

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN MỘT SỐ DÒNG NGŨ BẰNG CHỈ THỊ MICROSATELLITE

Nguyễn Thị Thu¹, Ngô Anh Tuấn¹, Vũ Thị Ngọc¹, Ngô Thị Thùy Linh¹, Vương Huy Minh², Lê Thị Bích Thủy¹,✉

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Ngô

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ltbthuy@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 04.3.2016

Ngày nhận đăng: 30.3.2017

TÓM TẮT

Việc nghiên cứu đánh giá đa dạng nguồn gen cây ngô là cần thiết, là cơ sở cho các nghiên cứu chọn giống và cải tạo giống ngô. Nghiên cứu này nhằm mục đích lựa chọn cặp lai phục vụ cho việc chọn tạo giống ngô lai kháng bệnh ngô mốc hồng. Chúng tôi đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn 71 dòng/ giống ngô, sử dụng 10 chỉ thị SSR và đã thu được 42 allele, số allele trung bình là 4,2 allele/locus, số allele trên 1 locus dao động từ 3 đến 6 allele. Hàm lượng thông tin đa hình (giá trị PIC) dao động từ 0,5783 đến 0,8088; giá trị PIC trung bình là 0,6981. Trong số các cặp mỗi sử dụng, cặp mỗi Umc1196 là cho nhiều băng đa hình nhất, cặp mỗi Umc1249 cho số băng đa hình thấp nhất. Dựa trên cây phân loại di truyền chúng tôi chia 71 dòng ngô này thành 7 nhóm. Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,333 đến 0,976. Trong đó, dòng ngô H3062 có hệ số tương đồng di truyền xa nhất so với 70 dòng ngô còn lại (0,333). Dòng ngô H3062 và H84 có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất là 0,333. Hai dòng ngô có hệ số tương đồng di truyền cao nhất là H161 và KC161 (0,976). Các dòng ngô nghiên cứu có hệ số tương đồng di truyền khá cao. Điều đó chứng tỏ các dòng ngô này có quan hệ di truyền khá gần nhau.

Từ khóa: allele, chỉ thị SSR, đa dạng nguồn gen, hệ số tương đồng di truyền, ngô.

MỞ ĐẦU

Ngô (*Zea mays* L.) thuộc chi Maydeae, họ hòa thảo Gramineae, có nguồn gốc từ Trung Mỹ, là cây lương thực quan trọng trên thế giới bên cạnh lúa mì và lúa gạo. Ở Việt Nam, cây ngô là loại cây nông nghiệp có diện tích thu hoạch lớn thứ hai sau lúa gạo. Cây ngô không chỉ làm lương thực cho người, thức ăn chăn nuôi mà còn là cây góp phần xóa đói giảm nghèo phục vụ cho các ngành công nghiệp nhẹ... Năng suất cây ngô không cao, hay bị cỏ dại hoặc sâu bệnh hại tấn công. Việc tạo ra các giống ngô có năng suất cao, phẩm chất tốt, có khả năng chống chịu với các điều kiện khí hậu khắc nghiệt, sâu bệnh hại... đang được các nhà khoa học quan tâm. Phương pháp phổ biến được áp dụng để tạo ra các giống mới là lai tạo các dòng có các phẩm chất tốt với nhau tạo ưu thế lai. Để việc lai tạo này đem lại hiệu quả cao hơn, tiến hành nhanh hơn thì việc đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen của các dòng ngô là cần thiết.

Hiện nay có nhiều phương pháp để đánh giá đa dạng di truyền như SSR, RAPD, AFLP, SNP... Trong đó kỹ thuật SSR được sử dụng phổ biến và có hiệu quả cho đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen. Yao và đồng tác giả (2007) đã nghiên cứu đa dạng nguồn gen của 54 giống ngô ở phía bắc của Trung Quốc sử dụng 42 chỉ thị SSR đã tìm ra được 256 allele. Mỗi một chỉ thị cho dao động từ 2 đến 9 allele, số allele trung bình là 6,1 allele. Legesse và đồng tác giả (2007) tiến hành đánh giá đa dạng của các giống ngô Châu Phi. Số lượng giống đánh giá là 56 giống với 27 chỉ thị SSR. Kết quả thu được 104 allele với mức độ trung bình 3,85 allele trên một locus, hệ số PIC trung bình là 0,58. Sharma và đồng tác giả (2007) đã tiến hành nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền của 48 giống ngô ở phía đông bắc dãy Himalayan sử dụng 42 chỉ thị SSR. Nghiên cứu cho thấy có chỉ thị cho 13 allele, hệ số PIC là 0,6. Bracco và đồng tác giả (2009) sử dụng 10 chỉ thị phân tử để đánh giá các giống ngô ở phía đông bắc Argentina.

Nghiên cứu tìm ra tổng số 65 allele, trung bình là 7,22 allele trên 1 locus, hệ số PIC là 0,37. Ở Việt Nam việc đánh giá đa dạng các nguồn gen cây ngô cũng được các nhà khoa học quan tâm. Lê Thị Minh Thảo và đồng tác giả (2014) đánh giá đa dạng di truyền trên 24 giống ngô nếp tự phối sử dụng 19 chỉ thị SSR thu được 75 allele. Hệ số PIC dao động trong phạm vi từ 0,36 đến 0,81. Số allele trung bình là 4 allele/locus. Phan Xuân Hào (2013) đánh giá đa dạng di truyền trên 70 dòng ngô mới dựa trên 35 chỉ thị phân tử SSR. Kết quả nghiên cứu chỉ ra hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,23 đến 1,00. Khoảng cách di truyền giữa các dòng tương đối lớn cho thấy sự khác biệt nhau về vật chất di truyền và đây là nguồn nguyên liệu thích hợp cho việc lai giống để tạo ra ưu thế lai.

Việc đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây ngô thực sự có hiệu quả đối với công tác lai tạo. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây ngô làm cơ sở để lựa chọn cặp lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Nguồn vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu là 71 dòng ngô (bảng 1) do Viện nghiên cứu Ngô cung cấp.

Các cặp môi được sử dụng để phân tích bao gồm: Umc1594, Umc1249, Umc1524, Umc1562, Umc1935, Phi333597, Umc1908, Umc1196, Umc1060, Umc1511 (Robertson *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012).

Bảng 1. Các dòng ngô sử dụng trong nghiên cứu.

STT	Tên dòng	Ký hiệu	STT	Tên dòng	Ký hiệu	STT	Tên dòng	Ký hiệu	STT	Tên dòng	Ký hiệu
1	H12	H12	19	TQ2	TQ2	37	H259	H259	55	H14b	H142
2	H54	H54	20	X126	X126	38	H411	H411	56	H822a	H8221
3	H53	H53	21	X127	X127	39	H665	H665	57	H306a	H3061
4	H56	H56	22	X1210	X1210	40	H822	H822	58	H306b	H3062
5	H71	H71	23	X1211	X1211	41	H3A1	HA31	59	H306c	H306
6	H76	H76	24	X1214	X1214	42	09N05	N05	60	H06	H06
7	H82	H82	25	H1	H1	43	TQ3	TQ3	61	DF5	DF5
8	H84	H84	26	H2	H2	44	TQM	TQM	62	DF7	DF7
9	H99	H99	27	H14	H14	45	T60M	TM60	63	H07	H07
10	H159	H159	28	H31	H31	46	X122	X122	64	IL9	IL9
11	H245	H245	29	H32	H32	47	X124	X124	65	161	H161
12	H262	H262	30	H35	H35	48	X128	X128	66	161KC	KC161
13	H264	H264	31	H42	H42	49	H171b	H1712	67	161KS	KS161
14	H306	H306	32	H46	H46	50	H245b	H2452	68	DF4	DF4
15	H675	H675	33	H63	H63	51	H56R	H561	69	DF4KC	DF41
16	DF18	DF18	34	H145	H145	52	H675a	H6751	70	H60M	H601
17	DF18C	DF183	35	H162	H162	53	H675b	H6752	71	3A	A3
18	09N03	N03	36	H171	H171	54	H14a	H141			

Phương pháp

Tách DNA tổng số

DNA tổng số được tách từ mô lá các dòng/giống ngô theo phương pháp của Shagai Maroof và đồng tác giả (1984) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Phương pháp PCR với các cặp môi SSR

Kỹ thuật PCR các cặp môi SSR được tiến hành với tổng thể tích là 15µl/ mẫu gồm những thành phần sau: 0,75 µl DNA genome (50 ng/µl); 0,75 µl môi xuôi (50 ng/ul); 0,75 µl môi ngược (50 ng/ µl); 2 µl dNTP (1 mM); 0,75µl Taq polymerase (2,5 đơn vị/ µl); và 1,5 µl đệm 10xPCR. Chu trình nhiệt bao gồm

các bước 94°C – 4 phút; 94°C – 1 phút; nhiệt độ bắt cặp được thay đổi tùy theo từng môi – 1 phút; 72°C – 2 phút; lặp lại 35 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 72°C – 7 phút; giữ ở nhiệt độ 4°C.

Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide

Sản phẩm của phản ứng PCR với các môi SSR được biến tính và chạy điện di trên gel polyacrylamide 5% sử dụng máy Sequence Gen (BioRad Laboratories Inc., Hercules., California, USA) trong đệm TBE 0,5xTBE. Bản gel được cố định bằng dung dịch acetic acid và nhuộm bạc.

Phân tích đa hình di truyền

Kết quả được thống kê dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện các băng DNA. Xác định hệ số tương đồng di truyền Jaccard, thiết lập sơ đồ hình cây để so sánh hệ số tương đồng di truyền giữa 71 dòng theo phương pháp UPGMA trong NTSYpc 2.1.

Hàm lượng thông tin đa hình (PIC - Polymorphic Information Content) được xác định nhờ phần mềm dựa trên công thức của Saal và Wricke (1999).

$$PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$$

Trong đó, P_{ij} là tần số xuất hiện của allel thứ j của kiểu gen i được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích đa hình DNA bằng kỹ thuật SSR

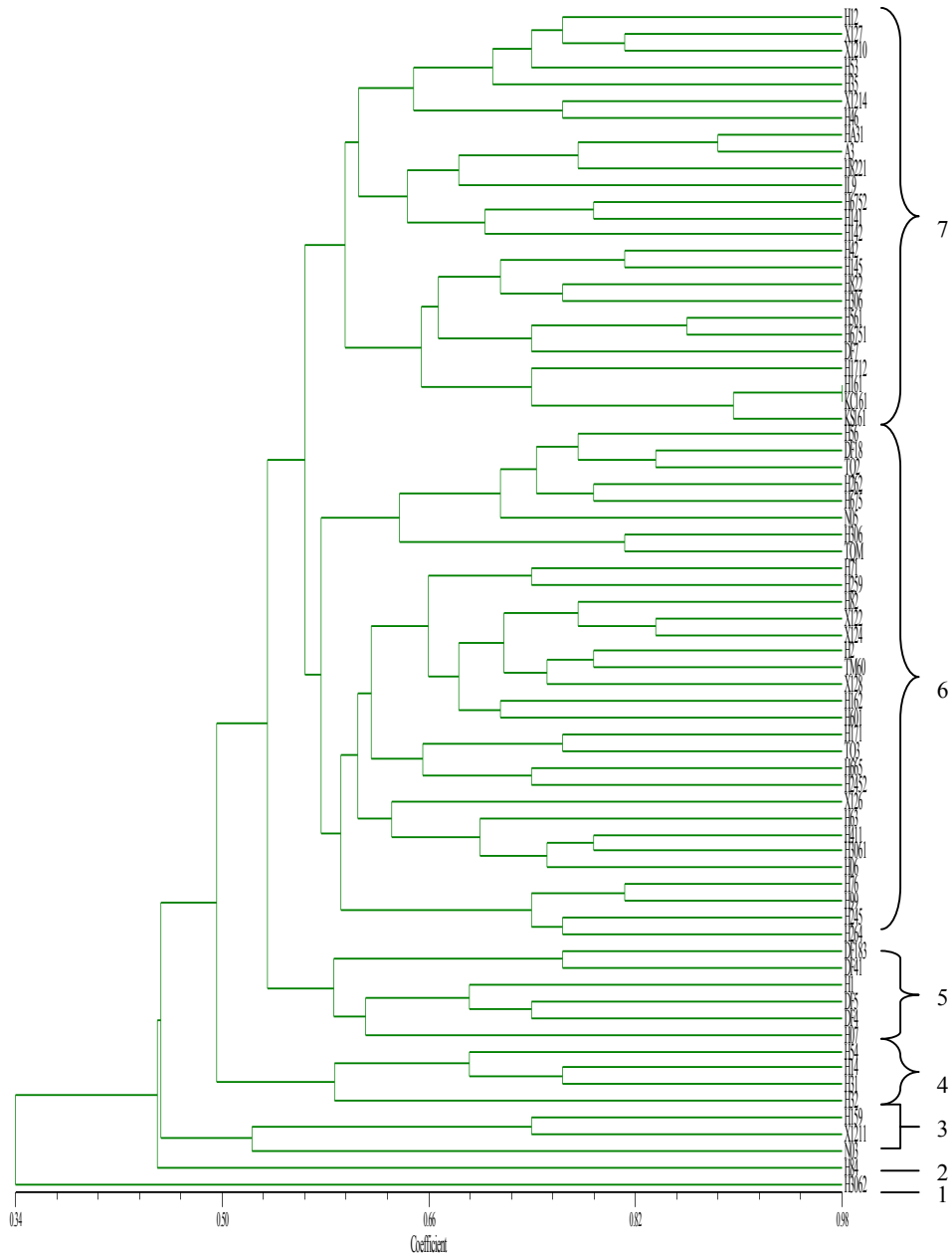
Sản phẩm PCR-SSR được chạy trên gel polyacrylamide 5%, cố định bằng acetic acid và nhuộm bằng bạc. Khi phân tích độ đa hình của các cặp môi chúng tôi thu nhận được tổng số 42 allele. Số allele của các cặp môi dao động từ 3 đến 6 allele, giá trị trung bình là 4,2 allele/ locus. Trong đó cặp môi Umc1562 và cặp môi Umc1196 cho số allele nhiều nhất là 6 allele; cặp môi Umc1594, Umc1935, Phi333597, Umc1511 cho 4 allele; cặp môi Umc1249, Umc1908, Umc1060 cho số allele thấp nhất là 3 allele. Giá trị trung bình là 4,2 allele/ locus cho thấy các dòng ngô nghiên cứu cho độ đa hình cao. So sánh với nghiên cứu khác chúng tôi nhận thấy: kết quả của nghiên cứu này là cao hơn của Lê Thị Minh Thảo và đồng tác giả (2014) (4 allele/locus), Legesse và đồng tác giả (2007) (3,85 allele/locus); thấp hơn nghiên cứu của Bracco và đồng tác giả (2009) (7,22), Yao và đồng tác giả (2007) (6,1 allele/locus).

Bảng 2. Mức độ đa hình của 10 môi SSR khi phân tích 71 dòng ngô.

STT	Tên môi	Số allele	Giá trị PIC	STT	Tên môi	Số allele	Giá trị PIC
1	Umc1594	4	0,7286	6	Phi333597	4	0,7272
2	Umc1249	3	0,5783	7	Umc1908	3	0,6131
3	Umc1524	5	0,7153	8	Umc1196	6	0,8088
4	Umc1562	6	0,7648	9	Umc1060	3	0,6450
5	Umc1935	4	0,6665	10	Umc1511	4	0,7337

Kết quả phân tích đa hình cho thấy cả 10 môi phân tích đều cho đa hình (bảng 2). Hệ số PIC được coi là thước đo tính đa dạng di truyền của các allele ở từng locus SSR, giá trị PIC có thể được hiểu như là sự đa dạng di truyền của gen. Như vậy, hệ số PIC của cặp môi nào cao thì phản ánh độ đa dạng di truyền càng cao trong phân tích đa dạng di truyền của 71 dòng ngô nghiên cứu và ngược lại. Hàm lượng thông tin đa hình

(giá trị PIC) trung bình của các môi là 0,6981. Trong đó giá trị PIC của cặp môi Umc1196 là cao nhất (0.8088), cặp môi Umc1249 là thấp nhất (0,5783). Khi so sánh giá trị PIC trung bình của nghiên cứu với các nghiên cứu khác chúng tôi nhận thấy: giá trị PIC trong nghiên cứu là cao hơn so với Legesse và đồng tác giả (2007) (0,58), Sharma và đồng tác giả (2007) (0,6), Bracco và đồng tác giả (2009) (0,37).



Hình 1. Biểu đồ quan hệ di truyền của 71 dòng ngô.

Mối quan hệ di truyền giữa 71 dòng ngô

Kết quả phân tích với 10 môi SSR, chúng tôi đã xây dựng được mối quan hệ di truyền giữa 71 dòng ngô (hình 1). Hệ số tương đồng di truyền được ghi nhận cao nhất ở hai dòng ngô H161 và KC161 (0,976). Hệ số tương đồng di truyền được ghi nhận thấp nhất ở hai dòng ngô H3062 và H84 (0,333).

Biểu đồ quan hệ di truyền (hình 1) cho thấy: hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,333 đến 0,976 và 71 dòng ngô chia làm 7 nhóm chính. Dòng H3062 là nhóm 1. Nhóm 2 là dòng H84. Nhóm 3 bao gồm 3 dòng: H159, X1211 và N03. Hệ số tương đồng di truyền cao nhất trong nhóm là 0,738 (giữa dòng H159 và X1211). Nhóm 4 bao gồm 4 dòng: H32, H54, H14, H31. Hệ số tương đồng di truyền cao nhất

trong nhóm là 0,762 (giữa hai dòng H14 và H31). Nhóm 5 bao gồm 6 dòng: DF183, DF41, H1, DF5, DF4, H07. Trong đó hai dòng DF183 và DF41 có hệ số tương đồng cao nhất: 0,762. Nhóm 6 là nhóm chứa nhiều dòng nhất bao gồm 31 dòng: H56, DF18, TQ2, H262, H675, N05, H306, TQM, H71, H259, H82, X122, X124, H2, TM60, X128, H162, H601, H171, TQ3, H665, H2452, X126, H63, H411, H3061, H06, H76, H99, H245, H264. Hệ số tương đồng di truyền thấp nhất trong nhóm là 0,500 (giữa hai dòng H63 và X124, X126 và X122). Hệ số tương đồng di truyền cao nhất trong nhóm là 0,833 (giữa hai dòng X122 và X124). Nhóm 7 bao gồm 25 dòng: H12, X127, X1210, H53, H35, X1214, H46, HA31, A3, H8221, IL9, H6752, H141, H142, H42, H145, H822, H306, H561, H6751, DF7, H1712, H161, KC161, KS161. Trong đó hệ số tương đồng di truyền cao nhất trong nhóm là 0,976 (giữa hai dòng H161 và KC161). Đây cũng là hệ số tương đồng cao nhất trong nghiên cứu.

Biểu đồ di truyền của 71 dòng ngô cho thấy các dòng ngô được chia ra làm nhiều nhánh nhỏ khác nhau và có quan hệ di truyền khá gần gũi. Đa số các dòng có hệ số tương đồng di truyền cao, một số dòng có hệ số tương đồng di truyền lên tới 97,6% (H161 và KC161). Một số cặp ngô trong nghiên cứu này có hệ số tương đồng di truyền từ 0,5 đến 0,7 (KS161 và H56, DF7 và H76, H822 và H82...) cùng với các đánh giá về đặc điểm nông sinh học khác sẽ được lựa chọn thành các cặp lai vì đây là khoảng cách không quá gần cũng như quá xa nhằm mục đích tổ hợp được con lai có ưu thế lai phù hợp. Khoảng cách di truyền này cho một cặp lai là phù hợp vì nếu gần quá thì không có sự khác biệt, còn xa quá thì khi lai sẽ khó khăn, không đảm bảo con lai sẽ có sức sống tốt.

KẾT LUẬN

Khi phân tích 71 dòng ngô với 10 cặp mỗi SSR cho thấy tất cả các cặp mỗi nghiên cứu đều cho đa hình. Chúng tôi thu được 42 allele trong đó số allele mỗi cặp mỗi nhân được dao động trong khoảng từ 3 allele tới 6 allele, số allele trung bình là 4,2 allele/locus. Cặp mỗi Umc1196 là cho nhiều băng đa hình nhất, cặp mỗi Umc1249 cho số băng đa hình thấp nhất. Giá trị PIC dao động trong khoảng 0,5783 đến 0,8088. Giá trị PIC trung bình là 0,6981. 71 dòng ngô được chia thành 7 nhóm chính. Trong đó, dòng ngô H3062 và H84 có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất là 0,333. Hai dòng ngô có hệ số tương

đồng di truyền cao nhất là H161 và KC161 (0,976).

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài “ Nghiên cứu chọn tạo các dòng, dòng ngô kháng bệnh mốc hồng bằng chỉ thị phân tử”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bracco M, Lia VV, Gottlieb, Hernández JC, Poggio L (2009) Genetic diversity in maize landraces from indigenous settlements of Northeastern Argentina. *Genetica* 135: 39 – 49.
- Chen J, Ding J, Li H, Sun X, Li J, Wang R, Dai X, Dong H, Song W, Chen W, Xia Z, Wu J (2012) Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to Fusarium ear rot in maize, *Mol Breeding* 30 (4): 1649-1656.
- Legesse BW, Myburg AA, Pixley KV, Bothe AM (2007) Genetic diversity of African inbred lines revealed by SSR markers. *Hereditas* 144 (1): 10 – 7.
- Lê Thị Minh Thảo, Nguyễn Thị Ánh, Trần Thanh Tân, Phạm Quang Tuân, Vũ Văn Liệt (2014) Phân tích đa dạng di truyền dựa trên kiểu hình và chỉ thị phân tử SSR và đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng ngô nếp tự phối phục vụ phát triển giống ngô nếp cho các tỉnh miền núi phía bắc. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12 (3): 285–297.
- Phan Xuân Hào (2013) Nghiên cứu chọn tạo dòng ngô cho kháng thuốc trừ cỏ bằng phương pháp lai trở lại. *Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ nhất*: 337 -347.
- Robertson LA, Jines MP, Balint PJ, Kleinschmidt CE, White DG, Payne GA, Maragos CM, Molnas TL, Holland JB (2006) QTL Mapping for Fusarium Ear Rot and Fumonisin Contamination Resistance in two Maize Populations. *Crop Sci* 46:1734–1743.
- Saal B, Wricke (1999) Development of simple sequence repeat makers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome* 42(5): 964 - 972.
- Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018
- Sharma L, Prasanna BM, Raesh B (2010) Analysis of phenotypic and microsatellite-based diversity of maize landraces in India, especially from the North East Himalayan region. *Genetica* 138(6): 619-31.
- Yao Q, Yang K, Pan G, Rong T (2007) Genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China based on SSR Data. *J Genet Genomics* 34 (9): 851 – 860.

EVALUATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF MAIZE LINES BY MICROSATELLITE MARKERS

Nguyen Thi Thu¹, Vu Thi Ngoc¹, Ngo Thi Thuy Linh¹, Vuong Huy Minh², Le Thi Bich Thuy¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*National Maize Research Institute*

SUMMARY

Recently, quantitative trait loci (QTLs) have been identified for resistance to ear rot. Techniques to ensure accurate phenotyping of Fusarium ear rot have been developed and validated. DNA marker technologies have matured and become economically feasible for some DNA marker assisted selection programs. Research and breeding efforts aimed at improving resistance to the Fusarium ear rot, identifying sources of resistance and characterizing the inheritance of ear rot. Resistance to Fusarium ear rot is under genetic control, but no complete resistance has been identified in maize. Once suitable sources of resistance have been identified, inheritance of resistance should be considered before selecting a breeding strategy, so evaluation of genetic diversity of maize lines is necessary for cross combination. Genetic diversity analysis of 71 inbred lines by 10 SSR markers detected 10 loci with a total of 42 alleles and average of 4.2 alleles per locus, the number of alleles on a locus varied from 3 to 6. Polymorphic Information Content (PIC) varied from 0.5783 to 0.8088, average of 0.6981. The Umc1196 marker revealed the highest polymorphism, the Umc1249 marker gave the lowest polymorphism. 71 inbred lines were divided into seven main groups. The genetic similarity among 71 lines ranged from 0.333 to 0.976. H3062 line maize had the lowest genetic similarity coefficient (0.333). The lowest genetic similarity coefficient was recorded in H3062 and H84 (0.333). Two lines H161 and KC161 had the highest genetic similarity coefficient (0.976). Almost maize lines had high genetic similarity coefficient showing the same similarity in genetic relationship.

Keywords: *alleles, maize, SSR marker, genetic similarity coefficient, genetic diversity*