

ĐÁNH GIÁ NGUỒN GEN GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CÚC BÓNG TẠI HUYỆN VÔ NHAI TỈNH THÁI NGUYÊN

Nguyễn Thanh Hoàn^{1*}, Vũ Hoài Nam², Ma Thị Trang²,
Hoàng Thị Huyền Trang², Trần Minh Quân², Dương Văn Cường²

¹Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên, ²Viện khoa học Sự sống - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Đậu tương Cúc bóng là một giống đặc hữu của tỉnh Thái Nguyên. Nhiều năm gần đây diện tích trồng giống đậu tương này đang bị thu hẹp, đang phải đối mặt với nguy cơ thoái hóa và mất dần giống. Về hình thái: Giống đậu tương Cúc bóng có mức tương đồng cao với giống đậu tương DT84, tuy nhiên kích thước hạt trung bình nhỏ hơn, khối lượng 1000 hạt dao động trong khoảng 120-135g, thấp hơn giống đậu tương DT84 từ 40-65g. Về hoá sinh: Hàm lượng protein trong hạt đậu tương Cúc bóng là 36,57%, lipid 21,38%, khoáng 4,74%, glucid 24,37% có chứa tới 17 loại amino acid. Trong nghiên cứu này, đặc điểm hình thái, hóa sinh và trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL* và *ITS2* đã được phân tích. Kết quả nhân bản thành công các đoạn gen (*rbcL*, *ITS2*) từ mô lá của giống đậu tương Cúc bóng bằng kỹ thuật PCR, với kích thước của gen *rbcL* là 700bp và của gen *ITS2* là 500bp. So sánh các trình tự trên với các trình tự trên ngân hàng gen quốc tế cho thấy: trình tự gen *rbcL* có độ tương đồng trên 99% với các loài thuộc chi *Glycine*, trình tự gen *ITS2* có mức tương đồng 100% với loài *Glycine max* và 99,7% với loài *Glycine soja* (sai khác 0,3%, và từ 4-6% với các loài còn lại thuộc chi *Glycine*). Trình tự mã vạch *ITS2* được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu quốc tế (NCBI) với mã số là MN224216.

Từ khóa: DNA mã vạch, *rbcL*, *ITS2*, đậu tương, *Glycine max*

Ngày nhận bài: 18/9/2019; **Ngày hoàn thiện:** 09/10/2019; **Ngày đăng:** 17/10/2019

PRELIMINARY REPORT ON THE DISTRIBUTION, MORPHOLOGY AND GENETICS OF CUC BONG SOYBEAN IN VO NHAI DISTRICT, THAI NGUYEN PROVINCE

Nguyen Thanh Hoan^{1*}, Vu Hoai Nam², Ma Thi Trang²,
Tran Thi Huyen Trang², Tran Minh Quan², Duong Van Cuong²

¹University of Agriculture and Forestry – TNU, ²Institute of Life Sciences – TNU

ABSTRACT

Cuc bong is a special soybean variety of Thai Nguyen province. In recent years, the area of cultivating this soybean has been narrowed, facing risk of degeneration and gradual loss of seed variety. Morphological: Cuc bong has a high similarity with DT84 soybean, but the average seed size is smaller, the weight of 1000 seeds ranges from 120-135g, lower than DT84 soybean from 40-65g. About biochemistry: The protein content of Cuc bong is 36.57%, lipid 21.38%, mineral 4.74%, glucid 24.37% have less than 17 types of amino acids. In this study, morphological, biochemical and nucleotide sequences of the *rbcL* and *ITS2* gene segments were analyzed. The results of successful cloning of gene segments (*rbcL*, *ITS2*) from leaf tissue of Cuc bong cultivar by PCR technique, with the size of *rbcL* gene is 700bp and that of *ITS2* gene is 500bp. Comparison of the above sequences with the sequences on international Gene Banks showed that the *rbcL* gene sequence has a similarity of more than 99% for the genus of *Glycine* genus, the sequence of *ITS2* gene has a similarity of 100% with that of *Glycine max* and 99.7% with *Glycine soja* (difference 0.3%, and 4-6% for other species belonging to genus *Glycine*). The nucleotide sequences of *ITS2* from Cuc bong have been registered on the NCBI with Barcode ID: MN224216.

Keywords: DNA barcode, *rbcL*, *ITS2*, soybean, *Glycine max*

Received: 18/9/2019; **Revised:** 09/10/2019; **Published:** 17/10/2019

* Corresponding author. Email: nguyenthoan595@gmail.com

1. Giới thiệu

Cây đậu tương là một loại cây thân thảo thuộc họ đậu (Fabaceae), có hàm lượng dinh dưỡng cao là cây thực phẩm quan trọng cho người và gia súc, nguyên liệu cho công nghiệp, và là cây cải tạo đất tốt [1].

Cây đậu tương dễ trồng và thích nghi tương đối rộng ở nhiều vùng khí hậu khác nhau. Tại Việt Nam, có 6 vùng sản xuất đậu tương, vùng Đông Nam Bộ, miền núi Bắc Bộ, Đồng bằng sông Hồng, Đồng bằng sông cửu Long, tổng diện tích 4 vùng này chiếm 66,6%, còn lại là vùng đồng bằng ven biển miền Trung và Tây Nguyên [2]. Các giống đậu tương rất đa dạng 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 do tập quán canh tác phân tán, chưa có khoanh vùng định hướng phát triển, cùng với sự phát triển của các giống đậu tương mới đang làm mất dần nhiều giống đậu tương bản địa có chất lượng. Mặt khác một giống có thể có nhiều tên gọi khác nhau hoặc cùng một tên gọi nhưng là các giống đậu tương khác nhau điều này đã tạo ra nhưng khó khăn trong công tác phân loại và bảo tồn các nguồn gen bản địa. Hiện nay, phương pháp phân loại phân tử DNA barcode (mã vạch DNA), là công cụ hữu hiệu trong việc phân loại định danh loài. Bằng cách so sánh các trình tự nucleotide của chỉ thị mã vạch DNA từ mẫu nghiên cứu với cơ sở dữ liệu trên thế giới, sự khác nhau giữa các trình tự nucleotid trên đoạn DNA này là cơ sở để phân biệt các loài với nhau. Phương pháp cho kết quả nhanh, chính xác, bổ sung cho phương pháp phân loại học truyền thống [3].

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu đậu tương Cúc bóng và giống đậu tương DT84 thu thập từ các xã Bình Long, Dân Tiến, Phương Giao huyện Võ Nhai tỉnh Thái Nguyên.

Sử dụng 12 mẫu lá bánh tẻ của giống đậu tương Cúc bóng thu thập từ các xã Bình

Long, Dân Tiến, Phương Giao huyện Võ Nhai tỉnh Thái Nguyên làm vật liệu tách chiết DNA. Các mẫu lá được bảo quản trong túi nilon có chứa silica hút ẩm, sau đó được bảo quản ở -20°C.

Cặp mồi PCR thực hiện phản ứng khuếch đại đoạn gen *rbcL* và *ITS2* được thiết kế dựa trên nghiên cứu của tác giả Shilin Chen, Levin Kress & Erickson [4].

ITS2-F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT,
ITS2-R: GACGCTTCTCCAGACTACAAT,
rbcLF: ATGTCACCACAAACAGAGACTAA
AGC,

rbcL-R: GTAAAATCAAGTCCACCCG

2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Phương pháp phân loại hình thái thực vật

Các mẫu đậu tương Cúc bóng được thu thập được trồng khảo nghiệm ở cùng một điều kiện canh tác, trên 2 vụ Xuân và Hè Thu. Phương pháp thực hiện theo QCVN 01-58:2011/BNNPTNT “Về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng giống đậu tương”.

Mô tả hình thái cây đậu tương dựa trên phương pháp của Ngô Thế Dân [2] và Trần Văn Điền [1], các bộ phận mô tả bao gồm: thân, lá, rễ, hoa, quả và hạt.

* Phương pháp phân tích sinh hóa hạt

Xác định hàm lượng protein, lipid, khoáng, glucit và thành phần amino acid trong hạt tại phòng phân tích hóa học Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên, thực hiện theo TCVN 4328-1:2007, TCVN 4331:2001, TCVN 8124 : 2009, TCVN 4594:1988, TCVN 8764:2010.

* Phương pháp tách chiết và khuếch đại DNA

DNA đậu tương Cúc bóng được tách chiết dựa trên phương pháp tách chiết của Dellaporta [5] Doyle [6]. Xác định nồng độ và độ tinh sạch các mẫu DNA bằng máy đo quang phổ kế Biomate 3. DNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại đoạn gen *rbcL* và *ITS2* trên máy PCR

Amplified Biosystems USA. Thành phần trong tổng phản ứng 10 µl bao gồm: H₂O (7,25 µl), Buffer (1 µl), dNTP (0,2 µl), Taq (0,05 µl), mỗi xuôi (0,25 µl), mỗi ngược (0,25 µl). Các thành phần phản ứng được trộn đều, sau đó đặt vào máy PCR với chu trình nhiệt: Biến tính 95°C 3 phút, tiếp theo 35 chu kỳ [95°C 30 giây, 55°C- 50 giây, 72°C- 45 giây], 72°C – 7 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trên hệ thống ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger (Sanger et al., 1977) với bộ kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (công ty 1st BASE tại Singapore), sử dụng cặp mỗi ITS2R/ ITS2F và cặp mỗi rbcLR/ rbcLF. Dữ liệu trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit, Seqscanner v2.0, DNASTar v2.0. Tìm kiếm và so sánh giữa trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng trên Ngân hàng gen (NCBI) bằng chương trình BLAST. Trình tự gen chỉ thị (*ITS2*) được đăng trên Ngân hàng gen NCBI.

3. Kết quả

3.1. Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái và hóa sinh hạt của đậu tương Cúc bóng

* Hình thái: Sau khi thu thập mẫu và gieo trồng đánh giá hình thái cây đậu tương Cúc bóng chúng tôi thu được kết quả như sau:

Thân cây thuộc thân thảo, có hình tròn, trên thân có nhiều lông nhỏ mọc dày bao phủ từ gốc lên đến ngọn, đến cả cuống lá. Thân khi còn non có màu xanh khi về già chuyển sang màu nâu nhạt. Thân có trung bình 13-14 đốt, các đốt ở phía dưới thường ngắn hơn các đốt ở phía trên, chiều cao từ gốc tới ngọn là 35-55 cm. Thân dạng bán đứng. Rễ cây có rễ chính và rễ phụ. Trên rễ chính mọc ra nhiều rễ phụ, rễ phụ cấp 2, cấp 3 tập trung nhiều ở tầng đất 8-9 cm. Trên rễ chính và rễ phụ có nhiều nốt sần. Cây có 3 loại lá: Lá mầm (lá từ diệp): Lá mầm mới mọc có màu xanh lục. Lá đơn mọc đối xứng nhau, lá kép: mỗi lá kép có 3 lá chét, lá kép thường có màu xanh tươi khi già biến

thành màu vàng nâu. Trên lá có nhiều lông tơ. Lá có hình dạng trứng nhọn.

Hoa đậu tương Cúc bóng nhỏ, không hương vị, thuộc loại cánh bướm. Hoa có màu tím nhạt, hoa phát sinh ở nách lá, đầu cành và đầu thân. Hoa mọc thành từng chùm, mỗi chùm có từ 1-10 hoa thuộc loại hoa đồng chu lưỡng tính trong hoa có nhị và nhụy, mỗi hoa gồm 5 lá đài, 5 cánh hoa có 10 nhị và 1 nhụy. Đài hoa có màu xanh; cánh hoa: một cánh to gọi là cánh cờ, 2 cánh bướm và 2 cánh thìa; nhị đực: 9 nhị đực cuộn thành ống ôm lấy vòi nhụy cái và 1 nhị riêng lẻ; nhụy cái: Bầu thượng, từ phòng một ngăn có 1-4 tâm bì (noãn). Quả đậu tương Cúc bóng hơi cong, có chiều dài từ 2 tới 7 cm. Quả có màu sắc biến động từ vàng trắng tới vàng sẫm. Lúc quả non có màu xanh nhiều lông khi chín có màu nâu vàng. Số quả biến động từ 31-40 quả trên một cây. Vỏ của lớp quả non gồm nhiều lông dài dần những lông dạng chùy tiêu biến, những lông có ria cứng tồn tại tới lúc quả già. Một quả chứa từ 1- 3 hạt, hạt có hình dạng tròn (hình bầu dục, hoặc tròn dẹt), vỏ hạt đậu tương Cúc bóng có 3 lớp rõ ràng: biểu bì, hạ bì và lớp nhu mô bên trong, màu vỏ hạt màu vàng bóng, khối lượng trung bình 100 hạt 12g - 13,5g. Rốn hạt có màu nâu sẫm.

Kết quả phân tích hình thái cho thấy, giống đậu tương Cúc bóng mang những đặc điểm hình thái chung của cây đậu tương như màu vỏ hạt, hình dạng lá, dáng cây, bên cạnh đó cũng có những điểm khác biệt với các giống khác về màu sắc hoa, màu vỏ quả khô khác với DT90, DT99 (hoa trắng), màu rốn hạt khác với DT2008, DT90, DT96 (đen, vàng); có mức tương đồng cao về hình thái với giống đậu tương DT84, tuy nhiên kích thước hạt trung bình của đậu tương Cúc bóng nhỏ hơn (hạt DT84 dài $0,9 \pm 0,01$ cm, rộng $0,72 \pm 0,02$ cm; hạt Cúc bóng dài $0,82 \pm 0,02$ cm, rộng $0,64 \pm 0,02$ cm), khối lượng 1000 hạt khoảng 120-135g thấp hơn giống đậu tương DT84 từ 40-65g. Các chỉ tiêu về thời gian sinh trưởng, chiều cao cây không có sự khác biệt lớn. Đặc điểm chung về hình thái cây đậu tương Cúc bóng được mô tả trên Hình 1.



Hình 1. Hình thái cây đậu tương Cúc bóng

*** Kết quả phân tích hóa sinh hạt**

Hàm lượng protein trong đậu tương Cúc bóng là 36,57%, lipit 21,38%, khoáng 4,74%, gluxit 24,37% có chứa tới 17 loại amino acid (Xem Bảng 1), với 8 loại không thay thế: isoleucine, leucine, lysine, valine, threonine, methionine, phenyl alanine, histidine.

Bảng 1. Thành phần amino acid trong protein của hạt đậu tương Cúc bóng

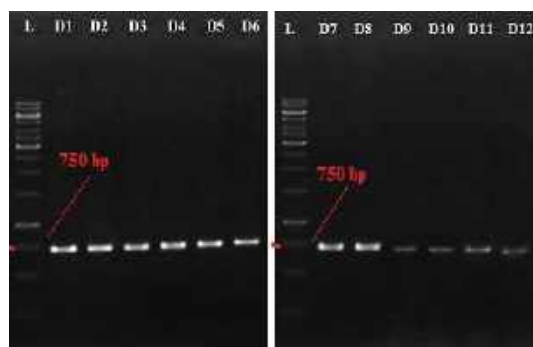
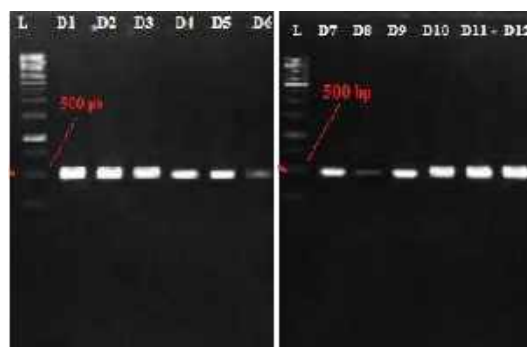
TT	Amino acid	Hàm lượng g/100g	% trong Protein
1	Aspartic acid	3,71	10,15
2	Serine	2,16	5,89
3	Glutamic acid	3,38	9,24
4	Glycine	1,50	4,10
5	Histidine	0,71	1,95
6	Threonine	0,75	2,04
7	Arginine	2,75	7,51
8	Alanine	1,52	4,15
9	Proline	1,71	4,68
10	Cystine	0,61	1,67
11	Tyrocine	0,97	2,66
12	Valine	1,53	4,18
13	Methionine	0,48	1,30
14	Lysine	2,29	6,27
15	IsoLeucine	1,68	4,58
16	Leucine	2,83	7,72
17	Phenyl alanine	1,82	4,99
	Tổng	30,39	83,11

3.2. Kết quả xác định mối quan hệ di truyền của đậu tương Cúc bóng

Từ kết quả giám định bằng phương pháp hình thái, 12 mẫu đậu tương Cúc bóng được lựa chọn để phân tích mã vạch DNA (mẫu từ D1 đến D12). DNA tổng số đã được tách chiết ít bị đứt gãy, các mẫu DNA tổng số thu được có chất lượng tương đối tốt. Tỷ số OD260/OD280 các mẫu nghiên cứu tương đối đồng đều, kết quả dao động từ trong khoảng 1,8 đến 2,0. DNA đạt tiêu chuẩn để sử dụng cho các kỹ thuật tiếp theo.

3.2.1. Kết quả khuếch đại các gen chỉ thị *rbcL* và *ITS2*

Kết quả nhân bản đoạn gen *rbcL* và *ITS2* được thể hiện ở hình 2 và hình 3.

Hình 2. Kết quả khuếch đại gen chỉ thị *rbcL*Hình 3. Kết quả khuếch đại gen chỉ thị *ITS2*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Glycine max isolate GBVN16086 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	969	969	100%	0.0	100.00%
Glycine max isolate GBVN7501 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	969	969	100%	0.0	100.00%
Glycine max isolate GBVN6659 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	969	969	100%	0.0	100.00%
Glycine max isolate GBVN6645 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	969	969	100%	0.0	100.00%
Glycine soja chloroplast, complete genome	969	969	100%	0.0	100.00%
Glycine max voucher PS1684MT01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	969	969	100%	0.0	100.00%
Glycine max cultivar PI 437654 chloroplast, complete genome	969	969	100%	0.0	100.00%
Glycine max cultivar NARC 17417 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	960	960	100%	0.0	99.63%
Glycine max isolate GBVN6648 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	960	960	100%	0.0	99.63%
Glycine stenophita voucher CSIRO:G1974 chloroplast, complete genome	960	960	100%	0.0	99.63%
Glycine falcata voucher CSIRO:G1718 chloroplast, complete genome	956	956	100%	0.0	99.44%
Glycine tabacina ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase large subunit (rbcL), gene	956	956	100%	0.0	99.44%

Hình 4. Kết quả BLAST trình tự gen *rbcL* trên NCBI

Từ kết quả trên cho thấy các gen chỉ thị đều được khuếch đại thành công. Đối chiếu với thang DNA chuẩn, kích thước sản phẩm khuếch đại các gen chỉ thị đều có kích thước như dự kiến (*rbcL* khoảng 700 bp, *ITS2* khoảng 500 bp). Như vậy, sản phẩm PCR đủ điều kiện để có thể giải trình tự.

3.2.2. Kết quả phân tích các gen chỉ thị *rbcL*

Trình tự gen *rbcL* của 12 mẫu đậu tương sau được so sánh với nhau bằng phần mềm Bioedit. Kết quả thấy không có sự sai khác trong trình tự vùng gen *rbcL*. Trình tự chỉ thị *rbcL* của mẫu nghiên cứu tiếp tục được tiến hành chạy BLAST trên NCBI (hình 4) và được tổng hợp bằng phần mềm DNASTAR trong bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, mẫu đậu tương nghiên cứu có sự tương đồng cao tới 100% với loài *Glycine soja*, loài *Glycine max*, và 5 giống đậu tương Việt Nam, tương đồng trên 99% với các loài còn lại. Theo tổ chức BOLD (Ngân hàng mã vạch): Với những phát sinh

sai khác lớn hơn 2% thì với có khả năng hình thành loài mới, như vậy với chỉ thị *rbcL* chưa đủ cơ sở để định danh đến cấp độ loài. Tuy nhiên, dữ liệu cung cấp căn cứ để xác định mẫu đậu tương Cúc bóng thuộc chi *Glycine*, đây cũng là cơ sở để khẳng định vùng gen *rbcL* có tính bảo thủ cao, trong một số trường hợp chỉ phân biệt được đến cấp độ chi, khó phân biệt được ở các loài có mối quan hệ gần gũi, điều này có thể thấy qua các kết quả nghiên cứu của Maria L Kuzmina [7] và Xiaorong [8].

3.2.3. Kết quả phân tích gen chỉ thị *ITS2*

Qua phân tích trình tự vùng gen *ITS2* trong nội bộ các mẫu đậu tương Cúc bóng cho thấy không có sự sai khác. Trình tự gen *ITS2* của mẫu đậu tương Cúc bóng tiếp tục được so sánh với với các dữ liệu có mức tương đồng cao nhất được công bố trên ngân hàng mã vạch DNA (NCBI) bằng ứng dụng BLAST (hình 5). Kết quả được tổng hợp trên hình 6 và bảng 3 với phần mềm Bioedit, DNASTAR phiên bản 2.0.

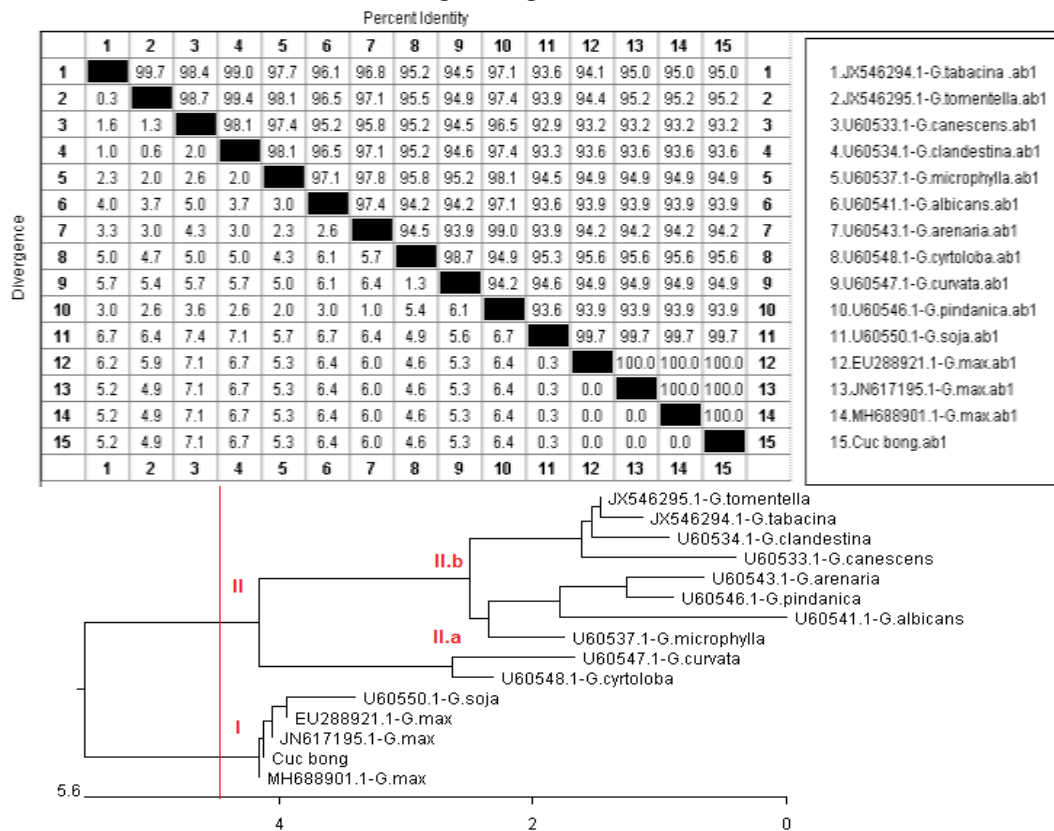
Bảng 2. Hệ số tương đồng trình tự gen *rbcL* của mẫu đậu tương Cúc bóng với trình tự trên ngân hàng mã vạch DNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	■	99.6	99.8	99.6	99.8	99.8	100.0	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	1
2	0.2	■	99.8	100.0	99.5	99.8	99.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	2
3	0.2	0.0	■	99.8	99.6	100.0	99.8	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	3
4	0.2	0.0	0.0	■	99.5	99.8	99.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	4
5	0.2	0.4	0.4	0.4	■	99.6	99.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	5
6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	■	99.8	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	6
7	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	■	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	7
8	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	8
9	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	9
10	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	10
11	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	11
12	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	12
13	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	13
14	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	14
15	0.5	0.7	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	15
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	

1.U74197.1-O.tabacina.ab1
2.KC893638.1-O.syndetika.ab1
3.LT576824.1-O.canescens.ab1
4.KC893640.1-O.tomentella.ab1
5.KC893634.1-O.stenophita.ab1
6.KC893636.1-O.dolichocarpa.ab1
7.KC893637.1-O.falcata.ab1
8.LT576825.1-O.max.ab1
9.KY241014.1-O soja.ab1
10.KR073289.1-O.max.ab1
11.KR073301.1-O.max.ab1
12.KR073297.1-O.max.ab1
13.KR073305.1-O.max.ab1
14.KR073306.1-O.max.ab1
15.Cucbong.ab1

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Glycine max small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer	590	590	78%	2e-164	100.00%
Glycine soja small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer	584	584	78%	9e-163	99.69%
Glycine cyrtoloba small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed	492	492	78%	6e-135	94.67%
Glycine curvata small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed s	481	481	78%	1e-131	94.04%
Glycine tomentella 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer	606	606	100%	2e-169	93.87%
Glycine tabacina 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	606	606	100%	2e-169	93.86%
Glycine tomentella small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe	466	466	78%	4e-127	93.44%
Glycine pindanica small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe	455	455	78%	8e-124	92.81%
Glycine arenaria small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed	455	455	78%	8e-124	92.79%
Glycine pindanica small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe	455	455	78%	8e-124	92.81%
Glycine arenaria small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed	455	455	78%	8e-124	92.79%

Hình 5. Kết quả BLAST trình tự gen ITS2 trên NCBI**Hình 6.** Kết quả so sánh trình tự nucleotide chỉ thị ITS2 của mẫu đậu tương cúc bóng và các loài thuộc chi Glycine

Bảng 3. Hệ số tương đồng trình tự gen ITS2 của mẫu đậu tương Cúc bóng với trình tự trên Ngân hàng mã vạch DNA**Hình 7.** Cây phát sinh chủng loại các loài thuộc chi *Glycine* xây dựng dựa trên trình tự ITS2 bằng phần mềm DNASTAR phiên bản 2.0.

Kết quả cho thấy mẫu đậu tương Cúc bóng có mức tương đồng tới 100% với cả 3 mã số trình tự thuộc loài *Glycine max*, 99,7% với loài *Glycine soja* với mức sai khác là 0,3% (một nucleotide) và từ 4%-7% với các loài còn lại. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kollipara [9], khi tác giả so sánh 18 loài thuộc chi đậu tương *Glycine* trong vùng gen nhân ITS sự sai khác giữa loài *Glycine max* với *Glycine Soja* dao động trong khoảng 0,2% (một nucleotide) và đến 8,6% với các loài như *Glycine hirticaulis* và *Glycine falcata* (độ dài của trình tự ITS2 của các loài đậu tương dao động khoảng 205 đến 222 nucleotide). Theo tổ chức BOLD: Những phát sinh sai khác lớn hơn 2% thì có khả năng hình thành loài mới. Kết quả cho thấy giống đậu tương Cúc bóng, có mối quan hệ họ hàng gần gũi với các giống đậu tương của Đài Loan, vùng Địa Trung Hải và Canada, và có thể thuộc loài *Glycine max* (sai khác 0%) hoặc

Glycine soja (sai khác 0,3%). Kết hợp với kết quả phân tích hình thái cho thấy cây đậu tương Cúc bóng có một số đặc điểm chung với loài *Glycine max*, khác với loài đậu tương hoang dã *Glycine soja*, điển hình như hình dáng cây loài *Glycine max* là thẳng hoặc bán đứng, trong khi loài *Glycine soja* dạng bò hoặc leo. Như vậy có thể kết luận giống đậu tương Cúc bóng thuộc loài *Glycine max*.

So sánh trình tự với 3 giống đậu tương trên thế giới cho thấy mặc dù vị trí địa lý khác nhau nhưng vùng gen ITS2 không có sự khác biệt giữa các giống (tương đồng 100%), mức đa hình thấp, mức bảo thủ trong loài cao, chỉ thị ITS2 phù hợp để giúp định danh các loài thuộc chi *Glycine*. Kết quả này cũng thấy trong nghiên cứu của Madesis [10], khi tiến hành phân loại 25 loài thuộc chi *Glycine* bằng chỉ thị ITS2, cho kết quả phân biệt thành công được giữa các loài là 100%. Nhiều nghiên cứu cũng đưa ra, đây là vùng gen rất hữu hiệu trong việc

phân loại đến cấp độ loài, đặc biệt các loài có mối quan hệ gần gũi như các loài thuộc cây họ cải, họ hoa hồng, họ hòa thảo, họ cói,... tuy nhiên ở một số trường hợp lại cho hiệu quả thấp như ở họ phong lan [7], [11].

Kết quả phân tích được thể hiện trên hình 7 cho thấy các mẫu nghiên cứu đều xuất phát chung một nguồn gốc (họ đậu Fabaceae, chi *Glycine*) và được chia thành 2 nhóm lớn.

Nhóm I gồm các giống đậu tương thuộc loài *Glycine max*: đậu tương Cúc bóng, đậu tương Đài loan (EU288921.1), giống đậu tương Địa Trung Hải (JN617195.1) và giống đậu tương Canada (MH688901.1), chúng có mối quan hệ gần gũi với loài *Glycine soja*.

Nhóm II gồm 10 mẫu, được chia thành hai phân nhóm

Phân nhóm II.a gồm 2 loài *Glycine curvata* và *Glycine cyrtoloba* (có mức tương đồng là 98,7%).

Phân nhóm II.b được chia thành 2 phân nhóm phụ nhỏ hơn. Một nhóm gồm các loài *Glycine tomentella*, *Glycine tabacina*, *Glycine clandestina*, *Glycine canescens*. Phân nhóm phụ còn lại gồm: *Glycine arenaria*, *Glycine pindanica*, *Glycine albicans*, *Glycine microphylla*.

3.3. Đăng ký trình tự gen chỉ thị lên ngân hàng gen quốc tế

Trình tự gen *ITS2* của giống đậu tương Cúc bóng được gia nhập mã đăng ký trên ngân hàng gen NCBI với mã số MN224216.

4. Kết luận

Giống đậu tương Cúc bóng Võ Nhai - Thái Nguyên có những đặc điểm khác biệt với các giống đối chứng về màu sắc hoa, màu vỏ quả khô, màu rốn hạt, có mức tương đồng cao với giống đậu tương DT84; nhưng kích thước hạt trung bình và khối lượng 1000 hạt lại nhỏ hơn. Hạt đậu tương Cúc bóng chứa 36,57% protein, 21,38% lipid, 4,74% khoáng, 24,37% glucid và 17 loại amino acid. Nguồn gen cây đậu tương Cúc bóng ổn định, không có sự biến dị hay đột biến trong 2 vùng gen *rbcL* và *ITS2*. Vùng gen *rbcL* có tính bảo thủ cao, có ý nghĩa trong việc xác định đậu tương Cúc bóng thuộc chi *Glycine*. Vùng gen *ITS2* của

giống đậu tương Cúc bóng có mức tương đồng 100% với các giống đậu tương vùng Địa Trung Hải, Đài Loan, Canada (loài *Glycine max*), có mối quan hệ gần gũi với loài *Glycine soja*, với mức sai khác là 0,3% (một nucleotide). Sự kết hợp giữa hai chỉ thị *rbcL* và *ITS2* là phù hợp làm mã vạch DNA cho cây đậu tương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Trần Văn Điền, *Giáo trình cây đậu tương*, Nxb Nông nghiệp, 2007.
- [2]. Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lại, Đỗ Thị Dung, Phạm Thị Đào, *Cây đậu tương*, Nxb Nông nghiệp, 1999.
- [3]. Fazekas, A. J., et al, "DNA barcoding methods for land plants", *Methods Mol. Biol.*, 858, pp. 223-252, 2012.
- [4]. Kress, W. J., & Erickson, D. L., "DNA barcodes: gens, genomics, and bioinformatics", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), pp. 2761-2762, 2008
- [5]. Dellaporta, Stephen L., Jonathan Wood, and James B. Hicks, "A plant DNA miniprep: version II", *Plant molecular biology reporter*, 1.4, pp. 19-21, 1983.
- [6]. Doyl, J. J., and J. L. Doyle, "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, v.12, pp. 13-15, 1990.
- [7]. Maria L Kuzmina, et al., "Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library", *BMC Ecology*, 12, pp. 1 - 11, 2012.
- [8]. Xiaorong, et al, "DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34.8, pp. 1198-1203, 2011.
- [9]. Kollipara, K. P., Singh, R. J., & Hymowitz, T., "Phylogenetic and genomic relationships in the genus *Glycine* Willd based on sequences from the ITS region of nuclear rDNA", *Genome*, 40(1), pp. 57-68, 1997.
- [10]. Madesis, P., Ganopoulos, I., Ralli, P., & Tsiftaris, A., "Barcoding the major Mediterranean leguminous crops by combining universal chloroplast and nuclear DNA sequence targets", *Genet Mol. Res.*, 11(3), pp. 2548-2558, 2012.
- [11]. Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., "Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals", *PLoS ONE* (5), pp.13102, 2010.