

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY KEO LÁ LIỀM (*Acarassicarpa*) BẰNG CHỈ THỊ RAPDVũ Ngọc Lan¹, Nguyễn Văn Phú^{2*}¹*Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*²*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*Email*: nvphusltv@gmail.com

Ngày gửi bài: 30.03.2015

Ngày chấp nhận: 20.09.2016

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là đánh giá đa dạng di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm thu thập tại các địa phương khác nhau ở Việt Nam sử dụng 56 chỉ thị RAPD. Sản phẩm PCR của 56 chỉ thị RAPD được phân tích bằng phần mềm NTSYS pc 2.10. Kết quả có 16 chỉ thị cho allen đa hình với tổng số 142 allen nhân bản, trong đó có 131 allen đa hình (92%) và 12/16 chỉ thị có 100% allen đa hình với kích thước allen từ 250 bp đến 3.000 bp. 53 giống keo lá liềm nghiên cứu được phân thành 2 nhóm chính với hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,47 đến 0,99. Nhóm I gồm 9 giống: A.cr.S.6, A.cr.N.34, A.cr.S.38, A.cr.S.51, A.cr.N.81, A.cr.N.84, A.cr.N.86, A.cr.N.87 và A.Cr.N.147. Nhóm II gồm 44 giống còn lại được phân thành 3 phân nhóm phụ bậc 1 (IIa, IIb, IIc). Kết quả này có thể sử dụng trong công tác bảo tồn cũng như lai chọn tạo giống keo lá liềm chịu hạn mới.

Từ khóa: DNA, chỉ thị RAPD, đa dạng di truyền, keo lá liềm.

Genetic Diversity Assessment of *Acacia crassicarpa* by RAPD Markers**ABSTRACT**

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers were used to characterize the genetic diversity and relationships among 53 accessions of *Acacia crassicarpa*. A total of 56 markers were tested. The results indicated that 16 markers produced 142 alleles in which 131 were polymorphic (accounting for 92%) and of which 12 generated 100% polymorphic alleles with the size ranging from 250 bp to 3000 bp. Based on the genetic similarity of 53 accessions, two main clusters with the similarity index ranging from 0.47 - 0.99 were grouped by NTSYSpc 2.10 software. Cluster I included nine accessions, namely A.cr.S.6, A.cr.N.34, A.cr.S.38, A.cr.S.51, A.cr.N.81, A.cr.N.84, A.cr.N.86, A.cr.N.87 and A.Cr.N.147. Cluster II was composed of 44 remaining accessions which were divided into 3 sub-groups of level 1 (IIa, IIb and IIc). High level of polymorphism among *Acacia* accessions suggested that RAPD markers can be useful for *A. crassicarpa* germplasm characterization and conservation and efficient selection of for drought tolerance.

Keywords: DNA, Genetic diversity, RAPD marker, *Acacia crassicarpa*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

keo lá liềm (*Acacia crassicarpa* A. Cunn. ex Benth) thuộc họ Trinh nữ (Mimosaceae), là một cây bản địa Úc (Queensland), Indonesia và Papua New Guinea. Chúng thường phân bố ở 8 - 20° vĩ nam, độ cao thích hợp dưới 200 m, cũng có thể trồng tới độ cao 700 m so với mặt biển, lượng mưa 1.000 - 3.500 mm/năm. keo lá liềm có chu kỳ sinh trưởng từ 6 - 9 năm, nếu

chăm sóc tốt và trồng đúng quy trình kỹ thuật thì chỉ mất 5 năm đã có thể cho khai thác lấy gỗ, mang lại giá trị kinh tế cao. keo lá liềm là cây trồng lý tưởng để hình thành rừng phòng hộ chống xói mòn, làm băng cản lửa, chắn gió để bảo vệ đất, điều hòa khí hậu, chống cát bay, cát nhả, cải tạo môi trường sinh thái, tạo điều kiện thuận lợi cho canh tác nông nghiệp và đời sống dân sinh. Qua điều tra tập đoàn cây trồng rừng chủ yếu trên đất cát nội đồng vùng miền Trung

đã xác định keo lá liềm là loài cây trồng có triển vọng nhất, là loài sinh trưởng nhanh nhất trong các loài keo ở vùng thấp, có thể gây trồng trên đất cát nội đồng có lên líp ở tỉnh Thừa Thiên - Huế, Quảng Trị, đồng thời có thể sinh trưởng trên nhiều loại đất khác nhau kể cả đất đồi và đất cát nội đồng, đất sét khó thoát nước, đất mặn và khả năng chịu hạn tốt. Quảng Trị và các tỉnh miền Trung có diện tích đất cát trắng lớn đến hàng vạn hecta, hiện nay số loài cây lâm nghiệp tồn tại được trên vùng cát trắng ven biển còn rất ít, lý do chủ yếu do tính chất khắc nghiệt của đất cát và khí hậu vùng cát làm cho các loại cây trồng sinh trưởng phát triển kém, trong khi tỷ lệ sống của các loài keo trồng ở một số mô hình khá cao: keo tai tượng đạt 75%, keo lá tràm là 85%, keo lai 95% và cao nhất là keo lưỡi liềm 96% (Đặng Thái Dương 2010; Lê Đình Khả và cs., 2006).

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu chọn giống keo theo hướng cho năng suất gỗ cao, chất lượng gỗ tốt, thích ứng rộng và có khả năng chịu hạn đã được triển khai từ nhiều năm nay tại một số viện nghiên cứu. Biện pháp chủ yếu là nhập hạt giống chất lượng cao, khảo nghiệm và chọn giống theo phương pháp cổ điển với các dòng cây trội. Vật liệu chọn làm bố mẹ thường được dựa trên những đánh giá về kiểu hình hay về một số đặc điểm sinh học. Chọn lọc cặp lai theo cách này có nhược điểm là chưa phản ánh đúng bản chất di truyền của cá thể. Việc nghiên cứu chọn giống keo sử dụng chỉ thị phân tử hoặc dựa trên các cơ sở kỹ thuật cao hầu như chưa có nhiều, các công bố kết quả nghiên cứu một cách chính thống về cây keo lá liềm của thế giới và Việt Nam hiện nay chưa có. Sử dụng chỉ thị phân tử (ADN marker) như RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN) để chọn giống sẽ bỏ qua các biến động không di truyền, đồng thời theo dõi được các biến động di truyền không thể hiện ra kiểu hình, tạo cơ sở vững chắc trong việc sử dụng nguồn tài nguyên thực vật một cách có hiệu quả hơn, để cải thiện giống cây trồng, phục vụ tốt hơn công tác quản lý và bảo tồn đa dạng sinh học, rút ngắn thời gian của quá trình chọn tạo giống phục vụ cho công tác trồng rừng. Trên đối tượng cây keo, với phương pháp RAPD đã phát hiện sự đa dạng di truyền ở các loài keo:

A. auriculiformis và *A. mangium*, *A. aroma* và *A. macracantha*, *A. senegal*, *A. mellifera*, *A. leata*. Nhiều tác giả cũng đã tìm ra các chỉ thị RAPD liên quan đến tính chịu mặn của một số loài keo này và xác định sự đa dạng của các dòng keo đối với tính chịu mặn chủ yếu là do sự khác nhau ở nền di truyền (Daffala *et al.*, 2011; Habeballa *et al.*, 2010; Nguyen, 2004; Paola, 2002; Nanda *et al.*, 2004).

Để góp phần phục vụ cho công tác phân loại, khai thác và sử dụng có hiệu quả các dòng keo lá liềm ưu tú tại Việt Nam, trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung đánh giá mối quan hệ di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm được thu thập từ các địa phương bằng các chỉ thị phân tử RAPD.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Tập đoàn 53 mẫu giống keo lá liềm được thu thập ở các vùng khác nhau (Bảng 1) do Khoa Lâm nghiệp - Đại học Nông lâm Huế cung cấp. Thông tin chính (kí hiệu, trình tự nucleotide) về các chỉ thị RAPD dùng trong nghiên cứu như ở bảng 2. Trình tự của các chỉ thị RAPD được tổng hợp bởi hãng Invitrogen.

Hoá chất: EDTA, Tris-HCl, SDS, Proteaza K, RNaza, chloroform, phenol, NaCl, agarosa... của các hãng Sigma, Merck, Amersham Pharmacia Biotech, Fermentas...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết tách ADN tổng số

ADN được chiết tách từ lá non của cây non bằng phương pháp CTAB được mô tả bởi Doyle (1990) có cải tiến: Lấy lá non ở cây khỏe, nghiền nhỏ bằng dụng cụ chuyên dụng, sau đó thêm chất đệm chiết tách bao gồm (NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM, Tris-HCl 100 mM, CTAB 2%, β -mercaptoethanol 1%), Chuyển dung dịch trên vào ống Eppendorf vô trùng, sau ly tâm dịch mẫu, thu kết tủa. Hòa tan kết tủa ADN bằng dung dịch TE bao gồm (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) rồi bảo quản lạnh sâu, kiểm tra ADN bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

Bảng 1. Các mẫu giống keo lá liềm được sử dụng trong nghiên cứu

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

Bảng 2. Thông tin chính của các chỉ thị RAPD

STT	Tên chỉ thị	Trình tự	STT	Tên chỉ thị	Trình tự
1	B8	5' - ACG GTA CCA G - 3'	29	OPB - 05	5' - TGC GCC CTT C - 3'
2	BIO - 07	5' - GGT TCG CTC C - 3'	30	OPB - 06	5' - TGC TCT GCC C - 3'
3	BIO - 08	5' - GGA CTC GAG T - 3'	31	OPB - 07	5' - GGT GAC GCA G - 3'
4	BIO - 16	5' - TCG AGA CGG A - 3'	32	OPB - 08	5' - GTC CAC ACG G - 3'
5	OPA - 01	5' - CAG GCC CTT C - 3'	33	OPB - 10	5' - TGG GGG ACT C - 3'
6	OPA - 02	5' - TGC CGA GCT G - 3'	34	OPB - 15	5' - TCC GCT CTG G - 3'
7	OPA - 03	5' - AGT CAG CCA C - 3'	35	OPB - 17	5' - AGG GAA CGA G - 3'
8	OPA - 04	5' - AAT CGG GCT G - 3'	36	OPC - 02	5' - GTG AGG CGT C - 3'
9	OPA - 05	5' - AGG GGT CTT G - 3'	37	OPC - 04	5' - CCG CAT CTA C - 3'

10	OPA - 06	5' - GGT CCC TGA C - 3'	38	OPC - 05	5' - GAT GAC CGC C - 3'
11	OPA - 08	5' - GTG ACG TAG G - 3'	39	OPC - 07	5' - GTC CCG ACG A - 3'
12	OPA - 09	5' - GGG TAA CGC C - 3'	40	OPC - 11	5' - AAA GCT GCG G - 3'
13	OPA - 09	5' - GGG TAA CGC C - 3'	41	OPC - 13	5' - AAG CCT CGT C - 3'
14	OPA - 10	5' - GTG ATC GCA G - 3'	42	OPC - 15	5' - GAC GGA TCA G - 3'
15	OPA - 11	5' - CAA TCG CCG T - 3'	43	OPC - 18	5' - TGA GTG GGT G - 3'
16	OPA - 13	5' - CAG CAC CCA C - 3'	44	OPC - 19	5' - GTT GCC AGC C - 3'
17	OPA - 15	5' - TTC CGA ACC C - 3'	45	OPD - 03	5' - GTC GCC GTC A - 3'
18	OPA - 16	5' - AGC CAG CAG A - 3'	46	OPD - 05	5' - TGA GCG GAC A - 3'
19	OPA - 17	5' - GAC CGC TTG T - 3'	47	OPD - 18	5' - GAG AGG CAA C - 3'
20	OPA - 18	5' - AGG TGA CCG T - 3'	48	OPE - 07	5' - AGA TGC AGC C - 3'
21	OPA - 19	5' - CAA ACG TCG G - 3'	49	OPE - 08	5' - TCA CCA CGG T - 3'
22	OPAJ - 02	5' - TCG CAC AGT C - 3'	50	OPG - 03	5' - GAG CCC TCC A - 3'
23	OPAJ - 04	5' - GAA TGC GAC C - 3'	51	OPG - 17	5' - ACG ACC GAC A - 3'
24	OPAK - 03	5' - GGT CCT ACC A - 3'	52	OPM - 06	5' - CTG GGC AAC T - 3'
25	OPAK - 04	5' - AGG GTC GGT C - 3'	53	OPM - 13	5' - GGT GGT CAA G - 3'
26	OPB - 01	5' - GTT TCG CTC C - 3'	54	OPQ - 05	5' - CCG CGT CTT G - 3'
27	OPB - 03	5' - CAT CCC CCT G - 3'	55	OPQ - 06	5' - GAG CGC CTT G - 3'
28	OPB - 04	5' - GGA CTG GAG T - 3'	56	OPV - 10	5' - CCC GTT TTG T - 3'

2.2.2. Phân tích bằng chỉ thị RAPD

Thử nghiệm phản ứng PCR dùng cho một mẫu là 25 µl bao gồm: Primer (20 pmol) 2 µl; dNTPs 0,5 µl; Taq ADN polymerase (5 U/µl) 0,2 µl; Buffer (10X) 2,5 µl; dH₂O 18,8 µl. Chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút, 45 chu kỳ (93°C trong 1 phút, 36°C trong 40 giây, 72°C trong 1 phút), cuối cùng 72°C trong 4 phút, giữ sản phẩm ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Các băng trên gel được xác định bằng cách cho điểm (0) không có băng và (1) có băng.

2.2.3. Phân tích thống kê kết quả

Sử dụng chỉ số PIC (Polymorphic Information Content) để đánh giá tính đa hình các allen được tạo ra của từng chỉ thị RAPD được tính toán theo công thức (Mohammadi, 2003) như sau:

$PIC = 1 - (\sum p_i^2)$; (p_i là tần số xuất hiện của allen thứ i)

Hệ số tương đồng di truyền (Similarity Index - SI) được tính theo công thức của Nei và Li (1979): $SI = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$, trong đó N_{ij} là số allen RAPD chung cho mẫu giống i và j, N_i và

N_j là số allen quan sát của mẫu giống i và j, tương ứng.

Ma trận tương đồng và cây phả hệ (cluster analysis) được xây dựng bằng phương pháp nhóm cặp không trọng số UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) sử dụng phần mềm NTSYS - pc 2.10 (Rohlf, 1992).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng di truyền của tập đoàn 53 mẫu giống cây keo lá liềm với các chỉ thị RAPD

Điều kiện tối ưu cho phản ứng nhân gen đã được xác định đối với 56 chỉ thị RAPD nghiên cứu. Các allen nhân bản được sử dụng như là các chỉ thị RAPD bao gồm hai loại đơn hình và đa hình. Allen đơn hình có mặt trong tất cả các giống nghiên cứu, còn allen đa hình xuất hiện ở giống này nhưng lại vắng mặt ở giống khác. Số allen đa hình càng cao thì việc thiết lập mối quan hệ di truyền càng chính xác. Kết quả phân tích PCR với 56 chỉ thị cho thấy, các chỉ thị đều xuất hiện vệt băng ADN (allen) với kích thước khác nhau, kích thước các vệt băng trong

khoảng từ 100 bp đến 3.000 bp. Từ 56 chỉ thị sử dụng, có 16 chỉ thị cho allen đa hình với chỉ số PIC dao động từ 0,49 (OPB - 03) đến 0,90 (OPD - 03) (Bảng 3), số chỉ thị còn lại cho băng ít (1 - 3 băng) hoặc không đa hình. Tổng số allen có được từ PCR của 16 chỉ thị với 53 mẫu keo lá liềm nghiên cứu là 142 allen. Số lượng allen trên 1 chỉ thị dao động từ 5 - 12, với chỉ thị OPM - 13 và OPD - 03 biểu hiện số allen lớn nhất, 12 allen (Hình 2). Tổng số allen đa hình là 131 allen (92%), có 12/16 chỉ thị có 100% allen đa hình gồm OPA - 02, OPA - 03, OPA - 13, OPB - 03, OPB - 07, OPB - 10, OPD - 18, OPAJ - 02, OPAK - 03, OPAK - 04, OPC - 07 và OPM - 13; kích cỡ của các allen từ 250 bp đến 3.000 bp. Hệ số đa hình di truyền PIC trung bình đạt 0,818 cho thấy mức độ đa dạng gen tồn tại trong các mẫu giống keo nghiên cứu ở mức khá đa dạng. Habeballa *et al.* (2010) sử dụng 15 chỉ thị RAPD để phân tích đa dạng di truyền và quan hệ giữa 30 kiểu gen của ba loài keo (28 kiểu gen của loài *A. senegal*, 1 thuộc loài *A. mellifera* và 1 thuộc loài *A. leata*), đã phát hiện 7 chỉ thị tạo

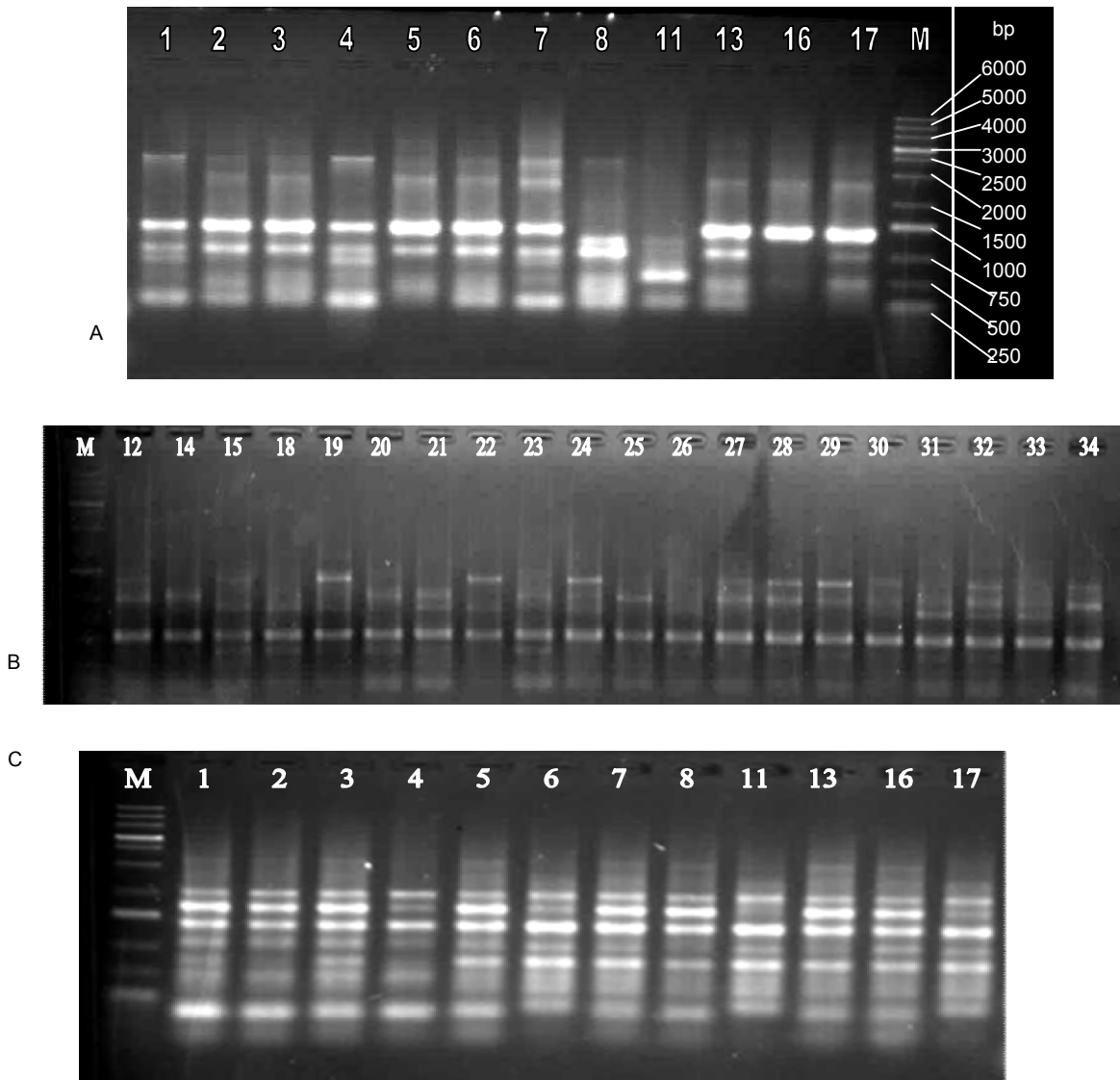
ra ít nhất 1 allen đa hình. Sử dụng 7 chỉ thị này để đánh giá mức độ đa hình và quan hệ di truyền của các dòng Keo nghiên cứu, đã phát hiện được tổng số 51 allen, trong đó có 44 allen đa hình trong số 28 kiểu gen Keo với trung bình 7,2 allen đa hình đối với 1 chỉ thị. Josiah *et al.* (2008) nghiên cứu biến động di truyền của 4 quần thể *A. senegal* tại Kenya bằng 10 chỉ thị RAPD và 5 chỉ thị ISSR đã ghi nhận 55 allen đa hình, số allen đa hình trung bình là 3,6 trên cặp RAPD + ISSR, khoảng 86% biến động di truyền hiện diện bên trong quần thể và điều kiện địa lý cũng góp phần vào các biến động này.

3.2. Kết quả phân tích quan hệ di truyền

Ứng dụng các chỉ thị phân tử trong đánh giá đa dạng di truyền và chọn giống của một số loài keo được thực hiện từ vài thập niên trở lại đây cho thấy một số chỉ thị có thể được sử dụng một cách hữu ích trong xác định quan hệ di truyền của các cá thể nghiên cứu, để từ đó có thể chọn vật liệu lai tạo và bảo tồn nguồn gen các loài keo được tốt hơn. Trong các chỉ thị, chỉ

Bảng 3. Kết quả phân tích 16 chỉ thị đa hình trên 53 mẫu giống keo lá liềm

STT	Tên chỉ thị	PIC	Số allen	Số allen đa hình	% băng đa hình
1	OPA - 02	0,84	10	10	100
2	OPA - 03	0,88	10	10	100
3	OPA - 13	0,87	11	11	100
4	OPB - 07	0,87	11	11	100
5	OPB - 10	0,80	6	6	100
6	OPD - 18	0,87	9	9	100
7	OPAJ - 02	0,70	5	5	100
8	OPAJ - 04	0,86	8	7	87,5
9	OPAK - 03	0,76	7	7	100
10	OPAK - 04	0,83	8	8	100
11	OPB - 03	0,49	4	4	100
12	OPC - 07	0,87	11	11	100
13	OPD - 03	0,90	12	7	58,3
14	OPM - 13	0,88	12	12	100
15	OPQ - 05	0,82	8	7	87,5
16	OPV - 10	0,86	10	6	60
	<i>Tổng số</i>		<i>142</i>	<i>131</i>	



Hình 2. Sản phẩm PCR - RAPD của một số mẫu giống keo lá liềm đại diện trong nghiên cứu (A) Với chỉ thị OPC - 07, (B) Với chỉ thị OPAJ - 04 và (C) với mỗi OPD - 03

Ghi chú: Giếng M: Marker 1kb; Các giếng khác: mẫu của các giống tương ứng với số của các mẫu giống keo khác nhau được liệt kê trong bảng 1.

thị RAPD cũng đã được sử dụng trong nghiên cứu về tính chống chịu của một số dòng keo. Nghiên cứu của Daffala *et al.* (2011) đã xác định được các chỉ thị RAPD liên quan tính chống chịu với mặn trong quá trình nảy mầm và sinh trưởng của Keo *A. senegal*. Kết quả chỉ ra rằng 44 trong số 51 allen biểu hiện đa hình đối với các dòng *A. senegal* đã chọn và chỉ số không tương đồng giữa các dòng nhỏ hơn 39%. Nguyễn Trần Nguyên và cs. (2004) đã sử dụng chỉ thị RAPD và SSR để nghiên cứu về tính chống chịu

mặn của 3 xuất xứ keo lá tràm (*A. auriculiformis*) và 3 xuất xứ keo tai tượng (*A. mangium*) và đã ghi nhận mức độ tương đồng của các xuất xứ keo lá tràm (Sakaerat - Thái lan; đảo Melville và sông Wenlock ở Queensland, Úc) liên quan đến tính chịu mặn là 65%; trên cơ sở đó đã gợi ý cho việc chọn vật liệu lai tạo cũng như bảo tồn nguồn gene tốt hơn.

Từ các số liệu thu được, tiến hành phân tích quan hệ di truyền của tập đoàn 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu bằng chương trình phần

mềm NTSYS pc 2.10. Dữ liệu ở bảng 4, hình 3 cho biết hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây quan hệ di truyền của tập đoàn 53 mẫu giống. Dựa vào kết quả này có thể biết được mối quan hệ giữa các mẫu giống, từ đó nhóm chúng thành từng nhóm để có hướng sử dụng và bảo tồn có hiệu quả.

Sơ đồ cây phả hệ và ma trận tương đồng di truyền thu được sau khi tổng hợp từ 131 bảng đa hình và sử dụng phần mềm NTSYS pc2.10 (Bảng 4, hình 3) cho thấy, hệ số tương đồng di truyền của 53 mẫu giống keo nghiên cứu là khá cao, dao động từ 0,47 đến 0,99 và trung bình là 0,73. Trong đó có 8 cặp giống có hệ số tương đồng di truyền là 0,99 tức là gần giống hệt nhau về mặt di truyền thuộc các phân nhóm di truyền khác nhau (ĐC02 - keo Thừa Thiên Huế và ĐC03 - keo Quảng Nam; A.cr.S.61 - keo Quảng Nam và A.cr.S.30 - keo Thừa Thiên Huế; A.cr.S.17 - keo Quảng Nam và A.cr.S.166 - keo Hà Tĩnh; A.cr.S.73 - keo Ninh Thuận và A.Cr.S.43 - keo Quảng Nam; A.cr.N.85 và A.cr.N.9 - keo Thừa Thiên Huế; A.cr.N.83 - keo Thừa Thiên Huế và A.cr.N.2 - keo Quảng Nam; A.cr.N.88 - Thừa Thiên Huế và A.cr.N.12 - keo Quảng Nam; A.cr.N.16 - keo Thừa Thiên Huế và A.cr.N.80 - keo Ninh Thuận).

Xét ở giá trị tương đồng 0,62, 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu được phân thành hai nhóm lớn với khả năng chịu hạn khác nhau.

- **Nhóm I:** gồm 9 dòng keo lá liềm đều là các giống địa phương Việt Nam có khả năng chịu hạn tốt. Trong đó có 6 mẫu giống keo Thừa Thiên Huế - K1 (A.Cr.N.147), K4 (A.cr.N.34), K7 (A.cr.N.81), K8 (A.cr.N.87), K11 (A.cr.N.84), K13 (A.cr.N.86) và 3 mẫu giống keo Quảng Nam - K2 (A.cr.S.6), K5 (A.cr.S.38) và K3 (A.cr.S.51). Các giống này chia thành 2 phân nhóm bậc 1:

+ **Phân nhóm Ia:** Gồm 7 giống - 4 giống keo Thừa Thiên Huế: K1 (A.Cr.N.147), K7 (A.cr.N.81), K8 (A.cr.N.87), K13 (A.cr.N.86) và 3 mẫu giống keo Quảng Nam: K2 (A.cr.S.6), K5 (A.cr.S.38), và K3 (A.cr.S.51). Hệ số tương đồng di truyền giữa các giống trong nhóm dao động từ 0,85 (K5 - A.cr.S.38) đến 0,87 (K3 - A.cr.S.51 và K8 - A.cr.N.87).

+ **Phân nhóm Ib:** Gồm 2 giống keo Thừa Thiên Huế: K4 (A.cr.N.34) và K11 (A.cr.N.84) có hệ số tương đồng là 0,88.

- **Nhóm II:** gồm 44 giống keo lá liềm còn lại, là các giống địa phương Việt Nam có khả năng chịu hạn kém hơn. 44 giống này chia thành 3 phân nhóm bậc 1 cụm lại ở mức tương đồng 0,78.

+ **Phân nhóm IIa:** gồm 3 giống keo đối chứng với hệ số tương đồng dao động từ 0,97 (K6 - ĐC01) đến 0,99 (K16 - ĐC02 và K17 - ĐC03).

+ **Phân nhóm IIb:** gồm 40 giống keo và chia thành 4 phân nhóm bậc 2:

Phân nhóm IIb1: gồm 4 giống keo với hệ số tương đồng là 0,99 (3 giống keo Thừa Thiên Huế: K9 - A.cr.N.85, K39 - A.cr.S.9, K10 - A.cr.N.85 và 1 giống keo Quảng Nam: K40 - A.cr.S.2).

Phân nhóm IIb2: gồm 26 giống keo với hệ số tương đồng dao động từ 0,85 (K28 - A.cr.N.85) đến 0,99 (K21 - A.cr.N.30 và K46 - A.cr.N.61, K26 - A.Cr.S.43 và K48 - A.Cr.S.73, K27 - A.cr.N.51 và K50 - A.cr.N.60, K25 - A.cr.N.16 và K44 - A.cr.N.41).

Phân nhóm IIb3: gồm 4 giống keo với hệ số tương đồng là 0,98 (K12 - A.Cr.N.162 ở Hà Tĩnh và K51 - A.cr.N.67 ở Thừa Thiên Huế, K14 - A.cr.N.82 ở Thừa Thiên Huế và K52 - A.cr.S.2 ở Bình Thuận).

Phân nhóm IIb4: gồm 6 giống keo (3 Quảng Nam - A.cr.S.12, A.cr.S.17, A.cr.S.19; 1 Thừa Thiên Huế - A.cr.N.88, 1 Quảng Bình - A.cr.N.151 và 1 Hà Tĩnh - A.cr.S.166) với hệ số tương đồng dao động từ 0,98 (K19 - A.cr.N.151 và K43 - A.cr.S.19) đến 0,99 (K15 - A.cr.N.88 và K41 - A.cr.S.12, K18 - A.cr.S.166 và K42 - A.cr.S.17).

+ **Phân nhóm IIc:** chỉ duy nhất một giống keo ở Thừa Thiên Huế - K22 (A.Cr.N.8).

Khi so sánh các đặc điểm nông sinh học của các mẫu giống với kết quả đánh giá bằng chỉ thị phân tử, chúng tôi nhận thấy các mẫu giống trong cùng một phân nhóm về cơ bản có đặc điểm nông sinh học giống nhau từ kiểu cây, màu sắc lá, thời gian sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu này

Bảng 4. Ma trận biểu diễn mối quan hệ tương đồng di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm

Table with 53 columns (K1 to K53) and 53 rows (K1 to K53) containing similarity values ranging from 1.00 to 0.00.

có thể làm cơ sở bước đầu để góp phần phục vụ cho công tác thu thập, phân loại, khai thác và sử dụng có hiệu quả nguồn gen của các dòng keo lá liềm ưu tú tại Việt Nam trong chọn giống.

5. KẾT LUẬN

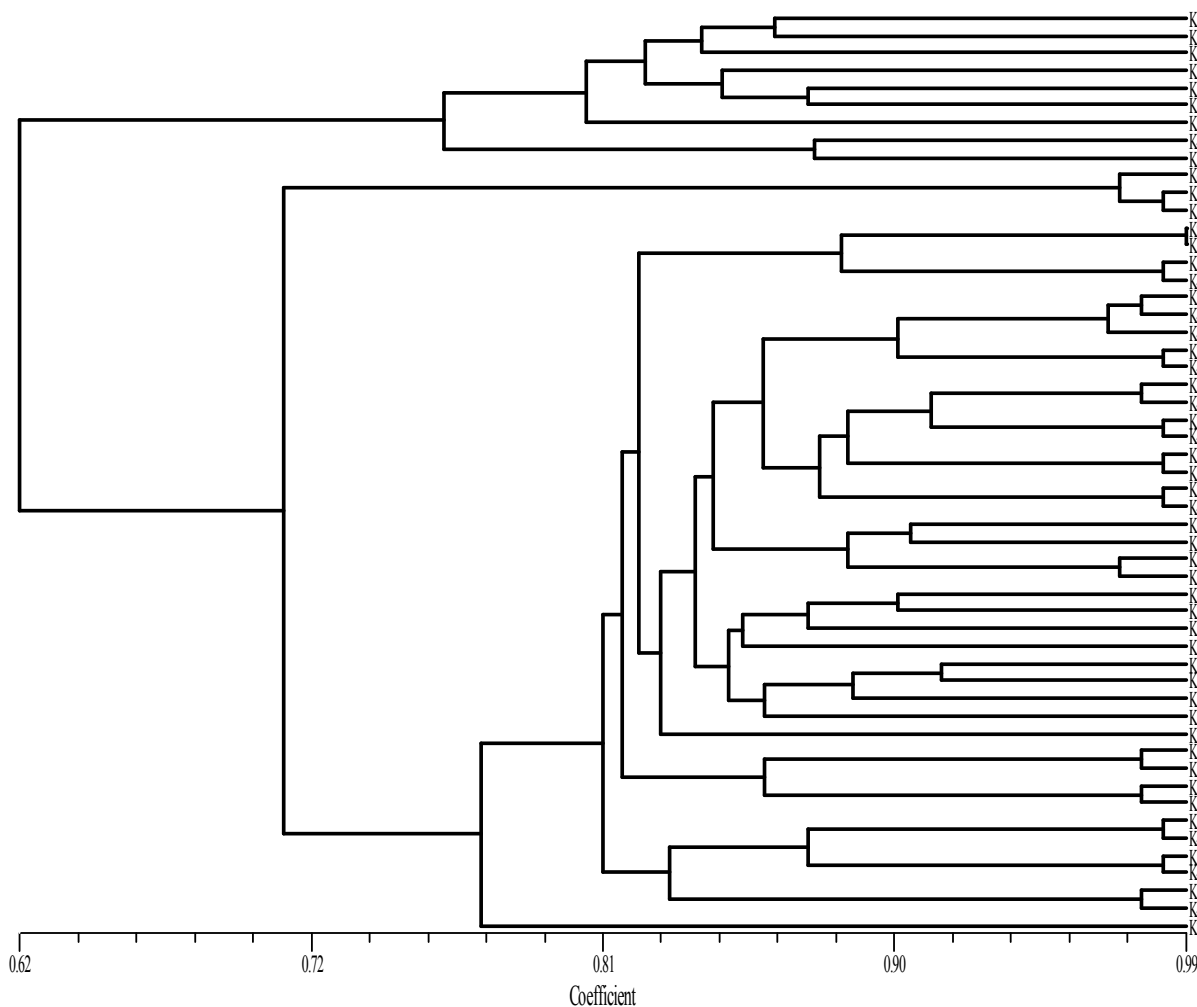
Phân tích tính đa dạng di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm ở Việt Nam bằng kỹ thuật RAPD với 56 chỉ thị, kết quả có 16 chỉ thị cho allen đa hình với 142 allen nhân bản, trong đó có 131 allen đa hình (92%), có 12/16 chỉ thị có 250 bp đến 3.000 bp, hệ số đa hình di truyền PIC trung bình đạt 0,818.

Mức tương đồng di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm nghiên cứu dao động từ 47 - 99%. Điều này cho thấy sự đa dạng di truyền là tương đối cao. Hai nhóm chính được ghi nhận khi sử dụng

chỉ thị RAPD ở giá trị tương đồng di truyền 0,62. Nhóm I bao gồm 9 giống được đánh giá là có khả năng chịu hạn tốt: 6 mẫu giống keo Thừa Thiên Huế - K1 (A.Cr.N.147), K4 (A.cr.N.34), K7 (A.cr.N.81), K8 (A.cr.N.87), K11 (A.cr.N.84), K13 (A.cr.N.86) và 3 mẫu giống keo Quảng Nam - K2 (A.cr.S.6), K5 (A.cr.S.38) và K3 (A.cr.S.51). Nhóm II bao gồm 44 giống còn lại có khả năng chịu hạn kém hơn chia thành 3 phân nhóm phụ bậc 1 (IIa, IIb, IIc). Kết quả này là cơ sở để lựa chọn vật liệu lai tạo giống nhằm tạo được quần thể con lai có khả năng chịu hạn tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đặng Thái Dương (2010). Nghiên cứu sinh trưởng và đánh giá khả năng cải tạo đất của một số loài keo (Acacia) 4 năm tuổi trồng trên vùng đất cát ven biển huyện Lệ Thủy tỉnh Quảng Bình. Tạp chí Nông nghiệp & PTNT.



Hình 3. Sơ đồ cây phả hệ biểu diễn mối quan hệ di truyền của 53 mẫu giống keo lá liềm

Lê Đình Khả, Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Xuân Liệu (2006). Cẩm nang ngành lâm nghiệp, chương Cải thiện giống và quản lý cây rừng. Bộ Nông nghiệp & PTNT, Chương trình Hỗ trợ ngành lâm nghiệp và đối tác. Dự án GTZ - REFAS, pp.1 - 141.

Daffalla H.M., Habeballa R.S., Elhadi E.A., and Khalafalla M.M. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker associated with salt tolerance during seeds germination and growth of selected *Acacia senegal* provenances. African Journal of Biotechnology, 10(31): 5820 - 5830.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull., 19: 11 - 15.

Habeballa R.S., Hamza N.B., and Gaali El.El. (2010). Genetic variability in Sudanese *Acacia senegal*

(L.) assessed by random amplified polymorphic DNA. African Journal of Biotechnology, 9(30): 4655 - 4660.

Josiah C.C., George D.O., Eleazar O.M., and Nyamu W.F. (2008). Genetic diversity in Kenyan populations of *Acacia senegal* (L.) wild revealed by combined RAPD and ISSR markers. African Journal of Biotechnology, 7(14): 2333 - 2340.

Mohammadi S.A., Prasanna B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant - Salient statistical tool and considerations. Crop Sci., 43: 1235 - 1248

Nanda R.M., Naya K.S., and Rout G.R. (2004). Studies on genetic relatedness of *Acacia* tree species using RAPD markers. Biologia, Bratislava, 59: 115 - 120.

Nei M. and Li W.H. (1979). Mathematical modes for studying genetic variation in terms of restriction

- endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76: 5269 - 5273.
- Nguyen Tran Nguyen; Maghaieb R.E.A; Saneoka H. and Fujita K. (2004). RAPD markers associated with salt tolerance in *Acacia auriculiformis* and *A. mangium*. Plant Science, 167: 797 - 805.
- Paola V.C., Beatriz O.S., Juan C.V. and Ana M.C. (2002). First comparative phenetic studies of Argentinean species of *Acacia* (Fabaceae), using morphometric, isozymal and RAPD approaches. American Journal of Botany, 89(5): 843 - 853.
- Rohlf F.J. (1992). NTSYS - pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Software.
- Semagn K., Bjørnstad Å. and Ndjiondjop M.N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology, 5(25): 2540 - 2568.