 62, p. 748.

Brown S. M., Kresovich S. (1996), “Molecular characterization for plant genetic resources conservation”, *Genome mapping in plants*, pp. 85-93.

Carlos Ruiz, Breto M.P., Asíns M. J. (2000), “A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers”, *Euphytica*, 112, pp. 89-94.

Gupta P.K., Balyan H. S., Sharma P. C., Ramesh B. (1996), “Microsatellites in plants: A new class of molecular markers”, *Current science*, Vol.70, No.1, pp. 45-53.

Hang N., Angeles E.R., Domingo J., Magpantay G., Singh S., Zhang G., Kumaravadivel N., Bennett J., Khush G. S. (1997), “Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using AFLP and PCA”, *Theor. Appl. Genet*, 95, pp. 313-320.

Inukai T., Zeigler R. S., Sarkarung S., Bronson M., Dung M., Kimoshita T., Nelson R. J. (1996), “Development of pre-isogenic lines for rice blast resistance by

marker-aided selection from a recombinant inbred population”, *Theor. Appl. Gent*, 93, pp. 560-567.

Maughan P. J., Maroof M. A. S., Buss G. R. (1996), “Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance and near-isogenic line analysis”, *Theor. Appl. Gent*, 93, pp. 392 - 401.

Singh A. K., Mehan V. K., Nigam S. N. (1997), “Sources of resistance to groundnut fungal and bacterial diseases an update and appraisa”, *Information Bulltetin*, ICRISAT, India, No. 50.