

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ NÂNG CAO KÍCH THƯỚC HẠT TRONG CHỌN GIỐNG ĐẬU PHỘNG (*Arachis hypogaea* L) TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Thị Lang¹, Lê Minh Khang¹, Nguyễn Thị Hồng Loan¹,
Nguyễn Văn Hữu Linh¹, Nguyễn Thị Khánh Trân¹, Lê Hoàng Phương¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này chủ yếu áp dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống đậu phộng theo hướng nâng cao kích thước hạt từ quần thể tự thụ của F_8 của tổ hợp lai HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP. Đã xác định có sự đa hình trên hai chỉ thị SNP Aradu-A07-1148327, Aradu-A07-1316694 và 1 chỉ thị SSR (simple sequence repeat) GM 1494 với kích thước hạt đậu phộng trên nhiễm sắc thể A07. Theo bản đồ GGT, xác định được mô hình di truyền của các giống lai trong quần thể so với bộ gen của cha mẹ trong thế hệ F_7 của tổ hợp lai HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP. Thông qua 20 SNP (single-nucleotide polymorphism) phân tử và 2 chỉ thị SSR (simple sequence repeat) trên số nhiễm sắc thể A07, khoảng cách di truyền từ 0-50,8 cM, các dòng được chọn mang một đồng gen vượt trội hơn so với bố mẹ trên nhiễm sắc thể A07. Kết quả có 4 dòng với 100% mang gen có kích thước hạt to giống với giống bố là (HATRI 02ĐP). Bốn dòng được chọn là: dòng 14 (F2-4-10-1-1-14); 20 (F2-18-11-26-19-20); 21 (F2-105-3-1-6-21); 22 (F2-215-75-86-35-22). Tuy nhiên sau khi đánh giá quần thể tự thụ F_8 và so sánh kiểu hình và kiểu gen chỉ có hai dòng 20 (F2-18-11-26-19-20) và 21 (F2-105-3-1-6-21) cho kích thước hạt to được chọn.

Từ khóa: Di truyền chọn giống, GGT, chỉ thị phân tử SNP (single-nucleotide polymorphism) SSR (simple sequence repeat), đậu phộng, kích thước hạt.

1. MỞ ĐẦU

Đậu phộng (lạc) (*Arachis hypogaea* L.) là một trong những loài cây trồng cho dầu từ hạt quan trọng của thế giới. Việc nghiên cứu cải tiến giống đậu phộng khá hạn chế so với các giống cây trồng khác vì đậu phộng có hệ di truyền hẹp. *Arachis hypogaea* có mức độ biến thiên di truyền thấp hơn loài đậu phộng hoang dại ($2n$ và $4n$). Bên cạnh đó, có rất nhiều loài với mức độ đa dạng di truyền cao, có quan hệ gần với loài đậu phộng trồng *Arachis hypogaea* và chúng sẽ trở nên hữu dụng khi được dùng làm nguồn vật liệu bố mẹ trong công tác chọn giống. Một trong những mục tiêu của công tác chọn tạo giống đậu phộng là tạo ra sự thay đổi và chọn (các) kiểu gen mong muốn để tạo ra giống đậu phộng có kích thước hạt to, năng suất cao kháng sâu bệnh và ngắn ngày. Đậu phộng là loại cây trồng tự thụ phấn cao, đòi hỏi sự chú ý đặc biệt trong việc phát hiện các dòng của bố mẹ và lựa chọn kỹ các vật liệu vì các quá trình này đòi hỏi các kỹ năng đặc biệt và có thể tốn thời gian. Nghiên cứu di truyền với sự hỗ trợ của sinh học phân tử đã rút ngắn thời gian trong chọn tạo giống cũng đã đạt được thành công trên cây lúa

(Lang và ctv., 2011). Theo hướng này, công tác nghiên cứu lai tạo giống trên cây đậu phộng cũng đã được đặt ra. Chen và ctv. (2010) đã phát triển phản ứng chuỗi allele cụ thể polymerase liên kết (AS-PCR) và các điểm đánh dấu trình tự đa hình khuếch đại (CAPS), tương ứng cho cả hai alen ahFAD2. Sự phát triển của các chỉ thị phân tử liên quan trong đậu phộng đã giúp cải thiện thông qua lai hồi giao có hỗ trợ đánh dấu (MABC) (Chu và ctv., 2007). Janila và ctv. (2016) đã đưa các alen ahFAD2 từ Sun Oleic95R vào chọn giống ưu tú sử dụng MABC và lựa chọn hỗ trợ chỉ thị phân tử (MAS). Bera và ctv., (2018) phát triển dòng đậu phộng HO thông qua MAS tại Ấn Độ. Bốn mươi chín QTL đã được xác định trong 14 LG cho chỉ số kích thước hạt giống, tỷ lệ nhân, khối lượng hạt, khối lượng vỏ, hạt nhân đơn, hạt nhân kép, diện tích vỏ và QTL tỷ lệ phần trăm hạt nhân được liên kết trên nhóm A07/B07 (Carolina và ctv., 2020). Bản đồ GGT tốt nhất ghi nhận thông qua đánh giá kiểu hình của dòng NILs và chỉ thị phân tử cho phép thu hẹp vùng QTL xuống phân đoạn nhiễm sắc thể 168,37kb, giữa SNPs Aradu_A07_1148327 và Aradu_A07_1316694 (Mounirou và ctv., 2020). Nghiên cứu này nhằm phát triển tổ hợp lai HATRI 01ĐP/HATRI 2 ĐP trên quần thể tự thụ và kết hợp với chỉ thị phân tử (SNP và SSR) để phục vụ công tác

¹ Viện Nghiên cứu Nông nghiệp công nghệ cao ĐBSCL

chọn tạo giống theo hướng nâng cao kích thước hạt và năng suất đậu phộng phục vụ cho sản xuất tại ĐBSCL.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu sử dụng cho thí nghiệm gồm các giống đậu phộng: HATRI 01ĐP hạt nhỏ và HATRI 02ĐP hạt to, được cung cấp bởi ngân hàng gen của Viện Nghiên cứu Nông nghiệp công nghệ cao ĐBSCL (HATRI) và giống MD 7 làm đối chứng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ lai tạo

Các hạt giống lai được trồng tại Viện Nghiên cứu Nông nghiệp công nghệ cao ĐBSCL và kết quả là đã thu được 18 cây F₁. Trong đó, mười hai cây được xác định là giống lai thực sự mang cả alen của cha lẫn mẹ. Mười hai cây F₁ này được sử dụng trồng và cho tự thụ thể hệ F₂, F₃, F₄, F₅, F₆, F₇, F₈. Thí nghiệm được tiến hành tại trại giống của Viện Nghiên cứu Nông nghiệp công nghệ cao ĐBSCL. Các hạt nhân trưởng thành được thu hoạch từ các dòng thể hệ F₇ cho tự thụ tiếp F₈ của mùa mưa năm 2020. Năng suất được thu hoạch trong tuần đầu tiên của tháng 10 năm 2020 đã được gieo vào tuần thứ ba của tháng 2 năm 2021. Thí nghiệm được tiến hành trồng tại ruộng của nông dân thuộc huyện Trà Cú, tỉnh Trà Vinh.

2.2.2. Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp đánh giá:

- Các chỉ tiêu theo dõi, đánh giá gồm: kích thước của trái (chiều dài và chiều rộng), kích thước của nhân (hạt) được đo bằng thước đo; khối lượng 100 hạt và năng suất (tấn/ha).

- Năng suất trái (tấn/ha) được tính như sau: Sau khi thu hoạch, dữ liệu được thu thập trên mỗi lô diện tích 3 m² và cân khối lượng (kg), sau đó quy đổi ra tấn/ha.

2.2.3. Đánh giá đa dạng kiểu gen

- *Ly trích DNA*: Theo Nguyễn Thị Lang (2002).

- *Phân tích đa hình bằng kỹ thuật SSR*: Mẫu DNA được chọn phân tích PCR – SSR theo phương pháp Nguyễn Thị Lang (2002); phân tích SNP theo Lang và ctv (2015).

Chuỗi mã trình tự DNA của chỉ thị SSR: GM 1494 (Guo và ctv 2012).

F'cttcgaagaaaagtgcacg R'gaagacagaagacgaagagcgta

Chuỗi mã trình tự của SNPs

Aradu_A07_148327:

F-TTGCTAATCA(G/A)TTGTTGGTTT(G/A); R-AAAGAAA(G/A)CCTTCCCCGA và

Aradu_A07_1316694:

TACCTGGCCCA(A/G)AAAGAAA (A/G), R-GCAGGTAATC(A/G)CCGTGATT (Mounirou và ctv., 2020).

- *Cắt bởi enzyme*, do chỉ thị Aradu-A07-1148327 và Aradu-A07-1316694 đơn hình phải phân cắt bởi enzyme *HinfI* và *EcoR V* theo thứ tự. Phương pháp phân cắt enzyme theo Lang (2016).

Chọn lọc quần thể thông qua lập bản đồ GGT.

Kiểm tra kiểu gen của quần thể con lai trên nhiễm sắc thể A07 dựa trên các chỉ thị phân tử đa hình giữa cây bố và mẹ. Lập bản đồ GGT đánh giá sự đa dạng di truyền của quần thể con lai, qua đó chọn lọc các cá thể mang gen mục tiêu mong muốn.

Phương pháp GGT do Tanksley và ctv đề xuất (1996) và sau đó, Van Berllo (2008), Milne và ctv. (2010) đã xây dựng phần mềm hữu dụng này.

Phương pháp lập bản đồ GGT thông qua các bước như sau:

lập file dữ liệu trên Excel: mã hóa gen của quần thể với A, B là kiểu gen đồng hợp tử của cây bố mẹ; H là kiểu gen dị hợp tử; U là kiểu gen chưa được xác định; (2) nhập dữ liệu vào cửa sổ GGT: chuyển đổi dữ liệu Excel sang dữ liệu GGT; (3) xử lý số liệu trong GGT; (4) đăng xuất kết quả.

2.3. Phân tích thống kê

Tất cả các số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Cropstat 7.2 (IRRI, 2007). Phân tích phương sai (ANOVA) để phát hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức. So sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định Duncan.

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Phát triển quần thể lai đậu phộng

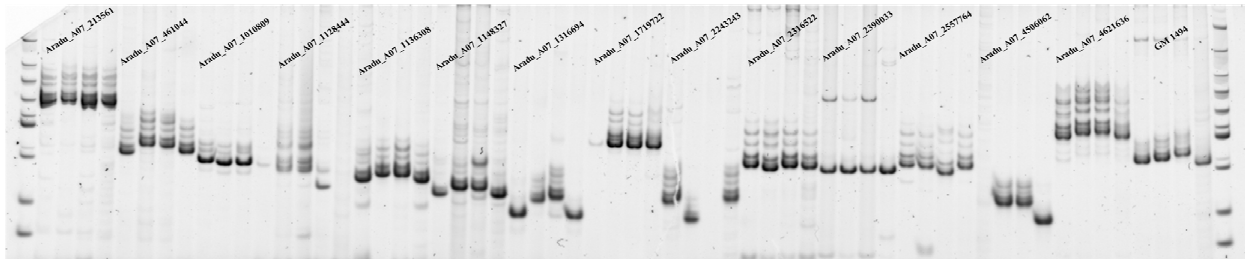
3.1.1. Đa dạng nguồn gen trên các giống đậu phộng bố mẹ

Việc chọn giống đậu phộng ứng dụng MAS đã đem lại những thành công nhất định trong thời gian gần đây như: rút ngắn thời gian chọn tạo, chọn được các giống kháng với điều kiện bất lợi, giống kháng bệnh, giống phẩm chất. Do đó, các giống lúa bố mẹ (HATRI 01ĐP và HATRI 02ĐP) được phân tích kiểu gen xem xét có mang gen mang kích thước hạt to, đồng thời, đánh dấu phân tử các gen liên quan đến các thành phần năng suất và năng suất. Ba mươi lăm chỉ thị phân tử được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền giữa các giống lúa bố mẹ, nhưng chỉ có 22 cho đa hình với bố mẹ: bao gồm 2 chỉ thị phân tử Aradu-A07-1148327 và Aradu-A07-1316694 được đánh dấu gen quy định gen kích thước của hạt đậu phộng (và

20 chỉ thị SNP và 2 chỉ thị SSR liên quan đến các thành phần năng suất và năng suất).

Trên bố mẹ được đánh giá với các chỉ thị đa hình trước khi lai tạo để phát triển quần thể cho các cặp lai. Ghi nhận như hình 1.

M 123 4 123 4 12 34 1234 1234 1234 1234 1234 1234 1 2 3 4 1 234 1234 1234 1234



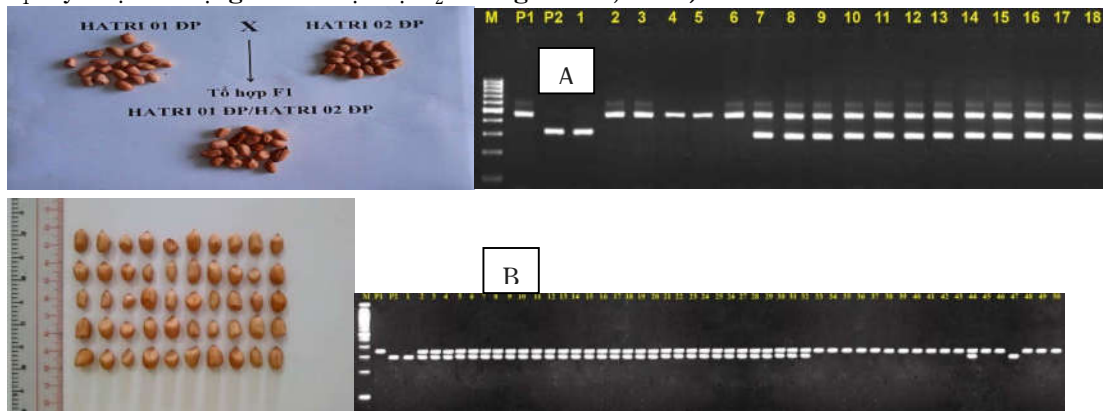
Hình 1. Kết quả đa hình của các giống bố mẹ với các chỉ thị cho gen liên quan 15 chỉ thị (Aradu_A07_213561, Aradu_A07_461044, Aradu_A07_1010809, Aradu_A07_1128444, Aradu_A07_1136308, Aradu_A07_1148327, Aradu_A07_1316694, Aradu_A07_1719722, Aradu_A07_2243243, Aradu_A07_2316522, Aradu_A07_2390033, Aradu_A07_2557764, Aradu_A07_4506062, Aradu_A07_4621636 và GM 1494) phân tử trên bốn giống đậu phộng : trên gel polyacrylamide với nhuộm nitrat bạc.

Ghi chú: M. DNA lamda 1: HATRI 01 ĐP; 2: HATRI 02 ĐP; 3: HATRI 03 ĐP; 4: MD 17

3.1.2. Phát triển quần thể lai

Các hạt giống bố mẹ được trồng tại nhà lưới của Viện HATRI và kết quả là thu được 18 cây F_1 . Trong đó, 12 cây được xác định là giống lai thực sự mang cả alen dị hợp tử từ bố mẹ nhờ chỉ thị phân tử. Mười hai cây F_1 này được sử dụng để cho tự thụ F_2 . Trong số

50 cây F_2 , ba mươi hai cây đã được tìm thấy mang cả hai alen bố mẹ trong tình trạng dị hợp tử. Các cây thế hệ F_1 , F_2 , F_3 , F_7 được tạo kiểu gen với các điểm đánh dấu và bốn cây cuối cùng đã được xác định là đồng hợp tử cho cả các alen với kích thước hạt to (Hình 2, 3, 4 và 5).



Hình 2. Sản phẩm PCR của quần thể F_1 (A) và F_2 (B) được đánh giá bằng chỉ thị phân tử GM 1494. Liên kết với gene kích thước hạt trên nhiễm sắc thể A07, vị trí hai băng 220bp (HATRI 01ĐP) và 200bp (HATRI 02ĐP) trên gel agarose 3%

Ghi chú: P1: HATRI 01ĐP; P2: HATRI 02ĐP. 1-50 là cây lai F_2

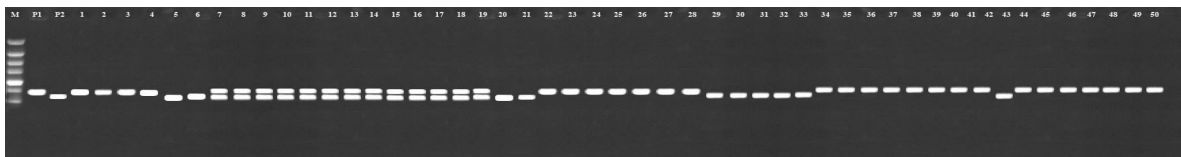
Theo Mounirou và ctv (2020), gen chỉ thị hạt to trên đậu phộng được kiểm soát bởi gen chính định vị trên nhiễm sắc thể A07 liên kết với chỉ thị Aradu-A07-1148327 và Aradu-A07-1316694. Do đó dùng hai chỉ thị SNP là Aradu-A07-1148327 và Aradu-A07-1316694 và chỉ thị GM 1494 để kiểm tra gen liên quan với kích thước hạt. Với chỉ thị GM 1494, kết quả khuếch đại PCR cho băng hình ở hai kích thước khác nhau

200bp và 220bp (Hình 2). Ở kích thước 220bp, các giống HATRI 01ĐP, HATRI 02ĐP thể hiện băng hình ở vị trí này, đây cũng là kích thước của gen cho hạt to. Các giống HATRI 01ĐP cho băng hình ở kích thước 200bp trên quần thể F_1 , F_2 (Hình 2A và 2B).

3.1.3. Ứng dụng chỉ thị phân tử đánh dấu trên quần thể F_3

Gene liên kết chặt trên nhiễm sắc thể A07 được đánh dấu bởi marker phân tử Aradu-A07-1148327. Gene này có liên kết với nhóm kích thước hạt (Mounirou và ctv (2020)). Dùng chỉ thị phân tử Aradu-A07-1148327 trên quần thể F_3 để đánh giá và chọn lọc năng suất cao của đậu phộng. Các dấu hiệu liên kết với locus năng suất trong quần thể HATRI 01ĐP x HATRI 02ĐP đã được phát hiện ở cha mẹ HATRI 01ĐP x HATRI 02ĐP cho đa hình với chỉ thị Aradu-A07-1148327. Marker Aradu-A07-1148327 được sử dụng làm marker đánh dấu có kích thước là 200-210bp và được dùng làm khuôn DNA để thiết lập các

cặp primer đặc hiệu. Trong quần thể ghi nhận với 50 cây (Hình 3), trong đó có 13 dòng có dạng dị hợp. Các dòng mang gen dị hợp tử (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) (chiếm 26%), xuất hiện với hai băng có kích thước 200bp - 210bp tương ứng với bố mẹ cho thấy sự biến động của kích thước hạt trên giống đậu phộng. Ở vị trí band dòng số 5, 6, 20, 21, 29, 30, 31, 32, 33 và 43 chỉ xuất hiện một band tương ứng với vị trí P2 (HATRI 02ĐP) mang gen hạt to. Trái lại, ở vị trí band còn lại xuất hiện 1 băng tương ứng với vị trí P1(HATRI 01ĐP) mang gen hạt nhỏ.

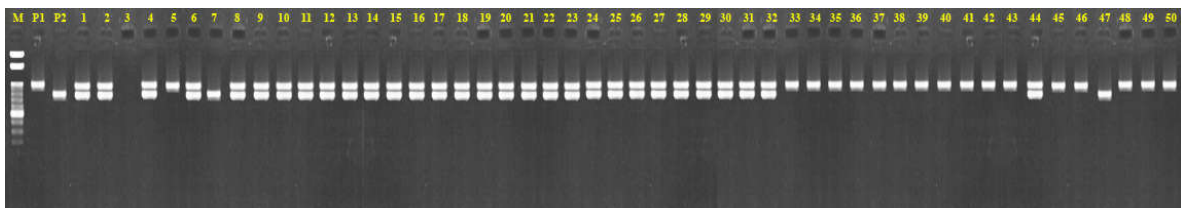


Hình 3. Sản phẩm PCR của quần thể F_3 , chỉ thị phân tử Aradu-A07-1148327 trên 50 dòng liên kết với gene kích thước hạt trên nhiễm sắc thể A07, vị trí hai băng 210bp (HATRI 01ĐP) và 200bp (HATRI 02ĐP), trên gel agarose 3%. Cắt bởi enzyme *HinfI*

Ghi chú: P1: HATRI 01ĐP; P2: HATRI 02ĐP; 1-50 là cây lai F_3

Tương tự kết quả sản phẩm PCR trên hình 4 với chỉ thị phân tử Aradu-A07-1316694 ghi nhận từ quần thể HATRI 01ĐP x HATRI 02ĐP có 9 cây đồng hợp tử cùng với alen của HATRI 02ĐP. Kết quả sản phẩm PCR cho thấy có 2 cá thể ở vị trí 7 và 47 có cùng kích thước với HATRI 02ĐP tương ứng với kích thước 250bp. Có 17 cá thể ở vị trí số 5, 33, 34, 35, 36, 37, 38,

39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 50 có cùng kích thước với HATRI 01ĐP với 300 bp. Các cá thể còn lại mang kiểu gen dị hợp tử có cùng kích thước với bố và mẹ. Như vậy qua hai chỉ thị phân tử (Aradu-A07-1148327 và Aradu-A07-1316694) trên quần thể cho thấy thế hệ F_3 vẫn còn phân ly khá cao từ 26-60% cho hai chỉ thị phân tử trên theo thứ tự.



Hình 4. Sản phẩm PCR của chỉ thị phân tử Aradu-A07-1316694 trên 50 dòng liên kết với gene trên nhiễm sắc thể A07, vị trí hai băng 300bp (HATRI 01ĐP) và 250bp (HATRI 02ĐP), trên gel agarose 3%. Cắt bởi enzyme *EcoRV*

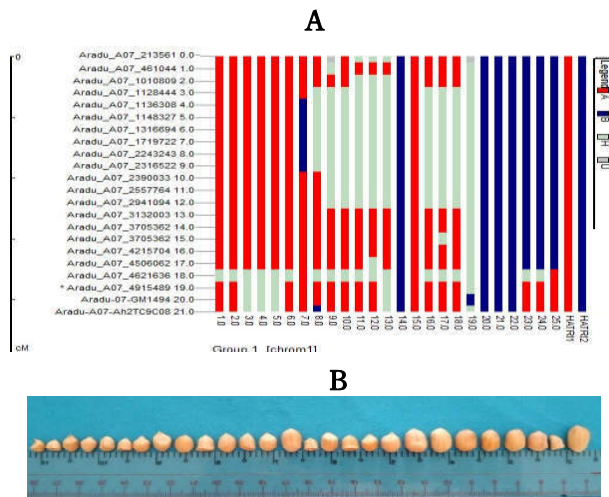
Ghi chú: M: là marker chuẩn; P1: HATRI 01ĐP; P2: HATRI 02ĐP; 1-50 là cây lai F_3

3.2. Chọn lọc các quần thể hồi giao thông qua lập bản đồ GGT

3.2.1. Chọn lọc các cá thể F_7 của quần thể lai cận giao

Quần thể F_6 của cặp lai HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP cho tự thụ tiếp tục và chọn lọc thế hệ F_7 . Trong quần thể F_7 chọn lọc 27 dòng để đánh giá kiểu gen thông qua bản đồ nhiễm sắc thể nhóm A07 trên từng cây bản đồ GGT (Graphical genotyping) là phương pháp cho phép thể hiện các alen đồng hợp trội, đồng

hợp lặn, dị hợp của một quần thể. Bản đồ GGT giúp dễ dàng nhận biết được kiểu di truyền của các con lai trong quần thể so với đoạn gen so với bố và mẹ. Bản đồ GGT được xây dựng trên nền tảng HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP ở thế hệ F_7 . Trên bản đồ này, gen quy định tính trạng kích thước hạt được đánh dấu bởi 22 chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể số A07, khoảng cách di truyền từ 0-50,8 cM. Các cá thể con lai được lựa chọn phải mang gen đồng hợp trội trên vùng di truyền này.



Hình 5. A. Sự đa dạng di truyền thế hệ F_7 trên quần thể lai hồi giao HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP trên nhóm 7 của đậu phộng; B. Các dòng mang kích thước của hạt nhân tương ứng theo thứ tự từ 1-27

Chú thích: màu xanh dương: kiểu gen theo cây bố (HATRI 02ĐP), màu đỏ: kiểu gen theo cây mẹ

Bảng 1. Kích thước hạt, khối lượng 100 hạt và năng suất trên các dòng đậu phộng trồng tại Trà Cú (Trà Vinh)

Dòng đậu phộng	Chiều dài củ lạc (mm)	Chiều rộng củ lạc (mm)	Chiều dài của hạt nhân (mm)	Chiều rộng của hạt nhân (mm)	Khối lượng 100 hạt (gram)	Năng suất hạt (g/bụi)
14 (F2-4-10-1-1-14)	38,8b	21,2a	19,9b	11,1a	60,2b	40,7b
20 (F2-18-11-26-19-20)	41,1a	25,6a	20,2a	12,3a	65,8a	45,8a
21 (F2 -105-3-1-6-21)	39,9b	22,9a	19,9b	11,2a	62,3b	44,5a
22 (F2-215-75-86-35-22)	36,7b	22,2a	15,6b	10,2a	61,2b	40,9b
23 (F2-5-100-8-19-4-23)	34,3b	19,9b	15,6b	10,0a	59,5c	38,4c
24 (F2 – 6-100-4-1-8-10-24)	37,8b	21,1b	15,9b	11,2a	53,5c	37,6c
25 (F2-2-7-15-20-14-1-25)	32,2b	22,1b	17,8b	10,1a	52,4c	33,8c
P1 (HATRI 01ĐP)	21,2c	14,5c	16,5c	9,8b	42,2d	28,0d
P2 (HATRI 02ĐP)	36,5b	22,1b	18,8b	10,0a	60,4b	40,5b
M17 (đối chứng)	31,2b	22,1b	17,8b	10,9b	53,6c	33,7c
Cv%	9,2	1,1	4,9	1,22	1,38	4,62

Các dòng sau khi đánh giá bằng chỉ thị phân tử tiếp tục trồng cho phân ly thế hệ F_8 . Kích thước hạt của các dòng được chọn lựa ở ngoài đồng trên cơ sở phân tích kiểu hình của các thế hệ. Trong các thế hệ tiếp tục cho tự thụ, ở thế hệ F_8 ghi nhận các chỉ tiêu chiều dài, chiều rộng củ và hạt lạc, thu được kết quả đều có ý nghĩa thống kê. Hầu hết các dòng cho thấy sự khác nhau và đều có kích thước củ và hạt cao hơn đối chứng. Trong đó, dòng có chiều dài củ và hạt lớn nhất là dòng số 20 (F2-18-11-26-19-20), kế đến là 21 (F2 -105-3-1-6-21). Dòng có hạt to nhất là dòng số 20 (F2-18-11-26-19-20) với chiều dài hạt 20,2 mm và

(HATRI 01ĐP), màu xám: kiểu gen dị hợp tử, khung màu xanh lá cây: đánh dấu các cá thể được lựa chọn, 1-27: các cá thể của quần thể HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP

Qua bản đồ GGT ở hình 5 cho thấy 4 cá thể có 100% các vùng gen trùng hợp với cá thể bố (HATRI 02 ĐP), mang gen mục tiêu. Các cá thể được chọn là 14 (F2-4-10-1-1-14); 20 (F2-18-11-26-19-20); 21 (F2 -105-3-1-6-21); 22 (F2-215-75-86-35-22). Điều này ghi nhận rằng trên 4 dòng thế hệ chọn từ F_2 tới F_7 đã có sự đồng nhất về đoạn gen mang kích thước hạt to và nhỏ trên các dòng này. Riêng hai cá thể 23 (F2-5-100-8-19-4-23) và 24 (F2 – 6-100-4-1-8-10-24) ghi nhận chiếm 95,2% số lượng hạt to nghiêng về giống bố HATRI 02ĐP. Hai cá thể này tiếp tục được chọn ở thế hệ F_8 để tạo dòng thuần.

3.2.2. Đánh giá kiểu hình của tổ hợp lai HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP trên quần thể F_8

chiều rộng hạt là 12,3 mm. Dòng có khối lượng 100 hạt cao nhất là dòng 20 (F2-18-11-26-19-20), kế đến là 21 (F2 -105-3-1-6-21). Hai dòng 24 (F2 – 6-100-4-1-8-10-24) và 25 (F2-2-7-15-20-14-1-25) có khối lượng 100 hạt thấp hơn giống đối chứng (MD 17) và HATRI 02ĐP nhưng vẫn cao hơn giống mẹ là HATRI 01ĐP. Năng suất của hai dòng 24 (F2 – 6-100-4-1-8-10-24) và 25 (F2-2-7-15-20-14-1-25) cao hơn cả giống bố, mẹ và giống đối chứng.

4. THẢO LUẬN

Mục tiêu của một chương trình nhân (chọn tạo) giống cây trồng là tạo ra sự thay đổi và chọn (các)

kiểu gen mong muốn để gieo trồng hoặc cho mục đích chọn giống. Đậu phộng là một loại cây trồng tự thụ phấn cao, trong quá trình chọn tạo giống đáp ứng nhu cầu của sản xuất thường đòi hỏi các kỹ năng đặc biệt và có thể tốn thời gian. Trong những năm gần đây, việc phát hiện ra các chỉ thị phân tử đa hình (SNP) kết hợp với các công nghệ giải trình tự gen phát triển đã dẫn đến một sự cải thiện đáng kể trong các quy trình lập bản đồ gen tốt (Varshney và ctv., 2009). Năng suất của đậu phộng được kiểm soát về mặt di truyền bởi các yếu tố đa gen. Lập bản đồ độ phân giải cao của loci định lượng (QTLs) với các điểm đánh dấu được liên kết có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc lựa chọn hỗ trợ đánh dấu trong chọn giống cho các đặc điểm mục tiêu. Trong nghiên cứu hiện tại, với quần thể giống HATRI 01ĐP hạt nhỏ lai với giống HATRI 02 ĐP cho hạt to và dài có cải thiện, giúp cho cây đậu cứng hơn. Sử dụng để xây dựng bản đồ GGT dựa trên chỉ thị phân tử 22 loci và kéo dài chiều dài 50,8 cm. Qua bản đồ GGT ở hình 5 cho thấy 4 cá thể có 100% các vùng gen trùng hợp với cá thể bố (HATRI 02 ĐP), mang gen mục tiêu hạt có kích thước to (15,6-20,2mm). Các cá thể được chọn là 14 (F2-4-10-1-1-14); 20 (F2-18-11-26-19-20); 21 (F2 - 105-3-1-6-21); 22 (F2-215-75-86-35-22). Điều này ghi nhận rằng trên 4 dòng thể hệ chọn từ F₂ tới F₈ đã có sự đồng nhất về đoạn gen mang kích thước hạt to và nhỏ trên các dòng này. Các chỉ thị phân tử được đánh dấu và tìm ra được các phát triển nhắm vào loci SNP liên quan đến giống hạt to và nhỏ của đậu phộng cho sự phân ly tốt và tỉ lệ di hợp tử cao là chỉ thị Aradu-A07-1316694.

5. KẾT LUẬN

- Đã xác định được sự có mặt gen quy định kích thước của hạt trên cây đậu phộng trong quần thể F₂ và F₃ của tổ hợp lai HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP.

- Có sự đa hình trên 22 chỉ thị định vị kích thước hạt trên nhiễm sắc thể A07. Dựa vào bản đồ GGT giúp dễ dàng nhận biết được kiểu di truyền của các con lai trong quần thể có đoạn gen so với bố và mẹ trong thể hệ F₇ của tổ hợp lai HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP. Thông qua 22 chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể A07, đã xác định được đoạn di truyền với khoảng cách từ 0-50,8 cm. Đã thu được 4 dòng có chứa 100% vùng gen trùng hợp với cá thể bố (HATRI 02ĐP), mang gen mục tiêu kích thước hạt to.

- Hai cá thể được chọn lọc sau khi đánh giá kiểu gen và kiểu hình có kích thước hạt to và năng suất

cao là: 20 (F2-18-11-26-19-20), kế đến là 21(F2 -105-3-1-6-21).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả cảm ơn Ủy ban Nhân dân tỉnh Trà Vinh và Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Trà Vinh đã cung cấp kinh phí để thực hiện đề tài này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bera SK, Kamdar JH, Kasundra SV, Dash P, Maurya AK, Jasani MD, *et al.* (2018). Improving oil quality by altering levels of fatty acids through marker-assisted selection of *ahfad2* alleles in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*. 2018; 214:162. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2241-0>
2. Carolina Chavarro, Ye Chu, Corley Holbrook, Thomas Isleib, David Bertioli, Ran Hovav, Christopher Butts, Marshall Lamb, Profile Ronald Sorensen, Scott A. Jackson and Peggy Ozias-Akins, 2020. Pod and Seed Trait QTL Identification To Assist Breeding for Peanut Market Preferences.G3: GENES, GENOMES, GENETICS July 1, 2020 vol. 10 no. 7 2297-2315; <https://doi.org/10.1534/g3.120.401147>.
3. Clements, J. C., M. Dracup and N. Galwey, 2002. Effect of genotype and environment on proportion of seed hull and pod wall in lupin. *Aust. J. Agric. Res.* **53**: 1147.
4. Chen Z, Wang ML, Barkley NA, Pittman RN (2010). A simple allele-specific PCR assay for detecting *FAD2* alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. *Plant Mol Biol Rep.* 2010; 28:542–548. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0181-5>
5. Chu Y, Ramos L, Holbrook CC, Ozias-Akins P. (2007). Frequency of a loss-of-function mutation in Oleoyl-PC Desaturase (*ahFAD2A*) in the mini-core of the US peanut germplasm collection. *Crop sci.* 2007; 47:2372–2378. [10.2135/cropsci2007.02.0117](https://doi.org/10.2135/cropsci2007.02.0117).
6. IRRI, 2007. CropStat for Windows software and downloads (CropStat.exe).
7. Janila P, Pandey MK, Shasidhar Y, Variatha MT, Sriswathi M, Khera P, *et al.* (2016). Molecular breeding for introgression of fatty acid desaturase mutant alleles (*ahFAD2A* and *ahFAD2B*) enhances oil quality in high and low oil containing peanut genotypes. *Plant Sci.* 2016; 242:203–213. [pmid:26566838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26566838/).
8. El-Zeadani, H., A. B. Puteh, M. M. A. Mondal, A. Selamat, Z. A. Ahmad *et al.*, 2014. Seed growth rate, seed filling period and yield responses

of soybean (*Glycine max*) to plant densities at specific reproductive growth stages. *Int. J. Agric. Biol* **16**: 1560–8530.

9. Mounirou Hachim Ayr, Justine Pallu, Aissatou Sambou, Joel Nguenpjo, Maguette Seye, Hodo-Abalo Tossim, Yvette Djiboune, Djibril Sane, Jean-François Rami, Daniel Fonceka, 2020. Fine-Mapping of a Wild Genomic Region Involved in Pod and Seed Size Reduction on Chromosome A07 in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Genes*, MDPI, 2020, 11 (12), 10.3390/genes11121402.

10. Milne *et al.*, Milne I, P Shaw, G Stephen, M Bayer, L Cardle, WTB Thomas, AJ Flavell and D Marshall (2010). Flapjack—graphical genotype visualization. *Bioinformatics*, 26: 3133–3134.

11. Nguyễn Thị Lang (2002). *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*. Nxb. Nông nghiệp, TP. HCM.

12. Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu, Bùi Chí Bảo (2015). *Kỹ thuật di truyền trong công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Giáo dục.

13. Nguyen Thi Lang, Nguyen Van Tao, Bui Chi Buu, 2011. Marker assisted backcrossing (MAB) for rice submergence tolerance in the Mekong delta. *Omon rice* 18: 11-21.2011.

14. Nguyễn Thị Lang (2016). *Sinh học phân tử: ứng dụng trong công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Giáo dục, 179 trang.

15. Tanksley, S. Dand Nelson, J. C. (1996). Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet*, 92: 191-203.

16. Van Berloo (2008). GGT 2.0: Versatile software for visualization and analysis of genetic data *J Hered*, 99 (2): 232-236.

17. Varshney RK, Hoisington DA, Nayak SN, Graner A (2009). Molecular plant breeding: methodology and achievements. In: Somers D, Langridge P, Gustafson PJ (eds) *Methods in molecular biology: plant genomics*. Humana, Totowa, pp 283–304.

APPLICATION MARKER ASSISTED SELECTION IN BREEDING IMPROVEMENT FOR SEED SIZE ON PEANUT (*Arachis hypogaea* L)

Nguyen Thi Lang, Le Minh Khang, Nguyen Thi Hong Loan,
Nguyen Van Huu Linh, Nguyen Thi Khanh Tran, Le Hoang Phuong
Summary

Seed size and quality are important for breeding and production, thus, a more mechanistic understanding of pod development and seed maturation would benefit the improvement of these traits. During pod development, seed filling plays an important role due to the translocation of organic and inorganic compounds and is an important yield component. The rapid development of peanut marker technology, great progress has been made in understanding the increase seed size in peanut, and a series of functional markers has been developed for seed size gene and breeding new peanut varieties in recent years. This paper mainly apply GGT from population F_7 from HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP. There is a polymorphic on the three seeds size positioning test is Aradu-A07-1148327, Aradu-A07-1316694 and GM 1494; on chromosome A07. According to the GGT map, it is easy to identify the genetic pattern of the hybrids in populations compared to the genomic of father and mother in the generation HATRI 01ĐP/HATRI 02ĐP in the F_7 generation. Adopted by 20SNP and two SSR marker on chromosome number A07, the genetic distance from 0-50.8 cM. The selected individuals must carry a superior co-gene on a chromosome that has 4 individuals with 100% of the genes that large seed size with (HATRI 02ĐP), carrying a large size seed target gene. The selected 4 lines as: line F2-4-10-1-1-14; F2-18-11-26-19-20; F2 -105-3-1-6-21; F2-215-75-86-35-22. However after evaluated F_8 and compared phenotype and genotypic only two lines 20 (F2-18-11-26-19-20); and line 21(F2 -105-3-1-6-21) good for selected size seed.

Keywords: Genetic breeding, GGT, seed size, peanut, single-nucleotide polymorphism (SNP) markers, simple sequence repeat (SSR) markers.

Người phản biện: PGS.TS. Đặng Trọng Lương

Ngày nhận bài: 9/7/2021

Ngày thông qua phản biện: 12/8/2021

Ngày duyệt đăng: 19/8/2021

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN MỘT SỐ GIỐNG CAM ĐỊA PHƯƠNG Ở VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ SSR

Lê Thị Thu Trang^{1*}, Khuất Hữu Trung², Đàm Thị Thu Hà¹,

Kiều Thị Dung², Lã Tuấn Nghĩa¹, Hoàng Trọng Cảnh¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu thiết lập tiêu bản ADN của tập đoàn 36 giống cam địa phương, sử dụng 30 chỉ thị SSR để nghiên cứu đa hình giữa các giống cam. Kết quả cho thấy tổng số alen phát hiện tại 30 locut là 95 alen khác nhau, trung bình 3,17 alen/locut. Hệ số thông tin đa hình của mỗi (PIC) dao động từ 0,31 (Ci07B09) đến 0,84 (AG14), trung bình 0,58 và mức độ tương đồng di truyền trong khoảng từ 0,59 đến 0,81. Tại mức tương đồng di truyền 0,59, các giống cam nghiên cứu chia làm 2 nhóm: nhóm I gồm 28 giống có mức tương đồng di truyền từ 0,598 đến 0,81; nhóm II gồm 8 giống có mức tương đồng di truyền từ 0,61 đến 0,716. Nghiên cứu đã xác định được 5 chỉ thị cho nhận dạng đặc trưng CT02, mCrCiR01D06a, CiBE0246, CiBE0105, CiBE2165. Các kết quả thu được có ý nghĩa trong công tác nhận dạng giống phục vụ công tác bảo tồn cũng như chọn lọc giống cam ở Việt Nam.

Từ khóa: *Alen đặc trưng, cam địa phương, chỉ thị SSR, đa dạng di truyền.*

1. MỞ ĐẦU

Cây ăn quả có múi (*Citrus*) là loại cây ăn quả có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao, được trồng ở nhiều nước trên thế giới với tổng sản lượng quả đạt khoảng 158,9 triệu tấn vào năm 2019 (FAOSTAT, 2020). Việt Nam nằm ở trung tâm phát sinh của rất nhiều giống cây ăn quả có múi (Võ Văn Chi, 1997). Trong những năm gần đây, diện tích cây ăn quả cả nước ngày càng được mở rộng, năm 2011 chỉ đạt 138,2 nghìn ha, đến năm 2019 đã đạt trên 256,8 nghìn ha, trong đó diện tích cam đạt 54,4 nghìn ha, sản lượng 488 nghìn tấn (Cục Trồng trọt, 2020). Tuy nhiên, các giống cam có chất lượng cao, phù hợp với thị hiếu người tiêu dùng trong nước và có tiềm năng để xuất khẩu vẫn còn hạn chế. Công tác nghiên cứu về chọn tạo giống cần tập trung và đầu tư nhiều hơn nữa. Do đó, việc nghiên cứu đa dạng nguồn gen cam địa phương không chỉ có ý nghĩa trong bảo tồn mà còn có ý nghĩa lựa chọn vật liệu cho chọn tạo giống cam chất lượng cao ở nước ta.

Trình tự lặp lại đơn giản (SSR - simple sequence repeat markers) được sử dụng khá phổ biến để phân tích đa dạng di truyền các loài thuộc chi *Citrus* ở mức

độ quần thể, cùng loài và khác loài. Ưu điểm của loại hình là đánh giá nhanh chóng, chính xác, cho đa hình cao và ổn định (Froelicher *et al.*, 2008). Tất cả các nghiên cứu về cây có múi của các tác giả Barkley *et al.* (2006); Khuất Hữu Trung và cs. (2009); Shrestha *et al.* (2012); Liu *et al.* (2013); Shahzadi *et al.* (2014); Sharma *et al.* (2015); Mahjbi *et al.* (2016); Ahmed *et al.* (2017); Nguyễn Thị Tuyết và cs. (2018) đều cho thấy chỉ thị SSR được sử dụng để xác định mối quan hệ di truyền ở nhóm cây có múi là hiệu quả nhất. Bài viết này trình bày kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền giữa 36 giống cam địa phương bằng chỉ thị SSR nhằm tạo ra cơ sở dữ liệu thông tin ở mức độ phân tử phục vụ công tác phân loại, bảo tồn, chọn tạo giống, khai thác và sử dụng nguồn gen cây ăn quả bản địa quý của Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Vật liệu là 36 mẫu giống cam có nguồn gốc thu thập tại các tỉnh/thành, gồm: Hà Giang, Yên Bái, Cao Bằng, Bắc Giang, Quảng Ninh, Hà Nội, Nghệ An, Huế, Quảng Nam, Tiền Giang và Đồng Tháp (Bảng 1).

- 30 chỉ thị SSR được định vị trên hệ genome cây có múi với thông tin về trình tự, kích thước, nhiệt độ gắn mỗi đã được công bố trên NCBI được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền.

¹ Trung tâm Tài nguyên thực vật

² Viện Di truyền nông nghiệp

*Email: lethutrang2810@gmail.com

Bảng 1. Danh sách các mẫu giống cam sử dụng trong nghiên cứu

TT	Kí hiệu	Tên mẫu giống	Nguồn gốc thu thập	TT	Kí hiệu	Tên mẫu giống	Nguồn gốc thu thập
1	C1	Cam Tây Giang	Quảng Nam	19	C19	Cam Chanh	Hà Giang
2	C2	Cam Xoàn	Đồng Tháp	20	C20	Cam Cháp	Nghệ An
3	C3	Cam Sành	Đồng Tháp	21	C21	Cam chua	Nghệ An
4	C4	Cam Xã Đoài	Nghệ An	22	C22	Cam Voi	Nghệ An
5	C5	Cam Sông Con	Nghệ An	23	C23	Cam mật	Nghệ An
6	C6	Cam Vân Du	Nghệ An	24	C24	Cam Vân Du lùn	Nghệ An
7	C7	Cam Bù	Nghệ An	25	C25	Cam Nam Đông	T.T. Huế
8	C8	Cam Giấy	Nghệ An	26	C26	Cam đường Canh	Nghệ An
9	C9	Cam Đường	Quảng Ninh	27	C27	Cam Sành	Yên Bái
10	C10	Cam sành Bồ Hạ	Bắc Giang	28	C28	Cam chua	Nghệ An
11	C11	Cam Đường	Quảng Ninh	29	C29	Cam sen đẹp	Tiền Giang
12	C12	Cam Sáp	Quảng Ninh	30	C30	Cam hồng nhiều	T.T. Huế
13	C13	Cam Sành	Hà Giang	31	C31	Cam mật không hạt	Tiền Giang
14	C14	Cam Đường Canh	Hà Nội	32	C32	Cam dây	Tiền Giang
15	C15	Cam Trương Vương	Cao Bằng	33	C33	Cam đắng	Tiền Giang
16	C16	Cam Sành	Nghệ An	34	C34	Cam chanh ruột vàng	Tiền Giang
17	C17	Cam chua	Yên Bái	35	C35	Cam lòng vàng	Hà Nội
18	C18	F29 Cam Giấy	Nghệ An	36	C36	Cam mật dòng 2	Tiền Giang

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Mẫu lá được thu thập và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của của Doyle JJ *at el.* (1990) có cải tiến và kiểm tra nồng độ bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và máy nanodrop Lite.

- Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96 well Thermal cycler. Tổng thể tích phản ứng là 25 µl, bao gồm: 12,5 µl PCR Master Mix 2X (Themor), 1 µl mỗi xuôi (10 pmol); 1 µl mỗi ngược (10 pmol); 1 µl DNA (50 ng/µl); 9,5 µl H₂O khử ion. Điều kiện phản ứng PCR như sau: 95°C trong 5 phút; 35 chu kì gồm: 94°C trong 1 phút, 55 - 60°C trong 30 giây (tùy thuộc vào Tm của môi), 72°C trong 30 giây; 72°C trong 7 phút, bảo quản 4°C.

- Sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide 8% và phát hiện dưới tia UV bằng phương pháp nhuộm Ethidium Bromide 0,5 mg/ml, kích thước sản phẩm PCR được so sánh với thang ADN 50.

- Phương pháp xử lí số liệu: kết quả phân tích dựa trên sự xuất hiện (1) hay không xuất hiện (0) của các băng ADN (các alen). Sơ đồ hình cây và xác định khoảng cách di truyền của các giống được thiết

lập bằng phần mềm NTSYSp 2.1X theo phương pháp của Rohlf (2000).

Mức độ đa dạng của locut được đánh giá bằng hệ số thông tin đa hình PIC (Polymorphism information content) được tính theo phương pháp của Mohammadi và Prasanna (2003).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: năm 2019.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học, Bộ môn Đa dạng sinh học nông nghiệp, Trung tâm Tài nguyên thực vật, xã An Khánh, huyện Hoài Đức, TP. Hà Nội.

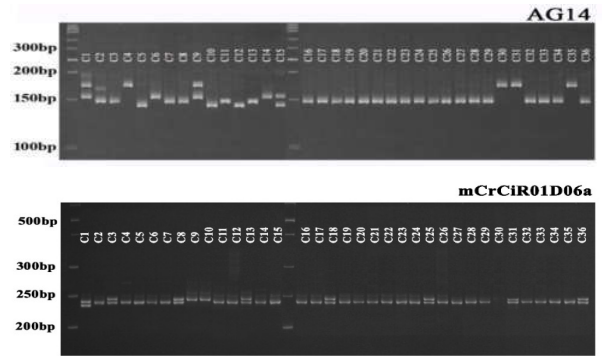
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Lập tiêu bản ADN của các mẫu giống cam nghiên cứu

Các mẫu lá non của 36 giống cam được sử dụng để tách chiết ADN tổng số, kết quả thu được các mẫu ADN tổng số có độ tinh sạch nằm trong khoảng 1,8 - 2,0 và nồng độ khá cao từ 154,7 - 571,1 ng/µl, hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu cho phản ứng PCR.

Tổng số 30 tiêu bản ADN của các giống cam ở các locut SSR được thiết lập với 95 alen, tại mỗi locut số alen đa hình biến động từ 2 đến 6, trung bình là

3,17 alen/locut. Có 8 cặp mỗi cho 2 alen (CAC23, Ci02F07, Ci07B09, Ci07D10, Ci07E06, Ci08A10, GT03, NTCP9), 14 cặp mỗi cho 3 alen (điển hình như Ci01C07, CT02, CiBE0105), 4 cặp mỗi cho 4 alen (AG14, Ci06A05b, CiBE0246, CiBE2016), 3 cặp mỗi cho 5 alen (CiBE1500, CiBE1098, CiBE1137) và riêng cặp mỗi CiBE2165 cho 6 alen. Tại mỗi locut, kích thước các alen thu được trong tập đoàn cam biến thiên từ 6bp (Ci07D10, Ci07B09) đến 50bp (Ci01C07, mCrCIR06A03). Tại 17/30 locut SSR có xuất hiện alen dị hợp tử chiếm tỉ lệ 56,67% (điển hình như AG14, ACT09, CIBE2165). Tần số alen phổ biến tại mỗi locut dao động từ 30% đến 80,56%.



Hình 1. Ảnh tiêu bản của 36 mẫu giống cam nghiên cứu với mỗi AG14 và CT21

Ghi chú: Thang ADN 50bp, C1-C36: là kí hiệu các mẫu giống cam ở bảng 1.

Bảng 2. Đa hình các locut SSR của các giống cam nghiên cứu

TT	Locut SSR	Số alen	Kích thước alen (bp)	Tần số alen phổ biến	Giống xuất hiện alen đặc trưng và kích thước alen	Hệ số PIC
1	AG14	4	143 - 170	38,10		0,84
2	ACT09	3	165 - 200	56,41		0,59
3	CAC23	2	250 - 275	55,56		0,49
4	Ci01C07	3	190 - 240	37,50		0,66
5	Ci02F07	2	175 - 185	66,04		0,45
6	Ci06A05b	4	180 - 220	46,94		0,69
7	Ci07B09	2	187 - 193	80,56		0,31
8	Ci07C09	3	245 - 255	55,32		0,58
9	Ci07D10	2	150 - 156	63,89		0,46
10	Ci07E06	2	210 - 225	64,10		0,46
11	Ci08A10	2	156 - 165	63,89		0,46
12	CT02	3	125 - 140	75,00	C1 (125bp)	0,39
13	CT21	3	135 - 170	47,22		0,62
14	GT03	2	150 - 175	51,43		0,50
15	mCrCIR01D06a	3	235 - 245	76,74	C1 (235bp)	0,37
16	mCrCIR06A02	3	225 - 235	44,44		0,63
17	mCrCIR06A03	3	180 - 230	44,44		0,62
18	NTCP9	2	273 - 280	60,00		0,48
19	P1223	3	206 - 240	37,50		0,66
20	CiBE0246	4	190 - 220	50,00	C23 (220bp)	0,65
21	CiBE0105	3	153 - 160	55,56	C15 (160bp)	0,52
22	CiBE2165	6	260 - 294	34,00	C27 (260bp)	0,76
23	CiBE1500	5	245 - 275	32,08		0,74
24	CiBE1098	5	106 - 125	30,00		0,77
25	CiBE1137	5	148 - 163	35,29		0,74