

## ĐÁNH GIÁ SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA 50 GIỐNG ĐẬU TƯƠNG VIỆT NAM CÓ PHẢN ỨNG KHÁC NHAU ĐỐI VỚI BỆNH GỈ SẮT BẰNG CHỈ THỊ SSR

Vũ Thanh Trà<sup>1\*</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1</sup>, Trần Thị Phương Liên<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup>Đại học Thái Nguyên, <sup>(\*)</sup>travuthanh@gmail.com

<sup>(2)</sup>Viện Công nghệ sinh học

**TÓM TẮT:** SSR (trình tự lặp lại đơn giản) là chỉ thị cho tính đa hình cao và ổn định, được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sự đa dạng di truyền của thực vật. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả sử dụng 15 cặp mồi SSR để phân tích sự đa dạng di truyền của 50 giống đậu tương có phản ứng khác nhau với bệnh gỉ sắt và đã xác định 14 cặp mồi cho thấy đa hình. Có 81 alen đã được khuếch đại, các alen được nhân bản với mỗi cặp mồi SSR dao động 4-8. Hàm lượng thông tin đa hình dao động từ 0,473 (Satt042) đến 0,798 (Satt175). Trong 15 cặp mồi SSR, 10 cặp mồi có biểu hiện đa hình cao với hàm lượng thông tin đa hình có giá trị PIC  $\geq 0,7$ . Các giống đậu tương nghiên cứu được phân thành hai nhóm rõ rệt: nhóm I chủ yếu gồm các giống mẫn cảm với bệnh gỉ sắt, nhóm II gồm các giống kháng bệnh và trung gian. Khoảng cách di truyền giữa hai nhóm là 29%. Thông tin này là cơ sở để lựa chọn các giống đậu tương có khả năng chống gỉ sắt để sản xuất, đồng thời cũng là cơ sở cho việc lựa chọn giống với sự khác biệt di truyền để phục vụ chọn tạo giống đậu tương.

*Từ khóa:* Bệnh gỉ sắt, chỉ thị SSR, đa dạng di truyền, giống đậu tương.

### MỞ ĐẦU

Đậu tương (*Glycine max* L.) là một cây công nghiệp ngắn ngày, được thuần hóa từ đậu tương hoang dại *Glycine* và *Zucc* ở Đông Á. Đậu tương là một trong 4 loại cây trồng chính (lúa mì, lúa nước, ngô, đậu tương) phát triển rộng khắp trên các châu lục vì còn là cây thực phẩm có hiệu quả kinh tế lại dễ trồng. Sản phẩm từ cây đậu tương được sử dụng rất đa dạng như dùng trực tiếp hạt thô hoặc chế biến thành phẩm, đáp ứng nhu cầu đạm trong khẩu phần ăn hàng ngày của người cũng như gia súc. Ngoài ra, trồng cây đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất, giúp tăng năng suất các cây trồng khác. Đậu tương được coi là cây trồng chiến lược trong cơ cấu cây trồng nông nghiệp ở nước ta. Tuy nhiên, việc sản xuất đậu tương ở Việt Nam còn gặp nhiều khó khăn do những hạn chế về giống kháng bệnh và điều kiện canh tác, phương pháp chọn giống truyền thống dựa vào các tính trạng hình thái và nông học tuy đơn giản hơn nhưng có nhiều nhược điểm như biểu hiện kiểu hình bị chi phối bởi môi trường, giai đoạn sinh trưởng, phát triển của cây và thậm chí bởi tính chủ quan của chính người tiến hành thí nghiệm, tốn nhiều thời gian và công sức, nhưng hiệu quả chọn giống không cao.

Ngày nay, chỉ thị phân tử được ứng dụng rộng rãi như một công cụ hữu hiệu trong nghiên

cứu di truyền và cho phép đánh giá một số lượng lớn locus trải khắp hệ gen của nhiều loại cây trồng [4, 11]. Những thông tin về sự đa dạng di truyền ở mức độ DNA có thể phát hiện được sự khác biệt nhỏ nhất giữa các giống, điều này giúp nhận dạng những giống quý, hiếm trong các tập đoàn cây trồng trồng một cách nhanh chóng và chính xác. Kỹ thuật DNA fingerprinting đã được áp dụng để nhận dạng và phân biệt giống ở hơn 30 loại cây trồng khác nhau như cam chanh (*Citrus* spp.), chuối (*Musa* spp.), lúa mì (*Triticum* spp.), dâu tây... [3, 14].

Trong các chỉ thị phân tử như RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), chỉ thị SSR (Simple Sequence Repeat) là chỉ thị đồng trội cho đa hình cao và ổn định, được sử dụng rộng rãi và hiệu quả trong nghiên cứu cấu trúc di truyền, nghiên cứu quá trình tiến hóa, làm rõ độ thuần của vật liệu tạo giống. Trong những năm gần đây, các công trình sử dụng chỉ thị SSR trong nghiên cứu tính đa dạng di truyền của cây đậu tương [1, 5, 6, 7, 12, 15, 16], phân tích sự đa dạng của cây lạc nhiễm bệnh gỉ sắt, cây lạc với bệnh héo xanh vi khuẩn [8, 9, 10, 13] đã được công bố.

Việc nghiên cứu sự đa dạng di truyền tập

đoàn đậu tương có phản ứng khác nhau đối với bệnh gỉ sắt không chỉ có ý nghĩa trong việc bảo tồn các giống đậu tương có khả năng kháng bệnh mà còn có ý nghĩa quan trọng trong công tác chọn tạo giống có chất lượng cao. Trong nghiên cứu này, chỉ thị SSR được sử dụng để nghiên cứu sự đa dạng di truyền và lập tiêu bản DNA của 50 giống đậu tương Việt Nam có phản ứng khác nhau đối với bệnh gỉ sắt, cung cấp thông tin cho công tác bảo tồn và chọn tạo giống đậu tương.

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng 50 giống đậu tương Việt Nam do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ và Viện Di truyền Nông nghiệp thuộc Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp làm vật liệu nghiên cứu. Các giống đậu tương đã được xác định tính kháng bệnh và chia làm 3 nhóm có phản ứng khác nhau đối với bệnh gỉ sắt: nhóm miễn cảm (không có khả năng chống chịu) với bệnh gỉ sắt bao gồm 25 giống: DT12, VX92, VX93, V74, V79, DH4, CV, CV1, ĐK, CĐ, CB7, QHCB, LVG, TTHT, DBBT, DTBT, MT2, HG1, HTĐT, MD, DL, MH, ND, CLGL, HN; nhóm trung gian được xác định và mô tả dựa trên thời gian ủ bệnh và số lượng cụm hạ bào tử có trong một thương tổn bao gồm 12 giống: M103, DT96, PHCB, PS, PT, NS, MT1, HG2, VK2, CT2, VK3, CT1 và nhóm kháng bệnh có khả năng cho năng suất tương đối của cây dưới áp lực của bệnh gỉ sắt bao gồm 13 giống: Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp4, DT2000, CBU8325, DT95, MTD65, CNB, PMTQ, HSP2, HSPHG, ZG.

Tách chiết DNA tổng số từ mầm của các giống đậu tương nghiên cứu theo phương pháp CTAB có cải tiến. Kiểm tra độ sạch và hàm lượng DNA bằng đo quang phổ hấp thụ kết hợp với điện di trên gel agarose 0,8%. Hỗn hợp PCR có thể tích 25  $\mu$ l, bao gồm dung dịch đệm PCR 1X; 2,5 mM  $MgCl_2$ ; 2 mM dNTPs; 200 nM đoạn mồi; 0,5 đơn vị *Taq* polymerase và 10 ng DNA khuôn. Phản ứng PCR thực hiện trong máy PCR - Thermal Cycler. Sản phẩm của phản ứng SSR được điện di trên gel polyacrylamide 15%, gel được nhuộm bạc theo phương thức hiện đại và chụp ảnh. Các băng trên gel được mã hóa số liệu theo bảng mã nhị phân với quy ước không có băng đánh số 0, mẫu nào có băng

đánh số 1.

Hệ số tương đồng di truyền Jaccard và phương pháp UPGMA trong NTSYSpc phiên bản 2.1 được sử dụng để phân tích, đánh giá sự đa dạng di truyền, thiết lập sơ đồ hình cây và phân tích tọa độ chính. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC - Polymorphic Information Content) cho mỗi locut chỉ thị SSR được tính theo công thức:  $PIC(i) = 1 - \sum P_{ij}^2$  trong đó,  $P_{ij}$  là tần suất allel thứ j ở locut SSR thứ i [2].

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Đa dạng di truyền 50 giống đậu tương bằng chỉ thị SSR

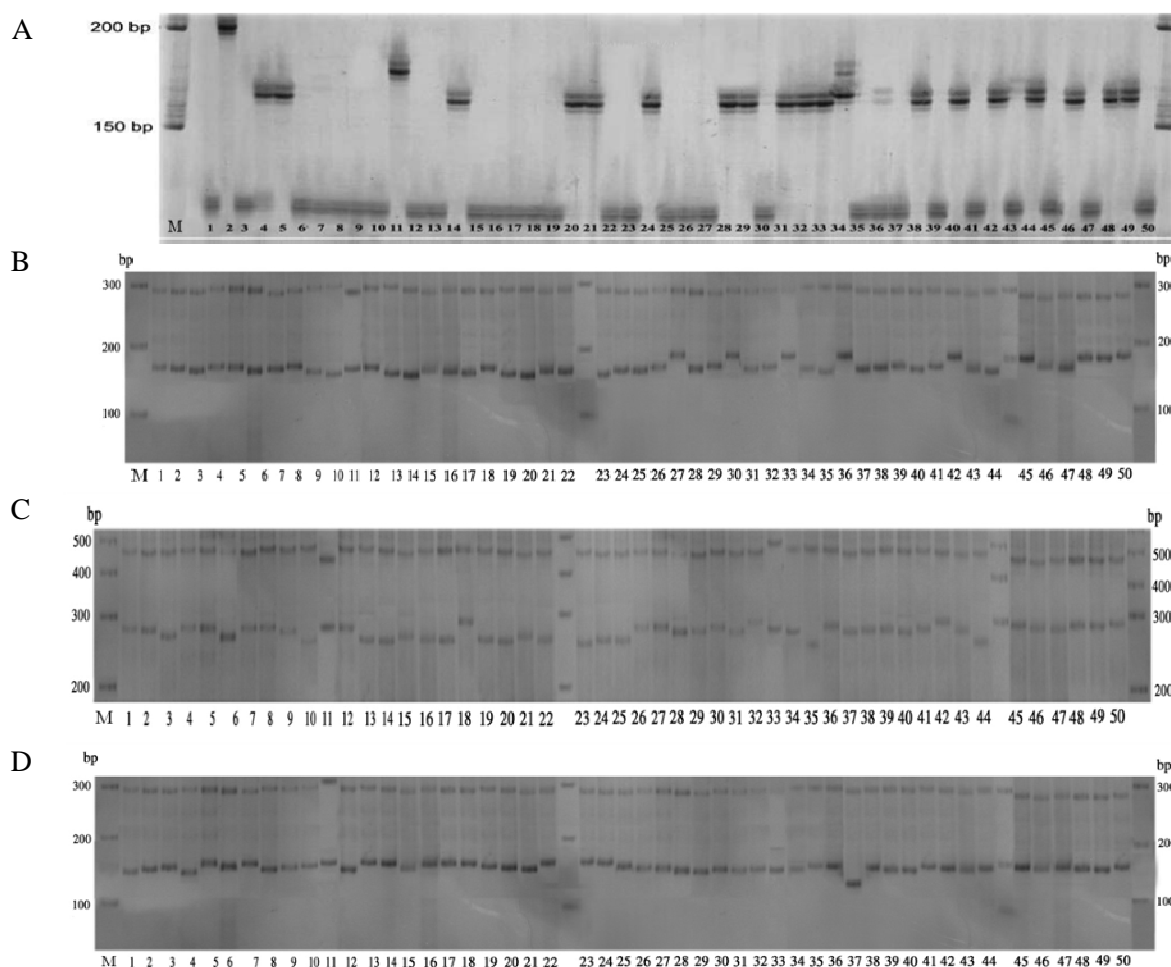
Phân tích hình ảnh điện di sản phẩm SSR của 15 cặp mồi (hình 1A, 1B, 1C, 1D) cho kết quả là, trong số 15 chỉ thị SSR sử dụng để phân tích sự đa dạng di truyền của 50 giống đậu tương thì có 14 chỉ thị cho sự đa dạng di truyền giữa các giống, riêng chỉ thị Satt460 cho kết quả không đa hình.

Thống kê các phân đoạn DNA được nhân bản đã phát hiện được 81 allel tại 14 locut. Số allel đa hình tại mỗi locut biến động từ 4 đến 8 và đạt trung bình 6 allel. Chỉ thị Satt489 cho số lượng allel nhiều nhất là 8 allel. Hàm lượng thông tin đa hình của các chỉ thị SSR biến động từ 0,473 đến 0,798, đạt trung bình 0,729 (bảng 1). So sánh với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Phương Liên và nnk. (2004) [7] trên cùng đối tượng là cây đậu tương có hệ số PIC trung bình là 0,6326, cho thấy, kết quả trong nghiên cứu này cho hệ số đa dạng trung bình PIC cao hơn (0,729) và biên độ dao động của hệ số đa dạng PIC giữa các chỉ thị là tương đối hẹp (0,473 - 0,798). Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Abe et al. (2003) [1] trên tập đoàn 131 giống đậu tương từ 14 nước châu Á (hệ số đa dạng trung bình PIC = 0,782), nhưng cao hơn so với nghiên cứu của Narvel et al. (2000) [11] trên 74 giống đậu tương ở Bắc Mỹ (hệ số đa dạng trung bình PIC = 0,56).

Các giống đậu tương nghiên cứu có hệ số tương đồng di truyền dựa trên phân tích SSR dao động từ 0,65 đến 0,97 hay sự khác biệt di truyền giữa các giống là 3 - 35%. Mức đa hình cao tương ứng với độ biến động di truyền giữa các mẫu giống đậu tương, chứng tỏ sự đa dạng

di truyền tồn tại ở các mẫu giống đậu tương nghiên cứu nhưng không quá lớn. Hệ số tương đồng cao nhất được phát hiện giữa DH4 và HG1 (0,97). Mối quan hệ này được hỗ trợ bằng sơ đồ hình cây qua kết quả phân tích nhóm (hình 2). Giá trị tương đồng cao chứng tỏ sự tồn tại dòng chu chuyển gen và trao đổi nguồn gen và mức độ chọn lọc ở đậu tương khá cao. Hệ số tương

đồng thấp nhất (0,68) được xác định giữa các giống nhiễm bệnh gỉ sắt đối với các giống có phản ứng trung gian và kháng bệnh gỉ sắt. Tuy nhiên, trên cùng một nhóm nhiễm bệnh gỉ sắt được biểu hiện trên biểu đồ hình cây, giống VK2 có phản ứng trung gian với bệnh gỉ sắt nhưng lại có xu hướng nghiêng về nhóm nhiễm bệnh gỉ sắt.

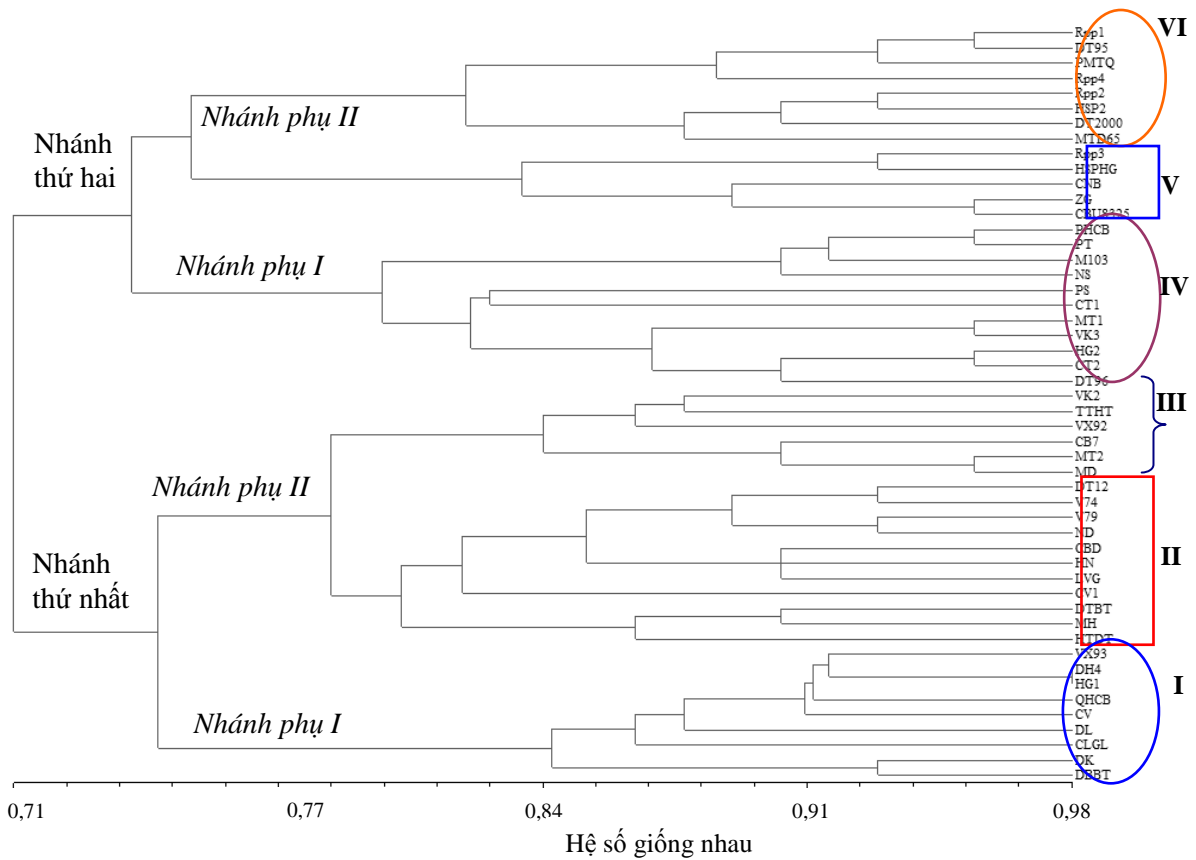


Hình 1. Các alen tại locus Satt009 (A), Satt175 (B), Satt146 (C) Satt 005 (D) của 50 giống đậu tương. M: marker phân tử; 1-50: các giống đậu tương.

Bảng 1. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) của các mồi SSR khi phân tích với 50 giống đậu tương

STT	SSR	Dạng SSR	Số alen	Hàm lượng thông tin đa hình (PIC)
1	Satt005	(ATT) <sub>19</sub>	7	0,770
2	Satt009	(ATT) <sub>14</sub>	5	0,690
3	Satt042	(ATT) <sub>27</sub>	4	0,473
4	Sat_064	(AT) <sub>34</sub>	5	0,767
5	Satt146	(ATT) <sub>17</sub>	7	0,798

6	Sct_187	(CT) <sub>10</sub>	6	0,757
7	Satt150	(ATT) <sub>20</sub>	5	0,686
8	Satt173	(ATT) <sub>18</sub>	5	0,767
9	Satt175	(ATT) <sub>16</sub>	7	0,798
10	Satt373	(ATT) <sub>21</sub>	6	0,753
11	Satt431	(ATT) <sub>21</sub>	5	0,692
12	Satt489	(ATT) <sub>23</sub> (GTT)	8	0,784
13	Satt557	(ATT) <sub>17</sub> GAT	5	0,707
14	Satt567	(ATT) <sub>14</sub>	6	0,757
			<b>81</b>	0,729



Hình 2. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ của 50 giống đậu tương có phản ứng khác nhau với bệnh gỉ sắt dựa trên chỉ thị phân tử SSR

Phân tích sơ đồ hình cây ở hình 2 cho thấy các giống đậu tương nghiên cứu được chia thành hai nhánh rõ rệt có khoảng cách di truyền là 29% (100% - 71%). Nhánh thứ nhất, bao gồm các giống nhiễm bệnh gỉ sắt và một giống trung gian như VK2, có thể phân tiếp thành hai nhánh phụ. Nhánh phụ thứ nhất gồm 9 giống DBBT, DK, CLGL, DL, CV, QHCB, HG1, DH4 và VX93 có khoảng cách di truyền gần nhau, với hệ

số tương đồng dao động từ 0,802 đến 0,975. Các giống thuộc nhánh phụ thứ 2 bao gồm HTDT, MH, DTBT, CV1, LVG, HN, CBD, ND, V79, V74, DT12, MD, MT2, CB7, VX92, TTHT và VK2, có hệ số tương đồng từ 0,65 đến 0,95. Nhánh thứ hai bao gồm các giống kháng bệnh và các giống trung gian. Trong nhánh này, cũng có 2 nhánh phụ: nhánh phụ thứ nhất gồm các giống kháng bệnh Rpp1, DT95, PMTQ, Rpp4,

Rpp2, HSP2, DT2000, MTD65, Rpp3, HSPHG, CNB, ZG và CBU8325 với hệ số tương đồng cao nhất dao động trong khoảng 0,68 - 0,95; nhánh phụ thứ 2 gồm các giống có phản ứng trung gian đối với bệnh gỉ sắt: PHCB, PT, M103, NS, PS, CT1, MT1, VK3, HG2, CT2 và DT96 với hệ số tương đồng từ 0,75 - 0,95.

Sơ đồ hình 2 cho thấy các giống đậu tương khác nhau về mặt di truyền phân bố theo khả năng kháng bệnh gỉ sắt. Như vậy, cũng giống như các chỉ thị phân tử khác, kỹ thuật SSR cho phép xác định nhanh mối quan hệ di truyền giữa các giống tham gia thí nghiệm, điều này rất có ý nghĩa kinh tế trong việc chọn tạo giống cây trồng.

### KẾT LUẬN

Trong số 15 cặp môi SSR được dùng trong phản ứng PCR với DNA hệ gen của 50 giống đậu tương có phản ứng khác nhau với bệnh gỉ sắt, có 14 cặp môi biểu hiện tính đa hình. Đã có 81 alen được nhân bản, số lượng alen được nhân bản của mỗi cặp môi SSR dao động từ 4 đến 8. Hàm lượng thông tin đa hình dao động từ 0,473 (Satt042) đến 0,798 (Satt175). Trong 15 cặp môi có 10 cặp môi cho tính đa hình cao nhất với hàm lượng thông tin đa hình trên 0,7.

Các giống đậu tương nghiên cứu được phân bố thành hai nhánh: Nhánh I bao gồm chủ yếu các giống mẫn cảm với bệnh gỉ sắt, nhánh II có phần lớn các giống kháng bệnh gỉ sắt. Khoảng cách di truyền giữa hai nhánh là 29%. Những thông tin này làm cơ sở cho việc tuyển chọn giống đậu tương kháng bệnh gỉ sắt phục vụ sản xuất, đồng thời cũng là cơ sở cho việc lựa chọn cặp bố mẹ khác xa nhau về mặt di truyền phục vụ công tác lai tạo giống.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe J., Xu D. H., Suzuki Y., Kanazawa A., Shimamoto Y., 2003. Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. *Theor. Appl. Gener.*, 106: 445-453.
- Anderson J. A., Churchill G. A., Autrique J. E., Tanksley, S. D., and Sorrells M. E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181-186.
- Bhat K. V., 2006. DNA fingerprinting and cultivar identification. Publish online, <http://www.iasri.res.in/ebook/EBADATL:102-109>.
- Chen Y., Nelson R. L., 2005. Relationship between origin and genetic diversity in Chinese soybean germplasm. *Crop. Sci.*, 45: 1645-1652.
- Hwang T. Y., Nakamoto Y., Kono I., Enoki H., Funatsuki H., Kitamura K., Ishimoto M., 2008. Genetic diversity of cultivated and wild soybeans including Japanese elite cultivars as revealed by length polymorphism of SSR markers. *Breeding Sci.*, 58: 315-323.
- 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.
- Trần Thị Phương Liên, Lương Thị Thu Hường, 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 DT2000. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 2(1): 77-83.
- Mace E. S., Phong D. T., Upadhyaya H. D., Chandra S., Crouch J. H., 2006. SSR analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases. *Euphytica*, 152(3): 317-330.
- Mondal S., Narvel J. M., Fehr W. R., Chu W. C., Grant D., Shoemaker R. C., 2000. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introduction and elite Genotypes. *Crop. Sci.*, 40: 1452-1458.
- Lê Thị Muội, Đinh Thị Phòng, Nguyễn Thị Hải, Lê Duy Thành, Trần Văn Dương, Nguyễn Văn Thắng, 2005. Đa hình genome tập đoàn giống lạc có phản ứng khác nhau với bệnh héo xanh vi khuẩn bằng các chỉ thị SSR, những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. Trang 1321-1324.
- Narvel J. M., Fehr W. R., Chu W. C., Grant D., Shoemaker R. C., 2000. Simple sequence repeat diversity among soybean

- plant introductions and elite genotypes. *Crop. Sci.*, 40: 1452-1458.
14. Oliveira M. B., Vieira E. S., Schuster I., 2010. Construction of a molecular database for soybean cultivar identification in Brazil. *Genet. Mol. Res.*, 9(2): 705-20.
15. Đinh Thị Phòng, Chu Thị Thuý, Bùi Văn Thắng, Nguyễn Văn Thắng, Nguyễn Thị Yến, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, 2005. Nghiên cứu kỹ thuật phát hiện sớm tính kháng bệnh gỉ sắt trong các dòng lạc F3 của tổ hợp lai giữa giống ICG950166 và L12 bằng chỉ thị SSR liên kết. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 3(1): 89-98.
16. Rinehart T. A., Trigiano R. N., Mclaurin W., Knight P., 2007. The Utility of DNA Fingerprinting for Plant Patent Protection: An example for Lagerstroemia. *Southern Nursery Association Proceedings*, 51: 607-609.
17. Rodrigues D. H., Neto F. D. A., Schuster I., 2008. Identification of essentially derived soybean cultivars using microsatellite markers. *Crop Breed Appl Biotechnol*, 8: 74-78.
18. Wang K. J. and Takahata Y., 2007. A preliminary comparative evaluation of genetic diversity between Chinese and Japanese wild soybean (*Glycine soja*) germplasm pools using SSR markers. *Genet. Resour Crop. Ev.*, 54: 157-165.

## ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF 50 VIETNAMESE SOYBEAN CULTIVARS WITH DIFFERENT RESPONSE TO RUTS BY SSR MARKERS

Vu Thanh Tra<sup>1</sup>, Chu Hoang Mau<sup>1</sup>, Tran Thi Phuong Lien<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup>Thai Nguyen University

<sup>(2)</sup>Institute of Biotechnology, VAST

### SUMMARY

Simple Sequence Repeat (SSR) are the markers of high polymorphism and stability, which are widely used and effective in studying the genetic diversity of plants. In this paper we present results on the use of 15 SSR primer pairs to analyze the genetic diversity of 50 soybean cultivars having different responses to rust. 14 primer pairs showed polymorphisms. There were 81 alleles have been amplified, amplified alleles of each SSR primer pairs ranged from 4 to 8. Polymorphic information contents of used primers ranged from 0.473 (Satt042) to 0.798 (Satt175). Among 15 SSR primer pairs, 10 have high Polymorphic information content (PIC  $\geq$  0.7). The soybean cultivars were grouped into two groups: Group I included, maily soybean cultivars that are susceptible to rust, group II consisted mostly rust-resistant cultivars. Genetic distance between the two groups is 29%. This information could be used as the basis for selection of soybean cultivars resistant to rust for soybean production, as well as the basis for the selection of soybean varieties with different genetic background for soybean breeding.

*Keywords:* *Glycine max*, dendrogram, genetic diversity, ruts, SSR markers.

*Ngày nhận bài:* 23-9-2011