

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC MẪU GIỐNG SEN (*Nelumbo* spp.) BẰNG CHỈ THỊ RAPD VÀ ISSR

Đặng Văn Đông¹, Bùi Thị Hồng¹, Nguyễn Thị Hồng Nhung¹,
Bùi Thị Hồng Nhụy¹, Chu Thị Ngọc Mỹ¹, Nguyễn Thị Hoa Mỹ²,
Nguyễn Thanh Thảo², Ngô Thị Hồng Tươi³, Đinh Trường Sơn^{2,4,*}

TÓM TẮT

Cây sen (*Nelumbo* spp.) thuộc họ Nelumbonaceae là cây có vai trò quan trọng trong văn hóa, dinh dưỡng và y học của người Việt Nam. Nghiên cứu này sử dụng 13 chỉ thị RAPD và 10 chỉ thị ISSR để nghiên cứu đa dạng di truyền của 80 mẫu giống sen được thu thập từ một số địa phương trong và ngoài nước. Các mẫu đã phát hiện được 224 locus (124 locus với chỉ thị RAPD và 100 locus với chỉ thị ISSR) và nhân bản được 10.819 sản phẩm PCR. Hệ số tương đồng di truyền của các mẫu giống sen dao động từ 0,51 - 0,93. Ở hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,74, 80 mẫu giống sen được tách thành 7 nhóm chính, trong đó, có 2 nhóm chỉ có 1 mẫu giống (FL031 và FL042). Điều này cho thấy, mức độ đa dạng di truyền của các mẫu giống sen nghiên cứu là rất cao. Các mẫu giống sen này có thể là nguồn gen quan trọng cho bảo tồn và phát triển nguồn gen sen.

Từ khoá: Cây sen, chỉ thị ISSR, RAPD, đa dạng di truyền.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sen (*Nelumbo* spp.) được sử dụng vào nhiều mục đích như làm cảnh, dược liệu và có giá trị văn hóa, tôn giáo. Các bộ phận của cây sen như lá, hoa, hạt và củ được sử dụng để chế biến món ăn như gỏi ngó sen, mứt sen, trà sen... [1]. Do có nhiều công dụng trong nhiều khía cạnh của cuộc sống, cây sen ngày càng trở thành một loại cây cảnh phổ biến.

Nghề trồng sen cảnh hoặc sen lấy hạt có thể đem lại hiệu quả kinh tế cao. Thị trường trong nước và quốc tế đánh giá cây sen và các sản phẩm từ cây sen là có tiềm năng [2], [3]. Mặc dù vậy, năng suất, chất lượng của các giống sen hiện có

chưa đáp ứng được nhu cầu của người tiêu dùng cũng như người trồng sen dẫn tới diện tích trồng sen ở Việt Nam còn ít [3]. Chính vì vậy, cần thiết phải tiến hành chọn tạo các giống sen mới đáp ứng được thị hiếu người tiêu dùng trong và ngoài nước.

Để phục vụ cho công tác chọn tạo giống sen mới thì việc đánh giá nguồn gen, trong đó có đánh giá đa dạng di truyền, phục vụ lựa chọn được các cặp bố mẹ là vô cùng quan trọng [4]. Đánh giá đa dạng di truyền có thể sử dụng nhiều loại chỉ thị phân tử khác nhau, trong đó, các chỉ thị dựa trên nguyên lý PCR như RAPD và ISSR được sử dụng khá phổ biến [5], [6], [7] và là công cụ hữu hiệu giúp công tác chọn tạo giống lựa chọn vật liệu bố mẹ [8]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của 80 mẫu giống sen thu thập từ các địa phương trong và ngoài nước bằng chỉ thị RAPD và ISSR. Kết quả phân tích có thể được sử dụng trong công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cũng như chọn tạo giống sen mới.

¹ Viện Nghiên cứu Rau quả

² Khoa Công nghệ sinh học,
Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³ Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁴ Viện Sinh học Nông nghiệp,
Học viện Nông nghiệp Việt Nam

* Email: dtson@vnua.edu.vn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- *Đối tượng nghiên cứu*: Tập đoàn 80 mẫu giống sen (*Nelumbo spp.*) được thể hiện ở bảng 1.

- *Vật liệu nghiên cứu*: ADN được tách từ mô lá của 80 mẫu giống sen.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

ADN của các mẫu giống sen được tách từ lá theo quy trình của Masoomi-Aladizgeh và cs (2019) [9]. Sự nguyên vẹn, nồng độ và độ tinh sạch của ADN tổng số sau tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên agarose 1,0% và trên máy quang phổ (Eppendorf BioPhotometer Plus).

Các môi UBC_ISSR được thiết kế bởi University of British Columbia, Canada, trình tự các môi RAPD được thiết kế bởi Operon Tech. Inc. Alameda, CA, USA. Thông tin cụ thể về trình tự môi, nhiệt độ gắn môi được thể hiện ở bảng 2 và 3.

Sử dụng bộ kit MyTaq™ mix 2X (Bioline, UK), 0,5 μM mỗi và 40 ng ADN tổng số cho mỗi phản ứng PCR tiêu chuẩn. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) theo chu trình sau: 94°C - 5 phút, (94°C - 30 giây, Tm - 30 giây, 72°C - 2 phút) x 35 chu kỳ, 72°C - 10 phút.

Khi thiết lập ma trận nhị phân, các băng vạch sản phẩm ADN trên bản gel điện di sáng rõ được

ghi điểm 1, vị trí không có băng vạch ghi điểm 0. Hệ số tương đồng di truyền được xác định theo Sokal và Michener (1958) [10] và được tiến hành trên phần mềm NTSYS 2.1.

Hệ số PIC được xác định theo công thức $PIC = 1 - \sum (P_{ij})^2$.

Trong đó: P_{ij} là tần số xuất hiện của băng i phát hiện bởi môi j [11].

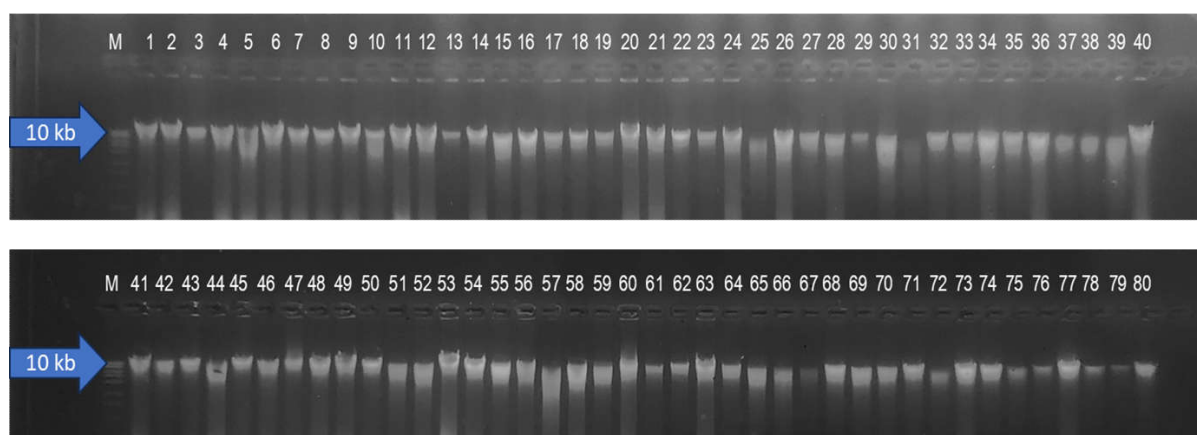
Chỉ số sai khác của mỗi cặp môi R_p (resolving power), $R_p = \sum I_b$.

Trong đó: I_b là giá trị đại diện cho thông tin của đoạn. $I_b = 1 - (2 \times |0,5 - p|)$, trong đó p là tỷ lệ các mẫu xuất hiện băng vạch [12].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra mức độ tinh sạch và sự nguyên vẹn cũng như định lượng bằng kỹ thuật điện di (Hình 1) và đo quang phổ (Bảng 1). Kết quả điện di cho thấy 80 mẫu ADN tổng số thu được có băng vạch rõ ràng, kích thước lớn, độ tinh sạch cao, nồng độ lớn. Kết quả trên cho thấy, mặc dù ADN có bị đứt gãy nhưng vẫn đáp ứng tốt mục đích sử dụng làm ADN khuôn cho quá trình phân tích đa dạng bằng chỉ thị phân tử RAPD và ISSR. ADN sau đó được pha loãng tới nồng độ 20 ng/μl để thực hiện các phản ứng PCR.



Hình 1. Kết quả kiểm tra ADN tổng số của 80 mẫu giống sen trên gel agarose 1%.

M: thang chuẩn ADN 1 kb, từ 1 - 80: ADN tổng số của 80 mẫu giống sen

Bảng 1. Tên, nguồn gốc và kết quả tách chiết ADN tổng số của 80 mẫu giống sen

TT	Giống	Kí hiệu	Nguồn gốc	Nồng độ ADN (ng/μl)	OD 260/280
1	Red Philip	FL001	Trung Quốc	970	1,90
2	Bát Trân Hồng	FL002	Trung Quốc	793	1,94
3	Shitong Shuai	FL003	Trung Quốc	447	1,76
4	Golden Monkey	FL004	Trung Quốc	1.070	1,79
5	Drop Blood	FL005	Trung Quốc	987	1,84
6	Quan Âm Trắng	FL006	Thái Lan	969	1,74
7	Phượng Hoàng Lửa	FL007	Trung Quốc	934	1,95
8	White Moon	FL008	Thái Lan	701	1,87
9	Red Rosy	FL009	Trung Quốc	1.044	1,84
10	Bloom And Healthy	FL010	Trung Quốc	593	1,85
11	Juwaba	FL011	Trung Quốc	918	1,93
12	Pink Rose	FL012	Trung Quốc	1.200	1,72
13	Tứ Quý	FL013	Việt Nam	323	1,78
14	Táo Trắng	FL014	Trung Quốc	1.208	1,77
15	Gold And Jade Peony	FL015	Trung Quốc	689	1,90
16	Kinzui	FL016	Nhật Bản	848	1,91
17	Cà Rốt Vũ Đẳng	FL017	Trung Quốc	515	1,78
18	Grand Master	FL018	Trung Quốc	573	1,85
19	Jinse	FL019	Trung Quốc	455	1,87
20	S1000	FL020	Trung Quốc	1.053	1,77
21	Quan Âm Hồng	FL021	Thái Lan	1.209	1,70
22	Cung Đình Viên Hồng	FL022	Việt Nam	655	1,86
23	Oga	FL023	Nhật Bản	323	1,66
24	New Lanceolate	FL024	Trung Quốc	1.110	1,81
25	Charming Lip	FL025	Trung Quốc	242	2,10
26	Zhongsan Hongtai	FL026	Trung Quốc	972	1,77
27	Cam Nhật	FL027	Trung Quốc	291	1,72
28	Red Flag	FL028	Trung Quốc	769	1,80
29	Đỏ Bắc Kinh	FL029	Trung Quốc	156	2,06

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

30	Thúy Túy Hồng An	FL030	Trung Quốc	556	1,85
31	Trương Tinh Yến	FL031	Trung Quốc	444	1,63
32	Midnight	FL032	Thái Lan	542	1,91
33	Red Roeny	FL033	Trung Quốc	615	1,86
34	Makota	FL034	Thái Lan	677	1,78
35	Pror Pink	FL035	Trung Quốc	532	1,78
36	Super	FL036	Trung Quốc	1.175	1,70
37	Zhongsan Sing	FL037	Trung Quốc	171	2,08
38	Super 14B	FL038	Trung Quốc	359	2,08
39	White Poeny	FL039	Trung Quốc	583	1,79
40	Green Cloud	FL040	Trung Quốc	1.052	1,74
41	Phật Âm	FL041	Trung Quốc	1.164	1,70
42	Pink Diamond	FL042	Thái Lan	715	1,67
43	Golden Apple	FL043	Trung Quốc	643	1,73
44	Bỉ Ngạn	FL044	Trung Quốc	1.083	1,63
45	New Brocade	FL045	Trung Quốc	590	1,81
46	Táo Hồng	FL046	Trung Quốc	808	1,94
47	Ngọc Lục Bảo	FL047	Trung Quốc	909	1,92
48	Cherry	FL048	Trung Quốc	769	1,86
49	Autum In Morning	FL049	Trung Quốc	1.153	1,70
50	Ánh Trăng	FL050	Trung Quốc	603	1,87
51	Bách Diệp HT Trắng	FL051	Việt Nam	1.062	1,89
52	Bách Diệp HT Hồng	FL052	Việt Nam	946	1,81
53	Cung Đình Trắng Cánh Đơn	FL053	Việt Nam	538	1,66
54	Jade In Jining	FL054	Trung Quốc	819	1,90
55	Mini Hồng	FL055	Trung Quốc	672	1,97
56	Pink Lady 2	FL056	Trung Quốc	1.153	1,71
57	Pink Lady 1	FL057	Trung Quốc	1.196	1,63
58	Ánh Dương	FL058	Trung Quốc	976	1,89
59	Super Mini Trắng	FL059	Trung Quốc	358	1,70
60	Nghi Lương	FL060	Trung Quốc	1.018	1,78
61	Sen Hồng Bắc Giang	SL001	Việt Nam	409	1,81

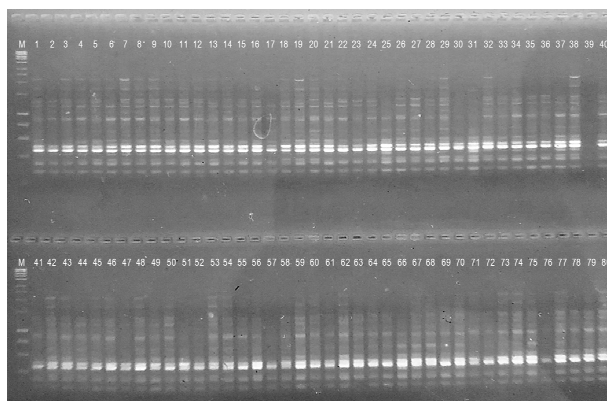
KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

62	Sen Hồng Đồng Tháp	SL002	Việt Nam	287	1,64
63	Sen Trắng Đồng Tháp	SL003	Việt Nam	1.050	1,79
64	Sen Hồng Mỹ Đức	SL004	Việt Nam	544	1,85
65	Sen Hồng Phú Thọ	SL005	Việt Nam	593	1,93
66	Sen Hồng Hà Nam	SL006	Việt Nam	253	2,03
67	Sen Hồng Quảng Ninh	SL007	Việt Nam	198	1,97
68	Bạch Liên	SL008	Việt Nam	761	2,06
69	Sen Trắng Hậu Giang	SL009	Việt Nam	471	1,84
70	Sen Mặt Bằng Hà Nội	SL010	Việt Nam	582	1,92
71	Rinoun	SL011	Nhật Bản	549	1,86
72	Trắng Thanh Oai	SL012	Việt Nam	542	1,83
73	Tịnh Tâm Huế	SL013	Việt Nam	956	1,91
74	Gia Trường liên	SL014	Nhật Bản	603	2,04
75	Sen Hồng Ba Vì	SL015	Việt Nam	265	2,07
76	Thái Hồng Bào	SL016	Nhật Bản	425	1,70
77	Triều Điền Tự Hồng Liên	SL017	Nhật Bản	1.108	1,78
78	Kuwana	SL018	Nhật Bản	387	1,78
79	Himemari	SL019	Nhật Bản	193	1,66
80	Bảo Kính Tự	SL020	Nhật Bản	659	1,84

3.2. Đánh giá đa dạng di truyền của 80 mẫu giống sen bằng chỉ thị RAPD

Kết quả chạy điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% (Hình 2) cho thấy, có 13 mỗi RAPD

cho băng vạch sản phẩm PCR sáng rõ và đều cho đa hình và được lựa chọn cho phân tích đa dạng di truyền cho 80 mẫu giống sen thu thập được.



Hình 2. Sản phẩm PCR nhân bản bởi mỗi RAPD APH 18

M: thang chuẩn ADN 1 kb, từ 1 - 80: sản phẩm PCR nhân bản được từ 80 mẫu giống sen

13 môi RAPD đã nhân bản được 5.448 băng sản phẩm PCR, trung bình 419,08 băng/môi. Số lượng băng trung bình nhân bản được trên mỗi dao động từ 292 (OPA 02) đến 783 (APH 18) (băng/môi). Trung bình mỗi môi nhân bản được 5,24 băng/mẫu trong đó chỉ thị APH 18 nhân bản được số băng/mẫu là lớn nhất, đạt 9,79 băng/mẫu. Các chỉ thị OPA-02, OPC 3 cho số băng ADN trung bình/mẫu giống đạt thấp nhất (lần lượt là 3,65 và 3,68).

13 môi RAPD nhân bản được tổng số 124 locus với tỷ lệ locus đa hình đạt 100%. Trung bình mỗi môi nhân bản được 41,54 locus trong tổng số 80 cá

thể. Mỗi nhân bản được số locus cao nhất (14 locus) là OPA18 trong khi đó môi OPA 2 chỉ nhân bản được 6 locus (Bảng 2). Li và cs (2010) [13] phát hiện tỷ lệ locus đa hình của 87 mẫu giống thuộc chi Sen (*Nelumbo*) bằng chỉ thị RAPD là 96,4%. Như vậy, tỷ lệ locus đa hình mà các chỉ thị RAPD phát hiện được trong nghiên cứu này (100%) là cao hơn so với nghiên cứu của Li và cs (2010) [13]. Han và cs (2007) [14] sử dụng 19 môi RAPD để phân tích đa dạng di truyền của 330 mẫu giống sen cũng thu được tỷ lệ đa hình của các locus đạt 85,38% (*Nelumbo nucifera*), thấp hơn so với kết quả của nghiên cứu này.

Bảng 2. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các môi RAPD trên 80 mẫu giống sen

Tên môi	Trình tự môi 5'-3'	Tm (°C)	Số locus phát hiện được (locus)	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Số cá thể mang locus (cá thể)	Tổng số băng nhân bản được (băng)	Số băng/ mẫu giống (băng)	Hệ số PIC	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp)
OPE 04	GTGACATGCC	32	8	100	28	416	5,20	0,29	3,30
OPG 05	CTGAGACGGA	32	8	100	44	353	4,41	0,40	5,13
OPC 03	GGGGGTCTTT	32	8	100	64	294	3,68	0,33	3,65
OPA 18	AGGTGACCGT	32	14	100	74	421	5,26	0,35	7,33
OPC 01	TTCGAGCCAG	32	10	100	48	450	5,63	0,27	4,25
OPA 02	TGCCGAGCTG	34	6	100	8	292	3,65	0,22	1,70
OPA 01	CAGGCCCTTC	34	11	100	18	515	6,44	0,35	5,18
OPA 03	AGTCAGCCAC	32	10	100	64	438	5,48	0,35	5,00
OPD 02	GGACCCAACC	34	10	100	39	463	5,79	0,32	4,73
OPE 18	GGA CTGCAGA	32	7	100	6	363	4,54	0,23	2,18
APH 18	GAATCGGCCA	32	13	100	56	783	9,79	0,23	4,33
OPR 12	GTGACATGCC	32	10	100	66	316	3,95	0,33	4,70
OPQ 01	CTGAGACGGA	32	9	100	25	344	4,30	0,39	5,20
Tổng			124			5.448			
Trung bình/môi			9,54	100	41,54	419,08	5,24	0,31	4,36

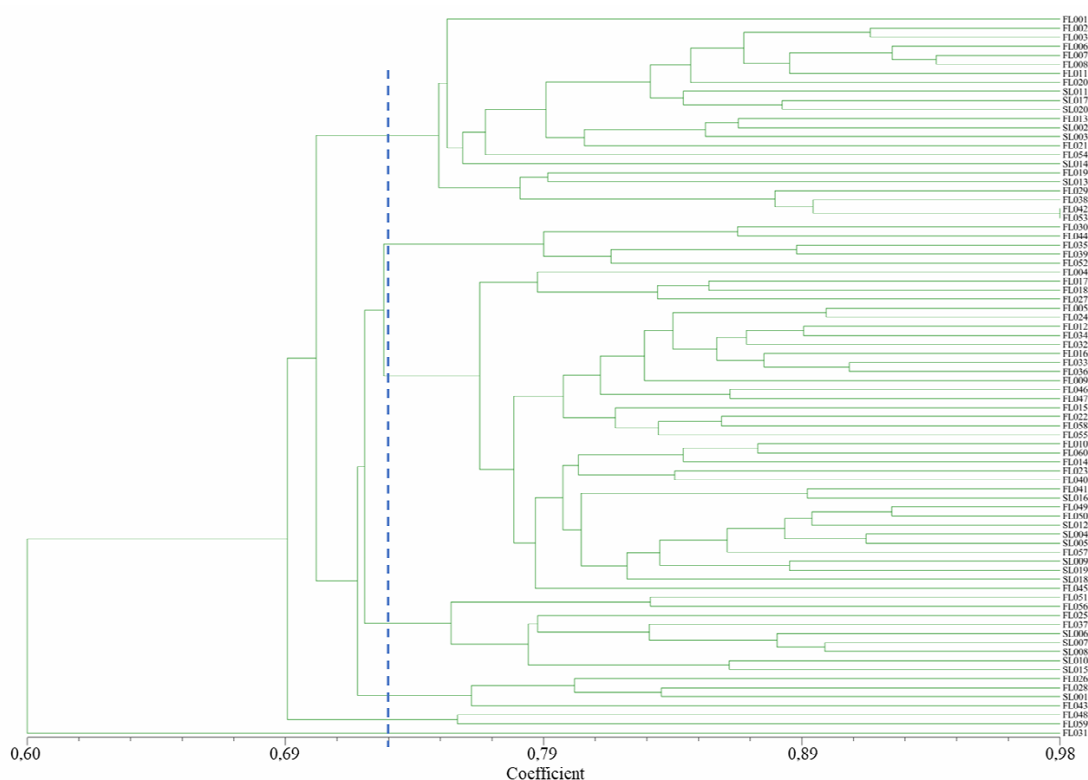
Hệ số PIC thường được dùng để đánh giá khả năng phân tích đa hình của mỗi [15]. Trong nghiên cứu này, giá trị PIC thấp nhất và cao nhất được tìm thấy ở mỗi OPA 02 (0,22) và OPG 05 (0,40), giá trị PIC trung bình là 0,31 (Bảng 2). Như vậy, có thể nói các mẫu RAPD sử dụng trong nghiên cứu này có năng lực phát hiện đa hình khá cao. Trong khi đó, nghiên cứu của Li và cs (2010) [13] chỉ thu được hệ số PIC trung bình của 11 chỉ thị RAPD là 0,18 khi nghiên cứu sự đa dạng di truyền của 87 mẫu giống thuộc 2 loài sen là *N. nucifera* và *N. lutea*.

Theo Prevost và Wilkinson (1999) [12], mỗi nào cho chỉ số Rp càng cao thì khả năng phân biệt kiểu gen càng cao. Chỉ số Rp thấp nhất được quan sát thấy ở mỗi OPA 02 (1,7) trong khi đó mỗi OPA 18 cho chỉ số Rp cao nhất (7,33).

Hệ số tương đồng di truyền được sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các cá thể.

Mức độ tương đồng di truyền càng cao thì hai mẫu càng gần nhau về di truyền và ngược lại. Hệ số tương đồng của 80 mẫu giống sen được phân tích bằng chỉ thị RAPD dao động từ 0,38 - 0,98 và đạt trung bình là 0,73. Kết quả trên chứng tỏ 80 mẫu giống sen thu thập được là có độ đa dạng di truyền rất cao. Han và cs (2007) [14] khi phân tích các mẫu giống sen phát hiện thấy sự đa dạng di truyền dao động từ 0,654 tới 0,956. Như vậy, kết quả nghiên cứu về hệ số tương đồng di truyền của 80 mẫu giống sen của nghiên cứu này có sự khác biệt di truyền là nhiều hơn so với nghiên cứu trên.

Từ hệ số tương đồng di truyền của 80 mẫu giống sen, sử dụng phương pháp phân cụm UPGMA trong phần mềm NTSYSpc 2.1 để lập biểu đồ mối quan hệ di truyền giữa 80 mẫu giống sen được phân tích bằng các chỉ thị RAPD (Hình 3).



Hình 3. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 80 mẫu giống sen được phân tích bởi chỉ thị RAPD.

Tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,73 (vị trí nét đứt), 80 mẫu giống sen được phân thành 7 nhóm chính

Hình 3 cho thấy, tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,73 (73%), 80 mẫu giống sen được phân thành 7 nhóm chính. Trong khi nhóm VII chỉ có 1 giống (FL031), nhóm VI có 2 giống (FL048 và FL059) thì các nhóm khác chiếm rất nhiều giống. Dựa trên sơ đồ mối quan hệ di truyền, về tổng thể thì giống FL031 là giống có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất so với các giống

còn lại và 2 giống có mối quan hệ di truyền gần nhất là FL042 và FL053.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng chỉ thị phân tử RAPD đã cho phép phân tích được sự đa dạng của 80 mẫu giống sen thu thập được. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn thì việc sử dụng thêm chỉ thị phân tử ISSR nhằm phân tích mối quan hệ di của 80 mẫu giống sen này là cần thiết.

Bảng 3. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các môi ISSR trên 80 mẫu giống sen

Tên môi	Trình tự môi	Tm (°C)	Số locus phát hiện được (locus)	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Số cá thể mang locus (cá thể)	Tổng số băng nhân bản được (băng)	Số băng /mẫu giống (băng)	Hệ số PIC	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp)
UBC 848	CACACACACACACARG	53,9	9	100	67	602	7,5	0,24	2,95
UBC 873	GACAGACAGACAGACA	48,2	8	75,0	43	437	5,5	0,26	3,38
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCG	52,4	9	77,8	80	456	5,7	0,24	3,40
UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTTA	50	13	76,9	20	648	8,1	0,25	4,90
UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAC	52,4	17	100	27	614	7,7	0,34	8,65
UBC 889	DBDACACACACACAC	47,6	9	100	78	424	5,3	0,20	2,45
UBC 888	BDBCACACACACACA	47,6	9	100	61	555	6,9	0,30	3,53
UBC 891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	47,6	8	100	62	430	5,4	0,35	4,15
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGT	50	8	100	56	519	6,5	0,21	2,68
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGC	52,4	10	90	62	686	8,6	0,23	2,85
Tổng			100			5.371	67,14		
Trung bình/môi			10	91,97	55,6	537,10	6,71	0,26	3,89

Ghi chú: Một số môi thoái hoá (degenerate primer) có sử dụng các nucleotide được viết dưới các ký hiệu khác biệt. Trong đó: R có thể là nucleotide A/G, B có thể là nucleotide C/G/T (không phải A), D có thể là nucleotide A/G/T (không phải C), H có thể là nucleotide A/C/T (không phải G) và V có thể là nucleotide A/C/G (không phải T).

3.3. Đánh giá đa dạng di truyền của 80 mẫu giống sen với chỉ thị ISSR

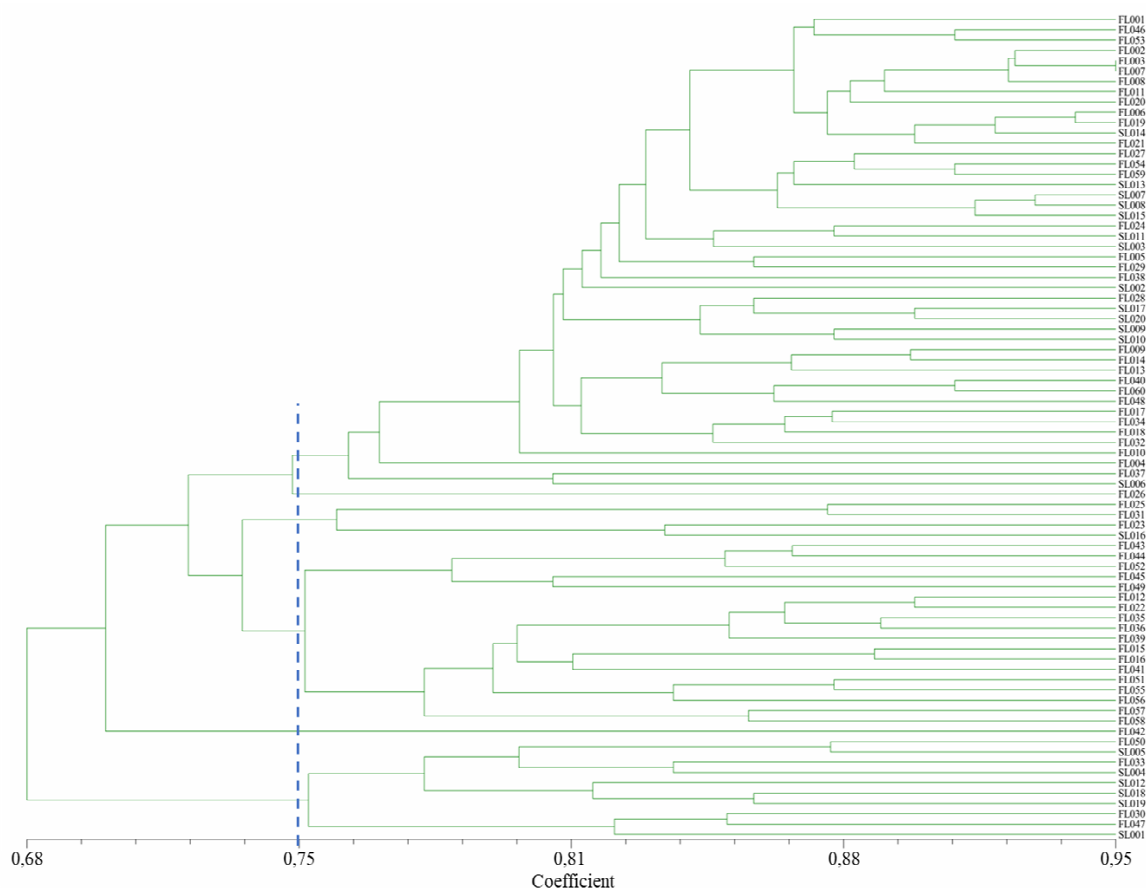
Trong nghiên cứu này, 10 chỉ thị ISSR đã được sử dụng để đánh giá sự đa dạng di truyền của 80 mẫu giống sen. 10 chỉ thị ISSR đã nhân bản được tổng số 5.371 sản phẩm PCR, số sản phẩm/mỗi dao động từ 424 (UBC 889) đến 686 (UBC 808) sản phẩm và đạt trung bình là 537,10 sản phẩm/mỗi. 10 chỉ thị ISSR đã nhân bản được 100 locus, trung bình tỷ lệ locus đa hình chiếm 91,97%. Có 6/10 môi cho tỷ lệ đa hình 100%. Mỗi UBC 811 phát hiện được tới 17 locus trong khi đó các môi UBC 873, UBC 891, UBC 807 phát hiện được số locus là thấp nhất (8 locus) (Bảng 3).

Đối với các chỉ thị ISSR, giá trị PIC thấp nhất và cao nhất được tìm thấy ở mỗi UBC 889 (0,20) và

mỗi UBC 891 (0,35), hệ số PIC trung bình là 0,26 (Bảng 3). Như vậy, có thể nói các môi ISSR sử dụng trong nghiên cứu này có năng lực phát hiện đa hình ở mức trung bình.

Đối với chỉ số Rp, giá trị Rp thấp nhất được quan sát thấy ở mỗi UBC 889 (2,45) và đạt cao nhất ở mỗi UBC 811 (8,65).

Hệ số tương đồng di truyền của 80 mẫu giống sen được phân tích bởi chỉ thị ISSR dao động từ 0,46 - 0,95 và đạt trung bình là 0,75. Kết quả phân nhóm bởi phương pháp UPGMA cho thấy, mối quan hệ di truyền của 80 mẫu giống sen là rất khác biệt. Ở mức độ đa dạng di truyền trung bình là 0,75 (vị trí nét đứt), 80 mẫu giống sen được phân thành 6 nhóm (Hình 4).



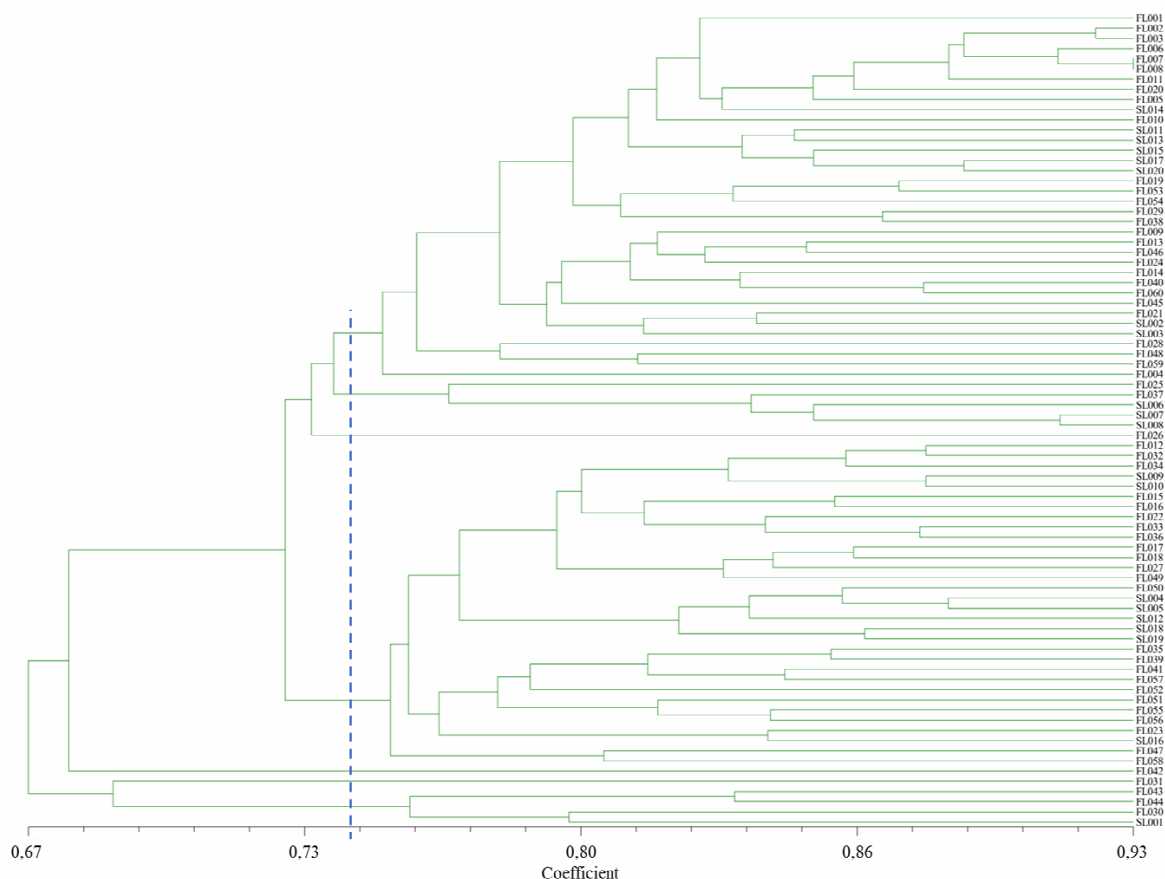
Hình 4. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 80 mẫu giống sen được phân tích bởi chỉ thị ISSR.

Tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,75 (vị trí nét đứt), 80 mẫu giống sen được phân thành 6 nhóm

3.4. Kết hợp chỉ thị ISSR và RAPD trong đánh giá đa dạng di truyền 80 mẫu giống sen

Thông thường, số locus phát hiện được càng nhiều thì kết quả xác định mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống nghiên cứu sẽ càng chính xác. Chính vì vậy, việc kết hợp 2 chỉ thị RAPD và ISSR trong một phân tích thường được thực hiện. 23 chỉ thị đã phát hiện được tổng số 224 locus và nhân

bản được tổng số 10.819 sản phẩm PCR (Bảng 2 và 3). Kết quả xác định sơ đồ tương đồng di truyền của các mẫu giống sen cho thấy, hệ số tương đồng di truyền của 80 mẫu giống dao động từ 0,51 - 0,93. Ở hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,74 (tương ứng với 74%), 80 mẫu giống sen được chia thành 7 nhóm chính trong đó có 2 giống là FL031 và FL042 tách thành 2 nhóm khác biệt (Hình 5).



Hình 5. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 80 mẫu giống sen được phân tích bởi kết hợp 2 chỉ thị RAPD và ISSR.

Tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,74 (vị trí nét đứt), 80 mẫu giống sen được phân thành 7 nhóm

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã sử dụng tổng số 23 chỉ thị (13 chỉ thị RAPD và 10 chỉ thị ISSR) để xác định sự đa dạng di truyền của 80 mẫu giống sen có nguồn gốc trong hoặc ngoài nước. Các chỉ thị đã phát hiện

được 224 locus (124 với RAPD và 100 với ISSR) và nhân bản được tổng số 10.819 sản phẩm PCR. Kết quả cho thấy, hệ số tương đồng di truyền của 80 mẫu giống sen khi kết hợp cả 2 chỉ thị dao động từ 0,51 - 0,93. Ở hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,74 (tương ứng với 74%), 80 mẫu giống sen được chia thành 7 nhóm chính. Tập đoàn 80 mẫu

giống sen thu thập được có mức độ đa dạng di truyền rất cao. Các mẫu giống sen này sẽ là nguồn gen quý phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen và chọn tạo giống sen mới.

4.2. Kiến nghị

Có thể vận dụng kết quả nghiên cứu trên trong công tác bảo tồn và chọn tạo giống sen mới.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Bộ Nông nghiệp và PTNT đã tài trợ kinh phí, thông qua đề tài “Nghiên cứu chọn tạo giống sen làm cảnh và sen lấy hạt phù hợp với các điều kiện trồng trọt khác nhau” để chúng tôi thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Phước Tuyên (2008). *Kỹ thuật trồng sen*. Nxb Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh.
2. Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Ngọc Huệ, Lê Tuấn Nghĩa (2017). Nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen cây sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) bảo tồn tại Trung tâm Tài nguyên thực vật. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 8 (8), 41 - 47.
3. Vo H. T. M., Van Halsema, G., Hellegers, P., Wyatt, A. & Nguyen, Q. H. (2021). The emergence of lotus farming as an innovation for adapting to climate change in the upper Vietnamese Mekong Delta. *Land*, 10 (4), 350.
4. Mafu N., Naidoo, R., Fato, P., Danson, J., Derera, J. & Laing, M. D. (2014). Genetic diversity of maize germplasm lines and implications for breeding *Maize streak virus* resistant hybrids. *South African Journal of Plant and Soil*, 31 (2), 77 - 86.
5. Wu Y. J., Chen, Y., Wang, J., Zhu, C. X. & Xu, B. L. (2006). RAPD analysis of jasmine rice-specific genomic structure. *Genome*, 49 (6), 716 - 719.
6. Zakiyah N. M., Handoyo, T. & Kim, K. -M. (2019). Genetic diversity analysis of Indonesian aromatic rice varieties (*Oryza sativa* L.) using RAPD. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 22 (1), 55 - 63.
7. Mazumder S. R., Hoque, H., Sinha, B., Chowdhury, W. R., Hasan, M. N. & Prodhan, S. H. (2020). Genetic variability analysis of partially salt tolerant local and inbred rice (*Oryza sativa* L.) through molecular markers. *Heliyon*, 6 (8), e04333.
8. Rao L. S., Usha Rani, P., Deshmukh, P. S., Kumar, P. A. & Panguluri, S. K. (2007). RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (6), 1235 - 1244.
9. Masoomi-Aladizgeh F., Jabbari, L., Nekouei, R. K. & Aalami, A. (2019). A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. *Protocol Exchange (Version 2)*.
10. Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas science bulletin* 38: 1409 - 1438
11. Munankarmi N. N., Rana, N., Bhattarai, T., Shrestha, R. L., Joshi, B. K., Baral, B. & Shrestha, S. (2018). Characterization of the genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) cultivars of Eastern Nepal using Inter-Simple Sequence Repeat Markers, *Plants*, 7 (2), 46.
12. Prevost A. & Wilkinson, M. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107 - 112.
13. Li Z., Liu, X., Gituru, R. W., Juntawong, N., Zhou, M. & Chen, L. (2010). Genetic diversity and classification of *Nelumbo* germplasm of different origins by RAPD and ISSR analysis. *Scientia horticulturae*, 125 (4), 724 - 732.
14. Han Y.-C., Teng, C.-Z., Chang, F.-H., Robert, G. W., Zhou, M.-Q., Hu, Z.-L. & Song, Y.-C. (2007). Analyses of genetic relationships in *Nelumbo nucifera* using nuclear ribosomal ITS

sequence data, ISSR and RAPD markers. *Aquatic Botany*, 87 (2), 141 - 146.

15. Guo X. & Elston, R. (1999). Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Human heredity*, 49, 112 - 118.

**ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF 80 LOTUS ACCESSIONS (*Nelumbo* spp.)
BY RAPD AND ISSR MARKERS**

**Dang Van Dong¹, Bui Thi Hong¹, Nguyen Thi Hong Nhung¹,
Bui Thi Hong Nhuy¹, Chu Thi Ngoc My¹, Nguyen Thi Hoa My²,
Nguyen Thanh Thao², Ngo Thi Hong Tuoi³, Dinh Truong Son^{2,4}**

¹ *Fruit and Vegetable Research Institute*

² *Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture*

³ *Faculty of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture*

⁴ *Institute of Agrobiology, Vietnam National University of Agriculture*

Summary

Lotus (*Nelumbo* spp.) belongs to the Nelumbonaceae family, which plays an important role in the culture, nutrition, and medicine of the Vietnamese people. This work used 13 RAPD and 10 ISSR molecular markers to study the genetic diversity of 80 collected lotus accessions. 23 primers detected 224 loci (124 loci by RAPD and 100 loci by ISSR markers) and successfully amplified 10,819 PCR products. The genetic similarity coefficient of 80 lotus accessions ranged from 0.51 to 0.93. At the average genetic similarity coefficient of 0.74, 80 lotus accessions were separated into 7 main groups, of which two groups have only one cultivar (FL031 and FL042). These results show that the genetic diversity of the studied lotus accessions is very high. These lotus accessions could be an important source for the conservation and development of lotus genetic resources and for developing new lotus varieties.

Keywords: *Nelumbo* spp., ISSR, RAPD, genetic diversity.

Người phản biện: PGS.TS. Lã Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 15/6/2023

Ngày thông qua phản biện: 12/7/2023

Ngày duyệt đăng: 14/7/2023