

## ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR13251 VÀ SSR18956 TRONG NHẬN DIỆN GIỚI TÍNH HOA DƯA LEO

Nguyễn Thị Mỹ, Lương Hiếu Ngân, Hồ Thị Bích Phượng, Lê Thị Kính và Lê Thị Trúc Linh\*

Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Thị Trúc Linh (email: linh.ltt@ou.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 11/02/2020

Ngày nhận bài sửa: 20/04/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

### Title:

SSR13251 and SSR18956 markers application for sex determination in cucumber

### Từ khóa:

Chỉ thị phân tử, dòng toàn hoa cái, dưa leo, SSR13251, SSR18956

### Keywords:

*Cucumis sativus* L., gynoeocious line, molecular marker, SSR13251, SSR18956

### ABSTRACT

In the cucumber hybrid breeding process, the use of gynoeocious lines as a maternal line has many advantages such as decreasing the breed confusion caused by self-pollination, requiring less labor for removing male or covering female flowers, making use of insects for pollinating, and ensuring high yield. Molecular marker is a useful tool to early and accurately identify cucumber gynoeocious lines. This study investigated the correlation between the two molecular markers e.g. SSR13251 and SSR18956 with the sex of flowers of 50 pure cucumber samples (19 gynoeocious lines, 31 monoecious lines). PCR reactions were performed to amplify the target sequences. The results showed that SSR13251 marker did not distinguish the different cucumber lines. Meanwhile, the PCR product size of SSR18956 marker differed among cucumber lines that helped to exactly identify the gynoeocious lines. After screening 50 pure cucumber samples with SSR18956 marker, the compatibility between this marker and the sexual phenotype of cucumber flowers was 84%. Therefore, the SSR18956 marker could be a potential marker to identify the gynoeocious lines in cucumber.

### TÓM TẮT

Trong quá trình chọn tạo giống dưa leo, việc sử dụng các dòng toàn hoa cái làm dòng mẹ đóng vai trò quan trọng trong hạn chế lẫn giống do quá trình tự thụ gây ra, không cần tốn công lao động khử đực hoặc bao cách ly hoa cái, có thể tận dụng côn trùng để thụ phấn và đảm bảo năng suất cao. Để nhận diện sớm và chính xác các dòng dưa leo toàn hoa cái, marker phân tử chính là công cụ hỗ trợ hữu ích nhất. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát mối tương quan giữa hai chỉ thị phân tử SSR13251 và SSR18956 với giới tính hoa của 50 mẫu dưa leo thuần (19 dòng toàn hoa cái, 31 dòng có cả hoa đực và hoa cái). Thực hiện phản ứng PCR để khuếch đại vùng trình tự mục tiêu. Kết quả cho thấy marker SSR13251 không phân biệt được các dòng dưa leo. Trong khi đó, kích thước sản phẩm PCR của marker SSR18956 có sự khác nhau giữa các dòng dưa leo, giúp nhận diện đúng mục tiêu dòng dưa leo toàn hoa cái. Sau khi sàng lọc 50 mẫu thuần với marker SSR18956, ghi nhận tỷ lệ nhận diện chính xác của marker này so với kiểu hình giới tính hoa dưa leo là 84%. Như vậy, marker SSR18956 có thể là một marker tiềm năng giúp hỗ trợ nhận diện các dòng dưa leo toàn hoa cái.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Mỹ, Lương Hiếu Ngân, Hồ Thị Bích Phượng, Lê Thị Kính và Lê Thị Trúc Linh, 2020. Ứng dụng chỉ thị phân tử SSR13251 và SSR18956 trong nhận diện giới tính hoa dưa leo. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(3B): 69-76.

## 1 MỞ ĐẦU

Dưa leo (*Cucumis sativus* L.) là một loại rau quả có sự đa dạng kiểu hình về giới tính hoa. Tùy vào kiểu hình giới tính hoa và số lượng mỗi loại hoa trên cây mà dưa leo được chia thành nhiều dòng khác nhau, bao gồm: dòng toàn hoa cái (gynoecious line), dòng toàn hoa đực (androecious line), dòng toàn hoa lưỡng tính (hermaphrodite line), dòng có hoa đực nhiều hơn hoa cái (monoecious line), dòng có hoa đực và hoa lưỡng tính (andromonoecious line) và dòng có cả hoa đực, hoa cái, hoa lưỡng tính (trimonoecious line) (Naegele and Wehner, 2016). Trong đó, các nhà chọn giống thường chú ý đến dòng toàn hoa cái vì có thể sử dụng làm dòng mẹ trong sản xuất hạt giống và cho năng suất cao khi trồng.

Các phương pháp chọn giống truyền thống thường tốn nhiều thời gian và chi phí cao, do phải chờ cây trưởng thành mới có thể lựa chọn cá thể mong muốn dựa trên kiểu hình. Ngoài ra, yếu tố môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến sự biểu hiện ra kiểu hình của tính trạng. Do đó, công tác chọn tạo giống hiện đại chủ yếu dựa vào các chỉ thị phân tử của cây trồng. Phương pháp này có các ưu điểm: rút ngắn thời gian chọn giống và giảm chi phí (có thể kiểm tra kết quả chọn giống ở giai đoạn cây con), tính chính xác cao (chỉ thị phân tử không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường).

Sự biểu hiện giới tính hoa của dưa leo được điều hòa bởi 3 gene xác định giới tính (sex-determination genes): một gene *F* trội quy định giới tính cái (female) và 2 gene lặn khác (*M/m* và *A/a*) (Yamasaki *et al.*, 2001; Mibus and Tatlioglu, 2004; Boualem *et al.*, 2014). Trong đó, gene *F* có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát tính trạng toàn hoa cái (gynoecy) (Mibus and Tatlioglu, 2004; Knopf and Trebitsh, 2006; Win *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Vì vậy, rất nhiều nghiên cứu tập trung phát triển các chỉ thị phân tử gắn liền với locus *F*, phục vụ cho việc nhận diện dòng toàn hoa cái trong nhân giống dưa leo.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng nhận diện dòng dưa leo toàn hoa cái của hai chỉ thị phân tử SSR13251 và SSR18956. Đây là hai chỉ thị phân tử nằm gần locus *F*, với khoảng cách di truyền lần lượt là 1,2 cM và 6,8 cM (Miao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). Nghiên cứu được tiến hành trên 50 mẫu dưa leo thuần gồm các dòng toàn hoa cái (*FF*) và dòng có hoa đực nhiều hơn hoa cái (*ff*).

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Giống dưa leo

Năm mươi (50) dòng dưa leo thuần sử dụng trong nghiên cứu được nhận từ kho nguồn gene của

công ty TNHH Hạt giống Tân Lộc Phát, bao gồm: 19 dòng toàn hoa cái và 31 dòng có hoa đực nhiều hơn hoa cái.

### 2.2 Tách chiết DNA

DNA được tách chiết từ lá non dưa leo, sử dụng Plant DNAzol® Reagent (Invitrogen, 10503027) theo quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ DNA sau khi tách chiết được xác định bằng máy quang phổ. Độ tinh sạch của DNA được xác định thông qua tỷ lệ A260/A280. Độ đứt gãy của DNA sau tách chiết được kiểm tra bằng điện di DNA bộ gene trên gel agarose (Invitrogen, 16520050) 1%. DNA sau đó được pha loãng về 25 ng/μL và bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.3 PCR

Phản ứng PCR sử dụng chỉ thị phân tử SSR13251 (trình tự mỗi xuôi: GGTCAATCCAAAAGAGAAAGCA, trình tự mỗi ngược: ATCAACA CCATTGACGACCA) và SSR18956 (trình tự mỗi xuôi: CGTATGTACGACAAAATGTGAACAG, trình tự mỗi ngược: TCGAAACCTCAATACTTCTACCAA) để khuếch đại đoạn trình tự có kích thước khoảng 300 bp trong bộ gene của dưa leo. Tổng thể tích phản ứng PCR là 20 μL, với thành phần như sau: 25 ng DNA; 2 unit DNA Taq polymerase (Invitrogen, F122S); 0,5 μM mỗi xuôi (PDH-BIO); 0,5 μM mỗi ngược (PDH-BIO); 200 μM dNTP (Bioline, BIO-39044); Buffer. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 1 chu kỳ 98°C/30 s; 30 chu kỳ gồm: 98°C/5 s, Tm tối ưu/5 s, 72°C/7 s; và 1 chu kỳ 72°C/30 s.

### 2.4 Điện di

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% (Invitrogen, 16520050) trong dung dịch TBE (Sigma, T4415) 1X, điện trường 90V và thời gian 90 phút. Sản phẩm được đọc bằng máy Gel Doc (Biorad).

### 2.5 Mối tương quan giữa các chỉ thị phân tử khảo sát với kiểu hình hoa dưa leo

Kiểu gene sau khi xác định bằng PCR sẽ được so sánh với kiểu hình thực tế ghi nhận được, để từ đó xác định mối tương quan giữa marker SSR13251 và SSR18956 với kiểu hình hoa dưa leo.

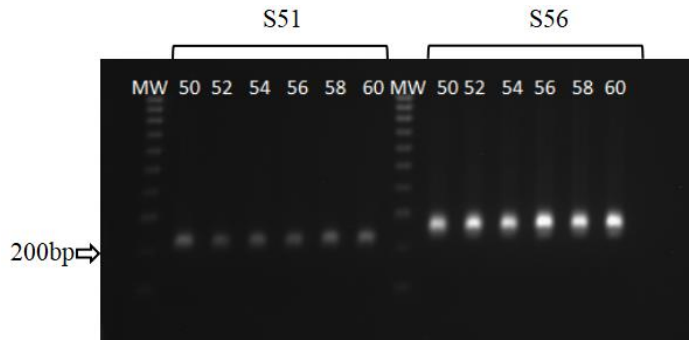
Hoa cái dưa leo mọc thành đôi hoặc từng hoa riêng biệt, có bầu noãn phát triển sớm. Hoa đực mọc thành cụm từ 5-7 hoa. Tất cả 50 dòng dưa leo thuần sử dụng trong nghiên cứu được trồng và chăm sóc trong nhà lưới để đảm bảo các điều kiện môi trường giống nhau giữa các mẫu. Tổng số lượng hoa đực và hoa cái được đếm và ghi nhận sau 15 ngày kể từ ngày cây ra hoa đầu tiên.

### 3 KẾT QUẢ

#### 3.1 Tối ưu hóa điều kiện phản ứng PCR

Tiến hành khảo sát nhiệt độ bắt cặp tối ưu của hai cặp mồi SSR13251 và SSR18956. Thực hiện phản ứng PCR với các thành phần phản ứng và số chu kỳ cố định, chỉ thay đổi nhiệt độ bắt cặp từ 50°C - 60°C.

Kết quả điện di cho thấy ở tất cả các nhiệt độ khảo sát từ 50°C - 60°C đều thu được một vạch sản phẩm PCR duy nhất và rõ nét (Hình 1). Trong đó, nhiệt độ bắt cặp ở 60°C cho băng sáng hơn so với các nhiệt độ còn lại. Như vậy, nhiệt độ lai tối ưu cho cả hai cặp mồi SSR13251 và SSR18956 là 60°C.

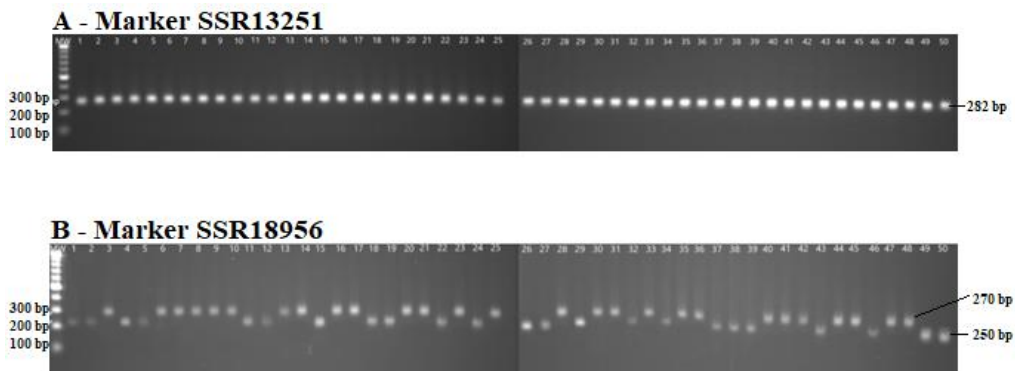


Hình 1: Phản ứng PCR với hai cặp mồi SSR13251 (S51) và SSR18956 (S56) ở các nhiệt độ lai khác nhau

#### 3.2 Thực hiện phản ứng PCR với 50 mẫu dưa leo thuần

Tính liên kết chặt với gene hoặc tính trạng mục tiêu (để đảm bảo nhận diện chính xác gene mục tiêu) là tiêu chí để lựa chọn chỉ thị phân tử sử dụng trong hỗ trợ chọn giống. Vì vậy, thí nghiệm này tiến hành

khảo sát mối tương quan giữa chỉ thị SSR13251 và SSR18956 với các dòng dưa leo thuần đã biết rõ kiểu hình về giới tính hoa bao gồm: 19 dòng dưa leo toàn hoa cái (*FF*) và 31 dòng dưa leo có hoa đực nhiều hơn hoa cái (*ff*). Các điều kiện của phản ứng PCR được thực hiện theo phản ứng tối ưu hóa ở thí nghiệm 2.1.



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR của 50 mẫu dòng thuần dưa leo

(A) Marker SSR13251 chỉ cho duy nhất sản phẩm PCR kích thước 282 bp. (B) Marker SSR18956 cho sản phẩm PCR kích thước 270 bp đối với dòng toàn hoa cái (kiểu gene *FF*) và kích thước 250 bp đối với dòng có hoa đực nhiều hơn hoa cái (kiểu gene *ff*).

Kết quả, chỉ thị SSR13251 chỉ cho 1 băng kích thước sản phẩm PCR khoảng 300 bp (cụ thể là 282 bp) giống nhau ở cả dòng dưa leo toàn hoa cái và dòng có hoa đực nhiều hơn hoa cái (Hình 2A). Trong khi đó, chỉ thị SSR18956 sẽ cho sản phẩm PCR với kích thước 270 bp ở các dòng dưa leo toàn hoa cái (kiểu gene *FF*) và kích thước 250 bp ở các dòng dưa leo có hoa đực nhiều hơn hoa cái (kiểu

gene *ff*) (Hình 2B). Kiểu gene của 50 mẫu dưa leo thuần xác định bằng chỉ thị SSR18956 được tổng hợp trong Bảng 1.

Như vậy, chỉ có chỉ thị SSR18956 có khả năng nhận diện các dòng dưa leo khác nhau nên sẽ được so sánh với kiểu hình thực tế để xác định mối tương quan.

**Bảng 1: Kiểu gene của 50 mẫu dưa leo thuần xác định bằng chỉ thị SSR18956**

STT	Kích thước sản phẩm PCR	Kiểu gene	Kiểu hình dự đoán dựa trên kiểu gene
1	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
2	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
3	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
4	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
5	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
6	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
7	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
8	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
9	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
10	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
11	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
12	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
13	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
14	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
15	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
16	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
17	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
18	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
19	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
20	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
21	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
22	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
23	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
24	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
25	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
26	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
27	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
28	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
29	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
30	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
31	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
32	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
33	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
34	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
35	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
36	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
37	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
38	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
39	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
40	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
41	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
42	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
43	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
44	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
45	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
46	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
47	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
48	270 bp	FF	Dòng toàn hoa cái
49	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái
50	250 bp	ff	Dòng hoa đục nhiều hơn hoa cái

### 3.3 Môi trường quan giữa chỉ thị SSR18956 và giới tính dựa leo của bộ mẫu

Kiểu hình của 50 dòng dựa leo thuần sử dụng

trong nghiên cứu được xác định theo mô tả ở mục 2.5. Kết quả kiểu gene và kiểu hình của từng dòng được tổng hợp trong Bảng 2.

**Bảng 2: Kiểu hình giới tính hoa và kiểu gene tương ứng xác định bằng chỉ thị SSR18956 của 50 mẫu dựa leo thuần**

STT	Kiểu hình ghi nhận thực tế	Kiểu gene xác định bằng PCR	Đánh giá
1	12 hoa đực, 1 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
2	24 hoa đực, 6 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
3	22 hoa đực, 3 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	-
4	19 hoa đực, 3 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
5	16 hoa đực, 5 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
6	0 hoa đực, 4 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
7	0 hoa đực, 5 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
8	0 hoa đực, 2 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
9	0 hoa đực, 1 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
10	0 hoa đực, 1 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
11	9 hoa đực, 3 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
12	29 hoa đực, 1 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
13	6 hoa đực, 1 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	-
14	7 hoa đực, 2 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	-
15	11 hoa đực, 6 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
16	0 hoa đực, 2 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
17	0 hoa đực, 4 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
18	15 hoa đực, 2 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
19	18 hoa đực, 5 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
20	0 hoa đực, 3 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
21	19 hoa đực, 2 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	-
22	24 hoa đực, 5 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
23	0 hoa đực, 4 hoa cái (dòng toàn hoa cái)	<i>FF</i> (dòng toàn hoa cái)	+
24	11 hoa đực, 4 hoa cái (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	<i>ff</i> (dòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+

25	0 hoa đực, 2 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
26	10 hoa đực, 4 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
27	7 hoa đực, 3 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
28	21 hoa đực, 1 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	-
29	21 hoa đực, 0 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
30	0 hoa đực, 2 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
31	0 hoa đực, 5 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
32	12 hoa đực, 2 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
33	0 hoa đực, 2 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
34	17 hoa đực, 2 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
35	0 hoa đực, 2 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
36	0 hoa đực, 8 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
37	13 hoa đực, 3 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
38	4 hoa đực, 3 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
39	10 hoa đực, 6 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
40	0 hoa đực, 3 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
41	13 hoa đực, 1 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	-
42	0 hoa đực, 5 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
43	28 hoa đực, 4 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
44	22 hoa đực, 1 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	-
45	4 hoa đực, 3 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	-
46	29 hoa đực, 6 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
47	0 hoa đực, 5 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
48	0 hoa đực, 3 hoa cái (đòng toàn hoa cái)	FF (đòng toàn hoa cái)	+
49	32 hoa đực, 1 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+
50	13 hoa đực, 4 hoa cái (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	ff (đòng hoa đực nhiều hơn hoa cái)	+

Đánh giá độ tương thích giữa kiểu gene và kiểu hình: dấu cộng (+) dùng để chỉ các mẫu có kiểu gene và kiểu hình tương thích với nhau hay kết quả phản ứng PCR nhận diện đúng kiểu hình; ngược lại, dấu trừ (-) dùng để chỉ các mẫu có kiểu gene và kiểu hình không tương thích với nhau hay kết quả phản ứng PCR nhận diện sai kiểu hình.



Bảng 2 cho thấy chi thị SSR18956 nhận diện được khá chính xác giới tính hoa của các dòng dưa leo trong bộ mẫu. Tỷ lệ nhận diện đúng của chi thị này là 84% (42/50 mẫu), nhận diện sai 16% (8/50 mẫu).

#### 4 THẢO LUẬN

Phương pháp chọn lọc truyền thống các dòng dưa leo toàn hoa cái phải dựa trên quan sát giới tính của cây ở ngoài đồng. Phương pháp này hạn chế về độ chính xác cũng như khả năng nhận diện sớm. Mặc khác, giới tính hoa dưa leo bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường nên chọn lọc dựa trên kiểu hình có thể không chính xác khi điều kiện môi trường ngoài đồng ruộng thay đổi (Galun, 1961; Tanurdzic and Banks, 2004). Trong khi đó, phương pháp chọn lọc phân tử có thể giúp rút ngắn thời gian, tăng hiệu quả và độ chính xác của quy trình tuyển chọn dòng mục tiêu so với phương pháp truyền thống.

Chi thị phân tử SSR13251 và SSR18956 được phát triển dựa trên sự khác biệt về trình tự gene trên nhiễm sắc thể số 6 của dòng dưa leo toàn hoa cái và dòng dưa leo có hoa đực nhiều hơn hoa cái (Miao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). Hai chi thị SSR13251 và SSR18956 được chứng minh liên kết chặt với gene *F* với khoảng cách di truyền lần lượt là 1,2 cM (Miao *et al.*, 2011) và 6,8 cM (Zhou *et al.*, 2013). Do vậy, khả năng hai chi thị này phân ly cùng với gene *F* trong quá trình hình thành giao tử rất cao.

Nghiên cứu này sử dụng hai chi thị SSR13251 và SSR18956 để đánh giá mối tương quan giữa kiểu gene thu được bằng PCR với kiểu hình thực tế của 50 mẫu dưa leo dòng thuần. Kết quả cho thấy sự tương quan giữa kiểu gene và kiểu hình là 84% đối với chi thị SSR18956. Chi thị này cho 2 loại sản phẩm PCR là 270 bp đối với dòng dưa leo toàn hoa cái và 250 bp đối với dòng dưa leo có cả hoa đực và hoa cái. Trong khi đó, chi thị SSR13251 không phân biệt được các dòng dưa leo do kích thước sản phẩm PCR giống nhau ở cả hai dòng dưa leo.

Chi thị SSR18956 cho kết quả nhận diện đúng trên tổng 50 mẫu dưa leo thuần là 84%. Trong đó, chi thị nhận diện chính xác 100% số cây khi PCR ra kiểu gene *ff* (cho sản phẩm 250 bp) sẽ có kiểu hình thực tế đúng là hoa đực nhiều hơn hoa cái (23/23 mẫu) (Bảng 2). Và 27 mẫu còn lại cho kết quả kiểu gene là *FF* thì có 19 mẫu có kiểu hình đúng là toàn hoa cái (70%) (Bảng 2). Vì thời gian lấy mẫu làm PCR có thể bắt đầu từ rất sớm, khi cây còn trong vườn ươm và chưa đem trồng trên ruộng. Khi đó, các cây được nhận diện kiểu gene là *ff* bằng chi thị

SSR18956 có thể được nhổ bỏ mà không sợ bị nhầm, chỉ cần trồng các cây còn lại, giúp tiết kiệm không gian nhà lưới và giảm công chăm sóc.

Cơ chế phân tử chính xác của việc chi thị SSR18956 không phân biệt được một số dòng dưa leo chưa được làm rõ. Lý do có thể giải thích là do ảnh hưởng của điều kiện môi trường. Việc đánh giá kiểu hình của các dòng dưa leo được thực hiện trong nhà lưới với các điều kiện về dinh dưỡng, đất, nước được quản lý nghiêm ngặt để thống nhất giữa các dòng dưa leo trong một lô thí nghiệm cũng như giữa các lần thí nghiệm khác nhau. Tuy nhiên, thời gian ngày đêm và điều kiện khác biệt về nhiệt độ có thể dẫn tới kiểu hình thay đổi ở một số dòng dưa leo. Từ đó dẫn tới việc đánh giá sai khác giữa kiểu gene và kiểu hình. Tuy nhiên, đây có thể không phải là nguyên nhân mà là một tác nhân di truyền khác còn chưa được phát hiện. Vì vậy, cần thực hiện thêm các khảo sát trên số mẫu lớn hơn và thực hiện trên quần thể phân ly F2 để có kết quả chính xác nhất về khả năng nhận diện của chi thị này.

#### 5 KẾT LUẬN

Chi thị SSR18956 là một chi thị phân tử tiềm năng để nhận diện các dòng dưa leo toàn hoa cái trong bộ giống hiện có. Chi thị này đang được tiếp tục đánh giá với gene *F* ở các thế hệ phân ly F2 và F3.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Boualem, A., Fleurier, S., Troadec, C., *et al.*, 2014. Development of a *Cucumis sativus* TILLinG platform for forward and reverse genetics. PLoS One. 9(5): e97963.
- Galun, E., 1961. Study of the inheritance of sex expression in the cucumber. The interaction of major genes with modifying genetic and non-genetic factors. Genetica. 32(1):134-163.
- Knopf, R.R. and Trebitsh, T., 2006. The female-specific Cs-ACS1G gene of cucumber. A case of gene duplication and recombination between the non-sex-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene and a branched-chain amino acid transaminase gene. Plant and Cell Physiology. 47(9): 1217-1228.
- Miao, H., Zhang, S., Wang, X., *et al.*, 2011. A linkage map of cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L.) with 248 microsatellite marker loci and seven genes for horticulturally important traits. Euphytica. 182(2): 167-176.
- Mibus, H., and Tatlioglu, T., 2004. Molecular characterization and isolation of the F/f gene for femaleness in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Theoretical and Applied Genetics. 109(8): 1669-1676.

- Naegele, R.P. and Wehner, T.C., 2016. Genetic resources of cucumber. *In*: Grumet, R., Katzir, N. and Garcia-Mas, J. (Eds.). Genetics and Genomics of Cucurbitaceae. Springer International Publishing. NewYork, pp. 61-86.
- Tanurdzic, M. and Banks, J.A., 2004. Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell*. 16(Suppl): S61–S71.
- Win, K.T., Zhang, C., Song, K., Lee, J.H. and Lee, S., 2015. Development and characterization of a co-dominant molecular marker via sequence analysis of a genomic region containing the Female (F) locus in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Molecular Breeding*. 35(12): 229.
- Yamasaki, S., Fujii, N., Matsuura, S., Mizusawa, H. and Takahashi, H., 2001. The M locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants. *Plant and Cell Physiology*. 42(6): 608-619.
- Zhang, Z., Mao, L., Chen, H., *et al.*, 2015. Genome-wide mapping of structural variations reveals a copy number variant that determines reproductive morphology in cucumber. *The Plant Cell*. 27(6): 1595-1604.
- Zhou, S., Zhang, P., Zhu, Y., Chen, X. and Chen, L., 2013. Identification of SSR marker linked to gynoecious loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*. 39(3): 291-298.