

Đánh giá biến lượng di truyền con lai cây cao su thuộc hai tổ hợp lai PB260 x RO44/71 và PB260 x RO62/54 bằng kỹ thuật RAPD

Nguyễn Minh Thiện, Phạm Thị Mỹ Tiên

Tóm tắt—Việc đánh giá các con lai bằng các chỉ thị hình thái như hiện nay tốn nhiều thời gian và dễ bỏ sót vật liệu di truyền tốt chưa được biểu hiện ở con lai. Để rút ngắn thời gian chọn tạo và sử dụng tối đa vật liệu di truyền, ngành cao su đã ứng dụng các chỉ thị phân tử dựa trên DNA như RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) vào công tác chọn giống. Chúng tôi đã sử dụng 8 primer để đánh giá 71 con lai và bố mẹ của chúng; kết quả thu được được phân tích bằng các phần mềm Popen 1.31, GenAlEx 6.1 và NTSYSpc 2.1. Kết quả PCR với 8 primer thu được tổng cộng 109 băng với 98 băng đa hình chiếm 81,65% và trung bình có 11 băng đa hình/cặp môi. Hệ số tương đồng di truyền dựa trên chỉ số DICE biến thiên từ 0,560 (LH05/0822 và PB260) đến 0,991 (LH05/0871 và LH05/0841); điều này có nghĩa khoảng cách di truyền biến thiên từ 0,009 đến 0,440, trung bình là 0,231. Hệ số đa dạng gene Shannon và hệ số dị hợp tử trung bình lần lượt là 0,328 và 0,176, điều này cho thấy con lai của hai tổ hợp biến thiên di truyền khá rộng. Kết quả phân tích nguồn biến lượng di truyền phân tử AMOVA cho thấy biến lượng di truyền do sự khác biệt giữa các cá thể trong quần thể chiếm 62% và giữa hai tổ hợp lai là 38% tổng biến lượng. Phân nhóm di truyền bằng phương pháp UPGMA cho thấy các con lai chia làm 2 nhóm di truyền chính (ở mức tương đồng di truyền 0,75), nhưng các con lai phân bố rải rác không phụ thuộc vào tổ hợp lai.

Từ khóa—Biến lượng di truyền, PB260 x RO44/71, PB260 x RO62/54, RAPD, cây cao su

Ngày nhận bản thảo: 30-09-2017, ngày chấp nhận đăng: 30-01-2018, ngày đăng: 12-09-2018

Tác giả: Nguyễn Minh Thiện – Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM, Phạm Thị Mỹ Tiên - Trường ĐH Công nghệ Đồng Nai- nguyennminhthien@hcmut.edu.vn

1. MỞ ĐẦU

Cây cao su có tên khoa học là *Hevea brasiliensis* thuộc họ Thầu dầu (Euphobiaceae). Họ Euphobiaceae có 10 loài cho mù cao su khác nhau gồm: *Hevea benthamiana*, *Hevea camargoana*, *Hevea camporum*, *Hevea guianensis*, *Hevea microphylla*, *Hevea nitida*, *Hevea pauciflora*, *Hevea rigidifolia*, *Hevea spuceana* và *Hevea brasiliensis*, nhưng chỉ có *Hevea brasiliensis* có nghĩa về mặt kinh tế và được trồng rộng rãi nhất. Tất cả loài từ chi *Hevea* đều là loài bản địa của vùng Amazon, Nam Mỹ và phân bố tự nhiên trên một khu vực rộng lớn từ vĩ độ 60 Bắc đến 150 Nam, giữa kinh độ 460 Đông đến 770 Tây. Ngoài khu vực trên, cây cao su không ghi nhận mọc tự nhiên ở khu vực khác [5, 11].

Do hầu hết các giống cao su canh tác hiện nay được bắt nguồn từ các cây cao su do Henry Wickham thu thập trong một phạm vi hẹp của vùng Rio Tapajoz nên các giống cao su sản xuất chỉ thích hợp canh tác trên các vùng có điều kiện sinh thái giống với vùng nguyên quán Wickham (W) [5, 13]. Với những nỗ lực cải thiện chất lượng giống cao su của các thành viên IRRBD (International Rubber Research Development Board) thì năng suất cao su đã tăng lên đáng kể so với các giống ban đầu và các kỹ thuật sản xuất giống cũng được tiêu chuẩn hóa như sử dụng hạt thực sinh có chọn lọc, ghép chồi ngủ trên gốc thực sinh, lai hoa. Tuy nhiên, vì nguồn di truyền W rất hạn hẹp và chọn lọc con lai chỉ dựa vào các tính trạng nông học mà chủ yếu là tính trạng năng suất mù và tốc độ tăng trưởng nên nguồn di truyền này

bị xói mòn dẫn đến tốc độ cải tiến giống bị suy giảm nghiêm trọng chỉ sau 2–3 chu kỳ lai [10]. Vì vậy để mở rộng nguồn di truyền bố mẹ cho công tác lai tạo giống cao su, IRRBD đã tiến hành thu thập nguồn cao su hoang dại trên khu vực rộng lớn của Amazon vào năm 1981 và phân phối cho các thành viên thực hiện công tác giống [5, 11].

RRIV (Rubber Research Institute of Viet Nam) cũng là một trong những đơn vị được tiếp nhận nguồn di truyền Amazon (A) và đã tiến hành sử dụng nguồn di truyền này vào công tác lai giống tại Việt Nam. Với nguồn di truyền này Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam (Viện) đã đạt được nhiều thành tựu đáng kể phục vụ cho mục tiêu phát triển cây cao su ra ngoài các vùng truyền thống ở Đông Nam Bộ và tạo các giống hướng đến các mục tiêu khác nhau như chịu lạnh, hướng mù, hướng gỗ, nâng cao tính kháng bệnh [5, 14]. Với việc đánh giá con lai dựa trên các tính trạng nông học thường tốn nhiều thời gian (khoảng 5–10 năm) và để bỏ qua các nguồn di truyền quý không được biểu hiện ở các con lai. Nhận thấy những hạn chế đó nên Viện đã tiến hành ứng dụng chỉ thị isozyme vào công tác giống và bước đầu đã mang lại một số kết quả đáng khích lệ. Tuy nhiên, các chỉ thị isozyme thể hiện nhiều hạn chế nên việc chọn lựa một chỉ thị dựa trên DNA là cần thiết và RAPD đã được nhiều Viện Nghiên cứu Cao su trên thế giới lựa chọn và RAPD đã chứng tỏ là một công cụ hiệu quả để đánh giá biến lượng di truyền giữa các loài cũng như giữa các cá thể trong quần thể [6, 15]. Tại RRII (Rubber Research Institute of India), RAPD đã được sử dụng phổ biến để nhận dạng, đánh giá biến lượng, phát hiện marker liên kết với tính trạng lùn tự nhiên và tính trạng kháng bệnh rụng lá do *Corynespora* trên cây cao su [12, 16 - 18].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị RAPD với 8 cặp mồi được chọn lọc từ 13 cặp mồi được báo cáo cho đa hình trên cây cao su nhằm đánh giá biến lượng di truyền của hai tổ hợp con lai cây cao su PB260 x RO44/71 và PB260 x RO62/54 nhằm mục đích đánh giá biến lượng di truyền các con lai qua đó hỗ trợ công tác lai tạo giống của Viện. Kết quả PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose và số liệu được phân tích bằng các phần mềm Popgen 1.31, GenAlEx 6.1 và NTYSp 2.1.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các vật liệu nghiên cứu của đề tài bao gồm 74 dòng vô tính (DVT) cây cao su tại Viện, trong đó có 3 dòng vô tính bố mẹ là PB260, RO44/71, RO62/54 và 71 dòng vô tính là các con lai của hai tổ hợp lai PB260 x RO 44/71 và PB260 x RO62/54 được kí hiệu LH03/ và LH05/. DNA được tách chiết bằng bộ kit QIAGEN DNeasy Plant mini kits (QIAGEN – Đức). Tám cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu được chọn lọc từ 13 cặp mồi đã được báo cáo cho đa hình trên cây cao su với tên và trình tự như bảng 1 [4, 17, 20].

Bảng 1. Danh sách và trình tự 8 cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Trình tự mồi	Tm (°C)
1	OPA04	5'- AATCGGGCTG -3'	32
2	OPA16	5'- AGCCAGCGAA -3'	32
3	OPA18	5'- AGGTGACCGT -3'	32
4	OPB12	5'- CCTTGACGCA -3'	32
5	OPC05	5'- GATGACCGCC -3'	34
6	P10	5'- TCCCCGCTAC -3'	34
7	A18	5'- AGGTGACCGT -3'	32
8	O4	5'- AAGTCCGCTC -3'	32

Phương pháp nghiên cứu

Lấy mẫu và ly trích DNA

Mẫu được lấy trên vườn tuyển non và vườn lưu trữ quỹ gene của Viện. Tiến hành chọn những mẫu lá non không sâu bệnh, mỗi mẫu lấy từ 3–5 lá cho vào bịch ziplock, ghi thông tin mẫu và cho vào thùng chứa đá khô chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, mẫu được rửa sạch dưới vòi nước và tiến hành ly trích DNA. Mẫu được nghiền với nitrogen lỏng và ly trích DNA theo quy trình của bộ kit QIAGEN DNeasy Plant mini kits được khuyến cáo bởi nhà sản xuất và được cải tiến một số bước. Mẫu sau ly trích được bảo quản ở -20°C .

Phương Định tính và định lượng DNA

Mẫu DNA được tiến hành định lượng bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 260 nm và 280 nm. Mẫu DNA được pha loãng 101 lần bằng cách pha loãng 10 μL DNA với 1000 μL nước cất 2 lần. Nếu kết quả đo có tỷ số $\text{OD}_{260/280} = 1.8 - 2$ thì DNA của mẫu đã được tinh sạch và hàm lượng DNA trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$\text{DNA (ng/mL)} = [(62,9 * \text{OD}_{260}) - (36,0 * \text{OD}_{280}) * \text{độ pha loãng}]$$

Mẫu DNA được định tính thông qua điện di trên gel agarose 1% để xác định mức độ nguyên vẹn và độ tinh sạch của DNA. Mỗi giếng được trên gel được load một mẫu DNA với 8 μL mẫu và 2 μL loading dye và 2 giếng ngoài cùng của gel được nạp thang Lambda molecular weight 100 bp. Gel được điện di trong buffer TEA 1x với hiệu điện thế 80 V. Sau điện di, gel được nhuộm với ethidium bromide 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trong 30 phút và rửa trong 10 phút.

PCR

Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ trước khi thực hiện phản ứng PCR với lần lượt 8 cặp mồi. Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25 μL gồm: 5 μL green PCR buffer 1X; 2 μL MgCl_2 25 mM; 0,5 μL dNTP 10 mM, 0,3 μL *Taq* DNA polymerase 5U; 2 μL mồi 10 μM ; 2 μL DNA mẫu. Phản ứng PCR được thực hiện bằng máy luân nhiệt MyCycle (BIO-RAD) theo chu kỳ luân phản ứng như Bảng 2.

Bảng 2. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR

Bước	Giai đoạn	Nhiệt độ °c	Thời gian	Số chu kỳ
1	Biến tính ban đầu	94	3 phút	1
2	Biến tính	94	30 giây	35
3	Bắt cặp	30	45 giây	
4	Kéo dài	72	2 phút	
5	Kéo dài cuối cùng	72	3 phút	1
6	Giữ mẫu	4	1 giờ	1

Điện di và mã hóa số liệu

Sản phẩm PCR với 8 cặp mồi RAPD gồm các con lai và bố mẹ được điện di cùng với thang 100 bp Molecular Ladder trên gel agarose 2% bằng bộ điện di nằm ngang với hiệu điện thế 70V, cường độ dòng điện 70 mA trong buffer TAE 1X trong vòng 80 phút. Gel sau đó được nhuộm với ethidium bromide 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trong 30 phút và chụp hình bằng máy GelDoc - ItTM Imaging System. Kết quả điện di được chuyển sang dạng nhị phân

theo nguyên tắc có band tương ứng với 1 và không có band tương ứng với 0.

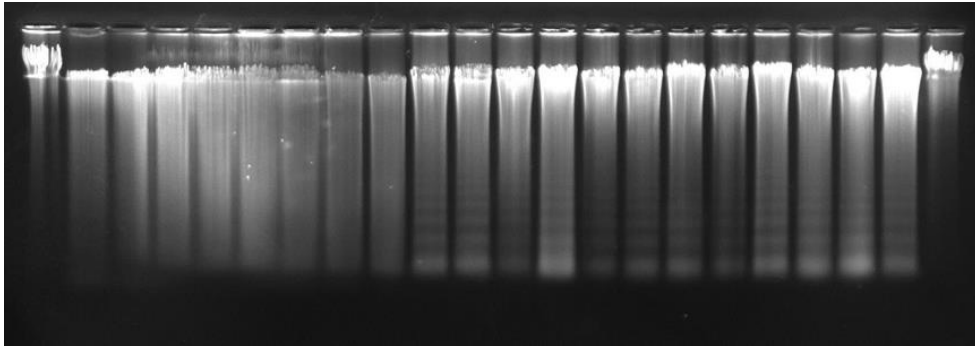
Phân tích kết quả RAPD

Kết quả đã mã hóa dưới dạng nhị phân được lưu dưới dạng file Microsoft Excel. File này được sử dụng là số liệu đầu vào cho các phần mềm phân tích kết quả RAPD được sử dụng trong nghiên cứu như NTSYSpc 2.1, GenAIEx 6.3 và Popgene 1.31 [9]. Biến lượng di truyền của quần thể được đánh giá các chỉ số: trung bình dị hợp tử (mean heterozygosity), khoảng cách di truyền và nguồn biến lượng phân tử AMOVA (Analysis of Molecular Variance), chỉ số Shannon (Shannon's diversity index), tỷ lệ băng đa hình và hệ số tương đồng/dị biệt di truyền giữa các cá thể và sự phân nhóm di truyền theo phương pháp UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average) dựa trên hệ số đồng dạng di truyền DICE của các cá thể.

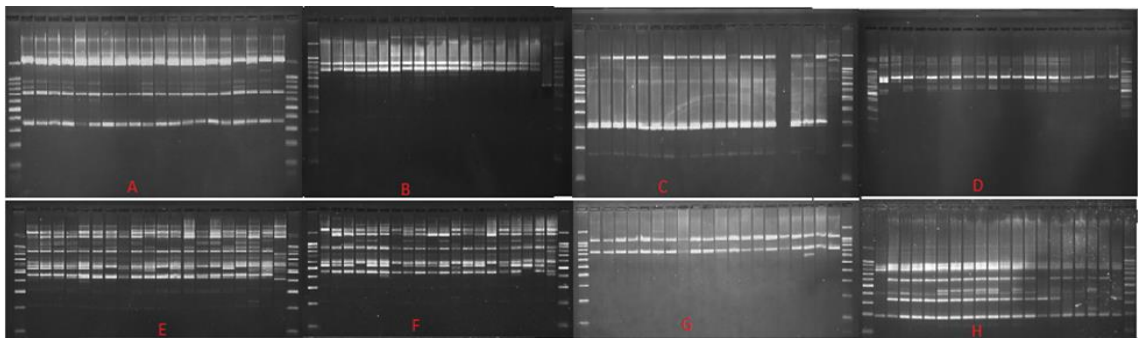
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả ly trích DNA

Tất cả 74 DVT được ly trích bằng bộ kit QIAGEN DNase Plant Mini Kits của QIAGEN với quy trình đã được tối ưu hóa theo khuyến cáo của nhà sản xuất và điều kiện tại Viện. Kết quả đo OD cho thấy 74 mẫu DNA cho hàm lượng DNA dao động từ 147,51 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (LH05/0803) đến 1840,55 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (PB260) với hàm lượng DNA trung bình là 429,81 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Tỷ số $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ dao động từ 1,48 đến 2,30 trung bình 1,73. Trong mẫu DNA của 74 DVT ly trích có 50 mẫu (66,7%) có tỷ số $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ nằm trong khoảng 1,7–2,0. Kết quả định tính các mẫu DNA ly trích được bằng điện di trên gel agarose 1% cho thấy chất lượng mẫu ly trích không cao, DNA đứt gãy nhiều thể hiện qua vệt sáng kéo dài trên gel điện di (Hình 1). Tuy nhiên, các kết quả định tính và định lượng DNA này cũng phù hợp với khuyến cáo của bộ kit và các đề tài nghiên cứu trước đó tại [5].



Hình 1. Định tính DNA tổng số bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. M là thang Lamda MWL (48, 502 bp, 500 ng/μl). Từ H20 đến H39 là ký hiệu các DVT cao su trong nghiên cứu

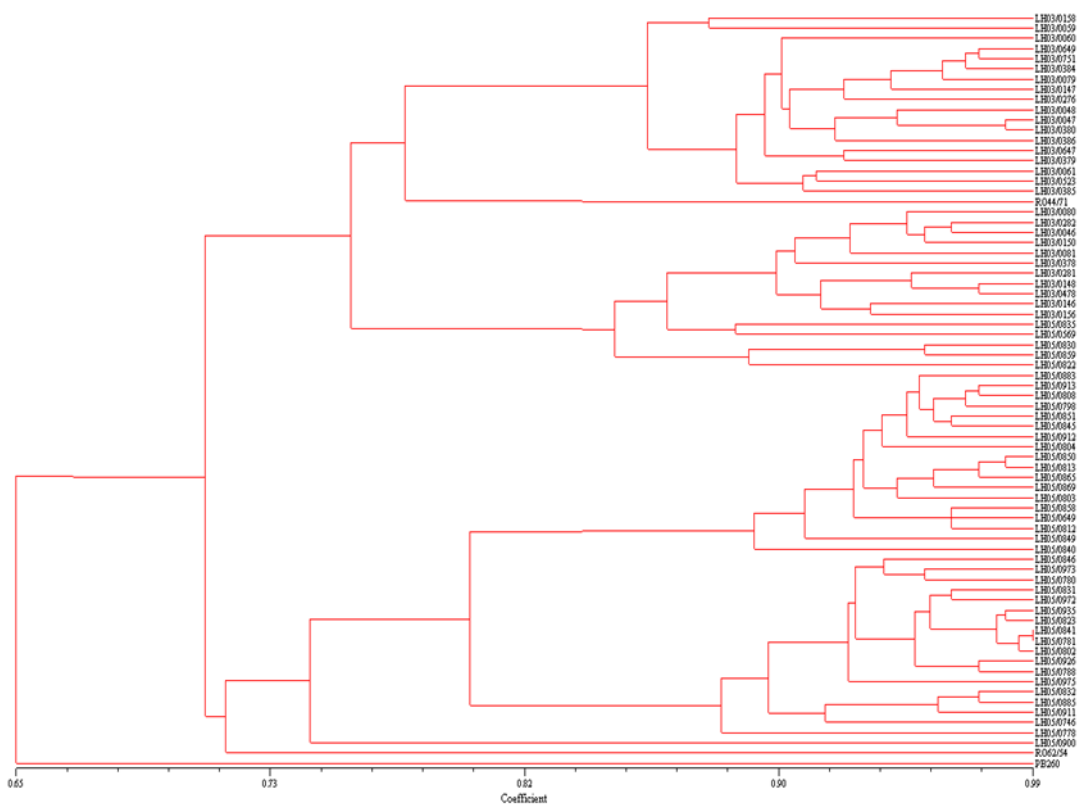


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm RAPD với 8 cặp mồi. A: cặp mồi O4, B: cặp mồi OPC05, C: cặp mồi OPB12, D: cặp mồi P10, E: cặp mồi A18, F: cặp mồi OPA18, G: cặp mồi OPA16, H: cặp mồi OPA04

Bảng 3. Khái quát các thông số di truyền trong quần thể khảo sát

Chỉ tiêu đánh giá	Tổ hợp 1	Tổ hợp 2	Cả quần thể
Số kiểu di truyền	29	42	71
Tổng số băng khuếch đại	70	78	109
Tổng số band khuếch đại bởi mỗi kiểu di truyền	46 – 58	37–60	37 – 60
Số band đồng hình	22	22	21
Biến thiên HSTĐDT cặp con lai	0,697 – 0,982	0,651–0,991	0,651–0,991
- Trung bình	0,836	0,835	0,769
Biến thiên KCDT con lai	0,018 – 0,303	0,009 – 0,349	0,009 – 0,440
- Trung bình	0,164	0,165	0,231
HSTĐDT giữa bố và mẹ	0,704	0,682	
KCDT giữa bố và mẹ	0,296	0,318	
Hệ số đa dạng gen Shannon	0,272	0,271	0,328
Hệ số dị hợp tử trung bình	0,177	0,176	0,176

* HSTĐDT: hệ số tương đồng di truyền. KCDT: khoảng cách di truyền



Hình 3. Kết quả phân nhóm di truyền con lai theo phương pháp UPGMA dựa trên hệ số đồng dạng di truyền DICE phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1

Theo Weising và cs (2005) thì đối với kỹ thuật RAPD không đòi hỏi DNA khuôn có độ tinh sạch cao và chỉ cần vài bản sao của DNA mẫu cũng đủ làm khuôn cho phản ứng PCR. Đối với mẫu DNA ly trích từ mẫu lá cao su chỉ cần kết quả OD₂₆₀/OD₂₈₀ từ 1,4 trở lên đã cho kết quả RAPD tốt và ổn định [7]. Chính vì vậy mà 24 mẫu DNA có giá trị OD₂₆₀/OD₂₈₀ ở ngoài khoảng 1,7–2,0 cũng cho sản phẩm RAPD phù hợp.

Đánh giá độ đa hình của các cặp mẫu trên tập đoàn giống nghiên cứu

Sản phẩm PCR với DNA từ 74 DVT làm khuôn được chạy điện di trên gel agarose 2%. Kết quả điện di được sử dụng để đánh giá sự đa hình của 8 cặp mẫu trên tập đoàn giống khảo sát (hình 2). Kết quả 8 cặp mẫu khuếch đại được tổng cộng 108 băng, trong đó số băng đa hình là 88 băng có kích thước 180–2300 bp, chiếm 80,73%. Số lượng băng đa hình do một cặp mẫu tạo ra biến thiên từ 4 (OPA16) đến 15 (P10), chiếm từ 66,67–92,86%, trung bình có 11 băng đa hình/cặp mẫu. Số lượng băng khuếch đại được và tỷ lệ băng đa hình là thông số giúp đánh giá biến lượng di truyền của

quần thể nghiên cứu. Tuy nhiên, so với các nghiên cứu trước thực hiện tại Viện sử dụng 8 cặp mẫu trên thì số lượng băng khuếch đại được và tỷ lệ băng đa hình có sự thay đổi, điều này chứng tỏ các thông số này thay đổi tùy theo cỡ mẫu và cấu trúc quần thể nghiên cứu.

Đánh giá đa dạng di truyền của quần thể con lai nghiên cứu

Kết quả phân tích RAPD cho thấy số băng DNA được phát hiện ở con lai dao động từ 37 (LH05/822) đến 60 băng (LH05/0849). Trong tổ hợp PB260/RO44/71 phát hiện được 70 băng dao động từ 46–58 băng cho mỗi DVT; trong khi đó, tổ hợp PB260/RO62/54 tạo được 78 băng, dao động từ 37–60 băng cho mỗi DVT. So với hai tổ hợp lai W x A do Huỳnh Thị Minh Tâm phân tích năm 2009 thì số băng DNA được khuếch đại từ con lai của hai tổ hợp được sử dụng trong nghiên cứu lớn hơn và dao động rộng hơn.

Kết quả phân tích hệ số tương đồng di truyền cho thấy các con lai quần thể con lai nghiên cứu có biến thiên di truyền rộng nhưng biến thiên giữa các

con lai giữa hai tổ hợp lai không khác nhau nhiều, có lẽ do sự khác biệt di truyền giữa bố mẹ của hai tổ hợp lai trên không chênh lệch nhiều. Cụ thể, khoảng cách di truyền của bố mẹ trong tổ hợp 1 và 2 lần lượt là 0,296 và 0,318 thì khoảng cách biến thiên di truyền giữa từng cặp cá thể trong từng tổ hợp lần lượt là 0,018 đến 0,303 và 0,009 đến 0,349, trung bình lần lượt là 0,164 và 0,165 (Bảng 3).

Với mức độ đa dạng di truyền của quần thể càng cao và ngược lại [19]. Hệ số Shannon của cả quần thể là 0,328 lớn hơn chỉ số Shannon của từng con lai trong tổ hợp. So với 13 tiểu vùng của bộ sưu tập IRRBD'81 đã được nghiên cứu bởi Lại Văn Lâm và cs (2010) có hệ số Shannon dao động từ 0,093 – 0,398 thì hệ số Shannon của quần thể khảo sát là khá cao. Hệ số dị hợp tử trung bình của các con lai trong hai tổ hợp khá cao lần lượt là 0,177 và 0,176. Hai tổ hợp lai đều có mẹ là PB260 thuộc nguồn W ở Đông Nam Á có hệ số dị hợp tử là 0,161 và bố thuộc tiểu vùng RO/CM thuộc nguồn A có hệ số dị hợp tử là 0,137 khi được phân tích với 8 cặp mồi trên [1, 3, 4, 8]. Kết quả này cho thấy có con lai của hai tổ hợp trên có hệ số dị hợp tử cao hơn bố mẹ chúng; có nghĩa là biến lượng di truyền không chỉ được duy trì mà còn mở rộng ở các tổ hợp lai W x A.

Phân tích nguồn biến lượng phân tử trong quần thể con lai khảo sát cho thấy biến lượng di truyền do sự khác biệt tổ hợp lai chiếm 38% và biến lượng di truyền do sự khác biệt giữa các cá thể chiếm 62%. Theo Lại Văn Lâm và cs (2010) nguồn biến lượng di truyền do sự khác biệt giữa các cá thể trong quần thể trong tập đoàn quỹ gene cây cao su ở Việt Nam chiếm 81%, trong khi biến lượng di truyền do sự khác biệt giữa các nguồn gene W, WA, A và 24 tiểu vùng của bộ sưu tập IRRBD'81 chỉ chiếm 19%. Kết quả phân tích nguồn biến lượng di truyền và hệ số dị hợp tử đã khẳng định chiến lược lai giữa W và A để tạo ưu thế lai là hoàn toàn có cơ sở.

Đánh giá nguồn biến dị di truyền của con lai so với bố mẹ

Kết quả so sánh hệ số tương đồng di truyền của các con lai so với bố mẹ chúng cho thấy các con lai trong hai tổ hợp phân tích giống bố hơn giống mẹ. Trung bình hệ số tương đồng di truyền của các con lai so với bố là 0,736 và với mẹ là 0,646. Kết quả này ngược với kết quả của Huỳnh Thị Minh Tâm (2009) khi phân tích trên hai tổ hợp PB260 x

AC55 và PB260 x PB62/26 cho kết quả các con lai giống mẹ hơn giống bố. Điều này chứng tỏ việc con lai giống bố hay giống mẹ chỉ là ngẫu nhiên không mang tính quy luật. Kết quả này có ý nghĩa lớn trong công tác lai tạo giống, bởi vì nó giúp mở rộng các tổ hợp lai thông qua việc gia tăng nguồn giống làm bố.

Phân nhóm di truyền của con lai trong quần thể khảo sát

Kết quả phân tích phân nhóm di truyền dựa trên dữ liệu RAPD của 8 cặp mồi sử dụng phương pháp UPGMA trên các hệ số tương đồng cho thấy các con lai trong hai tổ hợp chia làm hai nhóm gồm nhóm I và II (Hình 3) ở hệ số tương đồng khoảng 0,75; trong mỗi nhóm chính lai chia thành hai nhóm phụ (nhóm I: IA và IB; nhóm II: IIA và IIB). Ngoài hai nhóm này thì bố RO62/54, mẹ PB260 và con lai LH05/0900 không được xếp vào hai nhóm trên. Theo phân nhóm như trên thì nhóm II chỉ chứa con lai tổ hợp PB260 x RO62/54, nhóm IA chỉ chứa con lai tổ hợp PB260 x RO44/71, riêng nhóm phụ IB chứa hỗn hợp con lai của cả hai tổ hợp. Con lai LH05/0900 có khoảng cách di truyền khá xa với bố mẹ và các con lai khác của tổ hợp PB260 x RO62/54 cho thấy tiềm năng làm bố mẹ cho chương trình lai hồi quy với bố mẹ nhằm củng cố các tính trạng tốt của bố mẹ nếu DVT này có các tính trạng nông học thỏa đáng.

4. KẾT LUẬN

DNA ly trích từ lá cao su, sử dụng QIAGEN DNeasy Plant Mini Kits theo quy trình cải tiến của VNCCSVN, có hàm lượng và độ tinh sạch đảm bảo làm mạch khuôn cho phản ứng PCR bằng mồi RAPD. Tỷ lệ nồng độ các hóa chất và chu trình nhiệt cho phản ứng PCR bằng mồi RAPD đang sử dụng ở Viện đã cho phản ứng thành công trên các mẫu DNA này và cho hệ thống băng DNA đáp ứng yêu cầu đánh giá biến lượng di truyền của quần thể nghiên cứu.

Sử dụng kỹ thuật RAPD - PCR khuếch đại DNA cây cao su bằng 8 cặp mồi RAPD chọn lọc đã cho phép đánh giá biến lượng di truyền của các con lai cây cao su thuộc 2 tổ hợp lai PB260 x RO44/71 và PB260 x RO62/54. Tám cặp mồi sử dụng cho mức độ đa hình khá cao, đã khuếch đại được 109 băng trên 71 con lai, trong đó có 21 băng đồng hình (19,27%) và 88 băng đa hình (80,73%). Số lượng băng đa hình do mỗi cặp mồi tạo ra là từ 4 đến 15

băng (chiếm từ 67% đến 92,9%), trung bình có 11 băng đa hình/cặp mồi. Sản phẩm RAPD có kích thước từ 180 bp đến 2300 bp. Kết quả này tạo được cơ sở dữ liệu đáp ứng yêu cầu phân tích biến lượng di truyền của 71 DVT trong 2 tổ hợp nghiên cứu.

Phân tích các thông số di truyền của quần thể khảo sát cho thấy rằng dù là con lai của 2 tổ hợp có cùng mẹ, biến lượng di truyền của con lai trong quần thể khảo sát là khá cao. Hệ số tương đồng di truyền của các cặp con lai biến thiên từ 0,560 đến 0,991 với trung bình là 0,796. Chỉ số đa dạng gene Shannon trên cả quần thể là 0,328, tương đối cao nếu so với các quần thể khác sử dụng cùng hệ 8 cặp mồi. Hệ số dị hợp tử trung bình của các con lai trong mỗi tổ hợp là 0,177 và 0,176, cao hơn các nhóm bố mẹ tạo ra chúng. Phân tích nguồn biến lượng phân tử (AMOVA) cho thấy biến lượng di truyền do sự khác biệt cá thể chiếm 62% và sự khác biệt tổ hợp lai có đóng góp 38% vào tổng nguồn biến lượng, chỉ ra vai trò quan trọng của sự khác biệt tổ hợp lai đóng góp vào biến lượng di truyền quần thể con lai. Nguồn biến dị này là vật liệu quý giá cho công tác tuyển chọn giống cao su. Biến lượng di truyền rộng và tính dị hợp tử cao của quần thể con lai nghiên cứu sẽ là nguồn vật liệu quan trọng cho tuyển chọn giống và là nguồn bố mẹ đa dạng cho chu kỳ tạo giống kế tiếp.

Phân nhóm di truyền quần thể nghiên cứu theo phương pháp UPGMA trên hệ số đồng dạng di truyền cho thấy các con lai được chia làm 2 nhóm chính, trong đó mỗi nhóm chính được chia ra làm 2 nhóm phụ và một con lai (LH05/0900) không được xếp vào 2 nhóm trên. Dựa vào phân nhóm này không cho phép phân biệt hoàn toàn con lai thuộc tổ hợp nào trong 2 tổ hợp nghiên cứu. Với 8 cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu thì chưa phát hiện được mối liên hệ nào giữa các marker với các tính trạng nông học mong muốn trên hai tổ hợp này.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Phòng Công nghệ Sinh học và Bộ Môn Giống thuộc Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam đã tạo điều kiện cung cấp mẫu, hóa chất và thiết bị thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. D. Pethin, K. Nakkanong, C. Nualsri, Performance and genetic assessment of rubber tree clones in southern Thailand, *Scientia Agricola*, 72, pp. 306–313, 2015.
- [2]. L.V. Lâm, L.M. Túy, L.H.N. Anh, “Đánh giá nguồn gen IRRDB’81 trong chọn tạo bộ giống cao su kháng bệnh phấn trắng”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 9, pp. 26–29 (2008).
- [3]. L.V. Lâm, L.T.T. Trang, L.M. Túy, H.T. Liễu, T.T. Anh, L.V. Hùng, “Ứng dụng kỹ thuật RAPD nghiên cứu biến lượng di truyền nguồn gen Amazon và con lai cây cao su Wickham x Amazon”, Báo cáo kết quả đề tài năm 2009, Viện Nghiên cứu Cao Su Việt Nam, 2010.
- [4]. K.K. Liyanage, V.A. Sumanasinghe, D.P.S.T. Attanayake, B.W.A.N. Baddewithana, “Identification of recommended *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss) Müll. Arg. Clones grown in Sri Lanka by RAPD analysis”, *Tropical Agricultural Research*, 25, pp. 188 – 200, 2014.
- [5]. N.T. Huệ, “Cây Cao Su”, Nhà Xuất Bản Tổng Hợp Tp. Hồ Chí Minh, 2006.
- [6]. D.R. Gang, D.J. Weber, Genetic variability and relationships among ten populations of rubber rabbitbrush (*Chrysothamnus nauseosus* ssp. *Hololeucus*) determined by RAPD analysis bulk genomic DNA samples, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 36, pp. 1–8, 1995.
- [7]. H.T.M. Tâm, Đánh giá biến lượng di truyền quần thể con lai cây cao su của tổ hợp lai PB260 x AC55 và PB260 x RO62/26 bằng kỹ thuật RAPD, Đại học Nông Lâm tp. Hồ Chí Minh, 2009.
- [8]. K. Nakkanong, C. Nualsri, S. Sdoodee, “Analysis of genetic diversity in early introduced clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) using RAPD and microsatellite marker”, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 553–560, 2008.
- [9]. R. Peakall, Smouse P.E, GENALEX 6.3: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology*, 6, 288 – 295, 2006.
- [10]. P.M. Priyadarshan, Rubber. In: Genome mapping and molecular breeding in plants, *Technical crop edited by Kole C. Springer – Verlag berlin Heidellerg*, 6, pp. 143–155, 2007.
- [11]. P.M. Priyadarshan, Genesis and development. In: Biology of Hevea rubber, *Springer press*, 11- 14, 2017.
- [12]. Sumarmadij, T.W. Darmono, Country report, Indonesia. In: K.S. Chow, H.Y. Yeang, (eds) Report on the international rubber research and development board, Biotechnology workshop, Sungei Buloh, Malaysia, 9–11, 2004.
- [13]. T.T.T. Hoa, D.T. Nương, “Ước lượng tính di truyền và ru thể lai trong chương trình lai hoa 1983 - 1993 của Viện Nghiên cứu Cao Su Việt Nam”, Tuyển tập báo cáo nghiên cứu khoa học kỷ niệm 100 năm cây cao su di nhập vào Việt Nam, Nhà xuất bản Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh, 20–31, 1998.
- [14]. T.T.T. Hoa, L.V. Lâm, L.M. Túy, P.H. Dương, V.V. Trường, N.V. Hoàng, “Kết quả chọn tạo giống cao su tại Việt Nam giai đoạn 1984 - 2004 và phương hướng 2005 – 2010”, Khoa học công nghệ Nông Nghiệp và Phát

- Triển Nông Thôn 20 Năm đổi mới, Nhà Xuất Bản Chính Trị Quốc Gia, pp. 182–199, 2005.
- [15]. Y.A. Varghese, C. Knaak, M.R. Sethuraj, W. Ecke, Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker in *Hevea brasiliensis*, *Plant Breeding* 116, pp. 47–52 (1997).
- [16]. P. Venkatachlam, R. Sailasree, P. Priya, C.K. Saraswathyamma, A. Thulaseedaran, Identification of a DNA marker associated with draft trait in *Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg. through random amplified polymorphic DNA analysis, Proceedings IRRDB Symposium 2001 - Biotechnology and Rubber tree. Montpellier, France, 2001.
- [17]. P. Venkatachalam, S. Thomas, P. Priya, I. Thanseem, C.K. Saraswathyamma, A. Thulaseedaran, Identification of DNA polymorphism among clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Using RAPD analysis. *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 15, pp. 172–181, 2002.
- [18]. P. Venkatachalam, P.K. Jayashree, S. Sushmakumari, R. Jayashree, K. Rekha, S. Sobha, P. Priya, R.G. Kala., A. Thulaseedharan, Current perspectives on application of biotechnology to assist the genetic improvement of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), *Functional Plant Science and Biotechnology* 1, 1–17, 2007.
- [19]. K. Weising, H. Nybom, K. Wolff, G. Kahl, DNA fingerprinting in plants principle, methods and applications, *CRC press publisher*, USA, 2, 2005.
- [20]. A. Zewei, C. Han, S. Aihua, F. Jialin, H. Huasun., Identification of rubber clones by RAPD markers. International Natural Rubber Conference India, 88–92, 2005.

Evaluating the genetic variability of rubber hybrid progenies of the two crosses PB260 x RO44/71 and PB260 x RO62/54 by RAPD technique

Nguyen Minh Thien¹, Pham Thi My Tien²

¹Ho Chi Minh City University of Technology, VNU-HCM, ²Dong Nai Technology University

Corresponding author: nguyenminhthien@hcmut.edu.vn

Received: 30-09-2017, Accepted: 30-01-2018, Published: 12-09-2018

Abstract—The agronomic values of this population have been evaluated in the field experiments based on their phenotypic performance of agronomic traits, but the genetic variability of this population needs to be evaluated via techniques based on genetic material - DNA. In this study, the genetic variability in the investigated population of 71 hybrids and their parents was evaluated by RAPD technique, using eight selected arbitrarily primers; Genetic parameters and dendrogram expressing the genetic relationships among the investigated population were analyzed by GenALEx 6.1, Popgene 1.31 and NTSYSpc 2.1 softwares. Eight primers were used to generate the amplify products on each individual in the investigated population. From 74 genotypes, a total of 109 fragments were generated, among which, there were 89 polymorphic bands representing 81.65% with an average of 11 polymorphic bands/primer. Genetic similarity coefficient among the investigated population, based on DICE

coefficient, ranged from 0.560 (LH05/0822 and PB260) to 0.991 (LH05/0781 and LH05/0841) with an average of 0.796, meaning that the genetic distance among ranged from 0.009 to 0.440 with an average of 0.231. The Shannon index and mean heterozygosity values were 0.328 and 0.176, respectively. This indicated that the progenies of the two investigated crosses possessed a relatively high range of genetic variability. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that genetic variation within population represented 62%, while genetic variation among two different crosses contributes 38% to the total genetic variability. Dendrogram based on DICE's genetic similarity using UPGMA method showed that the hybrids divide into two major genetic groups (0.75), but the crosses were scattered independently of the hybrid.

Index Terms—Genetic variability, RAPD, PB260 x RO44/71, PB260 x RO62/54, rubber tree