

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC DÒNG KEO LÁ LIỀM ĐƯỢC TUYỂN CHỌN Ở CÁC VÙNG TRUNG BỘ VÀ NAM TRUNG BỘ BẰNG CHỈ THỊ SSR (MICROSETELLITE)

THS ĐẶNG THỊ THANH HÀ, TS KHUẤT HỮU TRUNG

Viện Di truyền Nông nghiệp

PGS.TS ĐẶNG THÁI DƯƠNG, VÕ QUANG ANH TUẤN

Trường Đại học Nông lâm Huế

Sử dụng 14 chỉ thị SSR (Microsatellite) để nghiên cứu đa dạng di truyền giữa các dòng keo lá liềm được thu thập ở các vùng khác nhau, thu được tổng số 52 loại alen khác nhau (trung bình 3,71 alen/locus). Số alen đa hình đạt 80,77% (gồm 42 alen) và 19,23% là đơn hình (gồm 10 alen). Hệ số PIC dao động từ 0,63 đến 0,87 (trung bình 0,71). Hệ số tương đồng di truyền giữa các dòng keo lá liềm dao động từ 0,63 đến 0,98 (trung bình là 0,81). Dựa vào mối quan hệ di truyền, 53 mẫu dòng keo nghiên cứu được chia làm 8 nhóm khác biệt: nhóm I gồm 27 dòng đều có nguồn gốc từ Thừa Thiên - Huế; nhóm II gồm 1 dòng có nguồn gốc từ Thừa Thiên - Huế; nhóm III gồm 2 dòng có nguồn gốc từ Hà Tĩnh; nhóm IV có 3 dòng có nguồn gốc từ Quảng Bình; nhóm V gồm 15 dòng có nguồn gốc từ Quảng Nam; nhóm VI gồm 2 dòng được thu thập từ Quảng Nam; nhóm VII gồm 2 dòng từ Quảng Nam; nhóm VIII có duy nhất 1 dòng có nguồn gốc từ Quảng Nam. Kết quả cho thấy, biến động di truyền giữa các cá thể là thấp. Điều này có thể là do các cá thể nghiên cứu đều có cùng nguồn gốc xuất xứ hoặc những cá thể này đã được chọn lọc từ quá trình nhân giống vô tính, nên những biến động là không nhiều.

Từ khóa: chỉ thị SSR, đa dạng di truyền, *Acacia orassicarpa*.

Đặt vấn đề

Keo lá liềm (*Acacia orassicarpa* A. Cunn.Ex. benth) còn gọi là Keo lười liềm, có xuất xứ bản địa từ Úc, Indonesia và Papua New Guinea (Doran, Turnbull, et al, 1997). Keo lá liềm được đưa vào trồng ở nước ta vào đầu những năm 80 của thế kỷ trước. Đây là loài cây có khả năng thích nghi tốt với điều kiện khắc nghiệt của đất cát nội đồng vùng Trung Bộ. Keo lá liềm có mức sinh trưởng nhanh nhất trong các loài keo ở vùng thấp, lại vừa thích hợp trong điều kiện cát bay cục bộ do có bộ rễ phát triển (Đặng Thái Dương, 2006). Keo lá liềm là loài cây đa tác dụng, có giá trị kinh tế (lấy gỗ và tinh dầu), là cây trồng lý tưởng để hình thành rừng phòng hộ bảo vệ đất, điều hòa khí hậu, chống cát bay, cát nhảy, cải tạo môi trường sinh thái, tạo điều kiện thuận lợi cho canh tác nông nghiệp và góp phần cải thiện thu nhập của nông dân trồng rừng ở nước ta. Trồng keo lá liềm trên các vùng đất dốc giúp

chống xói mòn, làm băng cản lửa, chắn gió bảo vệ đất rất hữu hiệu.

Trên thế giới, nghiên cứu chọn tạo giống keo ưu tú và đánh giá mối quan hệ di truyền bằng các chỉ thị phân tử đã được thực hiện từ vài thập niên trở lại đây. Tác giả Playford và cộng sự (1993) cho rằng, mức độ đa dạng di truyền cao ở *Acacia melanoxylon* có liên quan đến phân bố địa lý. Josiah và cộng sự (2008) đã nghiên cứu biến động di truyền của quần thể *Acacia senegal* bằng 10 mỗi RAPD và 5 mỗi SSR. Assoumane và cộng sự (2009) cũng đã sử dụng 11 cặp mỗi SSR được thiết kế đặc biệt cho loài *A. Senegal* để phân tích trên 247 cá thể, cho thấy độ đa dạng cao và ghi nhận sự biến động về di truyền cao có liên quan đến phân bố địa lý. Hiện nay, nghiên cứu chọn giống keo lá liềm ở Việt Nam chủ yếu được tiến hành theo kỹ thuật truyền thống nên chưa phản ánh đúng bản chất di truyền của các dòng/giống. Vì vậy, chúng tôi

ANALYZING GENETIC DIVERSITY OF ACACIA ORASSICARPA LINES

SELECTED IN THE CENTRAL AND SOUTHERN CENTRAL REGIONS OF VIETNAM BY MICROSATELLITE MARKERS

Summary

Using 14 SSR markers for analyzing genetic diversity of *Acacia orassicarpa* lines at different regions has obtained a total number of 52 different alleles (with the mean of 3.71 alleles per locus). There are 42 polymorphic alleles (80.77%) and 10 monomorphic alleles (19.23%). PIC value changes from 0.63 to 0.87 (with the mean of 0.71). Genetic similarity coefficient among *Acacia orassicarpa* lines is from 0.63 to 0.98 (with the mean of 0.81). Based on genetic relationships, 53 lines have been divided into 8 different groups: group I includes 27 lines, derived from Thua Thien - Hue; group II consists of 1 line; group III consists of 2 lines derived from Ha Tinh; group IV has 3 lines from Quang Binh; group V consists of 15 lines; group VI has 2 lines collected from Quang Nam; group VII includes 2 lines from Quang Nam; group VIII has only 1 line. The results have shown that genetic diversity among individuals was low. This may occur because the studied individuals have the same close origin or are selected from asexual propagation process, so the fluctuation is not much.

Key words: SSR marker, genetic diversity, *Acacia orassicarpa*.

thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định mối quan hệ di truyền của các cá thể keo lá liềm trồng ở các vùng Trung Bộ và Nam Trung Bộ nhằm góp phần chọn tạo giống keo ưu tú có khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 53 mẫu keo lá liềm sử dụng trong nghiên cứu là các dòng keo được thu thập ở các vùng Trung Bộ và Nam Trung Bộ (bảng 1).

Bảng 1: danh sách 53 mẫu keo lá liềm nghiên cứu

TT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	TT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	TT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
1	A.Cr.N.147	Thừa Thiên - Huế	19	A.Cr.N.151	Quảng Bình	37	A.cr.N.139	Thừa Thiên - Huế
2	A.cr.S.6	Quảng Nam	20	A.cr.N.153	Quảng Bình	38	A.cr.N.141	Thừa Thiên - Huế
3	A.cr.S.51	Quảng Nam	21	A.cr.N.30	Thừa Thiên - Huế	39	A.Cr.N.9	Thừa Thiên - Huế
4	A.cr.N.34	Thừa Thiên - Huế	22	A.Cr.N.8	Thừa Thiên - Huế	40	A.cr.S.2	Quảng Nam
5	A.cr.S.38	Quảng Nam	23	A.cr.N.19	Thừa Thiên - Huế	41	A.cr.S.12	Quảng Nam
6	ĐC01	Thừa Thiên - Huế	24	A.cr.N.10	Thừa Thiên - Huế	42	A.cr.S.17	Quảng Nam
7	A.cr.N.81	Thừa Thiên - Huế	25	A.cr.N.16	Thừa Thiên - Huế	43	A.cr.S.19	Quảng Nam
8	A.cr.N.87	Thừa Thiên - Huế	26	A.Cr.S.43	Quảng Nam	44	A.cr.S.41	Quảng Nam
9	A.cr.N.85	Thừa Thiên - Huế	27	A.cr.N.51	Thừa Thiên - Huế	45	A.cr.S.9	Quảng Nam
10	A.cr.N.83	Thừa Thiên - Huế	28	A.Cr.N.6	Thừa Thiên - Huế	46	A.cr.S.61	Quảng Nam
11	A.cr.N.84	Thừa Thiên - Huế	29	A.Cr.S.45	Quảng Nam	47	A.cr.S.64	Ninh Thuận
12	A.Cr.N.162	Hà Tĩnh	30	A.Cr.N.146	Thừa Thiên - Huế	48	A.cr.S.73	Ninh Thuận
13	A.cr.N.86	Thừa Thiên - Huế	31	A.Cr.S.55	Quảng Nam	49	A.cr.S.80	Ninh Thuận
14	A.cr.N.82	Thừa Thiên - Huế	32	A.Cr.N.156	Quảng Bình	50	A.cr.N.60	Thừa Thiên - Huế
15	A.cr.N.88	Thừa Thiên - Huế	33	A.Cr.S.42	Quảng Nam	51	A.cr.N.67	Thừa Thiên - Huế
16	ĐC02	Thừa Thiên - Huế	34	A.Cr.N.5	Thừa Thiên - Huế	52	A.cr.S.94	Bình Thuận
17	ĐC03	Quảng Nam	35	A.cr.N.90	Thừa Thiên - Huế	53	A.cr.S.100	Bình Thuận
18	A.Cr.N.166	Hà Tĩnh	36	A.Cr.N.7	Thừa Thiên - Huế			

Trình tự 28 cặp mỗi SSR dùng trong nghiên cứu do Hãng Bioneer cung cấp được sử dụng để phân tích và chọn lọc dựa vào các thông tin về trình tự và kích thước đã được công bố.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN tổng số: mẫu lá của từng dòng keo lá liềm được thu thập riêng rẽ và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của Obara và Kako (1998) có cải tiến (Obara và Kako, 1998).

Thành phần phản ứng PCR: tổng thể tích của phản ứng PCR là 10 µl, bao gồm: 1,0 µl đệm PCR 10X; 0,4 µl dNTPs 10 mM; 0,15 µl Taq DNA polymerase 5 U/µl; 0,8 µl mỗi xuôi 10 µM; 0,8 µl mỗi ngược 10 µM; 1 µl ADN (30 ng/µl); 5,85 µl nước khử ion.

Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 94°C (5 phút), 35-37 chu kỳ [94°C (50s); 55-60°C (1 phút), 72°C (1 phút 10s)] và kết thúc ở 72°C (5 phút).

Kiểm tra sản phẩm PCR: sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel polyacrylamide 6% và phát hiện dưới tia UV bằng phương pháp nhuộm

ethidium bromide.

Phân tích và xử lý số liệu: kết quả được thống kê dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng ADN (các alen). Số liệu được xử lý, phân tích bằng chương trình Excel version 5.0 và phần mềm NTSYSpc 2.1.

Hệ số PIC (Polymorphic Information Content) được tính theo công thức sau:

$$PIC = 1 - \sum P_i^2$$

trong đó: P_i : là tần số xuất hiện của alen thứ i .

Tỷ lệ số mỗi không xuất hiện bằng ADN (M%) được tính bằng công thức:

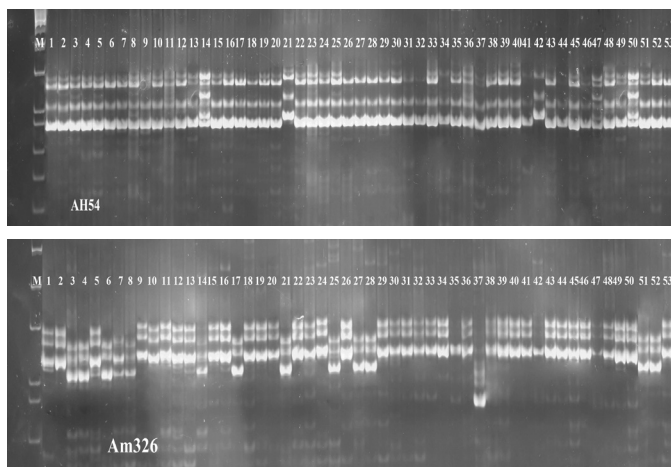
$$M\% = \frac{Z}{P}$$

trong đó, Z là tổng số mỗi không xuất hiện bằng ADN; P là tổng số mỗi được sử dụng trong nghiên cứu.

Kết quả và thảo luận

Hệ số PIC, số alen và tổng số băng ADN thể hiện trên từng mẫu

Trong tổng số 28 cặp mỗi SSR sử dụng trong nghiên cứu, có 14 cặp mỗi thể hiện rõ các băng, vạch hay phân đoạn ADN. Kết quả phân tích 14 cặp mỗi SSR trên tập đoàn 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu thu được tổng số 52 loại alen khác nhau, bao gồm 10 alen đơn hình (19,23%) và 42 alen đa hình (80,77%). Số alen/locus dao động từ 2 đến 10, trung bình 3,71 alen/locus. Trong đó, có 6 cặp mỗi thu được 2 alen bao gồm: Am041, Am164, Am502, AH71, AH20 và Am008; 3 cặp mỗi thu được 3 alen là Am770, AH29 và Am465; 2 cặp mỗi thu được 4 alen là AH69 và Am326; 1 cặp mỗi thu được 6 alen là Am012; 1 cặp mỗi thu được 7 alen là AH18 và 1 cặp mỗi thu được 10 alen là AH54 (hình 1).



Hình 1: ảnh điện di sản phẩm PCR của 53 mẫu giống keo lá liềm với cặp mỗi AH54 và Am326

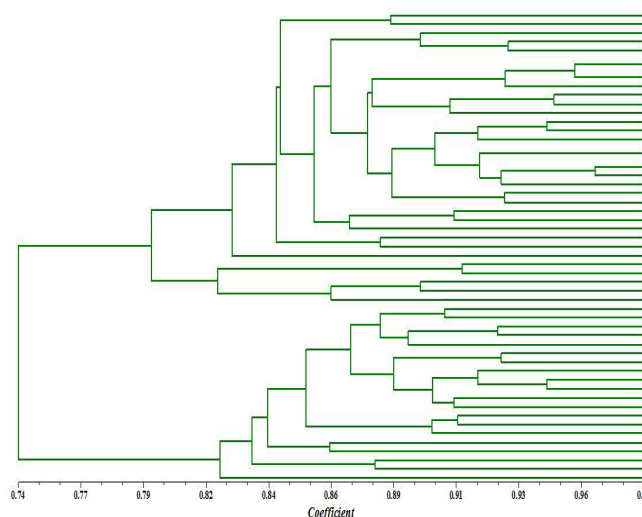
Theo Smith và cs (1997), hệ số PIC được xem là thước đo tính đa dạng di truyền của các alen ở từng locus SSR. Giá trị PIC có thể được hiểu là sự đa dạng di truyền của gen. Số liệu ở hình 1 cho thấy, các mẫu giống keo lá liềm được thu thập ở các vùng sinh thái khác nhau khá đa dạng về thành phần các alen ở những locus nghiên cứu. Hệ số PIC thay đổi từ 0,63 (ở mỗi xuất hiện 2 alen: Am041, Am164, Am502, AH71, AH20 và Am008) đến giá trị PIC cao nhất là 0,87 (ở mỗi xuất hiện 10 alen - AH54). Hệ số PIC trung bình của 14 cặp mỗi nghiên cứu là 0,71. Có 3 alen hiếm xuất hiện (alen có tần số xuất hiện nhỏ hơn 5%) ở hai cặp mỗi AH18 và AH54 (tỷ lệ 21,43%).

Bảng 2: hệ số PIC, số alen và tổng số băng ADN thể hiện trên từng cặp mỗi

TT	Tên cặp mỗi	Số alen thể hiện	Số alen hiếm	PIC	TT	Tên cặp mỗi	Số alen thể hiện	Số alen hiếm	PIC
1	AH18	7	1	0,80	10	AH71	2	0	0,63
2	AH54	10	2	0,87	11	AH29	3	0	0,72
3	AH69	4	0	0,78	12	Am465	3	0	0,71
4	Am012	6	0	0,78	13	AH20	2	0	0,63
5	Am041	2	0	0,63	14	Am008	2	0	0,64
6	Am164	2	0	0,64	Tổng		52	3	9,98
7	Am326	4	0	0,75					
8	Am502	2	0	0,63	Trung bình		3,71	0,21	0,71
9	Am770	3	0	0,75					

Kết quả phân tích mối tương quan di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm trong nghiên cứu

Số liệu thu được từ tiêu bản điện di PCR của 14 cặp mỗi SSR với tổng số 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu được thống kê và phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1, từ đó thiết lập được bảng hệ số tương đồng di truyền và xây dựng sơ đồ phát sinh chủng loại (hình 2).



Hình 2: sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các dòng keo lá liềm nghiên cứu

Kết quả cho thấy, hệ số tương đồng di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu là khá cao, dao động trong khoảng 0,63-0,98 (trung bình là 0,81). Ở mức tương đồng di truyền 83%, tổng số 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu được chia thành 8 nhóm cách biệt di truyền:

* **Nhóm 1**, gồm 27 giống keo lá liềm: A.Cr.N.147, A.cr.N.19, A.cr.N.34, ĐC01, ĐC02, A.cr.N.81, A.cr.N.83, A.cr.N.84, A.cr.N.60, A.cr.N.90, A.cr.N.67, A.cr.N.139, A.cr.N.87, A.cr.N.82, A.cr.N.51, A.cr.N.10, A.Cr.N.146, A.cr.N.16, A.Cr.N.6, A.Cr.N.5, A.Cr.N.8, A.Cr.N.7, A.cr.N.86, A.cr.N.88, A.cr.N.141, A.cr.N.85 và A.cr.N.30. Tổng số 27 giống thuộc nhóm này đều có nguồn gốc từ Thừa Thiên - Huế và được chia thành 5 phân nhóm: *phân nhóm 1.1* (gồm 2 giống: A.Cr.N.147 và A.cr.N.19 có hệ số tương đồng với nhau là 0,89); *phân nhóm 1.2* (gồm 3 giống: A.cr.N.34, ĐC01 và ĐC02; hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm dao động từ 0,88 đến 0,93); *phân nhóm 1.3* (gồm 17 giống: A.cr.N.81, A.cr.N.83, A.cr.N.84, A.cr.N.60, A.cr.N.90, A.cr.N.67, A.cr.N.139, A.cr.N.87, A.cr.N.82, A.cr.N.51, A.cr.N.10, A.Cr.N.146, A.cr.N.16, A.Cr.N.6, A.Cr.N.5, A.Cr.N.8 và A.Cr.N.7; hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm dao động từ 0,82 đến 0,98); *phân nhóm 1.4* (gồm 3 giống: A.cr.N.86, A.cr.N.88 và A.cr.N.141; hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm dao động từ 0,86 đến 0,91); *phân nhóm 1.5* (gồm 2 giống: A.cr.N.85 và A.cr.N.30; hệ số tương đồng di truyền với nhau là 0,88).

* **Nhóm 2**, gồm duy nhất giống A.Cr.N.9, có nguồn gốc từ Thừa Thiên - Huế; hệ số tương đồng di truyền với 52 giống còn lại dao động từ 0,67 đến 0,88.

* **Nhóm 3**, gồm 2 giống: A.Cr.N.162 và A.Cr.N.166 đều có nguồn gốc từ Hà Tĩnh và có hệ số tương đồng với nhau là 0,91.

* **Nhóm 4**, gồm 3 giống: A.Cr.N.151, A.cr.N.153 và A.Cr.N.156 có nguồn gốc từ Quảng Bình và có hệ số tương đồng dao động từ 0,83 đến 0,9.

* **Nhóm 5**, gồm 15 giống: A.cr.S.6, A.Cr.S.45, A.Cr.S.55, A.cr.S.17, A.cr.S.19, A.cr.S.38, A.Cr.S.42, A.cr.S.41, A.cr.S.80, A.cr.S.100, A.cr.S.61, A.cr.S.94, A.cr.S.9, A.cr.S.64 và A.cr.S.73. Nhóm này được chia thành 3 phân nhóm: *phân nhóm 5.1* (gồm 5 giống: A.cr.S.6, A.Cr.S.45, A.Cr.S.55, A.cr.S.17 và A.cr.S.19; có nguồn gốc từ Quảng Nam và có hệ số tương đồng dao động từ 0,87 đến 0,93); *phân nhóm 5.2* (gồm 7 giống là A.cr.S.38, A.Cr.S.42, A.cr.S.41, A.cr.S.80, A.cr.S.100, A.cr.S.61 và A.cr.S.94; hệ số tương đồng của phân nhóm này dao động từ 0,86 đến 0,94); *phân nhóm 5.3* (gồm 3 giống A.cr.S.9, A.cr.S.64 và A.cr.S.73; hệ số tương đồng dao động từ 0,89 đến 0,91).

* **Nhóm 6**, gồm 2 giống A.cr.S.38 và A.cr.S.2; có nguồn gốc từ Quảng Nam và có hệ số tương đồng di truyền với nhau là 0,86.

* **Nhóm 7**, gồm 2 giống A.Cr.S.43 và A.cr.S.12; có nguồn gốc từ Quảng Nam, hệ số tương đồng di truyền với nhau là

0,88.

* **Nhóm 8**, gồm duy nhất giống ĐC03, có nguồn gốc từ Quảng Nam, hệ số tương đồng di truyền với các mẫu giống còn lại dao động từ 0,63 đến 0,88.

Hệ số tương đồng di truyền của các mẫu keo lá liềm thu thập ở các vùng Trung Bộ và Nam Trung Bộ khá cao có thể là do các cá thể nghiên cứu đều có cùng nguồn gốc xuất xứ hoặc những cá thể này đã được chọn lọc từ quá trình nhân giống vô tính, hoặc là do hạt keo được phát tán nhờ gió từ vùng này sang vùng khác.

Kết luận và kiến nghị

Kết quả phân tích 14 chỉ thị phân tử SSR trên tập đoàn 53 mẫu giống keo lá liềm thu được tổng số 52 alen trong đó có 10 alen đơn hình và 42 alen đa hình, trung bình 3,71 alen/locus. Hệ số PIC dao động từ 0,63 đến 0,87 (trung bình 0,71). Tỷ lệ alen hiếm xuất hiện là 21,43% (xuất hiện 3 alen hiếm ở hai cặp mỗi AH18 và AH54).

Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống keo lá liềm dao động từ 0,63 đến 0,98. Ở mức tương đồng di truyền 84%, tổng số 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu được chia thành 8 nhóm cách biệt di truyền. Kết quả này rất hữu ích để lựa chọn được những cá thể hoặc dòng keo lá liềm ở các nhóm khác nhau, mang những đặc điểm ưu tú phục vụ công tác lai tạo giống.

Nhóm tác giả kiến nghị cần tiếp tục nghiên cứu xác định các alen đặc trưng, alen hiếm để nhận dạng chính xác nguồn gen ưu tú có khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi và kháng bệnh ở mức độ phân tử để phục vụ nghiên cứu lai tạo giống ■

Tài liệu tham khảo

1. Assoumane A.A., Vaillant A., Mayaki A.Z. and Verhaegen D. (2009). Isolation and characterization of microsatellite markers for *Acacia senegal* (L.) Willd, a multipurpose arid and semi-arid tree. *Molecular Ecology Resources*: 1-4.
2. Doran J., Cand Turnbull J.W. (1997). *Australian Trees and Shrubs: Species for Land Rehabilitation and Farm Planting in the Tropics*. ACIAR Monograph No. 24. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
3. Đặng Thái Dương (2006). Kết quả thí nghiệm trồng rừng keo (Acacia) trên vùng đất cát huyện Lệ Thủy, tỉnh Quảng Bình. *Báo Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* số tháng 10.2006.
4. Josiah C.C., George D.O., Eleazar O.M. and Nyamu W.F. (2008). Genetic diversity in Kenyan populations of *Acacia senegal* (L.) willd revealed by combined RAPD and ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7. 2333-2340.
5. Obara O.P. and Kako S. (1998). Genetic diversity and identification of cymbidium cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 99: 95-1001.
6. Playford J., Bell J.C., Moran G.F. (1993). A major disjunction in genetic diversity over the geographic range of *Acacia melanoxylon* R. Br. *Austr. J. Bot.* 41: 355-368.
7. Smith J.C., Chen E.C.L., Shu H., Smith O.N., Wall S.J., Senior M.L. (1997). An evaluation of utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163-173.