

## ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG NGUỒN GEN CỦA 30 MẪU GIỐNG SEN (*Nelumbo* spp.) BẰNG CHỈ THỊ RAPD VÀ ISSR

Ngô Thị Hồng Tươi<sup>1</sup>, Phạm Thị Ngọc<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Hồng<sup>1</sup>,  
Hà Thị Lợi<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Huệ<sup>2</sup>, Phạm Văn Cường<sup>3</sup>, Đinh Trường Sơn<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Phòng Đào tạo - Quản lý Khoa học, Trường Đại học Hoa Lư

<sup>4</sup>Viện Sinh học nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: dtson@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 09.12.2022

Ngày chấp nhận đăng: 22.05.2023

### TÓM TẮT

Cây sen (*Nelumbo* spp.) thuộc họ Nelumbonaceae là một cây trồng quan trọng, có nhiều công dụng như: làm cảnh, dinh dưỡng đến giá trị dược liệu và được trồng, sử dụng rộng rãi ở Việt Nam. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá đa dạng di truyền của 30 mẫu giống sen thu thập trong nước bằng chỉ thị phân tử RAPD và ISSR. Nghiên cứu sử dụng 30 mẫu (12 chỉ thị RAPD và 18 chỉ thị ISSR) và phát hiện được 178 locus trong đó có 115 locus đa hình và nhân bản được tổng số 4084 băng vạch sản phẩm PCR. Kết quả phân tích đa dạng di truyền khi kết hợp cả hai chỉ thị RAPD và ISSR cho thấy hệ số tương đồng di truyền của 30 mẫu giống sen dao động từ 0,65-0,93. Ở mức tương đồng di truyền 0,80, 30 mẫu giống sen được tách thành 4 nhóm chính. Kết quả trên cho thấy các mẫu giống sen nghiên cứu có mức độ đa dạng di truyền cao. Ba mươi mẫu giống sen thu thập được sẽ là nguồn gen quý phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cũng như chọn tạo giống sen mới.

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

### Genetic diversity analysis of 30 accessions of lotus (*Nelumbo* spp.) by RAPD and ISSR markers

### ABSTRACT

Lotus (*Nelumbo* spp., Nelumbonaceae family) is an important horticultural plant, with its uses ranging from ornamental, nutritional to medicinal values, and has been widely used in Vietnam. This study aimed to evaluate the genetic diversity of 30 lotus accessions collected in some provinces in Vietnam by using RAPD and ISSR markers. 12 RAPD and 18 ISSR successfully detected 178 loci, among these, 115 were polymorphic loci and 4084 clear and scorable bands were obtained. The similarity coefficient of 30 accessions ranged from 0.65 to 0.93 when combined both RAPD and ISSR markers. At the genetic similarity of 0.80, 30 lotus accessions could be divided into 4 distinct clusters. These results showed that the genetic diversity of 30 collected lotus accessions were very high. The 30 collected accessions are valuable source for the conservation and development of lotus genetic resources as well as for the breeding of new lotus varieties.

Keywords: Lotus, *Nelumbo* spp., ISSR and RAPD markers, genetic diversity.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sen (*Nelumbo* spp.) thuộc họ Nelumbonaceae là thực vật thủy sinh được trồng ở nhiều tỉnh thành trong nước. Cây sen được sử dụng vào nhiều mục đích, từ làm cảnh,

dinh dưỡng đến giá trị dược liệu và có tầm quan trọng đặc biệt về văn hóa và tôn giáo. Trước đây, sen là loài cây mọc hoang dại trong tự nhiên, hiện nay sen không những được trồng để thu lợi hiệu quả kinh tế cao mà còn được trồng làm cảnh trong các cơ quan, trường học (Hoàng Thị

Nga & cs., 2017). So với trồng lúa hoặc một số cây ăn quả khác thì trồng sen cho hiệu quả kinh tế cao hơn. Mặc dù vậy, diện tích trồng sen ở nước ta còn ít. Cho đến nay, nước ta đã nhập nội cũng như chọn tạo được nhiều giống sen giá trị kinh tế cao.

Để phục vụ cho công tác chọn tạo giống sen mới thì việc lựa chọn được các cặp bố mẹ là vô cùng quan trọng. Bên cạnh các tiêu chí lựa chọn dựa trên các kiểu hình mong muốn thì việc xác định được kiểu gen để thiết lập cặp lai luôn được các nhà chọn tạo giống quan tâm bởi sự khác biệt di truyền của bố mẹ ảnh hưởng mạnh mẽ đến kết quả lai (Chung & Liao, 2022). Khoảng cách di truyền giữa bố và mẹ càng lớn thì cơ hội tối đa hóa ưu thế lai ở con lai càng cao (Mafu & cs., 2014).

Có nhiều chỉ thị phân tử đã được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền (Kesawat & Das Kumar, 2009; Nadeem & cs., 2018). Trong số đó, các kỹ thuật phân tích dựa trên nguyên lý PCR như chỉ thị RAPD và ISSR được coi là phương pháp đáng tin cậy để đánh giá đa dạng di truyền trên nhiều đối tượng cây trồng (Wu & cs., 2006; Zakiyah & cs., 2019; Mazumder & cs., 2020). RAPD và ISSR có thể cung cấp thông tin rất hữu ích cho việc lựa chọn vật liệu bố mẹ trong các chương trình nhân giống (Rao & cs., 2007).

Đã có nhiều công trình nghiên cứu trong và ngoài nước về cây sen trong đó có đánh giá nguồn gen phục vụ chọn tạo giống sen mới, nghiên cứu đặc điểm thực vật học, sinh lý, hóa sinh và nhân giống *in vitro* một số giống sen hay các nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền dựa trên các chỉ thị hình thái hoặc chỉ thị phân tử (Han & cs., 2007; Li & cs., 2010; Hoàng Thị Nga & cs., 2017; Nguyễn Thị Quỳnh Trang, 2020; Đặng Thanh Long, 2022). Nghiên cứu này sử dụng chỉ thị RAPD và ISSR để đánh giá đa dạng di truyền của 30 mẫu giống sen mới thu thập được nhằm phục vụ công tác bảo tồn và chọn tạo giống sen mới.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Tổng số 30 mẫu giống sen được thu thập từ các địa phương trong nước (Bảng 1).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

DNA của 30 mẫu giống sen được tách chiết theo quy trình đã được công bố (Masoomi-Aladizgeh & cs., 2019). Độ nguyên vẹn của các mẫu DNA sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên agarose 1,0%. Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu được kiểm tra trên máy quang phổ.

Chỉ thị ISSR (UBC\_ISSR) được thiết kế bởi University of British Columbia, Canada. Các mẫu 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 trên bảng 2 và bảng 4.

Phản ứng PCR có sử dụng bộ kit MyTaq™ mix 2X (Bioline, UK), nồng độ mỗi môi 0,5μm và 10ng DNA khuôn. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy chu trình nhiệt T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) theo chu trình sau: 94°C - 5 phút, (94°C - 30 giây, nhiệt độ gắn môi phù hợp cho từng môi - 30 giây, 72°C - 2 phút) × 40 chu kỳ, 72°C - 10 phút. Trình tự môi và nhiệt độ gắn môi của từng môi được trình bày trên bảng 2 và bảng 4.

Ma trận nhị phân được thiết lập theo nguyên tắc các băng vạch sáng rõ và ổn định được ghi điểm 1, không có băng vạch ghi điểm 0. Sử dụng phương pháp phân cụm UPGMA trong phần mềm NTSYSpc 2.1 để xác định mối quan hệ di truyền của các mẫu giống sen. Hệ số PIC được tính bằng công thức:

$$PIC = 1 - \sum(P_{ij})^2$$

Trong đó:  $P_{ij}$  là tần số xuất hiện của băng  $i$  phát hiện bởi môi  $j$  (Munankarmi & cs., 2018).

Chỉ số sai khác của mỗi cặp môi  $R_p$  (resolving power):

$$R_p = \sum I_b$$

Trong đó:  $I_b$ : giá trị đại diện cho thông tin của đoạn ( $I_b = 1 - (2 \times |0,5 - p|)$ ), trong đó,  $p$ : tỷ lệ các mẫu xuất hiện băng vạch (Prevost & Wilkinson, 1999)).

Phân tích thành phần chính (Principal Component Analysis - PCA) và xác định mối tương quan giữa các ma trận bằng Mantel test được thực hiện trên phần mềm XLSTAT.

**Bảng 1. Danh sách 30 mẫu giống sen  
thu thập từ các địa phương trong nước**

Ký hiệu mẫu giống	Tên gọi khi thu thập	Địa điểm thu thập
S1	Autumn vàng	Hà Nội
S2	Raining love	Hà Nội
S3	Bạch tuyết	Hà Nội
S4	Táo Hồng 1	Hà Nội
S5	Táo đỏ nhọn	Hà Nội
S6	Táo Trắng	Hà Nội
S7	Red flag	Hà Nội
S8	Táo hồng 2	Hà Nội
S9	Supper	Hà Nội
S10	Pink charm	Đồng Tháp
S11	Mini nhật trắng	Hà Nội
S12	Raining love	Hà Nội
S13	Táo hồng	Hà Nội
S14	Raining love	Hà Nội
S15	Lucky pink	Hà Nội
S16	Táo đỏ 2	Hà Nội
S17	R4 sen xanh	Hà Nội
S18	Bạch Liên	Hà Nội
S19	Juwaba	Hà Nội
S20	Cam Nhật	Hà Nội
S21	S 100 trắng (Hoàng Kim)	Hà Nội
S22	R4 sen xanh	Đồng Tháp
S23	Khỉ vàng	Đồng Tháp
S24	Red Flag	Đồng Tháp
S25	Sunset Clouds	Đồng Tháp
S26	Pink lady	Đồng Tháp
S27	Táo đỏ tròn	Đồng Tháp
S28	Mẫu đơn trắng	Đồng Tháp
S29	Red carmine	Hưng Yên
S30	Hồng đơn	Hưng Yên

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đánh giá đa dạng di truyền của 30 mẫu giống sen với chỉ thị RAPD

Sử dụng 30 mẫu DNA từ 30 mẫu giống sen để thực hiện phản ứng PCR với 12 mỗi RAPD nhằm phân tích đánh giá sự đa dạng di truyền. Kết quả điện di cho thấy chỉ có 12 mỗi RAPD

nhân bản được tổng số 1532 băng DNA (sản phẩm PCR), trung bình 127,67 băng/mỗi (dao động từ 87 băng - 186 băng). Chỉ thị OPA-18 nhân bản được tổng số băng lớn nhất (186 băng), chỉ thị OPN-01 cũng nhân bản được số băng lớn, đạt 177 băng trong khi đó chỉ thị APH18 là mỗi nhân bản được số băng ít nhất (87 băng) (Bảng 2).

Đánh giá đa dạng nguồn gen của 30 mẫu giống sen (*Nelumbo spp.*) bằng chỉ thị RADP và ISSR

**Bảng 2. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các môi RAPD trên 30 mẫu giống sen**

Tên môi	Trình tự môi	Tm (°C)	Tổng số locus phát hiện được	Tổng số locus đa hình	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu giống	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (RP)	Hệ số PIC
APD18	GAGAGCCAAC	32	6	4	66,67	136	4,39	1,20	0,16
APG05	CTGAGACGGA	32	7	5	71,43	165	5,32	3,00	0,27
APH18	GAATCGGCCA	32	5	4	80,00	87	2,81	1,93	0,28
OPA03	AGTCAGCCAC	32	5	4	80,00	115	3,71	1,67	0,25
OPA18	AGGTGACCGT	32	9	7	77,78	186	6,00	3,73	0,26
OPA05	AGGGGTCTTG	32	5	4	80,00	101	3,26	1,53	0,24
OPC01	TTCGAGCCAG	32	7	6	85,71	142	4,58	1,60	0,18
OPC03	GGGGTCTTT	32	6	5	83,33	126	4,06	1,87	0,22
OPN01	CTCACGTTGG	32	8	6	75,00	177	5,71	2,33	0,19
OPS05	TTTGGGGCCT	32	4	3	85,00	95	3,06	1,40	0,24
OPS08	TTCAGGGTGG	32	7	7	100,00	100	3,23	2,80	0,28
OPS10	ACCGTTCCAG	32	6	5	83,33	102	3,29	2,27	0,25
Tổng			75	60		1532			
Trung bình/môi			6,25	5,00	80,69	127,67	4,12	2,11	0,24
Trung bình/mẫu			2,50	2,00		51,07			

Mười hai mỗi RAPD nhân bản được 75 locus, trong đó 60 locus là đa hình, chiếm 80,69%. Số lượng locus đa hình/mỗi trung bình là 6,25. Mỗi nhân bản được số locus đa hình cao nhất (7 locus) là OPA18 và OPS08 trong khi đó mỗi OPS05 chỉ nhân bản được 3 locus đa hình (Bảng 2). Tỷ lệ locus đa hình mà các chỉ thị RAPD phát hiện được trong nghiên cứu này (80,69%) là thấp hơn khi so với nghiên cứu của Li & cs. (2010) khi họ nghiên cứu sự đa dạng di truyền của 87 mẫu giống thuộc chi Sen (*Nelumbo*) bằng chỉ thị RAPD và phát hiện tỷ lệ locus đa hình là 96,4% (Li & cs., 2010). Tương tự như vậy, Han & cs. (2007) đã công bố tỷ lệ đa hình của các locus đạt 85,38% khi họ sử dụng 19 mỗi RAPD để phân tích đa dạng di truyền của 330 mẫu giống sen (*Nelumbo nucifera*) (Han & cs., 2007).

Hệ số PIC thường được sử dụng để xác định khả năng phân tích đa hình của mỗi (Guo & Elston, 1999). Giá trị PIC thấp nhất và cao nhất được tìm thấy ở mỗi APD-18 (0,16) và OPS08 (0,28), giá trị PIC trung bình là 0,24 (Bảng 2). Giá trị PIC thấp cho thấy khả năng phát hiện đa hình của các chỉ thị RAPD với 30 mẫu giống sen nghiên cứu là ở mức trung bình. Mặc dù vậy, cũng có một số chỉ thị RAPD cho hệ số PIC thấp đã được phát hiện khi nghiên cứu sự đa dạng di truyền của 87 mẫu giống thuộc hai loài sen là *N. nucifera* và *N. lutea* (hệ số PIC trung bình của 11 chỉ thị RAPD là 0,18) (Li & cs., 2010).

Theo Prevost & Wilkinson (1999), chỉ số sai khác giữa các cặp mỗi (Rp) cho thấy mối tương quan giữa kiểu gen và chỉ thị DNA, chỉ số Rp càng cao thì khả năng phân tích đa dạng di truyền càng hiệu quả (Prevost & Wilkinson, 1999). Chỉ số Rp thấp nhất được quan sát thấy ở mỗi APD-18 (1,2) trong khi đó mỗi OPA18 cho chỉ số Rp cao nhất (3,73).

Hệ số tương đồng di truyền thể hiện 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 giữa 30 mẫu giống sen được phân tích bằng chỉ thị RAPD dao động từ 0,56 (S\_20 vs S\_9, S\_22 vs S\_7) đến 0,93 (S\_30 vs S\_27)

(Bảng 3). Kết quả trên chứng tỏ 30 mẫu giống sen thu thập được là có độ đa dạng di truyền cao. Kanawapee & cs. (2011) khi phân tích 30 kiểu gen lúa bằng chỉ thị RAPD đã nhận thấy hệ số tương đồng di truyền của các mẫu giống dao động từ 0,64 đến 0,94 (Kanawapee & cs., 2011). Han & cs. (2007) khi phân tích các mẫu giống sen cũng phát hiện sự đa dạng di truyền trong các mẫu giống gen dao động từ 0,654 tới 0,956. Như vậy, kết quả nghiên cứu về hệ số tương đồng di truyền của 30 mẫu giống sen của nghiên cứu này là khá tương đồng với hai nghiên cứu trên.

Từ hệ số tương đồng di truyền giữa 30 mẫu giống sen chúng tôi sử dụng phương pháp phân cụm UPGMA trong phần mềm NTSYSpc 2.1 để lập biểu đồ mối quan hệ di truyền giữa 30 mẫu giống sen được phân tích bằng các chỉ thị RAPD (Hình 1).

Kết quả trên hình 1 cho thấy: Tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,76 (76%), 30 mẫu giống sen được phân thành 5 nhóm chính. Trong khi nhóm I có tới 20 mẫu giống thì các nhóm II chỉ có 4 mẫu giống, nhóm III có 3 mẫu giống, nhóm IV có 1 mẫu giống và nhóm V có 2 mẫu giống. Dựa trên sơ đồ mối quan hệ di truyền, về tổng thể thì mẫu giống S\_20 là mẫu giống có khoảng cách di truyền xa nhất so với các mẫu giống còn lại và hai mẫu giống có mối quan hệ di truyền gần nhất là S\_27 và S\_30 (Hình 1).

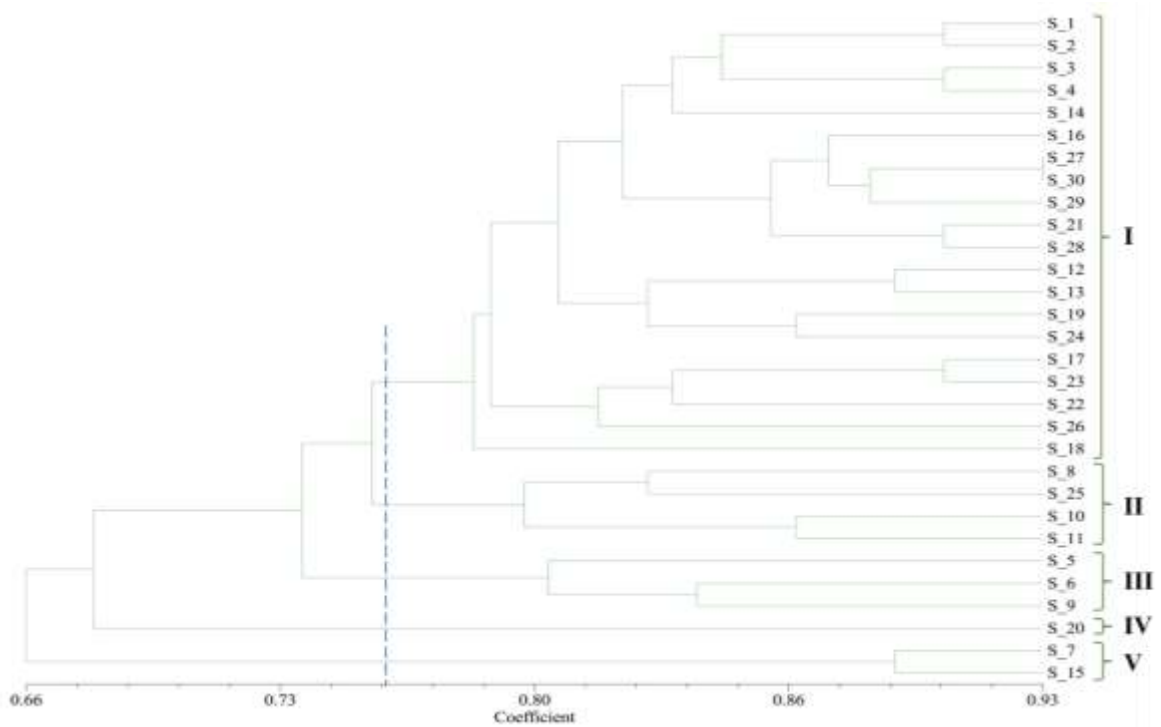
### 3.2. Đánh giá đa dạng di truyền của 30 mẫu giống sen với chỉ thị ISSR

Trong nghiên cứu này, 18 chỉ thị ISSR đã nhân bản được tổng số 2552 băng vạch sản phẩm PCR, số sản phẩm/mỗi dao động từ 79 (UBC836) tới 265 (UBC826) sản phẩm và đạt trung bình 141,78 sản phẩm/mỗi. Mười tám chỉ thị ISSR đã nhân bản được 103 locus, trong đó 55 locus là đa hình, chiếm 52,34%. Số lượng locus đa hình trung bình là 3,06 locus/mỗi. Mỗi UBC810 phát hiện được 4 locus nhưng toàn bộ các locus là đơn hình trong khi đó mỗi UBC836 nhân bản được nhiều locus đa hình nhất (7 locus) (Bảng 4).

Đánh giá đa dạng nguồn gen của 30 mẫu giống sen (*Nelumbo spp.*) bằng chỉ thị RAPD và ISSR

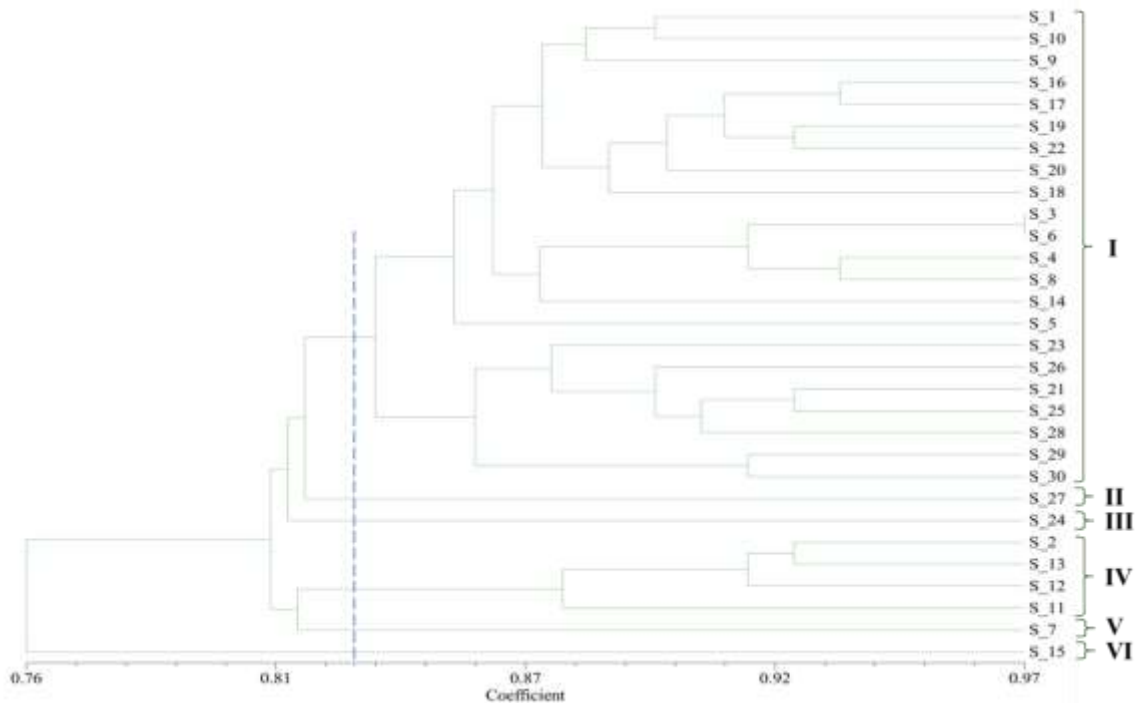
**Bảng 3. Hệ số tương đồng di truyền của 30 mẫu giống sen được xác định bằng chỉ thị RAPD (phía dưới đường chéo) và ISSR (phía trên đường chéo) tính theo hệ số tương đồng của Sokal & Michener**

ISSR RAPD	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_10	S_11	S_12	S_13	S_14	S_15	S_16	S_17	S_18	S_19	S_20	S_21	S_22	S_23	S_24	S_25	S_26	S_27	S_28	S_29	S_30
S_1		0,90	0,84	0,89	0,83	0,85	0,84	0,86	0,86	0,89	0,85	0,83	0,84	0,83	0,76	0,89	0,86	0,88	0,87	0,87	0,82	0,89	0,80	0,80	0,87	0,81	0,81	0,80	0,79	0,82
S_2	0,91		0,83	0,83	0,83	0,82	0,84	0,81	0,83	0,85	0,89	0,90	0,92	0,86	0,76	0,89	0,84	0,84	0,85	0,83	0,80	0,85	0,78	0,80	0,80	0,81	0,77	0,80	0,73	0,76
S_3	0,87	0,83		0,91	0,85	<b>0,97</b>	0,81	0,92	0,88	0,87	0,83	0,79	0,84	0,88	0,76	0,87	0,88	0,84	0,89	0,85	0,85	0,85	0,80	0,78	0,85	0,83	0,81	0,83	0,83	0,82
S_4	0,83	0,87	0,91		0,84	0,90	0,85	0,93	0,85	0,84	0,81	0,82	0,82	0,85	0,79	0,86	0,85	0,83	0,90	0,84	0,86	0,84	0,81	0,79	0,88	0,82	0,80	0,84	0,83	0,83
S_5	0,71	0,75	0,73	0,75		0,84	0,82	0,83	0,82	0,83	0,79	0,80	0,83	0,85	0,83	0,90	0,83	0,87	0,88	0,84	0,84	0,86	0,81	0,84	0,84	0,80	0,80	0,84	0,83	0,81
S_6	0,87	0,80	0,87	0,77	0,81		0,83	0,91	0,89	0,88	0,84	0,80	0,85	0,87	0,75	0,88	0,91	0,85	0,90	0,84	0,86	0,88	0,79	0,81	0,86	0,82	0,80	0,83	0,82	0,81
S_7	0,69	0,73	0,67	0,68	0,75	0,69		0,83	0,81	0,78	0,80	0,83	0,81	0,81	0,82	0,87	0,83	0,81	0,85	0,83	0,82	0,83	0,74	0,80	0,82	0,77	0,77	0,80	0,75	0,80
S_8	0,79	0,72	0,81	0,77	0,73	0,76	0,69		0,83	0,82	0,80	0,79	0,81	0,86	0,76	0,85	0,84	0,84	0,89	0,83	0,85	0,83	0,83	0,82	0,87	0,83	0,79	0,83	0,86	0,82
S_9	0,84	0,77	0,81	0,75	0,79	0,84	0,72	0,76		0,89	0,85	0,81	0,86	0,86	0,78	0,87	0,86	0,86	0,83	0,83	0,82	0,85	0,74	0,78	0,83	0,81	0,84	0,82	0,79	0,82
S_10	0,80	0,73	0,77	0,76	0,67	0,72	0,60	0,77	0,77		0,88	0,78	0,83	0,82	0,73	0,88	0,91	0,85	0,86	0,84	0,83	0,88	0,77	0,81	0,83	0,80	0,80	0,81	0,78	0,81
S_11	0,88	0,79	0,80	0,79	0,64	0,77	0,63	0,77	0,77	0,87		0,83	0,89	0,82	0,69	0,86	0,87	0,87	0,86	0,83	0,81	0,86	0,81	0,77	0,81	0,83	0,78	0,81	0,72	0,77
S_12	0,81	0,85	0,79	0,77	0,81	0,79	0,75	0,73	0,73	0,69	0,69		0,92	0,86	0,78	0,83	0,79	0,84	0,80	0,78	0,78	0,78	0,76	0,78	0,76	0,81	0,77	0,78	0,75	0,76
S_13	0,84	0,85	0,81	0,80	0,76	0,81	0,67	0,68	0,76	0,67	0,75	0,89		0,88	0,78	0,87	0,83	0,86	0,83	0,82	0,78	0,82	0,76	0,80	0,78	0,81	0,79	0,80	0,75	0,76
S_14	0,84	0,83	0,81	0,85	0,68	0,76	0,72	0,76	0,73	0,75	0,83	0,79	0,79		0,80	0,89	0,86	0,84	0,83	0,83	0,83	0,82	0,76	0,78	0,82	0,84	0,81	0,83	0,83	0,82
S_15	0,69	0,73	0,72	0,71	0,77	0,72	0,89	0,75	0,75	0,65	0,65	0,75	0,67	0,69		0,81	0,74	0,76	0,77	0,81	0,77	0,75	<b>0,67</b>	0,75	0,73	0,70	0,76	0,77	0,78	0,79
S_16	0,87	0,85	0,87	0,85	0,71	0,81	0,67	0,73	0,73	0,75	0,80	0,84	0,87	0,81	0,69		0,93	0,91	0,92	0,90	0,88	0,90	0,83	0,86	0,88	0,83	0,83	0,86	0,83	0,84
S_17	0,77	0,81	0,77	0,79	0,69	0,72	0,65	0,72	0,67	0,76	0,79	0,85	0,83	0,80	0,65	0,85		0,88	0,89	0,87	0,89	0,91	0,80	0,83	0,89	0,86	0,81	0,83	0,81	0,83
S_18	0,75	0,81	0,77	0,79	0,69	0,75	0,60	0,67	0,67	0,73	0,73	0,77	0,80	0,72	0,63	0,80	0,84		0,89	0,85	0,82	0,87	0,82	0,83	0,85	0,83	0,83	0,85	0,83	0,83
S_19	0,81	0,83	0,76	0,80	0,71	0,76	0,59	0,73	0,65	0,72	0,80	0,79	0,84	0,81	0,61	0,84	0,80	0,83		0,88	0,90	0,92	0,86	0,84	0,90	0,85	0,82	0,90	0,83	0,84
S_20	0,67	0,73	0,67	0,73	0,72	0,67	0,57	0,67	0,56	0,57	0,60	0,72	0,69	0,64	0,60	0,67	0,71	0,71	0,75		0,86	0,92	0,83	0,83	0,88	0,83	0,87	0,84	0,82	0,88
S_21	0,87	0,83	0,79	0,77	0,65	0,79	0,61	0,76	0,73	0,72	0,80	0,76	0,79	0,84	0,59	0,87	0,80	0,80	0,87	0,67		0,90	0,84	0,84	0,92	0,87	0,82	0,90	0,87	0,83
S_22	0,79	0,75	0,79	0,75	0,60	0,73	<b>0,56</b>	0,73	0,71	0,75	0,85	0,71	0,73	0,81	0,59	0,79	0,83	0,72	0,81	0,64	0,81		0,86	0,84	0,92	0,85	0,83	0,88	0,82	0,83
S_23	0,76	0,83	0,73	0,80	0,65	0,65	0,59	0,71	0,65	0,75	0,77	0,76	0,73	0,81	0,61	0,79	0,91	0,77	0,79	0,72	0,81	0,84		0,81	0,88	0,87	0,78	0,88	0,87	0,81
S_24	0,81	0,80	0,81	0,83	0,76	0,81	0,61	0,76	0,71	0,75	0,75	0,84	0,84	0,81	0,61	0,84	0,80	0,80	0,87	0,72	0,81	0,76	0,73		0,88	0,80	0,78	0,83	0,82	0,79
S_25	0,75	0,71	0,80	0,81	0,67	0,75	0,57	0,83	0,72	0,84	0,79	0,67	0,69	0,75	0,63	0,77	0,71	0,76	0,77	0,60	0,77	0,75	0,69	0,83		0,91	0,85	0,90	0,87	0,86
S_26	0,77	0,76	0,80	0,79	0,69	0,72	0,65	0,83	0,69	0,73	0,73	0,77	0,72	0,83	0,65	0,77	0,81	0,73	0,80	0,73	0,85	0,80	0,83	0,80	0,79		0,84	0,89	0,84	0,83
S_27	0,79	0,85	0,81	0,83	0,68	0,73	0,61	0,65	0,71	0,72	0,75	0,73	0,79	0,79	0,67	0,84	0,75	0,77	0,81	0,67	0,81	0,73	0,79	0,73	0,75	0,75		0,82	0,83	0,87
S_28	0,83	0,79	0,80	0,79	0,67	0,77	0,57	0,75	0,77	0,76	0,79	0,72	0,77	0,83	0,60	0,85	0,76	0,73	0,83	0,65	0,91	0,80	0,80	0,80	0,79	0,84	0,85		0,89	0,86
S_29	0,80	0,79	0,77	0,79	0,69	0,77	0,60	0,72	0,69	0,73	0,76	0,72	0,75	0,77	0,65	0,88	0,76	0,79	0,85	0,71	0,88	0,77	0,77	0,80	0,79	0,81	0,85	0,89		0,91
S_30	0,83	0,87	0,85	0,87	0,72	0,77	0,68	0,69	0,72	0,73	0,79	0,77	0,80	0,83	0,73	0,91	0,79	0,81	0,85	0,71	0,85	0,77	0,80	0,77	0,73	0,79	<b>0,93</b>	0,87	0,92	



Ghi chú: Tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,76 (vị trí nét đứt), 30 mẫu giống sen được phân thành 5 nhóm (từ I đến V).

**Hình 1.** Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 30 mẫu giống sen được phân tích bởi chỉ thị RAPD



Ghi chú: Tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,83 (vị trí nét đứt), 30 mẫu giống sen được phân thành 6 nhóm (từ I đến VI).

**Hình 2.** Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 30 mẫu giống sen được phân tích bởi chỉ thị ISSR

Đánh giá đa dạng nguồn gen của 30 mẫu giống sen (*Nelumbo spp.*) bằng chỉ thị RADP và ISSR

**Bảng 4. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các môi ISSR trên 30 mẫu giống sen**

Tên môi	Trình tự môi	Tm (°C)	Số locus phát hiện được	Số locus đa hình	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu giống	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (RP)	Hệ số PIC
ISSR1	CAGCAGCAGCAGCAG	51,6	5	3	60,00	109	3,63	1,80	0,25
ISSR13	CAGCACACACACACACA	57,3	6	3	50,00	171	5,70	0,60	0,08
ISSR3	AGAGAGAGAGAGAGATC	53,9	6	6	100,00	149	4,97	2,07	0,26
ISSR4	ACACACACACACACT	50,0	6	3	50,00	147	4,90	0,87	0,12
ISSR5	AGAGAGAGAGAGAGGGTG	57,3	4	1	25,00	117	3,90	0,20	0,05
ISSR6	CACACACACACACARG	53,9	7	6	85,71	145	4,83	2,07	0,23
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52,4	5	5	100,00	95	3,17	2,47	0,30
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50,0	4	0	0,00	120	4,00	0,00	0,00
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	52,4	9	3	33,33	262	8,73	0,53	0,05
UBC820	GTGTGTGTGTGTGTGTT	50,0	5	4	80,00	125	4,17	1,67	0,20
UBC826	ACACACACACACACC	52,4	9	2	22,22	265	8,83	0,33	0,03
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	53,9	8	3	37,50	209	6,97	2,07	0,16
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGGYA	51,6	7	7	100,00	79	2,63	3,67	0,36
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG	53,9	6	3	50,00	141	4,70	2,60	0,24
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	47,0	4	1	25,00	109	3,63	0,73	0,12
UBC888	BDBCACACACACACA	47,6	5	2	40,00	131	4,37	1,27	0,17
UBC889	DBDACACACACACAC	47,6	3	1	33,33	89	2,97	0,07	0,01
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTG	47,6	4	2	50,00	89	2,97	1,00	0,19
Tổng			103	55		2552			
Trung bình/môi			5,72	3,06	52,34	141,78	4,73	1,33	0,16
Trung bình/mẫu			3,43	1,83		85,07			

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, Y có thể là nucleotide C/T, 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).



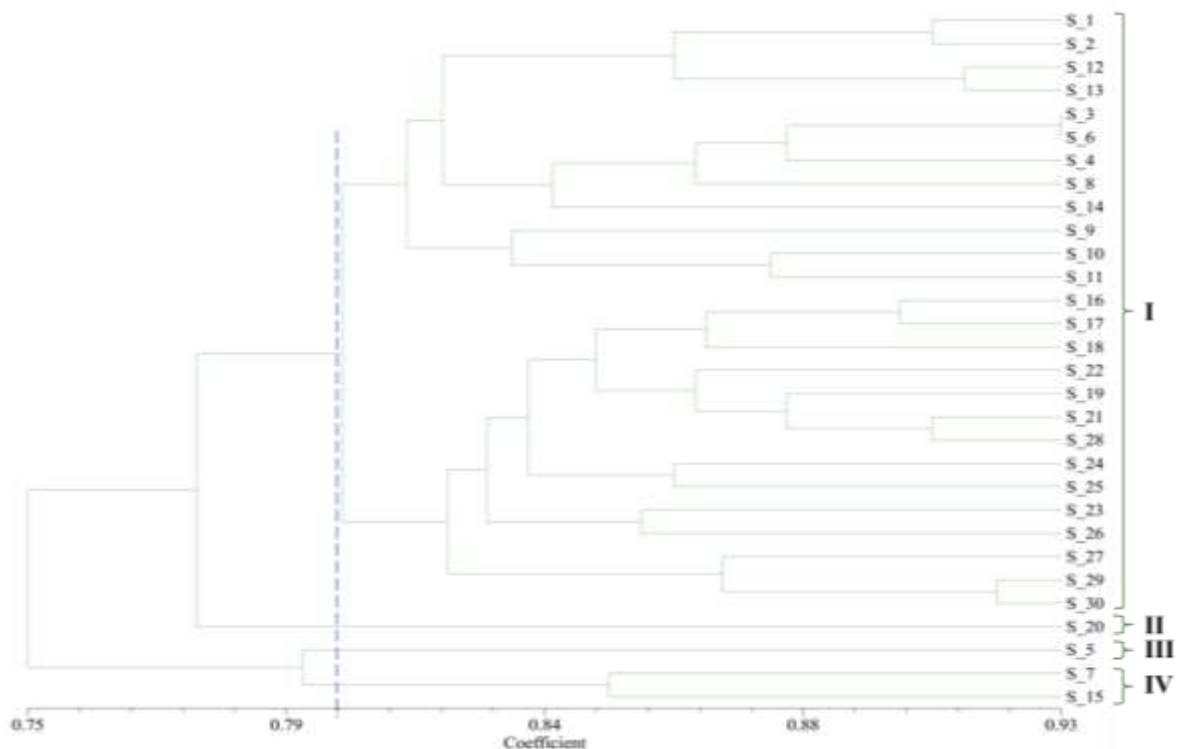
Hệ số tương đồng di truyền giữa 30 mẫu giống sen được phân tích bằng ISSR dao động từ 0,67 (S<sub>15</sub> vs S<sub>23</sub>) đến 0,97 (S<sub>3</sub> vs S<sub>6</sub>) (Bảng 3). Kết quả phân nhóm bởi phương pháp UPGMA cho thấy mối quan hệ di truyền giữa 30 mẫu giống sen là khá khác biệt. Ở mức độ đa dạng di truyền trung bình là 0,80 (vị trí nét đứt), 30 mẫu giống sen được phân thành 6 nhóm (từ I đến VI). Nhóm I có 22 mẫu giống, nhóm II có 1 mẫu giống (S<sub>27</sub>), nhóm III có 1 mẫu giống (S<sub>24</sub>), nhóm IV có 4 mẫu giống, nhóm V có 1 mẫu giống (S<sub>7</sub>) và nhóm VI cũng chỉ có 1 mẫu giống (S<sub>15</sub>) (Hình 2).

### 3.1.4. Kết hợp chỉ thị ISSR và RAPD trong đánh giá đa dạng di truyền 30 mẫu giống sen

Khi kết hợp hai chỉ thị RAPD và ISSR, tổng số locus phát hiện được là 178 locus (75 với RAPD và 103 với ISSR) trong đó có 115 locus đa hình và nhân bản được tổng số 4084 băng

vạch sản phẩm PCR (1532 với RAPD và 2552 với ISSR) (Bảng 2, Bảng 4). Kết quả xác định sơ đồ tương đồng di truyền của các mẫu giống sen cho thấy, ở mức độ tương đồng di truyền trung bình là 0,80 (tương ứng với 80%), 30 mẫu giống sen được chia thành 4 nhóm chính trong đó nhóm I có tới 26 mẫu giống, nhóm II và nhóm III chỉ có 1 mẫu giống và nhóm IV có hai mẫu giống (Hình 3).

Khi được phân tích bằng chỉ thị RAPD hoặc ISSR hoặc kết hợp cả hai chỉ thị RAPD và ISSR, 30 mẫu giống sen được phân thành các nhóm khác nhau (Hình 1, 2, 3). Do có sự khác nhau về sơ đồ tương đồng di truyền khi phân tích bằng hai chỉ thị RAPD và ISSR riêng rẽ hay kết hợp nên việc phân tích để tìm được mối tương quan giữa các chỉ thị là cần thiết. Để kiểm tra mức độ tương quan giữa các ma trận, chúng tôi sử dụng ma trận hệ số tương đồng di truyền để thực hiện phân tích tương quan giữa các ma trận bằng kiểm định Mantel.

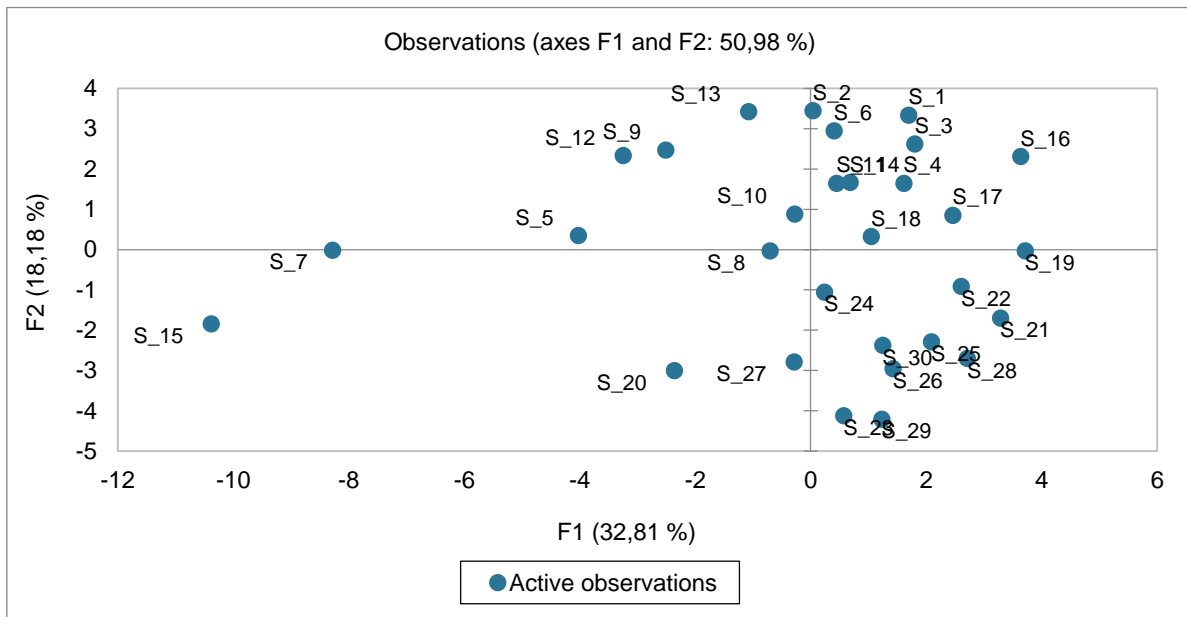


Tại giá trị hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,80 (vị trí nét đứt), 30 mẫu giống sen được phân thành 4 nhóm (từ I đến IV).

**Hình 3. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 30 mẫu giống sen được phân tích bởi kết hợp hai chỉ thị RAPD và ISSR**

**Bảng 5. Kết quả phân tích tương quan giữa các ma trận hệ số tương đồng bằng kiểm định Mantel**

Cặp ma trận so sánh	Hệ số tương quan (r)	P-value (Two-tailed)	Alpha
RAPD vs ISSR	0,343	< 0,0001	0,05
RAPD vs kết hợp RAPD + ISSR	0,848	< 0,0001	0,05
ISSR vs kết hợp RAPD + ISSR	0,789	< 0,0001	0,05



**Hình 4. Phân tích thành phần chính (PCA analysis) của 30 mẫu giống sen dựa trên kết hợp giữa hai chỉ thị RAPD và ISSR**

Kết quả cho thấy hệ số tương quan (r) giữa hai ma trận RAPD và ISSR là 0,343 (P-value < 0,0001). Kết quả này cho thấy có sự tương quan rất ít giữa hai ma trận tương đồng khi được phân tích bởi chỉ thị RAPD và ISSR. Ma trận tương đồng di truyền của chỉ thị RAPD cho mỗi tương quan rất cao với ma trận kết hợp giữa RAPD-ISSR (r = 0,848, P-value < 0,0001). Sự tương quan giữa chỉ thị ISSR so với kết hợp giữa RAPD-ISSR cũng khá cao (r = 0,789, P-value < 0,0001) (Bảng 5). Kết quả trên cho thấy hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của 30 mẫu giống sen của chỉ thị RAPD là cao hơn so với ISSR.

Kết quả so sánh các tiêu chí/chỉ số trên bảng 2 và bảng 4 cho thấy năng lực phân tích đa dạng di truyền của chỉ thị RAPD cao hơn ISSR và được thể hiện rõ trên một số tiêu chí như: Trung bình số locus nhân bản được/mỗi (6,25 vs

5,72), số locus đa hình (60 vs 55), số locus đa hình/mỗi (5,00 vs 3,06), Rp/mỗi (2,11 vs 1,33), hệ số PIC/mỗi (0,24 vs 0,16). Sự tương quan thấp giữa hai nhóm chỉ thị RAPD và ISSR chỉ ra rằng có thể do hai nhóm nhân bản được các DNA khác nhau và/hoặc vùng DNA mục tiêu của các chỉ thị nằm trên các khu vực khác nhau của bộ gen (Lalhruaitluanga & Prasad, 2009). Mỗi tương quan thấp giữa hai chỉ thị ISSR và RAPD cũng được mô tả ở cây blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) (Souframanien & Gopalakrishna, 2004), bồ công anh (*Lactuca indica* L.) (Thin Thanh Thi Pham & cs., 2022), bát giác liên (*Dysosma tonkinense*) (Ngoc Khanh Pham & cs., 2021) và ở cây *Triticum aestivum* (Khaled & cs., 2015). Bên cạnh đó, hiệu quả phân tích đa dạng di truyền bởi chỉ thị ISSR tốt hơn so với chỉ thị RAPD cũng đã được ghi nhận (Galván & cs., 2003).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Để có thêm một cách nhìn khác về sự đa dạng di truyền của 30 mẫu giống sen, chúng tôi sử dụng hệ số tương đồng di truyền được phân tích bởi sự kết hợp của hai chỉ thị RAPD và ISSR để tiến hành phân tích thành phần chính (PCA) nhằm xác định mối quan hệ di truyền giữa 30 mẫu giống sen. Trong đồ thị phân tán PCA, hai thành phần chính đầu tiên lần lượt chiếm 18,18% và 32,81% (tổng số 50,98%) (Hình 4). Tương tự với kết quả trên Hình 3, mẫu giống S<sub>15</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>5</sub> và S<sub>20</sub> có khoảng cách khá xa so với 26 mẫu giống còn lại (Hình 4). Hơn nữa, phân tích PCA cho phép chúng ta có góc nhìn trực quan hơn về khoảng cách lớn giữa các mẫu giống với nhau. Kết quả này một lần nữa cho thấy 30 mẫu giống sen rất đa dạng về mặt di truyền.

## 4. KẾT LUẬN

Đã xác định được sự đa dạng di truyền của 30 mẫu giống sen thu thập được ở các địa phương trong nước bằng 30 chỉ thị phân tử (12 chỉ thị RAPD và 18 chỉ thị ISSR). Các chỉ thị đã nhân bản được tổng số 4084 băng vạch sản phẩm PCR, 178 locus trong đó có 115 locus đa hình. Ở nghiên cứu này, năng lực phân tích đa dạng di truyền của chỉ thị RAPD là cao hơn so với chỉ thị ISSR. Kết quả phân tích đa dạng di truyền khi kết hợp cả hai chỉ thị RAPD và ISSR cho thấy hệ số tương đồng di truyền của 30 mẫu giống sen dao động từ 0,65-0,93. Ở mức tương đồng di truyền trung bình là 0,80, 30 mẫu giống sen được tách thành 4 nhóm chính. Kết quả trên cho thấy 30 mẫu giống sen nghiên cứu có mức độ đa dạng di truyền cao. Các mẫu giống sen thu thập được có thể được sử dụng cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cũng như chọn tạo giống sen mới.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí (đề tài T2022-01-05) và cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu, Bảo tồn và Phát triển nguồn gen cây sen Việt Nam đã cung cấp một số nguồn vật liệu để thực hiện công trình này.

- Chung P.Y. & Liao C. T. (2022). Selection of parental lines for plant breeding via genomic prediction. *Front Plant Sci.* 13: 934767.
- Đặng Thanh Long (2022). Nghiên cứu đa dạng di truyền các giống sen (*Nelumbo nucifera*) trồng tại Huế bằng kỹ thuật DNA barcode và đánh giá hoạt tính kháng ung thư của một số hoạt chất chiết tách từ hạt. Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng.
- Galván M.Z., Bornet B., Balatti P.A. & Branchard M. (2003). Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica.* 132(3): 297-301.
- Guo X. & Elston R. (1999). Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Human heredity.* 49: 112-8.
- 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.
- Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Ngọc Huệ & Lã Tuấn Nghĩa (2017). Nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen cây sen (*Nelumbo nucifera* Geartn.) bảo tồn tại trung tâm tài nguyên thực vật. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam.* 8(8).
- Kanawapee N., Sanitchon J., Srihaban P. & Theerakulpisut P. (2011). Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology.* 14(6): 2-2.
- Kesawat M.S. & Das Kumar B. (2009). Molecular markers: It's application in crop improvement, *Journal of Crop Science and Biotechnology.* 12(4): 169-181.
- Khaled A.G.A., Motawea M.H. & Said A.A. (2015). Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 13(2): 243-252.
- Lalhrui luanga H. & Prasad M.N.V. (2009). Comparative results of RAPD and ISSR markers for genetic diversity assessment in *Melocanna baccifera* Roxb. growing in Mizoram State of India. *African Journal of Biotechnology.* 8(22): 6053-6062.
- 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.
- 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.
- 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)*.
- 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.
- 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.
- Nadeem M.A., Nawaz M.A., Shahid M.Q., Dođan Y., Comertpay G., Yýldýz M., Hatipođlu R., Ahmad F., Alsaleh, A., Labhane N., Özkan H., Chung G. & Baloch F.S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2): 261-285.
- Nguyễn Thị Quỳnh Trang (2020). Nghiên cứu đặc điểm thực vật học, sinh lý, hóa sinh và nhân giống in vitro một số giống sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) trồng ở thừa Thiên Huế. Luận án Tiến sĩ, Trường đại học khoa học - Đại học Huế.
- Pham N.K., Ninh P.T., Pham H.T., Nguyen N.Q., Do N.H. & Dinh S.T. (2021). High genetic diversity of *Dyosma tonkinense* revealed by ISSR and RAPD markers. *Asian Journal of Plant Sciences*. 20: 637-647.
- Pham T.T.T., Tran H.T.T., Cao B.P., Ninh P.T., Do H.N. & Dinh S. T. (2022). High genetic diversity of 16 Indian lettuce (*Lactuca indica* L.) accessions from Vietnam. *Pak J Biol Sci*. 25(3): 201-209.
- 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.
- 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.
- Souframanien J. & Gopalakrishna T. (2004). A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet*. 109(8): 1687-93.
- 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): 716-9.
- 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.