ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ĐỂ XÁC ĐỊNH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN NGUỒN GEN HOA ĐÀO THU THẬP Ở MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Đặng Văn Đông[1*], Bùi Trí Thức[2], Nguyễn Thị Tình[2], Đinh Thị Dinh[1], Trần Thị Thúy[1]

TÓM TẮT

Đánh giá đa dạng di truyền của các nguồn gen cây trồng là cơ sở quan trọng cho việc xác định nguồn gốc giống và mối quan hệ di truyền của nguồn gen đó với các nguồn gen khác. Việc đánh giá này nếu chỉ dựa vào đặc điểm hình thái sẽ gặp rất nhiều khó khăn do cây trồng ở điều kiện ngoại cảnh khác nhau sẽ có kiểu hình khác nhau. Do vậy, nhóm nghiên cứu đã sử dụng chỉ thị phân tử để đánh giá đa dạng di truyền của 42 mẫu nguồn gen hoa đào được thu thập tại 7 tỉnh thành thuộc miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam. Kết quả cho thấy, các mẫu nguồn gen hoa đào có đặc điểm hình thái đặc trưng cho khu vực lấy mẫu. ADN tổng số các mẫu giống hoa đào đã được tinh sạch và kiểm tra qua gel agarose. ADN thu được không bị đứt gãy và có độ tinh sạch cao. ADN của 42 mẫu thu thập được kiểm tra độ đa dạng với 9 mồi RAPD. Kết quả khuếch đại vùng đặc hiệu được kiểm tra trên gel agarose cho thấy băng đa dạng di truyền được tổng hợp, phân tích và xây dựng cây phân loại thông qua phần mềm NTSYS 2.1. Tổng 42 mẫu giống hoa đào thu thập được chia thành 4 nhóm ở mức hệ số tương đồng di truyền là 0,64. Nguồn gen hoa đào phai cánh đơn Sapa và nguồn gen hoa đào phai cánh kép Thanh Hóa là hai nhóm độc lập và không trùng lặp với các mẫu giống hoa đào thu thập từ nơi khác.

Từ khóa: Hoa đào, đa dạng di truyền, RAPD

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hoa đào *(Prunus persica)* được trồng nhiều ở Trung Quốc, Việt Nam và một số quốc gia khác. Trên thế giới được biết đến cây đào quả nhiều hơn là đào hoa. Sổ tay về các giống đào và quả xuân đào do Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ biên tập năm 1985 (Okie, 1998) đã ghi nhận 800 giống bằng cách lai tạo và du nhập. Hơn 1.000 giống đã được chọn lọc ở Trung Quốc (Zhongping Cheng, 2007). Nếu đào cảnh được đưa vào thống kê, nguồn tài nguyên giống đào sẽ được tăng lên đáng kể. Trong nghiên cứu về tính đa dạng của các giống đào bằng các dấu hiệu phân tử như: DNA đa hình khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD) (Zhongping Cheng, 2007); đa hình chiều dài đoạn khuếch đại (AFLP) (Augusto *et al.,* 1999); lặp lại trình tự đơn giản (SSR) (Aranzana *et al.,* 2003); đa hình vi vệ tinh khuếch đại ngẫu nhiên (RAMP) (Cheng *et al*., 2001) đã được thực hiện. Mặc dù tính đa dạng của giống đào đã được nghiên cứu và đạt được một số tiến bộ, nhưng vẫn còn hạn chế do các tác giả mới chỉ tập trung vào các giống đào ăn quả, trong khi các nguồn gen hoa đào trồng làm cảnh lại chưa được quan tâm nghiên cứu. Ở Việt Nam, nhiều nguồn gen hoa đào có đặc điểm khác nhau được người dân lưu giữ để phát triển thành sản xuất hàng hóa. Tuy nhiên, sự khác nhau về di truyền giữa các nguồn gen hoa đào này như thế nào thì vẫn chưa được xác định. Trong nghiên cứu này, 9 mồi RAPD được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 42 mẫu nguồn gen hoa đào thu thập ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam. Kết quả nghiên cứu là minh chứng quan trọng cho việc xác định nguồn gốc giống, mối quan hệ di truyền giữa chúng và cũng là cơ sở khoa học trong công tác lưu giữ, bảo tồn nguồn gen cũng như lai tạo giống hoa đào mới.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu lá nguồn gen hoa đào Sapa, Lào Cai, hoa đào phai cánh kép Thanh Hóa và các nguồn gen hoa đào khác được thu thập tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, bao gồm: 16 mẫu thu thập từ huyện Sapa, tỉnh Lào Cai, 10 mẫu thu thập từ tỉnh Thanh Hóa, 02 mẫu thu thập tại tỉnh Lạng Sơn, 01 mẫu thu thập tại Hà Giang, 01 mẫu thụ thập tại Sơn La, 01 mẫu tại tỉnh Nghệ An, 04 mẫu thu thập tại Hà Nội, và 7 mẫu từ vườn lưu giữ tập đoàn giống hoa đào của Viện Nghiên cứu Rau quả (Bảng 1).

[1] Viện Nghiên cứu Rau quả
[2] Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên
* Tác giả liên hệ, email: donghoacaycanh03@gmail.com

Bảng 1. Các mẫu nguồn gen hoa đào thu thập

TT	Tên mẫu	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu thập mẫu
1	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 01	SP01	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
2	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 02	SP02	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
3	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 03	SP03	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
4	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 04	SP04	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
5	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 05	SP05	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
6	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 06	SP06	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
7	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 07	SP07	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
8	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 08	SP08	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
9	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 09	SP09	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
10	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 10	SP10	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
11	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 11	SP11	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
12	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 12	SP12	Xã Tả Phìn, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
13	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 13	SP13	Phường Ô Quý Hồ, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
14	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 14	SP14	Phường Ô Quý Hồ, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
15	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 15	SP15	Phường Ô Quý Hồ, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
16	Dòng đào phai cánh đơn Sapa 16	SP16	Phường Ô Quý Hồ, thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai
17	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 01	TH01	Tỉnh Thanh Hóa
18	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 02	TH02	Tỉnh Thanh Hóa
19	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 03	TH03	Tỉnh Thanh Hóa
20	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 04	TH04	Tỉnh Thanh Hóa
21	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 05	TH05	Tỉnh Thanh Hóa
22	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 06	TH06	Tỉnh Thanh Hóa
23	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 07	TH07	Tỉnh Thanh Hóa
24	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 08	TH08	Tỉnh Thanh Hóa
25	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 09	TH09	Tỉnh Thanh Hóa
26	Dòng đào phai cánh kép Thanh Hóa 10	TH10	Tỉnh Thanh Hóa
27	Đào bích GL 2-1	GL01	Huyện Gia Lâm, Thành phố Hà Nội
28	Đào phai GL 2-2	GL02	Huyện Gia Lâm, Thành phố Hà Nội
29	Đào phai Lạng Sơn	LS01	Tỉnh Lạng Sơn
30	Đào bích Nhật Tân	NT	Hà Nội
31	Đào Tiết Dê	TD	Hà nội
32	Đào bích Sơn La	SL	Tỉnh Sơn La
33	Đào Bích Lạng Sơn	LS02	Tỉnh Lạng Sơn
34	Đào phai Nghệ An	NA	Tỉnh Nghệ An
35	Đào phai Hà Giang	HG	Tỉnh Hà Giang
36	Đào Bạch	DB	Viện Nghiên cứu Rau quả, Hà Nội
37	Đào Thất Thốn	TT	Viện Nghiên cứu Rau quả, Hà Nội
38	Đào Bích Xoăn	BX	Viện Nghiên cứu Rau quả, Hà Nội
39	Đào Bích Mốc	BM	Viện Nghiên cứu Rau quả, Hà Nội
40	Đào Bích Mắt Nâu	BMN	Viện Nghiên cứu Rau quả, Hà Nội
41	Đào Quảng Chính	QC	Viện Nghiên cứu Rau quả, Hà Nội
42	Đào GL 2-3	GL03	Viện Nghiên cứu Rau quả, Hà Nội

- Các mồi được thiết kế dựa trên nghiên cứu của tác giả Sharma và cộng sự (2015) được sản xuất bởi công ty Integrated ADN Technologies (Coralville, Iowa, USA). Thông tin về ký hiệu, trình tự và nhiệt độ gắn mồi được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự các mồi được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu mồi	Trình tự mồi (5' – 3')	Giá trị Tm (°C) (Nhiệt độ gắn mồi)	Tài liệu tham khảo
1	OPA10	GTGATCGCAG	33,1	Carvalho *et al.*, 2004
2	OPA14	TGTGTGCTGG	35,4	Aladele *et al.*, 2008
3	OPAD14	GAACGAGGGT	33,8	Oliveira *et al.*, 2010
4	OPB07	GGTGACGCAG	38,1	Barakat *et al.*, 2010
5	OPB10	CTGCTGGGAC	36,6	Nagaty *et al.*, 2011
6	OPC11	AAAGCTGCGG	36,9	Aladele *et al.*, 2008
7	OPB17	AGGGAACGAG	33,1	Sharma *et al.*, 2015
8	OPB18	CCACAGCAGT	34,8	Barakat *et al.*, 2010
9	OPG04	AGCGTGTCTG	35,3	Sharma *et al.*, 2015

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách ADN tổng số từ các mẫu đào và tinh sạch mẫu ADN

Các mẫu lá đào được tách chiết ADN tổng số dựa trên phương pháp của Tri-Thuc Bui và cộng sự (2019) có biến đổi nhỏ để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

2.2.2. Phương pháp PCR-RAPD

Phản ứng PCR-RAPD được tiến hành trên máy máy PCR Master cycler X50s với tổng thể tích là 20 µL/phản ứng. Thành phần và chu kỳ nhiệt của phản ứng được trình bày ở Bảng 3. Sản phẩm RAPD được phân tách bằng điện di trên gel agarose 1,2% ở điện thế 120 V, 40A trong 30 phút. Sản phẩm RAPD được thể hiện thông qua máy chụp gel, kích thước của sản phẩm khuếch đại được xác định dựa trên kích thước của thang ADN chuẩn 1 kb.

Bảng 3. Thành phần PCR

Thành phần	Thể tích
10X Standard Taq Reaction Buffer	2,0 µL
10 mM dNTPs	0,4 µL
Primer (10 µM):	0,8 µL
Taq ADN polymerase (5U/µL):	0,1 µL
ADN khuôn (template)	1,0 µL
Dung dịch $MgSO_4$	1,5 µL
Nước khử ion	14,2 µL
Tổng thể tích phản ứng	20 µL

Bảng 4. Chu trình nhiệt của phản ứng

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Chu kỳ
Biến tính	95	30	-
Biến tính	95	30	69
Gắn mồi	33 - 38°C	30	
Kéo dài	68	60	
Kéo dài	68	300	-
Bảo quản	5	∞	-

2.2.3. Phương pháp xây dựng cây phân loại và xác định khoảng cách di truyền giữa các mẫu nguồn gen đào nghiên cứu

Các sản phẩm PCR với các mồi RAPD sau khi được khuếch đại và điện di trên gel agarose sẽ được nhuộm với ethidium bromide và chụp ảnh các băng đa dạng để xây dựng cây phân loại. Các băng ADN được ghi nhận dựa trên sự có mặt của chúng trên bản điện di của các mẫu nghiên cứu theo ADN thang chuẩn 1 kb (ADN marker). Nếu một băng ADN (có kích thước cụ thể) xuất hiện ở mẫu này nhưng không xuất hiện ở mẫu khác hoặc đồng thời xuất hiện ở cả hai mẫu nhưng không xuất hiện ở các mẫu khác thì băng ADN này gọi là băng đa hình. Ngược lại, nếu băng ADN nào xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu thì gọi là băng ADN đơn hình. Các đoạn được mã hóa bằng số tự nhiên 0 và 1, khi đó mẫu nào xuất hiện băng ADN thì ký hiệu là 1, còn không xuất hiện thì ký hiệu là 0. Số liệu sau khi thu được sẽ được tổng hợp vào phần mềm Excel. Sau đó được xử lý bằng chương trình NTSYSpc version 2.1 để tính hệ số tương đồng giữa các đôi mẫu.

Số liệu lần lượt được xử lý qua các bước trong NTSYS - SIMQUAL, SAHN để vẽ biểu đồ phân tích mối tương quan di truyền giữa các mẫu nghiên cứu (Rohlf, 1988).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

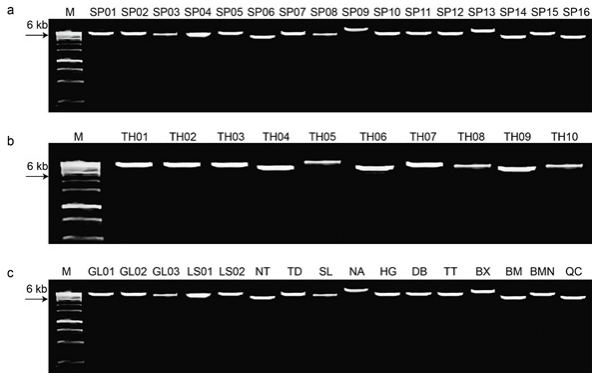
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5/2022 đến 4/2023 tại Viện Nghiên cứu Rau quả và Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tách PCR- RAPD

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách chiết ADN tổng số được thể hiện trong Hình 1.

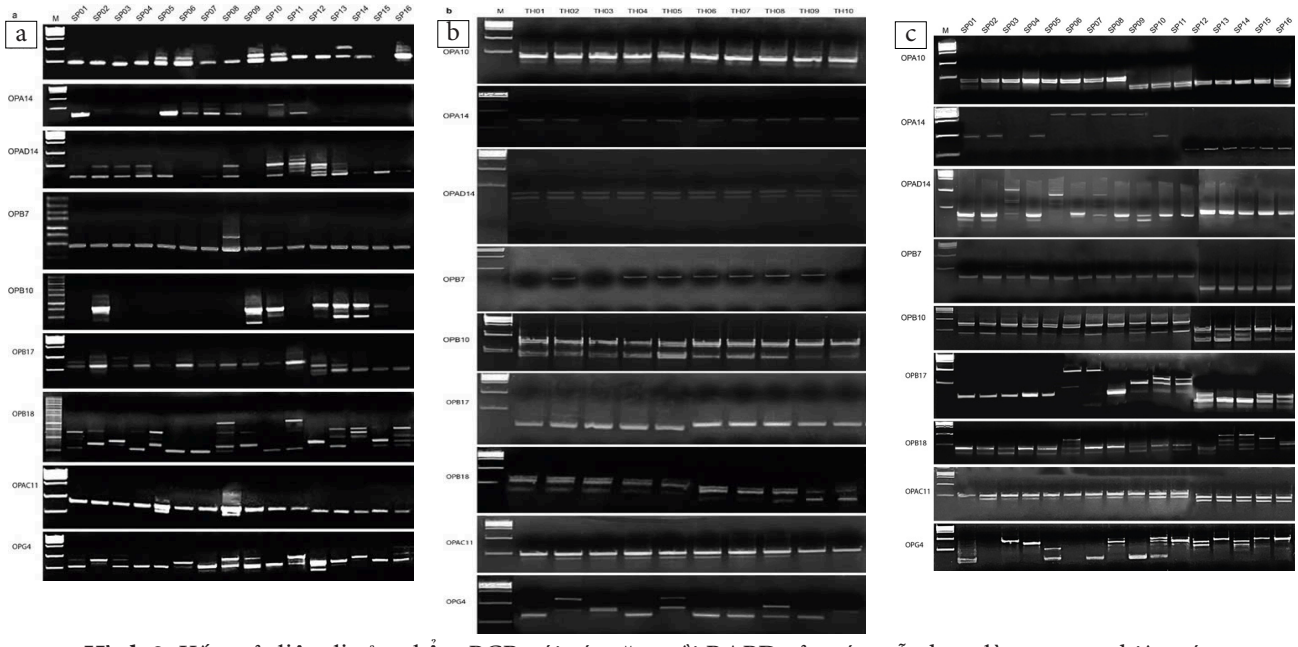
Kết quả điện di cho thấy, các đường chạy đều cho một băng ADN sáng, rõ nét kích thước lớn hơn 10 kb, không bị đứt gẫy và không có băng phụ. Băng ADN thu được có độ sáng rõ như kết quả tối ưu tách chiết ADN bằng CTAB và SDS đã được công bố trước đó (Masoodi *et al.*, 2021; Rani & Sharma, 2016; Xia *et al.*, 2019). Điều này chứng tỏ đã tách chiết được ADN tổng số của các mẫu đào nghiên cứu. Sản phẩm ADN không bị đứt gãy, hàm lượng cao, tuy nhiên vẫn còn lẫn tạp protein và một số tạp chất nằm lại ở phần giếng tra mẫu. Điều này có thể làm ảnh hưởng đến phản ứng PCR. Để đảm bảo ADN vừa không bị đứt gãy, vừa không bị lẫn tạp chất phục vụ quá trình kiểm tra bằng phản ứng PCR. Đoạn gel tương ứng với các băng sáng ADN được cắt riêng và sẽ được tinh sạch thông qua cột Silica của hãng Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu ADN sau khi được tinh sạch bằng cột Silica sẽ được bảo quản ở nhiệt độ -20°C để phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả kiểm tra ADN tổng số của 42 mẫu nguồn gen hoa đào thu thập

Ghi chú: M - thang chuẩn ADN 1 kb. a - kết quả kiểm tra ADN của 16 mẫu đào thu thập tại Sapa, b - kết quả kiểm tra 10 mẫu đào tại Thanh Hóa, c - kết quả kiểm tra ADN của các mẫu hoa đào thu thập ở các nơi còn lại.

Các ADN tinh sạch qua cột silica được sử dụng cho phản ứng PCR với các mồi đa dạng di truyền RAPD. Sau khi tiến hành PCR với từng mồi RAPD, ADN của các mẫu nguồn gen hoa đào, sản phẩm PCR sẽ được điện di qua gel agarose 1,2% ở hiệu điện thế 120V, 400A trong 30 phút. Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi RAPD của các mẫu hoa đào trong nghiên cứu

Ghi chú: M - thang chuẩn ADN 1 kb, kết quả nhân đoạn đa hình của 16 mẫu đào (SP01 đến SP16) thu thập tại Sa Pa trên 9 mồi RAPD (OPA10, OPA14, OPAD14, OPB7, OPB10, OPB17, OPB18, OPAC11, OPG4).

Từ hình 2 cho thấy, 9 cặp mồi RAPD sử dụng trong đề tài có sự đa hình cao giữa các mẫu nguồn gen hoa đào thu thập. Các băng ADN thu được trên gel agarose có độ sáng rõ ràng. So sánh với kết quả của Sharma và cộng sự (2015), số lượng băng đa dạng di truyền cho mồi OPB07 và OPB10 trong

kết quả nghiên cứu này có phần ít hơn. Điều này có thể do sự khác nhau giữa các mẫu nguồn gen hoa đào đã được sử dụng (Nagaty *et al.,* 2011; Sharma *et al.,* 2015). Các mẫu nguồn gen hoa đào khác nhau tạo ra số lượng băng khác nhau. Các băng ADN được tổng hợp trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả phân tích đa hình của 9 mồi RAPD với 42 mẫu hoa đào nghiên cứu

Tên mồi	Kích thước băng (bp)	Loại băng ADN nhân bản	Số băng ADN đa hình		Tổng số băng ADN nhân bản
			Số lượng	*Tỷ lệ (%)*	
OPA10	500 - 1000	2	2	100	54
OPA14	500 - 3000	4	4	100	44
OPAD14	500 - 3000	6	6	100	85
OPB07	300 - 1000	3	3	100	41
OPB10	800 - 5000	6	5	83,3	82
OPB17	300 - 3000	5	5	100	73
OPB18	500 - 3000	5	4	80	90
OPC11	800 - 1000	2	1	50	54
OPG04	500 - 4000	6	6	100	71
Tổng số		*39*	*36*		*594*

Qua Bảng 5 cho thấy, số lượng các băng ADN được nhân bản với mỗi mồi RAPD dao động từ 2 đến 6 phân đoạn với các kích thước dao động từ 300 đến 5.000 bp. Tổng số băng ADN được nhân bản với 42 mẫu hoa đào thu thập là 39 băng ADN, trong đó có 36 băng ADN đa hình. Tổng số băng ADN được nhân bản là 594 tương ứng với tổng số vạch xuất hiện trên điện di đồ sản phẩm RAPD của 42 mẫu hoa đào với 9 mồi. Trong đó, các mồi OPG04, OPA14, OPAD14, OPB07, OPA10, OPB07 cho tỷ lệ đa hình cao đạt 100%, 2 mồi OPB18 và OPB10 cho tỷ lệ đa hình thấp hơn lần lượt là 80% và 83,3%, mồi OPC11 cho tỷ lệ đa hình thấp nhất là 50%. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ đa hình giữa 42 mẫu nguồn gen hoa đào nghiên cứu là khá cao. So sánh số loại băng ADN được nhân bản với kết quả của Nagaty và cộng sự (2011) cho thấy, số băng ADN của mồi OPB07, OPB17, và OPB18 có sự khác biệt. Kết quả của Sharma và cộng sự (2015) cho ra số băng tương ứng với các mồi là 8, 8, và 10 băng. Trong kết quả này, số băng có phần ít hơn với số băng lần lượt là 3, 5 và 5. Tuy số lượng băng ít hơn, nhưng nó vẫn thể hiện sự đa hình giữa các mẫu nguồn gen hoa đào.

3.2. Kết quả xây dựng cây phân loại và xác định khoảng cách di truyền giữa các mẫu hoa đào nghiên cứu

Dựa trên chỉ thị RAPD ta có kết quả phân tích đa hình, các băng ADN của các mẫu hoa đào sẽ được tổng hợp và mã hóa theo hệ nhị phân 0 và 1 trong bảng phụ lục. Từ bảng tổng hợp mã hóa trên chúng tôi sẽ sử dụng phần mềm NTSYS 2.1 (Rohlf, 1988) để xác định hệ số tương đồng di truyền giữa 42 mẫu hoa đào thu thập. Kết quả xây dựng cây phân loại được thể hiện ở Bảng 6.

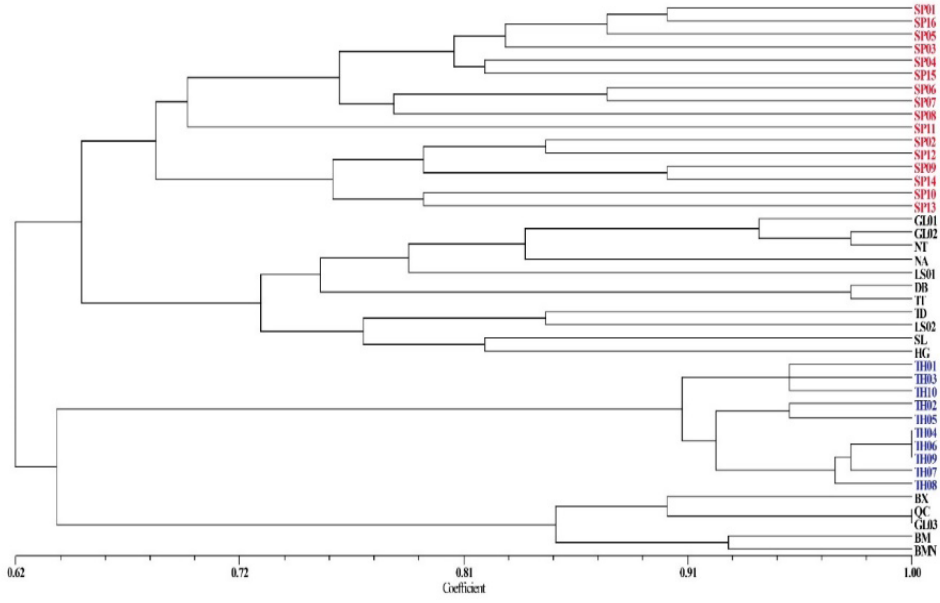
Bảng 6. Hệ số tương đồng di truyền giữa 42 mẫu hoa đào thu thập

	SP01	SP02	SP03	SP04	SP05	SP06	SP07	SP08	SP09	SP10	SP11	SP12	SP13	SP14	SP15	SP16	TH01	TH02	TH03	TH04	TH05	TH06	TH07	TH08	TH09	TH10	GL01	GL02	LS01	NT	TD	SL	LS02	NA	HG	DB	TT	BX	BM	BMN	QC	GL03
SP01	1.00																																								
SP02	0.72	1.00																																								
SP03	0.81	0.69	1.00																																						
SP04	0.78	0.67	0.81	1.00																																					
SP05	0.86	0.58	0.78	0.81	1.00																																				
SP06	0.72	0.50	0.69	0.72	0.75	1.00																																		
SP07	0.75	0.53	0.72	0.81	0.78	0.86	1.00																																	
SP08	0.75	0.58	0.72	0.75	0.78	0.75	0.78	1.00																																
SP09	0.69	0.81	0.67	0.69	0.72	0.69	0.61	0.61	1.00																															
SP10	0.67	0.72	0.64	0.72	0.75	0.72	0.69	0.69	0.81	1.00																														
SP11	0.67	0.56	0.69	0.72	0.64	0.67	0.64	0.75	0.53	0.67	1.00																													
SP12	0.67	0.83	0.64	0.67	0.53	0.50	0.53	0.53	0.75	0.67	0.56	1.00																												
SP13	0.67	0.72	0.58	0.72	0.69	0.56	0.64	0.53	0.75	0.67	0.50	0.72	1.00																											
SP14	0.81	0.81	0.78	0.75	0.78	0.64	0.67	0.67	0.89	0.75	0.58	0.75	0.75	1.00																										
SP15	0.75	0.69	0.78	0.81	0.78	0.69	0.78	0.67	0.78	0.75	0.58	0.69	0.64	0.83	1.00																									
SP16	0.89	0.67	0.86	0.83	0.86	0.72	0.75	0.75	0.75	0.67	0.67	0.61	0.61	0.86	0.81	1.00																								
TH01	0.69	0.64	0.67	0.69	0.62	0.64	0.62	0.62	0.67	0.64	0.59	0.64	0.59	0.72	0.67	0.69	1.00																							
TH02	0.62	0.62	0.64	0.67	0.59	0.56	0.59	0.59	0.59	0.62	0.51	0.51	0.56	0.64	0.64	0.62	0.87	1.00																						
TH03	0.74	0.69	0.72	0.74	0.67	0.64	0.62	0.62	0.72	0.64	0.59	0.64	0.64	0.77	0.72	0.74	0.95	0.87	1.00																					
TH04	0.62	0.62	0.59	0.67	0.59	0.56	0.59	0.59	0.59	0.62	0.51	0.51	0.56	0.64	0.64	0.62	0.92	0.95	0.87	1.00																				
TH05	0.67	0.62	0.69	0.67	0.59	0.62	0.59	0.64	0.64	0.62	0.56	0.56	0.56	0.69	0.64	0.67	0.92	0.95	0.92	0.90	1.00																			
TH06	0.62	0.62	0.59	0.67	0.59	0.56	0.59	0.59	0.59	0.62	0.51	0.56	0.56	0.64	0.64	0.62	0.92	0.95	0.87	1.00	0.90	1.00																		
TH07	0.59	0.59	0.56	0.64	0.56	0.54	0.56	0.56	0.56	0.59	0.49	0.54	0.54	0.62	0.62	0.64	0.90	0.92	0.85	0.97	0.87	0.97	1.00																	
TH08	0.64	0.64	0.62	0.64	0.56	0.59	0.56	0.62	0.62	0.59	0.54	0.59	0.54	0.67	0.62	0.64	0.95	0.92	0.90	0.97	0.92	0.97	0.95	1.00																
TH09	0.62	0.62	0.59	0.67	0.59	0.56	0.59	0.59	0.59	0.62	0.51	0.56	0.56	0.64	0.64	0.62	0.92	0.95	0.87	1.00	0.90	1.00	0.97	0.97	1.00															
TH10	0.69	0.64	0.67	0.74	0.67	0.64	0.67	0.62	0.67	0.69	0.59	0.59	0.64	0.72	0.72	0.69	0.95	0.92	0.95	0.92	0.92	0.92	0.90	0.90	0.92	1.00														
GL01	0.69	0.64	0.62	0.69	0.72	0.64	0.67	0.56	0.67	0.69	0.59	0.74	0.64	0.67	0.77	0.64	0.64	0.62	0.64	0.67	0.56	0.67	0.64	0.64	0.67	0.64	1.00													
GL02	0.69	0.64	0.62	0.69	0.77	0.64	0.67	0.62	0.67	0.69	0.59	0.69	0.64	0.67	0.77	0.64	0.59	0.62	0.64	0.62	0.56	0.62	0.59	0.59	0.62	0.64	0.94	1.00												
LS01	0.62	0.56	0.59	0.56	0.64	0.62	0.59	0.54	0.64	0.62	0.56	0.56	0.51	0.59	0.69	0.56	0.62	0.74	0.67	0.69	0.69	0.69	0.67	0.67	0.69	0.67	0.77	0.77	1.00											
NT	0.72	0.67	0.64	0.67	0.74	0.67	0.64	0.64	0.69	0.67	0.62	0.72	0.62	0.69	0.74	0.67	0.62	0.59	0.67	0.59	0.59	0.59	0.56	0.62	0.59	0.62	0.90	0.97	0.74	1.00										
TD	0.59	0.64	0.67	0.64	0.62	0.64	0.56	0.51	0.67	0.69	0.64	0.64	0.54	0.62	0.72	0.59	0.74	0.67	0.74	0.72	0.67	0.72	0.69	0.69	0.72	0.74	0.68	0.81	0.71	0.58	1.00									
SL	0.74	0.74	0.67	0.64	0.72	0.64	0.56	0.51	0.72	0.69	0.59	0.64	0.64	0.72	0.72	0.69	0.64	0.67	0.69	0.67	0.67	0.64	0.64	0.64	0.67	0.69	0.68	0.68	0.65	0.65	0.68	1.00								
LS02	0.59	0.64	0.56	0.54	0.56	0.59	0.51	0.41	0.62	0.59	0.59	0.64	0.49	0.56	0.67	0.54	0.59	0.56	0.59	0.62	0.51	0.62	0.59	0.59	0.62	0.59	0.68	0.81	0.71	0.58	0.81	0.81	1.00							
NA	0.69	0.64	0.72	0.69	0.72	0.69	0.62	0.62	0.72	0.69	0.59	0.69	0.59	0.72	0.77	0.69	0.64	0.62	0.69	0.56	0.67	0.56	0.54	0.59	0.56	0.64	0.74	0.81	0.65	0.84	0.68	0.61	0.55	1.00						
HG	0.72	0.67	0.69	0.72	0.69	0.62	0.64	0.54	0.64	0.67	0.62	0.77	0.62	0.74	0.79	0.72	0.67	0.64	0.67	0.69	0.59	0.69	0.67	0.67	0.69	0.67	0.84	0.77	0.61	0.74	0.65	0.77	0.71	0.71	1.00					
DB	0.79	0.64	0.72	0.59	0.72	0.64	0.62	0.62	0.67	0.59	0.54	0.74	0.59	0.72	0.72	0.69	0.69	0.62	0.69	0.62	0.67	0.62	0.59	0.64	0.62	0.64	0.68	0.68	0.65	0.71	0.55	0.68	0.61	0.68	0.71	1.00				
TT	0.82	0.67	0.74	0.62	0.74	0.67	0.64	0.64	0.69	0.62	0.56	0.72	0.62	0.74	0.74	0.72	0.67	0.64	0.72	0.59	0.69	0.59	0.56	0.62	0.59	0.67	0.65	0.71	0.68	0.74	0.52	0.71	0.58	0.71	0.68	0.97	1.00			
BX	0.72	0.62	0.69	0.67	0.69	0.67	0.64	0.69	0.64	0.62	0.56	0.62	0.51	0.64	0.69	0.67	0.67	0.59	0.72	0.59	0.64	0.59	0.56	0.62	0.59	0.67	0.52	0.58	0.48	0.61	0.52	0.45	0.45	0.58	0.48	0.65	0.68	1.00		
BM	0.67	0.56	0.64	0.67	0.69	0.46	0.54	0.59	0.49	0.56	0.51	0.51	0.56	0.59	0.59	0.62	0.62	0.69	0.67	0.64	0.64	0.64	0.62	0.62	0.64	0.67	0.58	0.65	0.48	0.61	0.39	0.45	0.32	0.58	0.55	0.52	0.55	0.74	1.00	
BMN	0.74	0.59	0.67	0.69	0.72	0.54	0.56	0.67	0.56	0.59	0.59	0.59	0.59	0.67	0.62	0.69	0.69	0.62	0.74	0.62	0.67	0.62	0.59	0.64	0.62	0.69	0.55	0.61	0.39	0.65	0.42	0.42	0.29	0.61	0.52	0.55	0.58	0.84	0.90	1.00
QC	0.67	0.56	0.69	0.62	0.69	0.56	0.59	0.59	0.54	0.56	0.46	0.51	0.51	0.59	0.64	0.62	0.62	0.69	0.67	0.64	0.64	0.64	0.62	0.62	0.64	0.67	0.52	0.58	0.55	0.55	0.45	0.52	0.45	0.52	0.55	0.65	0.68	0.87	0.87	0.77
GL03	0.67	0.56	0.69	0.62	0.69	0.56	0.59	0.59	0.54	0.56	0.46	0.51	0.51	0.59	0.64	0.62	0.62	0.69	0.67	0.64	0.64	0.64	0.62	0.62	0.64	0.67	0.52	0.58	0.55	0.55	0.45	0.52	0.45	0.52	0.55	0.65	0.68	0.87	0.87	0.77

Ghi chú: Ký hiệu các mẫu giống hoa đào: SP01-SP16, TH01-TH10, GL01, GL02, LS01, NT, TD, SL, LS02, NA, HG, DB, TT, BX, BM, BMN, QC, GL03.

Kết quả bảng 6 cho thấy, hệ số tương đồng di truyền từng cặp mẫu nằm trong khoảng 0,29 - 1 (tương ứng với từ 29% - 100%). Mức độ đa dạng di truyền giữa các cá thể nằm trong khoảng từ 0 (1 - 1) đến 0,71 (1 - 0,29). Điều này cho thấy 42 mẫu nguồn gen hoa đào thu thập có mức độ đa dạng về ADN genome khá cao. Trong đó cặp mẫu nguồn gen hoa đào Quảng Chính và mẫu nguồn gen hoa đào GL 2-3 có hệ số tương đồng di truyền cao nhất là 100%; 3 mẫu nguồn gen hoa đào Thanh Hóa 04, Thanh Hóa 06 và Thanh Hóa 09 là 3 mẫu nguồn gen hoa đào cũng có hệ số tương đồng di truyền cao nhất là 100%. Mẫu nguồn gen hoa đào Bích mắt nâu và mẫu nguồn gen hoa đào Lạng Sơn 02 có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất là 29%.

Dựa vào giá trị hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu khi so sánh với nhau, chúng tôi tiếp tục sử dụng phần mềm NTSYS để xây dựng cây phân loại cho 42 mẫu giống hoa đào thu thập để thể hiện mỗi quan hệ di truyền giữa các mẫu nguồn gen hoa đào với nhau (Hình 3).



Hình 3. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 42 mẫu nguồn gen hoa đào thu thập

Ghi chú: Ký hiệu các mẫu giống hoa đào: SP01-SP16, TH01-TH10, GL01, GL02, LS01, NT, TD, SL, LS02, NA, HG, DB, TT, BX, BM, BMN, QC, GL03.

Sơ đồ 3 cho thấy 42 mẫu nguồn gen hoa đào trong nghiên cứu được chia thành 4 nhóm lớn khi xét ở mức hệ số tương đồng di truyền là 0,64.

Nhóm I: Nhóm I gồm 16 mẫu nguồn gen hoa đào được thu thập tại thị xã Sapa tỉnh Lào Cai là SP01, SP02, SP03, SP04, SP05, SP06, SP07, SP08, SP09, SP10, SP11, SP12, SP13, SP14, SP15, SP16 với mức tương đồng di truyền dao động từ 0,5 đến 0,89. Nhóm này được chia thành 5 nhóm phụ khi xét ở mức độ tương đồng di truyền là 0,78: Nhóm phụ 1.1 gồm 6 mẫu là SP01, SP16, SP05, SP03, SP04 và SP15; Nhóm phụ 1.2 gồm 3 mẫu là SP06, SP07, SP08 chia thành 2 nhánh: nhánh 1.2.1 gồm SP06 và SP07 với mức tương đồng di truyền giữ hai mẫu là 0,86 và nhánh 1.2.2 gồm mẫu SP08; Nhóm phụ 1.3 gồm duy nhất một mẫu là SP11; Nhóm phụ 1.4 gồm 4 mẫu là SP02, SP12, SP09, SP14 và được chia thành 2 nhánh nhỏ: nhánh nhỏ 1.4.1 gồm hai mẫu là SP02 và SP12 với mức độ tương đồng di truyền là 0,83; nhánh nhỏ 1.4.2 gồm hai mẫu là SP09 và SP14 mới mức độ tương đồng di truyền là 0,89; Nhóm phụ 1.5 gồm hai mẫu là SP10 và SP13 với mức tương đồng di truyền giữa mẫu là 0,67.

Nhóm II: Nhóm II gồm 11 mẫu nguồn gen hoa đào là GL01, GL02, NT, NA, LS01, DB, TT, LS02, SL, HG với mức độ tương đồng di truyền dao động từ 0,52 đến 0,97. Ở mức độ tương đồng di truyền 0,81 nhóm 2 được chia thành 5 nhóm phụ: Nhóm phụ 2.1 gồm 4 mẫu là GL01, GL02, NT và NA được chia thành 2 nhánh nhỏ: nhánh nhỏ 2.1.1 gồm 3 mẫu là GL01, GL02 và NT với mức độ tương đồng di truyền dao động từ 0,9 đến 0,97; nhánh nhỏ 2.1.2 gồm 1 mẫu là NA. Nhóm phụ 2.2 gồm duy nhất 1 mẫu là LS01; Nhóm phụ 2.3 gồm 2 mẫu là DB và TT với mức độ tương đồng di truyền giữa hai mẫu là 0,97; Nhóm phụ 2.4 gồm 2 mẫu TD và LS02 với mức độ tương đồng di truyền là 0,81; Nhóm phụ 2.5 gồm 2 mẫu là SL và HG với mức tương đồng di truyền là 0,77.

Nhóm III: Nhóm III gồm 10 mẫu nguồn gen hoa đào được thu thập tại Quảng Xương, Thanh Hóa

là TH01, TH02, TH03, TH04, TH05, TH06, TH07, TH08, TH09, TH10 với mức độ tương động di truyền dao động từ 0,85 đến 1. Dựa trên mức độ tương đồng di truyền 0,93 nhóm III được chia thành 3 nhóm phụ: Nhóm phụ 3.1 gồm 3 mẫu là TH01, TH03 và TH10 với mức độ tương đồng di truyền giữa 3 mẫu là 0,95; Nhóm phụ 3.2 gồm 2 mẫu là Th02 và TH05 với mức tương đồng di truyền giữa 2 mẫu là 0,95; Nhóm phụ 3.3 gồm 5 mẫu là TH04, TH06, TH09, TH07, TH08 và được chia thành 2 nhánh nhỏ khi xét ở mức tương đồng di truyền là 0,96: nhánh nhỏ 3.2.1 gồm 3 mẫu là TH04, TH06, TH09 và TH07 trong đó 3 mẫu TH04, TH06, TH09 có mức độ tương đồng di truyền ở mức cao nhất là 1 và có mức độ tương đồng di truyền với mẫu TH07 là 0,97; nhánh nhỏ 2 gồm duy nhất một mẫu là TH08.

Nhóm IV: Nhóm IV gồm 5 mẫu nguồn gen hoa đào thu thập từ vườn tập đoàn Viện Nghiên cứu Rau quả là BX, QC, GL03, BM, BMN với mức độ tương đồng di truyền dao động từ 0,74 đến 1. Khi xét ở mức độ tương đồng 0,9 nhóm IV được chia thành 2 nhóm phụ: Nhóm phụ 4.1 gồm 3 mẫu là BX, QC, GL03 trong đó 2 mẫu QC và GL03 có mức độ tương đồng di truyền giữa hai mẫu là 1 và có mức độ tương đồng với mẫu đào BX là 0,87; Nhóm phụ 4.2 gồm 2 mẫu là BM và BMN với hệ số tương đồng di truyền giữa hai mẫu là 0,9. Qua sơ đồ cây mô tả sự đa dạng di truyền 42 mẫu hoa đào thu thập và sự phân nhóm cho thấy, các nhóm đào được phân ly theo khu vực địa lý. Các mẫu nguồn gen hoa đào được thu thập tại những địa phương gần nhau hoặc cùng một địa phương có quan hệ di truyền gần nhau và được chia vào một nhóm riêng. Trong sơ đồ đã chỉ rõ, các mẫu nguồn gen hoa đào được thu thập tại thị xã Sapa, tỉnh Lào Cai được nằm chung vào 1 nhóm, các mẫu đào được thu thập tại huyện Quảng Xương, Thanh Hóa được chia thành một nhóm. Tuy nhiên các mẫu đào trong nhóm khu vực Sapa tỉnh Lào Cai có mức độ đa dạng cao hơn so với các mẫu đào trong nhóm khu vực huyện Quảng Xương, tỉnh Thanh Hóa. Nguyên nhân dẫn đến sự đa dạng của các mẫu đào khu vực Sapa có thể giải thích do khu vực này ngoài trồng các mẫu nguồn gen đào hoa thì còn trồng thêm các giống đào quả, mận với diện tích lớn. Điều này dẫn đến sự thụ phấn chéo giữa các cây cùng loài và giữa các loài làm cho các loài có sự đa dạng hơn về mặt phân tử. Trong khi các mẫu đào được thu thập tại huyện Quảng Xương, tỉnh Thanh Hóa ít đa dạng hơn do tập quán của người dân địa phương chỉ trồng đào để làm cảnh và không trồng xen với các loại cây cùng họ khác như mơ, mận nên ít có sự thụ phấn chéo giữa các loài nên sự đa dạng về mặt phân tử thấp. Đào phai cánh kép Thanh Hóa và đào phai cánh đơn Sapa có sự khác biệt về mặt di truyền so với các mẫu nguồn gen hoa đào hoa đang có trên thị trường như đào bích, đào hoa tại Gia Lâm, hoa đào tại Nhật Tân và một số tỉnh khác như Hà Giang, Sơn La, Lạng Sơn, Nghệ An.

IV. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thu thập được 42 mẫu hoa đào tại 7 tỉnh thành thuộc miền Bắc và miền Trung Việt Nam. Các mẫu nguồn gen hoa đào có đặc điểm hình thái đặc trưng cho khu vực lấy mẫu. ADN tổng số của các mẫu đào đã được tinh sạch và kiểm tra qua gel agarose. ADN thu được không bị đứt gãy và có độ tinh sạch cao. ADN của 42 mẫu nguồn gen hoa đào thu thập được phân tích đa hình với 9 mồi RAPD. Kết quả khuếch đại vùng đặc hiệu được kiểm tra trên gel agarose. Băng ADN đa hình được tổng hợp, phân tích và xây dựng cây phân loại thông qua phần mềm NTSYS 2.1. 42 mẫu hoa đào nghiên cứu đã chia thành 4 nhóm ở hệ số tương đồng di truyền 0,64. Mẫu hoa đào phai cánh đơn Sapa và mẫu hoa đào phai cánh kép Thanh Hóa thuộc hai nhóm độc lập, không trùng lặp với các mẫu hoa đào thu thập từ nơi khác.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo được hỗ trợ bởi đề tài "Nghiên cứu khai thác, phát triển nguồn gen hoa Đào Sapa, Lào Cai và hoa Đào phai cánh kép Hà Sơn, Thanh Hóa theo hướng sản xuất hàng hóa". Mã số: NVQG-2021/ĐT.18. thuộc Chương trình bảo tồn và sử dụng bền vững nguồn gen đến năm 2025, định hướng đến năm 2030 của Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THM KHẢO

Aladele S., Ariyo O., and R. De Lapena, 2008. Genetic relationships among West Africanokra *(Abelmoschus caillei)* and Asian genotypes *(Abelmoschus esculentus)* using RAPD. *African Journal of Biotechnology,* 7 (10): p. 1426-1431.

Augusto M., Sergio Lobos, Yamil Tarek Jadue, Manuel Toro, Rosa Messina, Manuel Lladser, Daniela Seelenfreund, 1999. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties *(Prunus persica)*. *Plant Molecular Biology Reporter,* 17 (3): 255-267.

Barakat M.N., Rania S. Abdel Fattah, M. Badr and M.G. El-Torky, 2010. *In vitro* mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *Chrysanthemum morifolium*. *African Journal of Agricultural Research,* 5 (8): 5748-757.

Cheng H.Y., W.C. Yang, J.Y. Hsiao, 2001. Genetic diversity

and relationship among peach cultivars based on Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP). *Botanical Bulletin - Academia Sinica Taipei,* 42 (3): 201-206.

Maria J. Aranzana, A. Pineda, Patrick Cos, Patrick Cosson, Elisabeth Dirlewanger, 2003. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the Prunus genome. *Theoretical and Applied Genetics,* 106 (5): 819-825.

Masoodi, K., S. Lone and R. Rasool, 2021. Genomic DNA extraction from the plant leaves using the CTAB method, p. 37-44.

Nagaty, M., S. El-Assal, and M. Rifaat, 2011. Characterization of the genetic diversity of peach cultivars in Taif by RAPD-PCR. *American Journal of Applied Sciences,* 8: 945-952.

Okie W.R., 1998. *Handbook of peach and nectarine varieties: Performance in the southeastern United States and index of names.* U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 808 pages.

Oliveira E.C., A.T. Amaral Júnior, L.S.A. Gonçalves, G.F. Pena, S.P. Freitas Júnior, R.M. Ribeiro and M.G. Pereira, 2010. Optimizing the efficiency of the touchdown technique for detecting inter-simple sequence repeat markers in corn *(Zea mays). Genetic and Molecular Research,* 9 (2): p. 835-842.

Parul Sharma, Rajnish Sharma, Maneet Rana and Himani Sharma, 2015. Molecular characterization of peach *(Prunus persica)* germplasm to study genetic diversity using RAPD molecular markers. *Green Farming,* 6 (6): 1246-1249.

Rani B. and V. Sharma, 2016. A modified CTAB method for quick extraction of genomic DNA from rice seed/grain/ leaves for PCR analysis. *International Journal of Science and Research Methodology*, 4 (4): 254-260.

Rohlf F., 1988. NTSYS-pc - Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc. New York, 2.1.

Tri-Thuc Bui, Rebekka Harting, Susanna A. Braus-Stromeyer, Van-Tuan Tran, Miriam Leonard, Annalena Höfer, Anja Abelmann, Fruzsina Bakti, Oliver Valerius, Rabea Schlüter, Claire E. Stanley, Alinne Ambrósio, Gerhard H. Braus, 2019. Verticillium dahliae transcription factors Som1 and Vta3 control microsclerotia formation and sequential steps of plant root penetration and colonization to induce disease. *New Phytology,* 221 (4): 2138-2159.

Yimiao Xia, Fusheng Chen, Yan Du, Chen Liu, Guanhao Bu, Ying Xin, Boye Liu, 2019. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. *Bioscience Reports,* 39 (2): BSR20182271. doi: 10.1042/ BSR20182271.

Zhongping Cheng, 2007. Genetic characterization of different demes in *Prunus persica* revealed by RAPD markers. *Scientia Horticulturae,* 111 (3): 242-247. https:// doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.020.

Application of molecular markers to determine genetic relationships of peach blossom germplasm collected in Northern and Central regions of Vietnam

Dang Van Dong, Bui Tri Thuc, Nguyen Thi Tinh, Dinh Thi Dinh, Tran Thi Thuy

Abstract

Genetic diversity analysis of plant germplasm is a basic and necessary research for determining the origin of varieties and their genetic relationships with other germplasms. Relying solely on morphological characteristics for this evaluation poses significant challenges, as plants grown under different environmental conditions exhibit different phenotypes. In this study, molecular markers were used to evaluate the genetic diversity of 42 peach blossom accessions collected from seven provinces in Northern and Central Vietnam. The results showed that the peach blossom accessions displayed morphological characteristics specific to their collection areas. The total DNA of the peach samples was purified and examined using agarose gel electrophoresis. The obtained DNA was intact and of high purity. The DNA of the 42 peach blossom accessions was used for diversity analysis using nine RAPD primers. The results of the specific region amplification were verified on the agarose gel. The genetic diversity bands were scored, analyzed, and a classification tree was constructed using NTSYS 2.1 software. The 42 peach blossom accessions were clustered into four groups at a genetic similarity coefficient of 0.64. The single-petal pink peach blossom accession from Sapa and the double-petal pink peach blossom accessions from Thanh Hoa were identified as two independent groups, showing no overlap with other collected peach blossom accessions.

Keywords: Peach blossom, genetic diversity, RAPD

Ngày nhận bài: 27/6/2024
Ngày phản biện: 27/9/2024
Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Minh Nguyệt
Ngày duyệt đăng: 06/11/2024