

XÂY DỰNG BẢN ĐỒ CÁC NHÓM LIÊN KẾT GENOME CÂY BÔNG CỎ (*G. arboreum* L.) PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU CHỌN GIỐNG BÔNG VẢI KHÁNG BỆNH XANH LÙN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Nguyễn Thị Lan Hoa², Trịnh Minh Hợp³, Nguyễn Duy Bảy⁴ và CS.*

¹Viện Di truyền nông nghiệp.

²Trung tâm Tài nguyên thực vật.

³Viện Nghiên cứu Bông và PTNN Nha Hồ.

⁴Trường Đại học Kỹ thuật Texas, Hoa Kỳ.

*Phạm Thị Hoa¹, Nguyễn Thị Nhài¹, Nguyễn Thị Tân Phương¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy¹.

I. MỞ ĐẦU

Cây bông *Gossypium* L. bao gồm 45 loài lưỡng bội và 5 loài tứ bội (Fryxell, 1992). Bông lưỡng bội chia làm 8 bộ gen, được ký hiệu từ A đến G và K (Beasley, 1940; Wendel và Cronn, 2003) với số lượng nhiễm sắc thể = 13. Cho đến nay, có 4 loài bông được trồng lấy sợi: Hai dạng nhị bội (bông cỏ) ($2n = 2x = 26$): *G. arboreum* và *G. herbaceum* và hai dạng tứ bội ($2n = 2x = 52$): *G. hirsutum* (bông luồi) và *G. barbadense* (bông hải đảo). Trong đó, bông cỏ *G. arboreum* có bộ gen lưỡng bội AA có các đặc tính nông sinh học tốt như chín sớm, độ bền xơ, hàm lượng dầu cao, có khả năng chống chịu điều kiện bất lợi, kháng sâu bệnh tốt... Vì thế, đây là nguồn gen được các nhà chọn giống quan tâm (Ma, 2008).

Lập bản đồ liên kết dựa trên các chỉ thị ADN đóng vai trò quan trọng trong công tác nghiên cứu cấu trúc genome, chức năng gen, tiến hóa cũng như giúp cho công tác chọn giống nhờ chỉ thị phân tử (Wangzhen Guo và CS., 2007). Gần đây, với sự ra đời của chỉ thị phân tử, đặc biệt là chỉ thị SSR, nhiều bản đồ di truyền genome cây bông ở các loài khác nhau đã được thiết lập (Reddy và CS., 2001; Qureshi và CS., 2004; Han và CS., 2004, 2006; Park và CS., 2005; Wang và CS., 2006; Guo và CS., 2007; Ma và CS., 2008).

Để lập bản đồ gen, công tác khảo sát chính xác các tổ hợp lai với những giống bố mẹ đóng vai trò qua trọng. Cây bố mẹ phải mang đặc tính tương phản rõ rệt và có mức độ đa hình ADN đủ lớn để dễ dàng xác định các chỉ thị liên kết. Tuy nhiên khoảng cách di truyền giữa các cây bố mẹ không được quá xa vì có thể ảnh hưởng tới sức sống hoặc độ hữu thụ của thế hệ con lai.

Trong nghiên cứu này, để lập bản đồ nhóm liên kết genome ở bông cỏ *G. arboreum*, chúng tôi đã tiến hành khảo sát đánh giá đa hình ADN giữa giống B10 (có nguồn gốc từ Ấn Độ) và giống bông cỏ Nghệ An sử dụng chỉ thị SSR. Những chỉ thị cho đa hình giữa hai giống bông B10 và CNA được sử dụng để phân tích phân ly di truyền quần thể F₂ (B10 × CNA). Số liệu phân tích phân ly di truyền được xử lý để xây dựng bản đồ các nhóm liên kết genome cây bông cỏ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Giống bông cỏ Nghệ An kháng bệnh xanh lùn và giống bông cỏ B10 có nguồn gốc từ Ấn Độ.

- Quần thể F2 (B10 ×CNA) gồm 271 cá thể.

- 770 cặp mồi SSR được chọn lọc từ 8915 cặp mồi đã được lập bản đồ trên hệgenome cây bông [Cotton Marker Database: <http://www.cottonmarker.org>; Cotton Genome Database: <http://cottondb.org>; Các bản đồ liên kết genome cây bông đã công bố: Reddy et al.(2001); Qureshi et al.(2004), Han et al.(2004, 2006), Park et al.(2005), Wang et al.(2006), Guo et al.(2007), Ma et al.(2008)].

2. Phương pháp nghiên cứu

- **Phương pháp tách chiết ADN tổng số:** ADN lá bông được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp CTAB của Doyle et al.(1987) có cải tiến.

- **Kỹ thuật SSR:** Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 9902. Tổng dung dịch phản ứng là 15 µl bao gồm 50 ng ADN tổng số, 0.15 µM mồi, 0.2 mM dNTPs, 1X dịch đệm PCR, 2.5 mM MgCl₂ và 0.5 đơn vị Taq TaKaRa. Điều kiện phản ứng PCR như sau: 7 phút: 95⁰C; 40 chu kỳ của: 15 giây: 94⁰C, 30 giây 55⁰C, 2 phút: 72⁰C và bước cuối cùng - giữ mẫu ở 4⁰C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose SFR 3,5% (Liu et al., 2000).

- Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu phân tích quần thể phân ly F2 với các chỉ thị SSR được nhập vào Excel và được xử lý chương trình phần mềm Mapmaker/EXP V 3.0 (Whitehead Institute, 1992).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích đa hình giữa hai giống bông B10 và CAN

Để lập bản đồ liên kết gen kháng bệnh xanh lùn ở bông cỏ *G. arboreum* phải thiết lập được quần thể phân ly thông qua các tổ hợp lai từ những cây bố mẹ có các đặc tính kháng và nhiễm bệnh xanh lùn rõ rệt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng cặp lai giữa giống bông cỏ Nghệ An kháng bệnh xanh lùn và giống bông cỏ Ấn Độ B10 có đặc tính nông sinh học tốt nhưng nhiễm bệnh (bảng 1). Đây là cặp bố mẹ có khác biệt di truyền cao nhất và thuộc 2 nhóm khác nhau khi phân tích tương quan di truyền trong các giống bông cỏ nghiên cứu.

Dựa trên thông tin 8915 cặp mồi đã biết của hệ genome cây bông, chúng tôi đã chọn lọc được 770 cặp mồi đã biết vị trí trên bản đồ nhiễm sắc thể để phân tích đa hình ADN giữa 2 dòng/giống bố mẹ nói trên. Những cặp mồi này phân bố đều trên hệ gen bông cỏ.

Các cặp mồi SSR sử dụng trong nghiên cứu này nằm trong 11 nhóm mồi khác nhau: BNL, CIR, CMS, DPL, JESPR, MGES, MUCS, MUSS, NAU, STV, TM, trong đó, 3 nhóm mồi được chọn nhiều nhất là BNL với 254 cặp mồi, NAU với 182 cặp mồi và CIR với 134 cặp mồi. Kết quả phân tích đa hình 770 mồi thu được 119 cặp mồi cho đa hình giữa 2 giống nghiên cứu, chiếm 15,45%. Do các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này đã được chọn lọc từ các cặp mồi đã công bố trên các bản đồ genome, vì vậy tỷ lệ đa hình thu được cao hơn so với các công bố trước trên cùng đối tượng bông cỏ *G. arboreum* (Ma et al.2008). Ma (2008) đã sử dụng 6.092 cặp mồi eSSR và gSSR để khảo sát đa hình giữa cặp lai 2 giống bố mẹ bông cỏ *G. arboreum* L. JLMZ ×ZJXSLS và thu được 268 cặp mồi đa hình. Trong công trình này, chúng tôi đã sử dụng 192 cặp mồi đã được lập bản đồ tham khảo từ công trình nói trên để khảo sát đa hình với hai giống bông B10 và CNA.

Trong các nhóm mồi nghiên cứu, tỷ lệ đa hình đạt cao nhất thu được là 26,7% ở nhóm mồi BNL, tiếp theo đó là nhóm mồi NAU với tỷ lệ mồi cho đa hình đạt 14,28%. Các nhóm mồi DPL, JESPR và MUSS không cho kết quả đa hình trong số 15, 31 và 13 mồi sử dụng (bảng 2).

Hai nhóm môi BNL và NAU cũng là 2 nhóm môi được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu trước với phần trăm đa hình cao hơn so với các nhóm môi khác (Wang et al.2006; Guo et al.2007; Ma et al.2008).

Đa hình ADN trên cơ sở phân tích SSR của cặp bố mẹ trên từng nhiễm sắc thể được ghi nhận và nhóm lại theo từng nhiễm sắc thể. Kết quả cho thấy trên tất cả các nhiễm sắc thể khảo sát đều thu được các locus SSR đa hình. Số locus SSR đa hình nhiều nhất đạt 16 trên nhiễm sắc thể số 11 và thấp nhất là 5 locus cho đa hình trên các nhiễm sắc thể số 2, 7 và 13.

Sau khi phân tích kết quả thu được từ 119 chỉ thị SSR cho đa hình, chúng tôi nhận thấy đa số các chỉ thị cho đa hình là chỉ thị đồng trội với một alen đặc hiệu, ngoài ra có một số ít chỉ thị xuất hiện ở trạng thái đồng trội với nhiều alen, hoặc trạng thái trội. Kết quả xác định các chỉ thị cho đa hình giữa hai giống bông bố mẹ được minh họa ở hình 1.



Hình 1. Kết quả đánh giá đa hình giữa hai giống bông B10 và CNA bằng chỉ thị SSR trên gel agarose SFR3,5%

(A): Kết quả phân tích với 21 chỉ thị SSR thuộc nhóm BNL.

M: 100bp ladder; P1: B10; P2: CNA.

P1,P2: Cặp môi cho đa hình.

Xây dựng bản đồ các nhóm liên kết genome cây bông cỏ dựa trên phân tích phân ly quần thể F2 (B10 × ×× ×CNA)

Gieo trồng thu mẫu lá và tách chiết ADN của quần thể phân ly F2

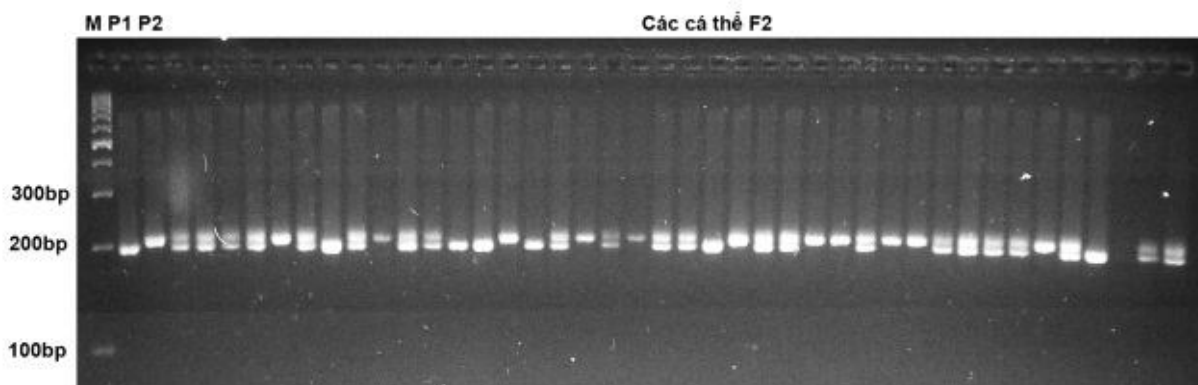
Quần thể F2 được tạo ra từ cặp lai giữa giống bông cỏ B10 và giống bông kháng bệnh xanh lùn CNA được gieo trồng tại ruộng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển nông nghiệp Nha Hồ. Mẫu lá non của 271 cây F2 được thu ở giai đoạn cây con 10 ngày tuổi để tách chiết ADN tổng số. Nồng độ ADN sau đó được kiểm tra chất lượng và nồng độ bằng máy quang phổ nano drop. Qua kiểm tra cho thấy chất lượng ADN của các cá thể F2 đảm bảo độ tinh sạch, không bị gãy và có nồng độ cao, có thể sử dụng để phân tích SSR. Nồng độ các mẫu ADN giao động từ 300 - 500 ng/ul.

Lập bản đồ di truyền các nhóm liên kết của cây bông vải sử dụng công nghệ chỉ thị phân tử và quần thể phân ly F2

119 chỉ thị SSR cho đa hình giữa hai giống bố mẹ B10 và CNA được sử dụng để phân tích sự phân ly di truyền của quần thể F2 (B10 ×CNA) (hình 2). Qua phân tích sự phân ly quần thể cho thấy mối tương quan phân ly giữa các cá thể đồng hợp tử và dị hợp tử trong quần thể là tương

đôi cân bằng, không bị nghiêng về một bên cây bố hoặc cây mẹ, điều này chứng tỏ quần thể đảm bảo sự lấy mẫu ngẫu nhiên có thể sử dụng cho lập bản đồ phân tử.

BNL3261



Hình 2. Ảnh phân tích SSR trên gel agarose SFR 3,5% của một số cá thể đại diện cho quần thể F2 với môi BNL3261

Giống 1. Marker 100bp; P1: B10; P2: CNA; Các giếng còn lại - cá thể F2

Điểm đánh giá phân ly di truyền của quần thể F2 sau đó được đưa vào bảng excel và sử dụng phần mềm Mapmaker V.3.0 để xây dựng bản đồ di truyền nhóm liên kết genome cây bông. Trong số 119 chỉ thị đa hình được sử dụng để phân tích phân ly quần thể F2, 99 chỉ thị đã phân thành 14 nhóm liên kết tương ứng với 13 nhiễm sắc thể, riêng nhiễm sắc thể số 12 có 2 nhóm liên kết với giá trị LOD ≥ 3 . Chiều dài genome được xác định là 1.294,5 cM với khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 13,08 cM và giá trị khoảng cách tối đa giữa hai chỉ thị ngắn hơn 40 M Kosambi. Qua so sánh với các bản đồ đã công bố trên thế giới cho thấy vị trí các chỉ thị phân tử trên các nhiễm sắc thể có sự tương quan.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát đa hình giữa giống B10 và giống CNA bằng 770 chỉ thị SSR thuộc 11 nhóm môi khác nhau cho thấy, nhóm môi BNL cho tỷ lệ đa hình bố mẹ cao nhất đạt 26,7%. Các nhóm môi DPL, JESPR và MUSS không cho đa hình giữa 2 giống bố mẹ.

Kết quả khảo sát đa hình ADN giữa 2 giống bông bố mẹ B10 và CNA bằng 770 chỉ thị SSR thu được 119 chỉ thị cho đa hình. Đa số các chỉ thị cho kết quả phân tích là đồng trội với một alen đặc hiệu, một số ít chỉ thị xuất hiện ở trạng thái đồng trội với nhiều alen hoặc trạng thái trội.

Bản đồ liên kết di truyền genome cây bông cỏ (*G. arboreum*L.) đã được xây dựng với 99 chỉ thị SSR phân thành 14 nhóm liên kết. Chiều dài genome được xác định là 1.294,5 cM với khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 13,08 cM và giá trị khoảng cách tối đa giữa hai chỉ thị ngắn hơn 40 cM Kosambi.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu này là kết quả của đề tài cấp Nhà nước “Chọn giống bông vải kháng bệnh xanh lùn bằng chỉ thị phân tử” thuộc Chương trình “Ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn” - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hợp tác và giúp đỡ tận tình của Tiến sĩ Robert

Wright, Trưởng Phòng Thí nghiệm Genome thực vật, Trường Đại học Kỹ thuật Texas, Mỹ về sự chia sẻ thông tin và các phương pháp trong nghiên cứu genome cây bông.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Lan Hoa, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thanh Quân, Phạm Thị Hoa, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Thị Tân Phương, Trịnh Minh Hợp, Nguyễn Duy Bảy, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Thanh Thủy (2010), Phân tích và xác định các chỉ thị phân tử đa hình phục vụ lập bản đồ các nhóm liên kết genome và xác định vị trí gen kháng bệnh xanh lùn ở cây bông cỏ (*Gossypium arboreum*L.), Tạp chí Công nghệ Sinh học, Tập 8, Số 1, tr: 69 - 74.
- Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Phạm Anh Tuấn, Phạm Thị Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thủy và CS, (2009), Phân tích đa dạng di truyền phân tử, các đặc tính nông sinh học và tính kháng bệnh xanh lùn ở một số giống bông vải trong nước và nhập nội, Tạp chí Công nghệ Sinh học, Tập 7, Số 2, tr: 211 - 219.
- Doyle, JJ. and JL. Doyle (1987), A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem Bull* 19: 11 - 15.
- Guo WZ. et al.(2007), A microsatellite - based, linkage map reveals genome structure, function and evolution in *Gossypium*, *Genetics* 176: 527 - 541
- Han ZG et al.(2006), Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST - SSR in allotetraploid cotton, *Theor Appl Genet* 112: 430 - 439.
- Ma XX. Zhou BL. et al.(2008), Simple sequence genetic linkage maps of A - genome diploid cotton (*Gossypium G. arboreum*), *JIPB* 50, 4: 491 - 502.
- Park YH et al.(2005), Genetic mapping of new cotton fiber loci using EST - derived microsatellites in an interspecific recombinant inbred (RIL) cotton population, *Mol Gen Genomeics* 274: 428 - 441
- Qureshi SN et al.(2004), EST - SSR: A new class of genetic markers in cotton, *Cotton Sci* 8: 112 - 123.
- Reddy OUK et al.(2001), New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research, *Cotton Sci* 5: 103 - 113.
- Rong J et al.(2004), A 3374 - locus genetic recombination map of sequence - tagged sites reveals features of genome organization, transmission of cotton (*Gossypium*), *Genetics* 166: 389 - 417.
- Wang CB et al.(2006), Characterization, development and exploitation of EST - derived microsatellites in *Gossypium raimondii*, *Ulbrich Chin Sci Bull* 51: 557 - 561.
- Zhang J et al.(2002), Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense*L.) with a haploid population, *Theor Appl Genet* 105:1166 - 1174.