Đánh giá đặc tính di truyền của các dòng bưởi từ nuôi cấy hạt nhỏ bằng chỉ thị phân tử microsatellites

Nguyễn Phương Thúy*, Nguyễn Thị Nga, Lê Thị Cẩm Tú, Đào Thị Bé Bảy, Trần Thị Oanh Yến

Viện Cây ăn quả miền Nam

Ngày nhận bài 9/10/2015, ngày chuyển phản biện 12/10/2015, ngày nhận phản biện 6/11/2015, ngày chấp nhận đăng 27/11/2015

Quả có múi không hạt luôn là một trong những mục tiêu chính trong chọn tạo giống cây có múi. Một trong những phương pháp tạo giống cây có múi không hạt là tạo dòng tam bội, cây có múi tam bội (2n = 3x = 27) có thể được tạo ra bằng chọn lọc cây con tam bội từ nuôi cấy các hạt nhỏ. Trong bài báo này, hạt nhỏ của 5 giống bưởi thương phẩm (Da xanh, Lông cổ cò, Huyết, Tứ quý và Đỏ ND) được nuôi cấy thành cây và được sử dụng để chọn lọc cây tam bội. Hạt nhỏ là các hạt có kích thước bằng 1/3-1/6 kích thước hạt bình thường. Các hạt nhỏ sau khi được gieo ươm thành cây sẽ được theo dõi, đánh giá khả năng sinh trưởng, mức bội thể bằng khảo sát nhiễm sắc thể (NST) và đánh giá đặc tính di truyền bằng chỉ thị phân tử microsatellites. Kết quả cho thấy: có thể sử dụng chỉ thị phân tử SSRs (Simple sequence repeats) để xác định cây tam bội từ các cây hạt nhỏ, 2 chỉ thị phân tử SSR là mCrCIR03G05 và mCrCIR01C06a có thể phát hiện được cây bưởi Da xanh và Lông cổ cò từ nuôi cấy hạt nhỏ là cây tam bội với 3 allen được nhân đoạn và hiện diện trên gel agarose, các cây hạt nhỏ có đặc tính di truyền tương tự nhau và giống với cây mẹ. Các cây hạt nhỏ này khi khảo sát NST cũng nhận được số lượng là 2n = 3x = 27.

Từ khóa: *bưởi không hạt, cây tam bội, đặc tính di truyền, microsatellites, nuôi cấy hạt nhỏ.*

Chỉ số phân loại *4.6*

Evaluation on genetic characteristics of seedless pomelo varieties from small seeds by using microsatellite markers

Summary

One of main purposes in citrus breeding is to create seedless fruits; therefore, triploids in citrus are taken into consideration by breeders since their fruits are seedless. Several breeding strategies based on conventional and innovative methods have been developed for the triploid production. In citrus, Occasional triploid (2n = 3x = 27) offspring have been found in small seeds of monoembryonic cultivars. In this report, small seeds were extracted from 5 commercial pomelo varieties: Da xanh, Long co co, Huyet, Tu quy and Do ND pomelos and cultured in MS medium for germination. Trees from small seeds were analyzed genetic characteristics by microsatellite (SSR) markers. Results showed that the trees from small seeds and the mother tree in the same variety were identical in genetic characteristics, and two SSR markers mCrCIR03G05 and mCrCIR01C06a could be used for identifying triploid trees in Da xanh and Long co co pomelo.

Keywords: *genetic characteristics, microsatellites, seedless pomelo, small seeds, triploids.*

Classification number *4.6*

Đặt vấn đề

Cây bưởi (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới thuộc châu Á và được trồng ở Trung Quốc cách đây hơn 2.000 năm [1, 2]. Theo Barrett và Rhodes (1976), cây bưởi là một trong 3 loài cây có múi có trong tự nhiên không do quá trình lai tự nhiên tạo ra [3] và hầu hết các nghiên cứu sau đồng ý với kết luận này [4-7]. Ngoài ra, cây bưởi còn là cây bố mẹ của nhiều loài cây có múi như: chanh, cam và bưởi chùm…

Diện tích trồng bưởi trên thế giới khoảng 328.689 ha, với sản lượng khoảng 8.453.000 tấn vào năm 2013. Trong đó, châu Á chiếm khoảng 58,7% tổng diện tích và 65,1% tổng sản lượng bưởi toàn thế giới. Các quốc gia sản xuất chính trong khu vực này là Trung Quốc, Bangladesh với diện tích lần lượt là 83.100 và 76.000 ha, tương đương với 3.802.100 tấn và 610.000 tấn về sản lượng (nguồn FAOSTAT).

*Tác giả liên hệ: Email: npthuy130583@gmail.com

Ở nước ta, diện tích trồng bưởi là 46.537 ha, với sản lượng khoảng 442.756 tấn năm 2014 (nguồn Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn). Sản xuất bưởi ở nước ta được phân bố từ Bắc tới Nam và giữ vị trí quan trọng trong nhóm cây trồng cho quả phục vụ xuất khẩu vì chất lượng quả ngon, vỏ dày, dễ dàng xử lý sau thu hoạch và vận chuyển. Bưởi ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long chiếm hơn 59,5% diện tích và 63,7% sản lượng bưởi của cả nước (nguồn: Tổng cục Thống kê năm 2013). Nguồn gen cây bưởi ở nước ta rất đa dạng, một số giống bưởi thương phẩm được ưa chuộng trên thị trường trong và ngoài nước như: bưởi Năm roi, bưởi Da xanh, bưởi Lông cổ cò, bưởi Đường lá cam, bưởi Đường da láng, bưởi Diễn, bưởi Phúc Trạch, bưởi Thanh Trà, bưởi Đoan Hùng... Tuy nhiên, các giống bưởi thương phẩm cung cấp trên thị trường thường có rất nhiều hạt, trong khi nhu cầu của người tiêu dùng đặt ra là ngoài phẩm chất ngon bưởi còn phải không hoặc ít hạt.

Từ những yêu cầu cấp thiết trên, Viện Cây ăn quả miền Nam đã và đang nghiên cứu tạo ra giống bưởi tam bội nhằm tạo giống bưởi có thể kế thừa các đặc tính tốt từ bố mẹ và có tính trạng mới là không hạt (các cá thể tam bội sẽ không có khả năng tạo hạt) bằng phương pháp nuôi cấy hạt nhỏ. Theo Esen và Soost (1971), phôi tam bội được tìm thấy trong những hạt có kích thước nhỏ hơn 1/3 tới 1/6 kích thước hạt thông thường [8] và nảy mầm sớm hơn hạt nhị bội ở cùng tuổi [9]. Cây tam bội ngoài đặc tính không hạt còn có thêm một số đặc tính mong muốn của nhà chọn tạo giống như: chống chịu sâu bệnh tốt hơn, năng suất cao hơn... [10].

5 giống bưởi: Da xanh, Tứ quý, Huyết, Đỏ ND và Lông cổ cò được chọn lọc cho nuôi cấy hạt nhỏ tạo cây tam bội. Đây là các giống thương phẩm có thịt quả hồng đỏ đến đỏ đậm, chất lượng từ khá ngon đến ngon, tuy nhiên, chúng có cùng nhược điểm là có từ nhiều đến rất nhiều hạt.

Để xác định cây có múi tam bội, có thể sử dụng một trong các phương pháp như: đếm số lượng NST trong tế bào; dùng máy flow cytometry xác định mức bội thể; hay sử dụng chỉ thị phân tử có tính chuyên biệt cao. Mỗi phương pháp có ưu và nhược điểm riêng. Phương pháp khảo sát NST có độ chính xác cao nhưng đòi hỏi người khảo sát phải có tay nghề cao, xác định thời điểm chính xác để cố định mẫu... Phương pháp xác định mức bội thể bằng máy flow cytometry yêu cầu phải có thiết bị, đây là loại thiết bị chuyên biệt cao, rất đắt tiền và hóa chất cũng chuyên biệt, phương pháp này nhanh nhưng thường khó thực hiện do đòi hỏi phải có thiết bị, hóa chất và con người chuyên biệt. Phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử yêu cầu có phòng thí nghiệm sinh học phân tử, hóa chất và con người chuyên biệt. Ngày nay, với sự tiến bộ của sinh học phân tử, phương pháp này khả thi hơn khi thực hiện tại các viện nghiên cứu, trường đại học..., bên cạnh đó, còn giúp xác định mức độ tương đồng di truyền giữa cá thể hạt nhỏ với cây giống thương phẩm của cùng một giống. Do vậy, khảo sát mức bội thể và đặc tính di truyền trên cây có múi bằng chỉ thị sinh học phân tử SSRs ra đời. Cuenca và cs (2011) đã thành công trong việc sử dụng chỉ thị phân tử SSRs để xác định các cây quýt 'Fortune' tam bội [11]. Trong bài viết này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát đặc tính di truyền và xác định cây bưởi tam bội của các cây được tạo ra từ nuôi cấy hạt nhỏ với cây thương phẩm của cùng một giống bằng chỉ thị phân tử SSRs.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Quả của các giống bưởi: Da xanh, Đỏ ND, Lông cổ cò, Huyết và Tứ quý được sử dụng làm nguồn vật liệu thu thập hạt nhỏ cho nuôi cấy. Cây sau khi nuôi cấy được trồng tại vườn tập đoàn của Viện Cây ăn quả miền Nam, các cá thể được trồng và được đánh mã số theo tên giống và số thứ tự phía sau (bảng 1).

Bảng 1: danh sách các cây bưởi được nuôi cấy từ hạt nhỏ/kém phát triển

STT	Tên giống	STT	Tên giống
1	Bưởi Da xanh (đối chứng)	28	Bưởi Lông cổ cò 5
2	Bưởi Da xanh 1	29	Bưởi Lông cổ cò 9
3	Bưởi Da xanh 2	30	Bưởi Lông cổ cò 12
4	Bưởi Da xanh 3	31	Bưởi Lông cổ cò 15
5	Bưởi Da xanh 16	32	Bưởi Lông cổ cò 18
6	Bưởi Da xanh 5	33	Bưởi Lông cổ cò 21
7	Bưởi Da xanh 17	34	Bưởi Lông cổ cò 25
8	Bưởi Da xanh 7	35	Bưởi Lông cổ cò 48
9	Bưởi Da xanh 10	36	Bưởi Huyết (đối chứng)
10	Bưởi Da xanh 20	37	Bưởi Huyết 14
11	Bưởi Da xanh 23	38	Bưởi Huyết 15
12	Bưởi Da xanh 24	39	Bưởi Huyết 20
13	Bưởi Đỏ ND (đối chứng)	40	Bưởi Huyết 26
14	Bưởi Đỏ ND 36	41	Bưởi Huyết 34
15	Bưởi Đỏ ND 28	42	Bưởi Huyết 38
16	Bưởi Đỏ ND 37	43	Bưởi Huyết 39
17	Bưởi Đỏ ND 31	44	Bưởi Huyết 51
18	Bưởi Đỏ ND 7	45	Bưởi Huyết 63
19	Bưởi Đỏ ND 41	46	Bưởi Huyết 73
20	Bưởi Đỏ ND 42	47	Bưởi Tứ quý (đối chứng)
21	Bưởi Đỏ ND 43	48	Bưởi Tứ quý 10
22	Bưởi Đỏ ND 44	49	Bưởi Tứ quý 15
23	Bưởi Đỏ ND 45	50	Bưởi Tứ quý 17
24	Bưởi Đỏ ND 46	51	Bưởi Tứ quý 25
25	Bưởi Lông cổ cò (đối chứng)	52	Bưởi Tứ quý 51
26	Bưởi Lông cổ cò 1	53	Bưởi Tứ quý 59
27	Bưởi Lông cổ cò 2		

23 cặp mồi SSRs được sử dụng cho phân tích đặc tính di truyền. Trình tự chuỗi nucleotides của các chỉ thị phân tử SSRs được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: các chỉ thị phân tử SSRs được sử dụng cho phân tích đặc tính di truyền

STT	Các đoạn mồi	Trình tự nucleotidic (5'-3')	Tài liệu tham khảo
1	TAA15	F: GAAAGGGTTACTTGACCAGGC R: CTTCCCAGCTGCACAAGC	[12]
2	TAA27	F: GGATGAAAAATGCTCAAAATG R: TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC	
3	TAA41	F: AGGTCTACATTGGCATTGTC R: ACATGCAGTGCTATAATGAATG	
4	mCrCIR02A09	F: ACAGAAGGTAGTATTTTAGGG R: TTGTTTGGATGGGAAG	[13]
5	mCrCIR03C08	F: CAGAGACAGCCAAGAGA R: GCTTCTTACATTCCTCAAA	
6	mCrCIR03G05	F: CCACACAGGCAGACA R: CCTTGGAGGAGCTTTAC	
7	CAT01	F: GCTTTCGATCCCTCCACATA R: GATCCCTACAATCCTTGGTCC	[12]
8	ATC09	F: TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG R: TGTGAGTGTTTGTGCGTGTG	
9	AG14	F: AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA R: CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC	
10	CAC15	F: TAA ATC TCC ACT CTG CAA AAG C R: GAT AGG AAG CGT CGT AGA CCG	
11	CAC33	F: GGT GAT GCT GCT ACT GAT GC R:CAA TTG TGA ATT TGT GAT TCC G	
12	CT19	F: CGC CAA GCT TAC CAC TCA CTA C F: GCC ACG ATT TGT AGG GGG ATA G	
13	CT21	F: CGA ACT CAT TAA AAG CCG AAA C R: CAA CAA CCA CCA CTC TCA CG	
14	TAA3	F: AGA GAA GAA ACA TTT GCG GAG C R: GAG ATG GGA CTT GGT TCA CAC G	[14]
15	TAA45	F: GCA CCT TTT ATA CCT GAC TCG G R: TTC AGC ATT TGA GTT GGT TAC G	
16	TAA52	F: GAT CTT GAC TGA ACT TAA AG R: ATG TAT TGT GTT GAT AAC G	
17	mCrCIR01C06a	F: GGA CCA CAA CAA AGA CAG R: TGG AGA CAC AAA GAA GAA	[13]
18	mCrCIR01F04a	F: AAG CAT TTA GGG AGG GTC ACT R: TGC TGC TGC TGT TGT TGT TCT	
19	mCrCIR01D06a	F: GAT CAA AAC ATT ATT CCA A R: TTT TTC ATC AAC AAG ACT G	
20	CMS-23	F: CTA TGT GAC AGC ACT GAT GG R: TTT CCT ATC TCT CTT GAG ACA T	[15]
21	CMS-26	F: TGA TGT CTT GAT CCA CAC TTC C R: ACT CAA AGC TCC GCT ACA GTG	
22	AMB5	F: CCC TGC ACA AAA ACT CAC AC R: TGG GGG TGT TGA ATG GTA AT	[16]
23	GT03	F: GCC TTC TTG ATT TAC CGG AC R: TGC TCC GAA CTT CAT CAT TG	[17]

Phương pháp

Thu mẫu: lá non của 53 cây bưởi gồm 48 cây từ hạt nhỏ và 5 cây đối chứng được thu vào lúc 8-9 giờ, các mẫu lá được nghiền thành bột mịn trong dung dịch nitơ lỏng, dùng cho tách chiết ADN.

Tách chiết ADN: sử dụng bộ kit DNeasy Plant Mini của QIAGEN. Các bước trong quá trình tách chiết ADN được thực hiện theo quy trình có sẵn trong bộ Kit.

Kiểm tra ADN sau khi tách chiết: ADN sau khi ly trích kiểm tra số lượng và chất lượng bằng máy nano drop và gel agarose 0,8%.

Phân tích tính đa hình dựa vào chỉ thị phân tử SSRs: kỹ thuật SSRs được thực hiện theo Golein và cs (2012) [18] có hiệu chỉnh cho phù hợp: khuếch đại những đoạn SSRs từ bộ gen ADN được thực hiện trong phản ứng PCR (25 µl) gồm: 1 x PCR buffer, 0,2 mM dNTP, 0,3 µM primer, 2 mM $MgCl_2$, 1 unit *Taq* DNA polymerase và 50 ng ADN mẫu. Chu kỳ khuếch đại gồm 4 bước: bước 1: tách sợi đôi ở 95°C trong 5 phút; bước 2: 95°C trong 45 giây, 57-58°C trong 30 giây, 72°C trong 90 giây (35 chu kỳ); bước 3: 72°C trong 7 phút; bước 4: 4°C.

Kiểm tra sản phẩm PCR: sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 3%. Các sản phẩm PCR khuếch đại sau khi điện di được ghi nhận bằng cách có sự hiện diện của đoạn ADN khuếch đại trên gel là 1 và không có sự hiện diện là 0.

Phân tích thống kê: phân tích, đánh giá đặc tính di truyền các giống/dòng bưởi dựa trên hệ số tương đồng Jaccard và phương pháp UPGMA bằng phần mềm NTSYSpc 2.1. Hàm lượng thông tin tính đa hình PIC (polymorphic information content) của mỗi cặp mồi SSRs xác định theo công thức:

$$PIC_i = 1 - \sum P_i^2$$

Trong đó: P_i là tần số xuất hiện của allen thứ i. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn) [12].

Kết quả và thảo luận

Phân tích tính đa hình các cây bưởi được nuôi cấy từ hạt nhỏ/kém phát triển

Tổng số 53 giống/dòng được phân tích tính đa hình ADN có 48 cây bưởi được nuôi cấy từ hạt nhỏ, hạt kém phát triển thuộc 5 giống bưởi Da xanh (11 cây), bưởi Tứ quý (6 cây), bưởi Huyết (10 cây), bưởi Đỏ ND (11 cây), bưởi Lông cổ cò (10 cây) và 5 cây đối chứng là 5 giống bưởi thương phẩm được thu quả cho trích hạt nhỏ.

Trong 23 chỉ thị phân tử SSRs được sử dụng trong phân tích có 18 chỉ thị cho sản phẩm khuếch đại đoạn AND (trong 18 chỉ thị có 2 chỉ thị TAA15 và GT03 có xuất hiện băng trên gel nhưng thể hiện trạng thái đơn hình - monomorphism và 16 chỉ thị còn lại thể hiện trạng thái đa hình - polymorphism, chiếm tỷ lệ 88,89%); 5 chỉ thị (TAA27, mCrCIR02A09, TAA52, mCrCIR01D06a và CMS-23) không xuất hiện allen.

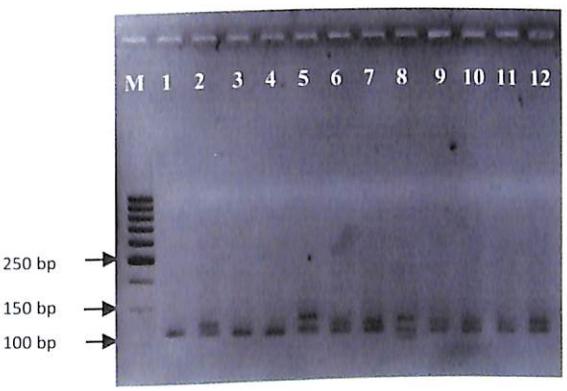
Tổng số 36 allen được ghi nhận từ 16 chỉ thị đa hình, trung bình có 2,25 allen trên một chỉ thị SSR. Chỉ thị có tính đa hình cao nhất là mCrCIR01C06a (4 allen). Tổng số 1.268 allen đã được khuếch đại từ 53 giống/dòng của 16 chỉ thị SSRs, với kích thước của allen khuếch đại trong khoảng từ 130 đến 240 bp. Giá

trị PIC dao động từ 0,35 (chỉ thị mCrCIR03C08) đến 0,74 (chỉ thị mCrCIR01C06a), với giá trị PIC trung bình là 0,44 (bảng 3), kết quả này chứng tỏ rằng các chỉ thị trong phân tính có tính đa hình khá cao.

Bảng 3: kết quả nhân đoạn ADN của các chỉ thị SSRs trên 48 dòng bưởi hạt nhỏ và 5 giống thương phẩm trên gel agarose

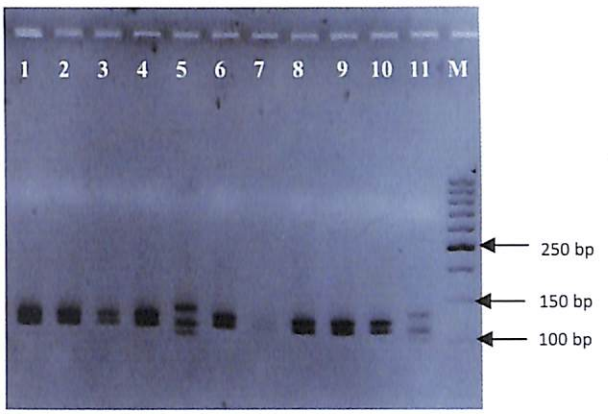
STT	Các chỉ thị SSRs	Số mẫu cho sản phẩm khuếch đại	Số đoạn ADN (allen)	Kích thước phân đoạn (bp)	Tỷ lệ allen đa hình (%)	PIC
1	TAA41	53	3	130-160	100,00	0,61
2	mCrCIR03C08	53	2	205-220	100,00	0,35
3	mCrCIR03G05	53	3	230-200	66,67	0,50
4	CTA01	53	2	160-175	100,00	0,42
5	ATC09	42	1	180	100,00	0,00
6	AG14	30	2	160-190	100,00	0,47
7	CAC15	53	2	160-180	50,00	0,49
8	CAC33	53	3	175-210	100,00	0,66
9	CT19	53	3	150	100,00	0,64
10	CT21	42	3	140-190	100,00	0,64
11	TAA3	53	2	150-160	100,00	0,38
12	TAA45	42	1	140	100,00	0,00
13	mCrCIR01C06a	53	4	160-200	100,00	0,74
14	mCrCIR01F04a	53	2	200-240	50,00	0,46
15	CMS26	53	1	175	100,00	0,00
16	AMB5	53	2	130-160	100,00	0,66
Hệ số PIC trung bình						0,44

Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy chỉ thị mCrCIR03G05 và mCrCIR01C06a đã phát hiện được cây bưởi Da xanh 10, bưởi Lông cổ cò 9 và 21 có 3 allen thể hiện trạng thái cây tam bội (hình 1 và 2) (do khuôn khổ bài báo có hạn nên chúng tôi chỉ giới thiệu về chỉ thị mCrCIR03G05). Tuy nhiên, chỉ thị này chưa phát hiện được dòng tam bội trên các cây hạt nhỏ của các giống bưởi Huyết, bưởi Tứ quý, bưởi Đỏ ND (hình 3-5).



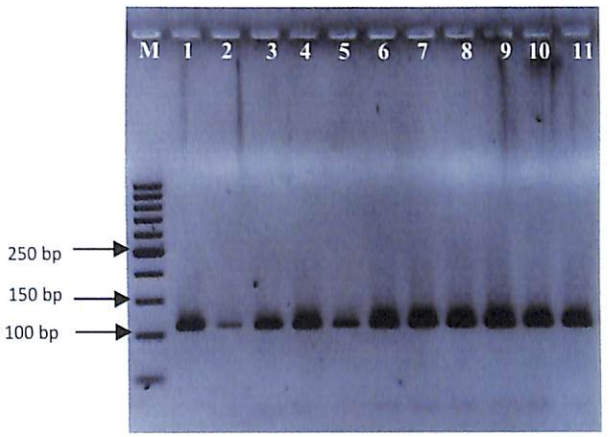
Hình 1: chỉ thị mCrCIR03G05 của các cây bưởi Da xanh hạt nhỏ được nhân đoạn thể hiện trên gel agarose 3%

M: thang ADN 50 bp; 1: bưởi Da xanh (đối chứng); 2: bưởi Da xanh 1; 3: bưởi Da xanh 2; 4: bưởi Da xanh 3; 5: bưởi Da xanh 16; 6: bưởi Da xanh 5; 7: bưởi Da xanh 17; 8: bưởi Da xanh 10; 9: bưởi Da xanh 7; 10: bưởi Da xanh 20; 11: bưởi Da xanh 23; 12: bưởi Da xanh 24



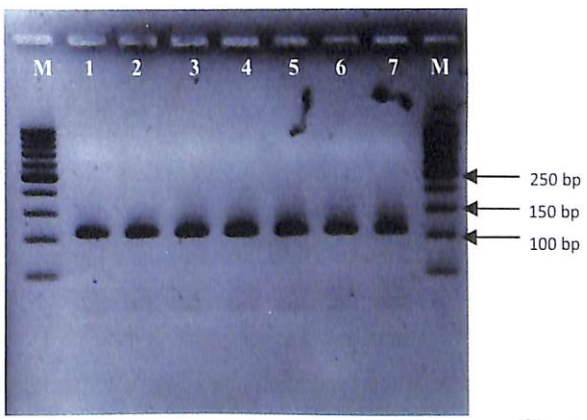
Hình 2: chỉ thị mCrCIR03G05 của các cây bưởi Lông cổ cò hạt nhỏ được nhân đoạn thể hiện trên gel agarose 3%

1: bưởi Lông cổ cò (đối chứng); 2: bưởi Lông cổ cò 1; 3: bưởi Lông cổ cò 2; 4: bưởi Lông cổ cò 5; 5: bưởi Lông cổ cò 9; 6: bưởi Lông cổ cò 12; 7: bưởi Lông cổ cò 15; 8: bưởi Lông cổ cò 18; 9: bưởi Lông cổ cò 25: 10: bưởi Lông cổ cò 48; 11: bưởi Lông cổ cò 21



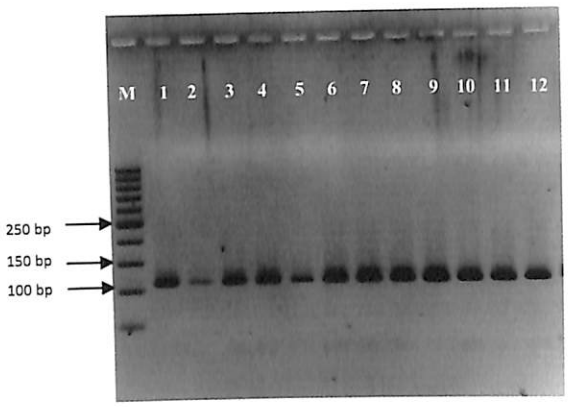
Hình 3: chỉ thị mCrCIR03G05 của các cây bưởi Huyết hạt nhỏ được nhân đoạn thể hiện trên gel agarose 3%

1: bưởi Huyết (đối chứng); 2: bưởi Huyết 14; 3: bưởi Huyết 15; 4: bưởi Huyết 20; 5: bưởi Huyết 26; 6: bưởi Huyết 34; 7: bưởi Huyết 38; 8: bưởi Huyết 39; 9: bưởi Huyết 51; 10: bưởi Huyết 63; 11: bưởi Huyết 73



Hình 4: chỉ thị mCrCIR03G05 của các cây bưởi Tứ quý hạt nhỏ được nhân đoạn thể hiện trên gel agarose 3%

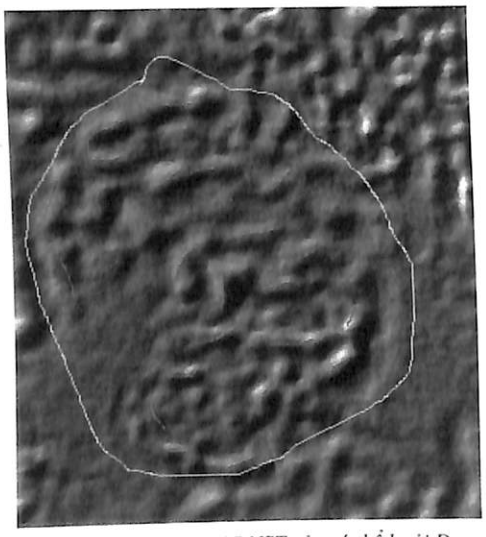
1: bưởi Tứ quý (đối chứng); 2: bưởi Tứ quý 10; 3: bưởi Tứ quý 15; 4: bưởi Tứ quý 17; 5: bưởi Tứ quý 25; 6: bưởi Tứ quý 51; 7: bưởi Tứ quý 59



Hình 5: chỉ thị mCrCIR03G05 của các cây bưởi Đỏ hạt nhỏ được nhân đoạn thể hiện trên gel agarose 3%

1: bưởi đỏ ND (đối chứng); 2: bưởi đỏ ND 36; 3: bưởi đỏ ND 28; 4: bưởi đỏ ND 37; 5: bưởi đỏ ND 31; 6: bưởi đỏ ND 7; 7: bưởi đỏ ND 41; 8: bưởi đỏ ND 42; 9: bưởi đỏ ND 43; 10: bưởi đỏ ND 44; 11: bưởi đỏ ND 45; 12: bưởi đỏ ND 46

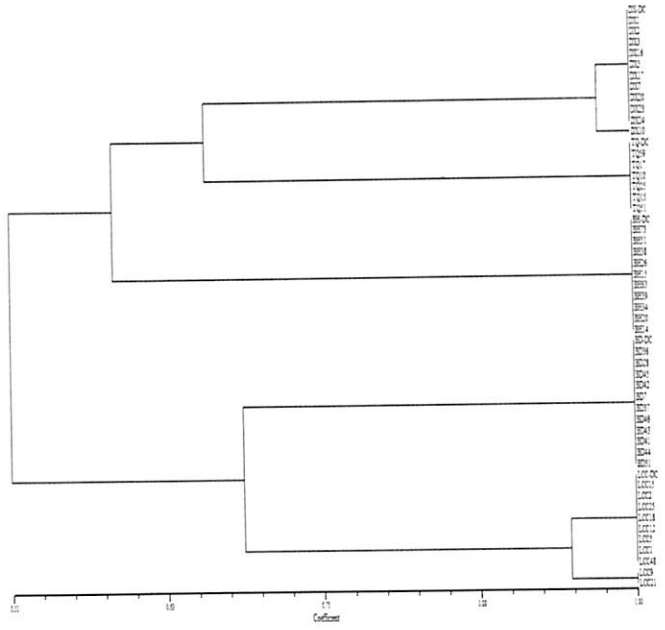
Kết quả đánh giá hình thái bưởi Da xanh 10 và bưởi Lông cổ cò 9 cho thấy: cây có rễ và chồi chậm hình thành hơn các cây khác. Khi chồi phát triển đường kính chồi to hơn các cây khác, lá dày, xanh đậm. Trong giai đoạn chăm sóc cây sau ra ngôi và trồng ra đồng, những cây này có lá nhỏ, dày nhưng thân cành mảnh mai, chậm phân cành, lóng thân dài hơn so với các cây khác. Kết quả khảo sát NST cho thấy, các cây này là cây tam bội có số lượng NST là 2n = 3x = 27 (hình 6).



Hình 6: tế bào có 2n = 3x = 27 NST của cá thể bưởi Da xanh 10 (cây từ nuôi cấy hạt nhỏ)

Mối quan hệ di truyền của 53 cây bưởi được nuôi cây từ hạt nhỏ/kém phát triển

Kết quả phân tích đa dạng di truyền theo phương pháp UPGMA dựa vào chỉ số tương đồng giản đơn SM (simple matching coefficient) thu được mối tương quan di truyền giữa 53 cây bưởi thể hiện qua biểu đồ hình cây (hình 7).



Hình 7: giản đồ đa dạng di truyền 53 cây bưởi thuộc 5 giống được nuôi cấy từ hạt nhỏ/kém phát triển theo hệ số di truyền giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA

Các dòng bưởi từ nuôi cấy hạt nhỏ thuộc cùng một giống có chung một nhóm và khoảng cách di truyền rất thấp (< 5%), mức độ tương đồng di truyền rất cao. Kết quả cũng cho thấy, giữa cây đối chứng (cây lấy quả thu hạt) và cây hạt nhỏ không có sự khác biệt về di truyền, điều này cho thấy rằng cây tam bội từ nuôi cấy hạt nhỏ có đặc tính di truyền tương tự như cây mẹ.

Phân tích giản đồ phân nhóm của 53 cây bưởi đã chứng tỏ có sự khác nhau về mặt di truyền giữa các giống. Nếu xét mức độ tương đồng di truyền ở mức 0,75 thì 53 cây bưởi phân tích được chia thành 5 nhóm thuộc 5 nhóm giống khác nhau là bưởi Da xanh, bưởi Tứ quý, bưởi Huyết, bưởi Đỏ ND và bưởi Lông cổ cò. Kết quả cho thấy rằng, các dòng bưởi từ hạt nhỏ của cùng một giống đều có mức độ tương đồng di truyền rất cao so với với cây mẹ.

Nhóm I: bao gồm 11 cây bưởi Lông cổ cò, gồm 10 cây bưởi Lông cổ cò hạt nhỏ và cây bưởi Lông cổ cò mẹ (đối chứng) có mức tương đồng rất cao (dao động từ 0,95 đến 1,00). Trong nhóm I, các dòng được chia thành 2 nhóm phụ: Nhóm phụ I1: là các dòng: bưởi Lông cổ cò (đối chứng), bưởi Lông cổ cò 1, 2, 5, 15, 18, 21, 25 và 48, có hệ số tương đồng di truyền là 1. Nhóm phụ I2: có mức độ tương đồng di truyền khoảng 0,95 gồm: bưởi Lông cổ cò 9 và 12. Hai dòng này đã thể hiện 3 allen trên agarose gel.

Nhóm II: gồm 12 cây bưởi Đỏ ND, trong đó có 11 cây từ nuôi cấy hạt nhỏ và cây bưởi Đỏ ND (đối chứng), tất cả các dòng phân tích đều có tính tương đồng di truyền rất cao ở 16 chỉ thị SSR trong phân tích.

Nhóm III: gồm 11 cây bưởi Huyết: 10 cây bưởi Huyết từ nuôi cấy hạt nhỏ là bưởi Huyết 14, 15, 20, 26, 34, 38, 39, 51, 63, 73 và bưởi Huyết (đối chứng). Tất cả đều có hệ số tương đồng di truyền rất cao là 1. Các cây hạt nhỏ giống nhau về mặt di truyền và giống với cây mẹ.

Nhóm IV: gồm các cây bưởi Tứ quý từ nuôi cấy hạt nhỏ, gồm: bưởi Tứ quý 10, 15, 17, 25, 51, 59 và bưởi Tứ quý (đối chứng) ghi nhận hệ số tương đồng di truyền là 0,83.

Nhóm V: gồm 12 cây bưởi bưởi Da xanh (11 cây từ nuôi cấy hạt nhỏ và cây bưởi Da xanh đối chứng). Chúng có mức độ tương đồng di truyền rất cao, từ 0,97 đến 1. Trong nhóm này có dòng bưởi Da xanh 10 có sự khác biệt về mặt di truyền so với các dòng bưởi Da xanh nuôi cấy hạt nhỏ khác và cây mẹ, tuy nhiên, sự khác biệt này rất thấp (< 5%), chứng tỏ là chúng cũng rất tương đồng về mặt di truyền với cây mẹ.

Các kết quả trên cho thấy, khi nuôi cấy hạt nhỏ, chúng gần như không có sự khác biệt di truyền giữa các hạt nhỏ trong cùng một giống và với giống lấy quả trích hạt nhỏ, điều này có thể cho thấy rằng cây từ hạt nhỏ có thể không trải qua quá trình thụ tinh.

Kết luận

Đặc tính di truyền của 48 giống/dòng bưởi được nuôi cấy từ hạt nhỏ, hạt kém phát triển của 5 giống bưởi thương phẩm với cây mẹ đã được xác định. Các cây bưởi phân tích được phân thành 5 nhóm chính thuộc 5 giống. Các dòng hạt nhỏ của cùng một giống có mức độ tương đồng di truyền rất lớn và giống với cây mẹ. Hạt nhỏ có khả năng mang các đặc tính của cây mẹ.

2 chỉ thị mCrCIR03G05 và mCrCIR01C06a đã giúp phát hiện được cây bưởi Da xanh 10, bưởi Lông cổ cò 9 và 21 là cây tam bội.

Có thể sử dụng 2 chỉ thị phân tử này kiểm tra lại các giống cây có múi tam bội.

Có thể sử dụng phương pháp nuôi cấy hạt nhỏ để phân lập cây tam bội từ các giống cây có múi thương phẩm chất lượng cao nhưng có nhiều hạt.

Tài liệu tham khảo

[1] M.J. Corazza-Nunes, M.A. Machado, W.M.C. Nunes, M. Cristofani, M.L.P.N. Targon (2002), "Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* Burm. Merr.) using RAPD and SSR markers", *Euphytica*, **126**, pp.169-176.

[2] L. Yong, L. De-Chun, W. Bo, S. Zhong-Hai (2006), "Genetic diversity of pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its relatives based on simple sequence repeat markers", *Chinese J. of Agr. Biotechnology*, **3**, pp.119-126.

[3] H.C. Barrett, A.M. Rhodes (1976), "A numerical taxonomic study of affinity relationshipsin cultivated Citrus and its close relatives", *Syst. Bot*, **1**, pp.105-136.

[4] C.T. Federici, D.Q. Fang, R.W. Scora, M.L. Roose (1998), "Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis", *Theor. Appl. Genet.*, **96**, pp.812-822.

[5] E. Nicolosi, Z.N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella, E. Tribulato (2000), "Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers", *Theor. Appl. Genet.*, **100**, pp.1155-1166.

[6] N.A. Barkley, M.L. Roose, R.R. Krueger, C.T. Federici (2006), "Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)", *Theor. Appl. Genet.*, **112**, pp.1519-1531.

[7] A. Uzun, T. Yesiloglu, Y. Aka-Kacar, O. Tuzcu, O. Gulsen (2009), "Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs)", *Scientia Horticulturae*, **121**, pp.306-312.

[8] A. Esen, R.K. Soost (1971), "Unexpected triploids in citrus: their origin, identification and possible use", *J. Hered*, **62**, pp.329-333.

[9] A. Esen, R.K. Soost (1973), "Precocious development and germination of spontaneous triploid seed in citrus", *J. Hered*, **64**, pp.147-154.

[10] P. Spiegel-Roy, A. Vardi (1992), "Shani, Orah and Winola: three new selections from our breeding program", *Proc. 7th Intl. Citrus Congr. of the Intl. Soc.* Citriculture, Acireale, Sicilia, Italy, pp.72-73.

[11] J. Cuenca, Y. Froelicher, P. Aleza, J. Jua'rez, L. Navarro, P. Ollitrault (2011), "Multilocus half-tetrad analysis and centromere mapping in citrus: evidence of SDR mechanism for 2n megagametophyte production and partial chiasma interference in mandarin cv 'Fortune'", *Heredity*, **107**, pp.462-470.

[12] M. Jannati, R. Fotouhi, A.P. Abad, Z. Salehi (2009), "Genetic diversity analysis of Iranian *Citrus* varieties using micro satellite (SSR) based markers", *Journal of Horticulture and Forestry*, **1(7)**, pp.120-125.

[13] H. Snoussi, Duval Marie-France, A. Garcia-Lor, Z. Belfalah, Y. Froelicher, A. Risterucci, X. Perrier, J.P. Jacquemoud-Collet, L. Navarro, M. Harrabi, P. Ollitrault (2012), "Assessment of the genetic diversity of the Tunisian citrus rootstock germplasm", *BMC Genetics*., pp.13-16, http://www.biomedcentral.com/1471-2156/13/16.

[14] B. Golein, A. Talaie, Z. Zamani, A. Ebadi, A. Behjatnia (2005), "Assessment of genetic variability in some Iranian sweet oranges (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) and mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) using SSR markers", *Int. J. Agri. Biol.*, **7(2)**, pp.167-170.

[15] R. Ahmad, D. Struss, M.S. Southwick (2003), "Development and characterization of microsatellite markers in *Citru*", *J Am Soc Hortic Sci*, **128(4)**, pp.584-590.

[16] B. Golein, A. Talaie, Z. Zamani, B. Moradi (2006), "Development and characterization of new microsatellite loci from lemon (*Citrus limon*)", *Int J Agr Biol*, **8**, tr.172-174.

[17] Khuất Hữu Trung, Hà Trọng Huy, Nguyễn Trường Khoa, Ngô Hồng Bình, Nguyễn Thanh Bình, Đặng Trọng Lương, Lê Huy Hàm (2009), "Nghiên cứu đa dạng di truyền một số giống bưởi bản địa Việt Nam (*Citrus grandis*) bằng chỉ thị Microsatellite", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **7(4)**, tr.485-492.

[18] B. Golein, M. Nazeryan, B. Babakhani (2012), "Assessing genetic variability in male sterile and low fertile citrus cultivars utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)", *African Journal of Biotechnology*, **11(7)**, pp.1632-1638.