

# BÁO CÁO KHOA HỌC

*Nghiên cứu nhận dạng phân tử  
một số nguồn gen đậu tương  
địa phương bằng chỉ thị SSR*

Báo cáo viên: Nguyễn Thị Ngọc Lan

# BỐ CỤC CỦA BÁO CÁO

- 1. Mở đầu
- 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu
- 3. Kết quả nghiên cứu
- 4. Kết luận
- 5. Tài liệu tham khảo

## 1.1. ĐẬU VẤN ĐỀ

- Đậu tương là loại cây trồng chiến lược của nhiều quốc gia trên thế giới. Hạt đậu tương có hàm lượng các chất dinh dưỡng cao, là nguồn năng lượng cần thiết cho cuộc sống con người. Ở Việt Nam, cây đậu tương được gieo trồng ở cả 7 vùng nông nghiệp trên cả nước.
- Các giống đậu tương rất đa dạng và phong phú cả về kiểu hình và kiểu gen, đây là nguồn nguyên liệu để chọn tạo giống đậu tương mới cho năng suất và chất lượng phù hợp với mục tiêu chọn giống. Tuy nhiên, tại Việt Nam đến nay chưa có bất kỳ nghiên cứu nào về việc lập tiêu bản để nhận dạng những giống đậu tương địa phương, có tiềm năng di truyền.

## 1.1. ĐẶT VẤN ĐỀ (TIẾP)

- Phương pháp lập tiêu bản ADN (hay DNA fingerprinting) có những điểm nổi trội: (i) Cho đa hình di truyền cao không phụ thuộc vào loại tế bào, (ii) hạn chế tối đa tác động của môi trường, (iii) kiểu di truyền đơn giản.
- Trong đó, các bộ chỉ thị AFLPs và SSR đã được sử dụng thành công trong nghiên cứu phân loại, nhận dạng ADN nhân của một số loài cây trồng ở một số ngân hàng gen thế giới, phòng thí nghiệm chuyên định loại và xác định tiêu bản giống trên thế giới.
- Từ những lý do nêu trên, việc xây dựng tiêu bản ADN giống đậu tương là cần thiết cho việc bảo tồn và khai thác nguồn gen đậu tương bản địa.

## 2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

- **Mẫu giống:** 19 mẫu đậu tương Việt Nam được lưu giữ tại Ngân hàng gen cây trồng quốc gia - Trung tâm Tài nguyên thực vật

**Bảng 1.** Danh sách 19 giống đậu tương sử dụng trong nghiên cứu

<b>Tên giống</b>	<b>Số ĐKNHG</b>	<b>Ký hiệu</b>	<b>Tên giống</b>	<b>Số ĐKNHG</b>	<b>Ký hiệu</b>
<b>Sông Mã</b>	GBVN006645	SB1	<b>Cúc Hà Bắc</b>	GBVN004980	SB12
<b>Sông Mã</b>	GBVN006648	SB2	<b>Lơ Bắc Giang</b>	GBVN006642	SB13
<b>Cúc Lục Ngạn</b>	GBVN006807	SB4	<b>Tậu pấu</b>	GBVN008807	SB14
<b>Vàng Mường Khương</b>	GBVN006659	SB5	<b>Tậu pấu đu</b>	GBVN008808	SB15
<b>Vàng Hà Giang</b>	GBVN0014154	SB6	<b>Tậu pấu đà</b>	GBVN008811	SB16
<b>Xanh Bắc Giang</b>	GBVN007501	SB7	<b>Tậu pấu xừ</b>	GBVN008812	SB17
<b>Xanh Bắc Giang</b>	GBVN0016086	SB8	<b>Mác thúa tương kheo</b>	GBVN009821	SB18
<b>Cúc Quảng Ninh</b>	GBVN008024	SB9	<b>Mác thúa tương đương</b>	GBVN0014144	SB19
<b>Xanh Quảng Ninh</b>	GBVN008023	SB10	<b>Đậu tương đen</b>	GBVN008025	SB20
<b>Cúc Hà Bắc</b>	GBVN004979	SB11			

## 2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU (TIẾP)

- **Chỉ thị phân tử:** 30 chỉ thị SSR nằm trên 20 NST của đậu tương được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu là những chỉ thị được lấy từ cơ sở dữ liệu genome đậu tương [soybase.org](http://soybase.org). Thông tin về chỉ thị được và mối liên kết với các QTL liên quan được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2.** Danh sách 30 chỉ thị SSR sử dụng trong nghiên cứu và thông tin QTL liên kết

Locut	Chr	Motif	QTL	% chi phối kiểu hình (R <sup>2</sup> )	Tài liệu tham khảo
<b>Satt184</b>	1	(ATT)13	Sd wt 18-1.2	11.3	Panthee et al. 2005
<b>Satt267</b>	1	(ATT)16	<u>Pubescence density 2-4</u>	3.79	Du et al. 2009
<b>Satt005</b>	1	(ATT)19	<u>Phytoph 6-2</u>	21.98	Li et al. 2010
<b>Satt530</b>	2	(ATT)12	<u>Seed weight 32-3</u>	20.5	Li et al. 2008
<b>Satt194</b>	3	(ATT)23	<u>Seed yield 25-2</u>	14.0	Palomeque et al. 2009
<b>Satt596</b>	16	(ATT)17	<u>Seed weight 36-14</u>	7.53	Han et al. 2012
<b>Satt165</b>	5	(ATT)18			Zhao et al. 2005
<b>Satt281</b>	6	(ATT)19	<u>Rhizoc root and hypocot rot 1-1b</u>	39.0	Zhao et al. 2005
<b>Satt307</b>	6	(ATT)12	<u>SDS 8-2</u>	13.6	Njiti et al. 2002
<b>Satt245</b>	7	(ATT)13(ATG) 15	<u>Rhizoc root and hypocot rot 1-3b</u>	14.0	Zhao et al. 2005
<b>Satt308</b>	7	(ATT)21	<u>Seed protein 34-3</u>	8.3	Lu et al. 2012
<b>Satt177</b>	8	(ATT)16	<u>Rhizoc root and hypocot rot 1-2b</u>	23.0	Zhao et al. 2005
<b>Satt329</b>	8	(ATT)23	<u>Sclero 9-1</u>	10.4	Guo et al. 2008
<b>Satt242</b>	9	(ATT)26	<u>Seed glycitein 6-4</u>	0.9	Gutierrez-G. et al. 2010
<b>Satt345</b>	10	(ATT)27	<u>Leaflet area 2-3</u>	11.0	Vieira et al. 2006



**Bảng 2.** Danh sách 30 chỉ thị SSR sử dụng trong nghiên cứu và thông tin QTL liên kết (tiếp)

Locut	Chr	Motif	QTL	% chi phối kiểu hình (R <sup>2</sup> )	Tài liệu tham khảo
<b>Satt197</b>	11	(ATT)20	<u>Seed glycitein 4-2</u>	41.2	Kassem et al, 2004
<b>Satt509</b>	11	(ATT)30	<u>Seed glycitein 8-2</u>	13.4	Yoshikawa et al. 2010
<b>Satt192</b>	12	(ATT)32	<u>Seed glycitein 9-7</u>	11.7	Yang et al. 2011
<b>Satt434</b>	12	(ATT)32	<u>Bean pyralid 1-5</u>	12.5	Xing et al. 2012
<b>Satt335</b>	13	(ATT)12	<u>Lodging 6-2</u>	17.0	Orf et al. 1999
<b>Satt586</b>	13	(ATT)19	<u>Leaflet P 1-2</u>	25.6	Li et al. 2005
<b>Satt534</b>	14	(ATT)25	<u>Seed linolenic 10-1</u>	0.59	Spencer et al. 2004
<b>Satt045</b>	15	(ATT)18	<u>Seed palmitic 7-3</u>	13.38	Wang et al. 2012
<b>Satt406</b>	16	(ATT)31	<u>Leaflet width 8-4</u>	4.32	Kim et al. 2005
<b>Satt431</b>	16	(ATT)21	<u>Photoperiod insensitivity 5-4</u>	18.1	Liu et al. 2011
<b>Satt228</b>	8	(ATT)19	<u>Seed calcium 1-1</u>	10.7	Zhang et al. 2009
<b>Satt191</b>	18	(ATT)18	<u>Seed oil 36-6</u>	9.08	Wang et al. 2012
<b>Satt309</b>	18	(ATT)13	<u>SCN 14-2</u>	97.0	Meksem et al. 1999
<b>Satt373</b>	19	(ATT)21	<u>First flower 8-3</u>	74.6	Yamanaka et al. 2001
<b>Satt239</b>	20	(ATT)22	<u>Seed protein 15-1</u>	27.7	Chung et al. 2003

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- ADN tổng số được tách chiết bằng cách trộn lẫn 10-20 cá thể của từng mẫu giống, được tách chiết theo phương pháp của Doyle; 1987 được cải tiến.
- Phản ứng PCR với mỗi SSR được thực hiện với thành phần: 1x buffer, 0,25mM dNTPs, 20mM mỗi SSR (xuôi và ngược), 0,5unit Taq và 25ng ADN tổng số đậm tương; thể tích phản ứng PCR là 10 $\mu$ l; ở điều kiện nhiệt: biến tính ở 95°C trong 5 phút, 35 chu trình: 94°C trong 30 giây, 55°C trong 40 giây, 72°C trong 1 phút; tổng hợp tiếp ở 72°C trong 7 phút, bảo quản tại 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide 8% với ADN ladder của Fermentas.

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU (TIẾP)

- Xử lý số liệu đối với chỉ thị SSR bao gồm: Số alen trên một locus, Hệ số đa dạng di truyền PIC, tần số alen, hệ số đa dạng gen, cây phân loại dựa trên thuật toán UPGMA, khoảng cách di truyền sử dụng khoảng cách “C.S Chord 1967” (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) được phân tích bằng phần mềm Power Marker v3.25 (Liu & Muse, 2005)

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

- Trong tổng số 30 mồi SSR được khảo sát, 25/30 mồi cho băng đa hình trong tập đoàn 19 giống đậu tương nghiên cứu. Tổng số alen thu nhận được là 114 trên tổng số 25 locut, đạt trung bình 5 alen/locut. Số alen quan sát được lớn nhất tại locut Satt005 với tổng cộng 8 alen, nhỏ nhất tại locut Satt335 thu được chỉ 2 alen.
- Hệ số đa dạng di truyền (PIC: Polymorphism Information Content) dao động trong khoảng từ 0,135 (tại locut Satt345) tới 0,838 (tại Satt005), hệ số đa dạng về gen (gendiversity) dao động trong khoảng từ 0,145 (tại locut Satt345) tới 0,854 (tại locut Satt005).
- Như vậy, với 25 chỉ thị SSR cho đa hình và rõ nét, 25 tiêu bản ADN của bộ 19 mẫu giống đậu tương địa phương của Việt Nam đã được xây dựng đối với từng vị trí locut SSR theo từng nhiễm sắc thể.

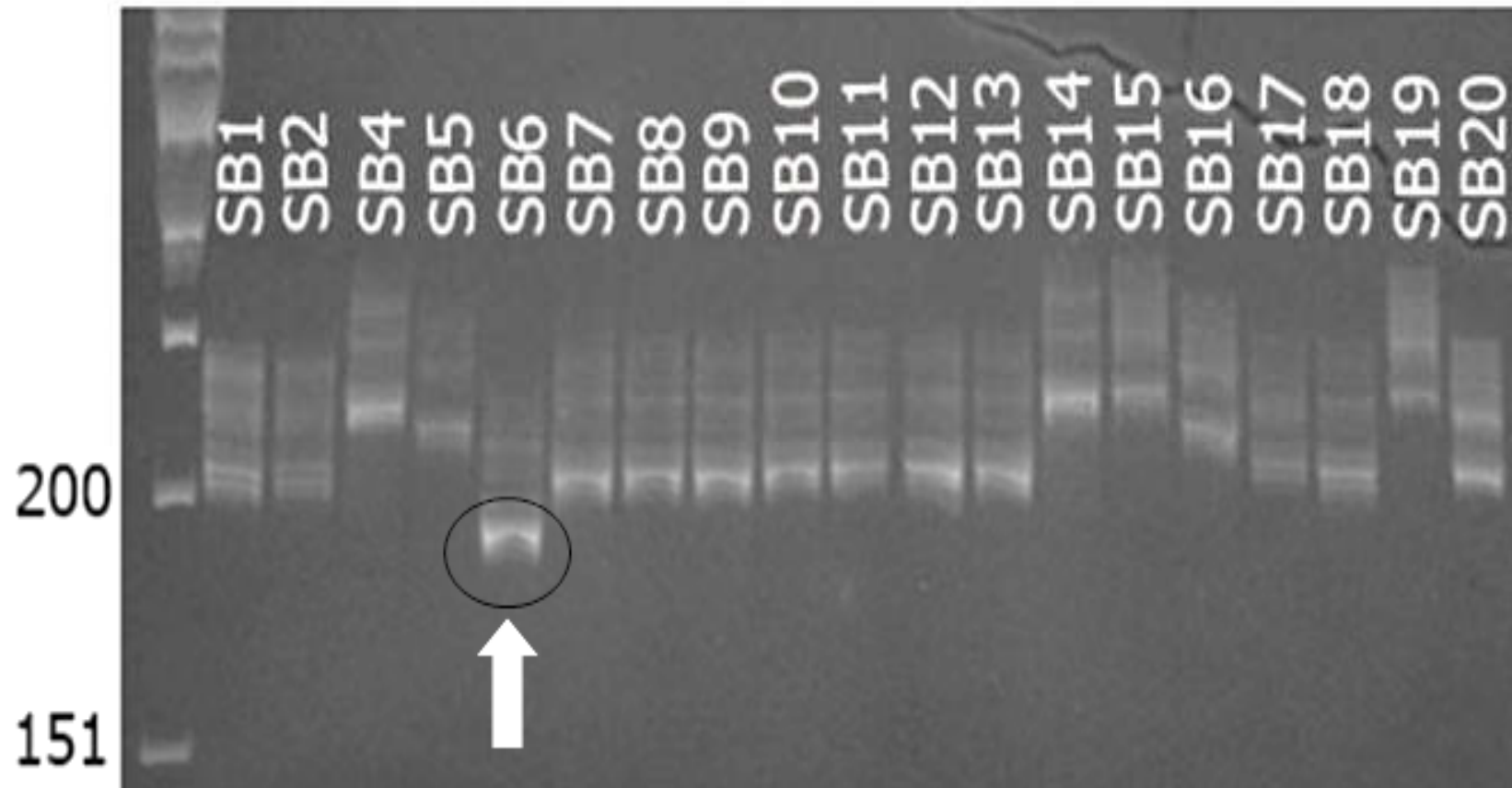
**Bảng 3.** Tổng số alen và alen đặc trưng theo từng locut đối với 19 giống đậu tương bằng chỉ thị SSR

Marker	Số alen	Alen unique	PIC	Mẫu có alen hiếm	Marker	Số alen	Alen unique	PIC	Mẫu có alen hiếm
<b>Satt184</b>	5		0.6485		<b>Satt434</b>	4		0.3393	
<b>Satt267</b>	2		0.2554		<b>Satt431</b>	4	1	0.4952	SB6
<b>Satt005</b>	8		0.8376		<b>Satt335</b>	2		0.2024	
<b>Satt530</b>	5		0.6591		<b>Satt586</b>	4		0.4047	
<b>Satt194</b>	5		0.6507		<b>Satt534</b>	6	1	0.7741	SB11
<b>Satt596</b>	5		0.6130		<b>Satt045</b>	5		0.7085	
<b>Satt307</b>	5	1	0.6528	SB11	<b>Satt309</b>	2		0.2306	
<b>Satt245</b>	5		0.5614		<b>Satt406</b>	3		0.4918	
<b>Satt308</b>	7		0.7529		<b>Satt228</b>	3		0.3814	
<b>Satt242</b>	4		0.6452		<b>Satt191</b>	4		0.6452	
<b>Satt345</b>	2		0.1349		<b>Satt373</b>	6		0.6443	
<b>Satt197</b>	4		0.5050		<b>Satt239</b>	6	1	0.7341	SB1
<b>Satt192</b>	8		0.6574		<b>Tổng số</b>	114			

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU (TIẾP)

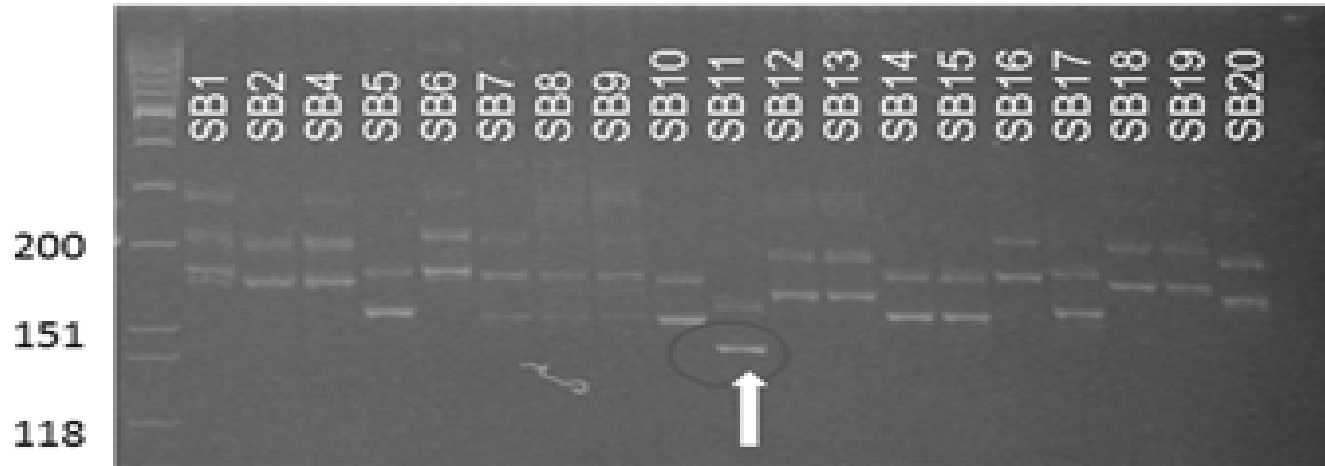
- Locut Satt307 liên kết với *QTL SDS 8-2* quy định khả năng kháng *Fusarium solani* với mức ảnh hưởng của locut tới kiểu hình là 13,6%. Ngoài ra, locut Satt307 liên kết với các QTL khác như tính kháng *Phytophthora sojae*, khả năng chín quả, trọng lượng hạt, độ dài lông thân...
- Locut Satt534 liên kết với *QTL Seed linolenic 10-1* quy định hàm lượng axit linolenic trong hạt với mức ảnh hưởng 0.59%. Bên cạnh đó, locut này cũng liên kết với các QTL khác như thời gian ra hoa đầu tiên, khả năng chịu ngập...
- Locut Satt239 liên kết với *QTL Seed protein 15-1* quy định hàm lượng protein trong hạt đậu tương với mức ảnh hưởng 27.7%. Bên cạnh đó, locut này còn liên kết với các QTL khác như hàm lượng dầu trong hạt, chiều cao cây, năng suất hạt...(Cregan et al. 1999)

# SATT431

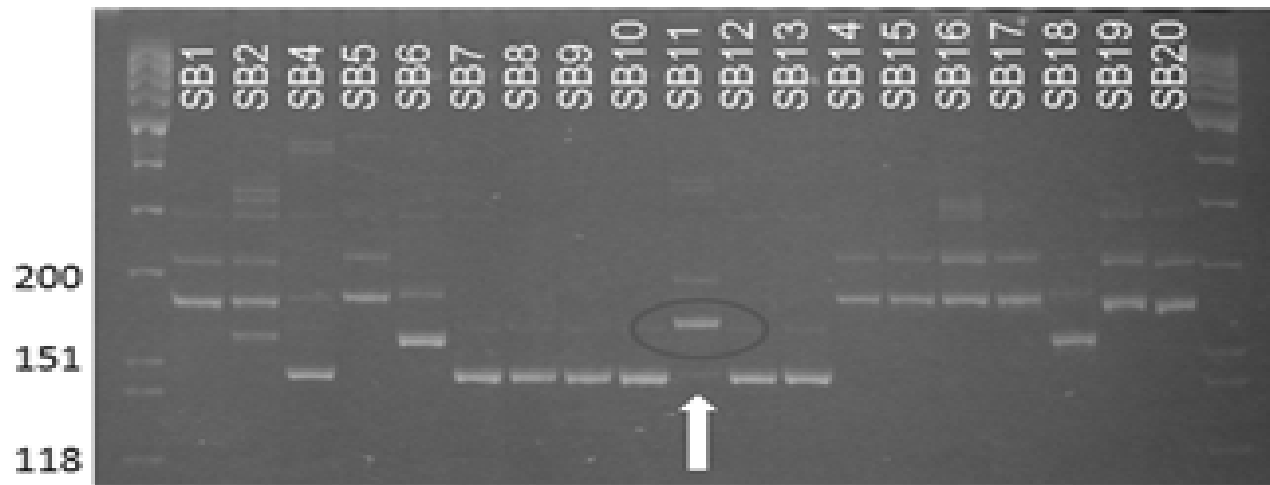


**Hình 1.** Tiêu bản SSR của 19 giống đậu tương tại locut Satt431. Mẫu giống SB6 (đậu tương Cúc Hà Bắc) được nhận dạng bởi 1 alen hiếm

### SATT 534



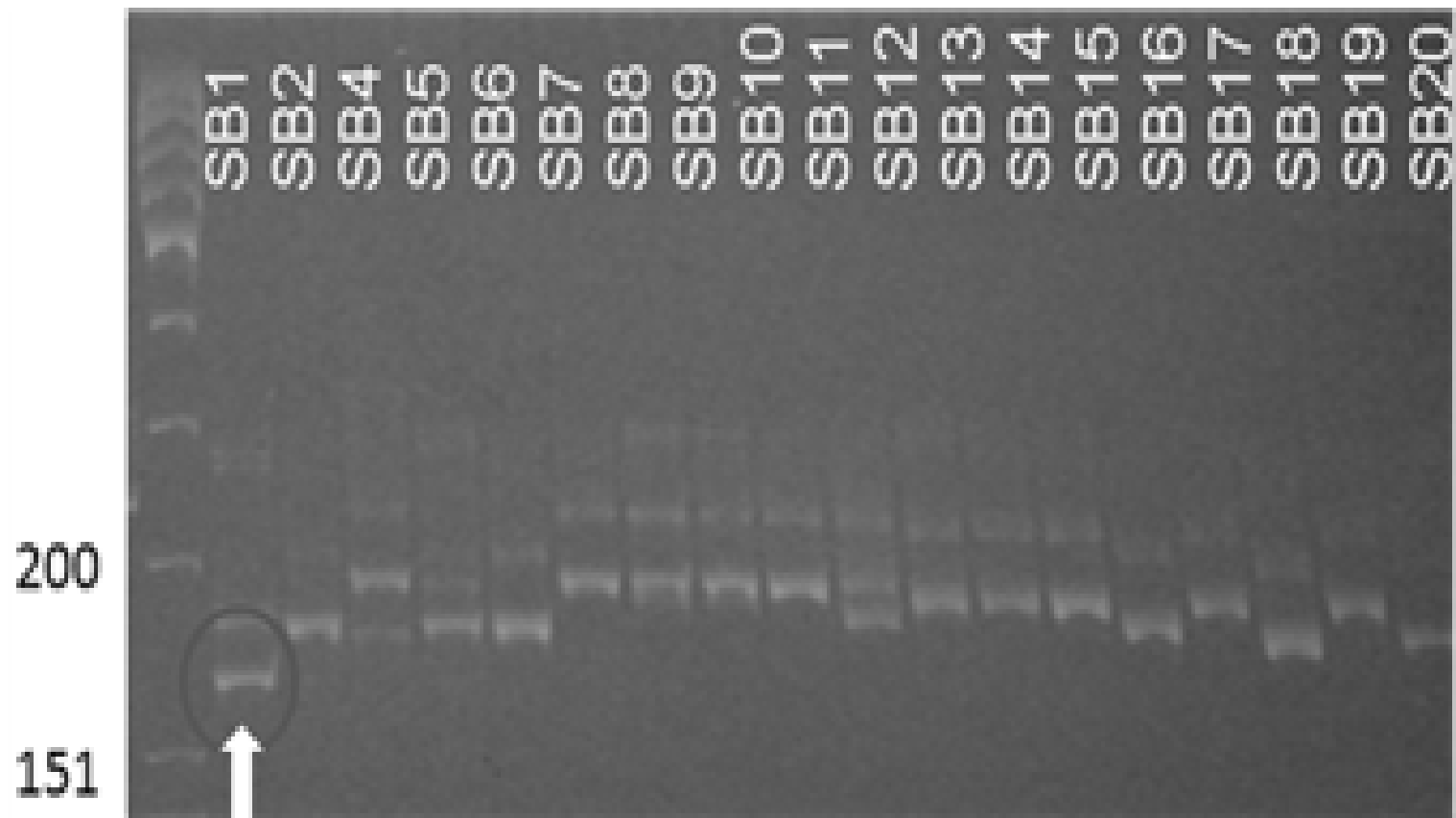
### SATT 307



**Hình 2.** Tiêu bản của 19 giống đậu tương tại locut Satt307 và Satt534.  
Mẫu giống SB11 (đậu tương Vàng Hà Giang) được nhận dạng bởi 2 alen hiếm 2 locut SSR này



## SATT 239



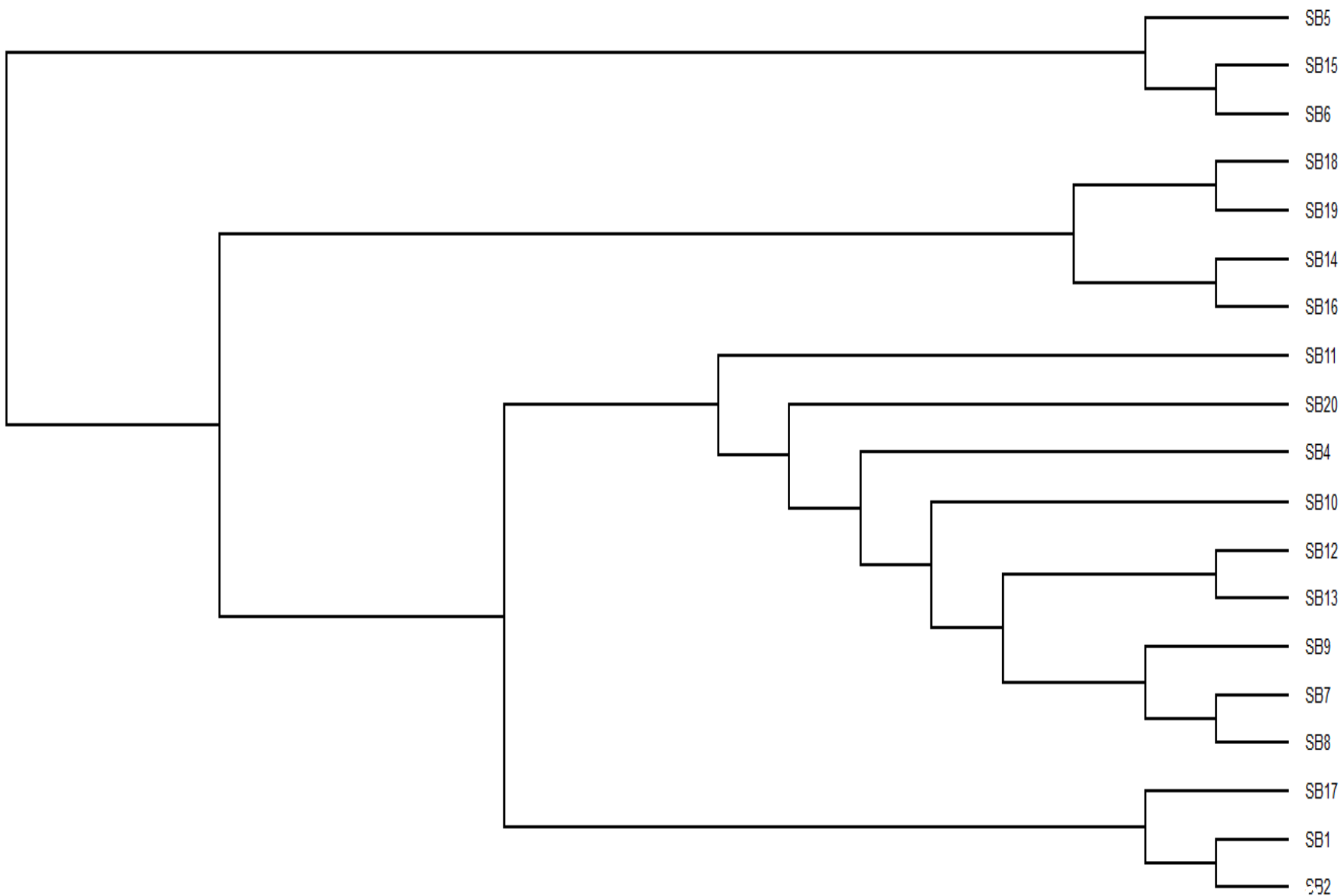
**Hình 3.** Tiêu bản SSR của 19 giống đậu tương tại locut Satt239. Mẫu giống SB1 (đậu tương Sông Mã-Mai Châu) được nhận dạng bởi 1 alen hiếm.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU (TIẾP)

- Cây phân loại dựa vào 114 alen từ 25 tiêu bản SSR được xây dựng bằng phần mềm Power Marker v3.25 theo phương pháp tính khoảng cách di truyền của Nei, 1972, phân nhóm UPGMA chia 19 mẫu giống trong nghiên cứu thành 3 nhóm chính, nhóm 3 chia thành 2 nhóm phụ, gồm 19 giống được nhận biết tách biệt với nhau.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU (TIẾP)

- Nhóm thứ nhất gồm mẫu giống đậu vàng Hà Giang, đậu vàng Mường Khương và Tậu pấu đu, nhóm thứ hai bao gồm 4 mẫu giống bao gồm Tậu pấu, Tậu quá đà, Mác thúa tương kheo và Mác thúa tương đương.
- Nhóm phụ 3.1 bao gồm 9 mẫu giống Đậu tương xanh Bắc Giang (số ĐK GBVN0016086), Đậu tương cúc Quảng Ninh, Đậu tương xanh Quảng Ninh, Cúc Hà Bắc (số ĐK GBVN004979), Cúc Hà Bắc (số ĐK GBVN004980), Đậu tương lơ Bắc Giang, Cúc Lục Ngạn và Đậu tương đen; nhóm phụ 3.2 bao gồm 3 mẫu giống là đậu tương Sông Mã thu tại Mai Châu, đậu tương Sông Mã thu tại Yên Châu (Số ĐK GBVN006648) và Tậu pấu xù. Kết quả này cho thấy tổ hợp các alen thu được từ bộ chỉ thị này là duy nhất đối với từng giống đậu tương nghiên cứu.



**Hình 4.** Cây phân loại biểu thị quan hệ di truyền giữa 19 giống đậu tương bản địa bằng 30 chỉ thị SSR (Power marker v3.25, bootstrap 1000)

## 4. KẾT LUẬN

- Kết quả nghiên cứu tập đoàn 19 giống đậu tương Việt Nam đã thu được 114 alen đa hình trong số 25/30 môi SSR.
- Bộ mẫu tiêu bản gồm 25 locut SSR trải đều trên 20 NST đã được thiết lập, trong đó có 4 tiêu bản SSR có 4 alen hiếm của 3 mẫu giống đậu tương là đậu tương Cúc Hà Bắc, đậu tương sông Mã thu tại Mai Châu và đậu tương Vàng Hà Giang.
- Các alen này nằm trong vùng liên kết với QTL quy định khả năng kháng *Fusarium solani*, kháng *Phytophthora sojae*, quy định hàm lượng axit linolenic trong hạt, hàm lượng protein trong hạt, khả năng chín của quả, trọng lượng hạt, độ dài lông thân, thời gian ra hoa đầu tiên, khả năng chịu ngập.
- Thông tin từ nghiên cứu này có ý nghĩa trong công tác quản lý nguồn gen và chọn tạo giống đậu tương nước nhà.



**XIN TRÂN TRỌNG  
CẢM ƠN!**