

# Đánh giá đa dạng di truyền một số dòng, giống hoa chi Lan Huệ (*Hippeastrum herb.*) bằng chỉ thị phân tử RAPD

Nguyễn Hạnh Hoa<sup>1</sup>, Bùi Thị Thu Hương<sup>1,\*</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>2</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Đại học Nông nghiệp Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học

Nhận ngày 04 tháng 10 năm 2013

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 10 năm 2013; chấp nhận đăng ngày 07 tháng 3 năm 2014

**Tóm tắt.** Để thành công cho một chương trình phát triển giống, việc khảo sát, đánh giá về kiểu hình cũng như kiểu gen là cần thiết nhằm làm tăng hiệu quả cho quá trình chọn tạo giống mới. Nguồn gen chi Lan Huệ được thu thập từ một số nơi trồng phổ biến tại một số vùng trồng hoa truyền thống và xuất hiện đơn lẻ hay hoang dại ở Việt nam. Nghiên cứu trình bày kết quả phân tích đa dạng nguồn gen ở mức phân tử của 10 giống/loài chi Lan Huệ (*Hippeastrum Herb.*). 15 chỉ thị RAPD được sử dụng trong phản ứng PCR với các mẫu nghiên cứu cho 594 phân đoạn, trong đó có 504 phân đoạn đa hình, đạt tỷ lệ 84,4%. Số liệu nhị phân các phân đoạn ADN được xử lý bằng phần mềm NTSYS 2.02h. Kết quả phân tích cho thấy hệ số đa dạng di truyền (PIC) thu được của các môi khá cao đạt từ 0,6928 đến 0,8587, trung bình đạt 0,806. Phân tích số liệu thu được cũng cho thấy sự đa dạng lớn trong tập đoàn nguồn gen đã thu thập, với hệ số tương đồng di truyền từ 0,2 đến 0,76. Những kết quả này bước đầu cung cấp những dẫn liệu cần thiết phục vụ cho công tác chọn tạo giống mới chi Lan Huệ.

*Từ khóa:* Chỉ thị phân tử, đa dạng di truyền, *Hippeastrum Herb*, Lan Huệ, RAPD.

## 1. Mở đầu

Hiện nay, trên Thế giới, chi Lan Huệ (*Hippeastrum Herb.*) có khoảng 90 loài và 600 dạng lai [1]. Nhiều loài thuộc chi này được trồng làm cảnh do chúng có hoa to, đẹp, đa dạng về màu sắc, có thể sử dụng dưới dạng hoa cắt cành, trồng chậu hoặc trồng thảm [2].

Ở nước ta, theo công bố gần đây chi có 2 loài thuộc chi *Hippeastrum*, thứ nhất là loài *Hippeastrum equestre* (Aiton) Herb., cây

nguyên sản ở Nam Mỹ, ở Việt Nam có gọi là Lan Huệ hay Loa kèn đỏ bởi các dòng giống chủ yếu có hoa màu đỏ; thứ hai là loài *Hippeastrum reticulatum* (Aiton) Herb., cây nguyên sản ở Braxin, ở Việt Nam gọi là Lan Huệ Mạng. Cả 2 loài Lan Huệ được nhập trồng làm cảnh ở nhiều nơi của nước ta đều có khả năng thích nghi cao, cho hoa đẹp và thường nở vào mùa xuân-hè, nhưng chưa thấy hình thành quả. Lan Huệ được trồng chủ yếu trong vườn, trong chậu và nhân giống bằng thân hành con [3, 4]. Do chủ yếu được nhân giống vô tính từ thân hành nên bộ giống cây hoa thuộc chi

\* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-983230802  
E-mail: btthuonhp@gmail.com

*Hippeastrum* ở Việt Nam còn khá nghèo nàn về màu sắc. Hơn nữa, các dòng giống Lan Huệ ở Việt Nam trong điều kiện tự nhiên thì thời gian ra hoa của chúng chưa mang lại giá trị kinh tế. Lai hữu tính là một trong những phương pháp hiệu quả tạo ra những dòng giống Lan Huệ mới có màu sắc hoa khác biệt và thời gian ra hoa khác nhau để đáp ứng nhu cầu thị trường. Tuy nhiên, để có hiệu quả trong lai tạo, việc đầu tiên các nhà chọn giống phải thu thập nguồn vật liệu và đánh giá mối quan hệ di truyền giữa chúng. Chính vì vậy, để làm sáng tỏ mối quan hệ thân thuộc giữa các dòng/giống Lan Huệ làm cơ sở lý thuyết và thực tiễn trong

vấn đề tạo giống bằng phương pháp lai hữu tính, việc đánh giá đa dạng di truyền của một số dòng giống hoa Lan Huệ bằng chỉ thị phân tử là việc cần thiết.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

10 dòng/giống Lan Huệ được cung cấp bởi Bộ môn Thực vật, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội có kí hiệu và đặc điểm theo bảng sau:

Bảng 1. Các dòng/ giống hoa Lan Huệ nghiên cứu

STT	Kí hiệu dòng/ giống	Nơi thu thập	Đặc điểm cơ bản của hoa
1	TSDK	Lào Cai	Màu trắng sọc đỏ, cánh kép
2	ĐNK	Lào Cai	Màu đỏ nhung, cánh kép
3	ĐN	Hà Nội	Màu đỏ nhung
4	ĐST	Hà Nội	Màu đỏ sọc trắng
5	TSD	Hà Nội	Màu trắng sọc đỏ
6	ĐNST	Hà Nội	Màu đỏ nhạt sọc trắng
7	TR	Hà Nội	Màu trắng
8	TNSH	Lào Cai	Màu trắng ngà sọc hồng
9	TSĐTB	Hà Nội	Màu trắng sọc đỏ
10	CV	Vĩnh Phúc	Màu cá vàng

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp tách chiết ADN

Mẫu lá non của 10 dòng, giống Lan Huệ được tách chiết ADN theo phương pháp CTAB của Ziegenhagen *et al.* (1993) có biến đổi [5].

#### Phương pháp PCR

Phương pháp PCR với các môi RAPD được thực hiện trên máy Veriti<sup>TM</sup> 96 well thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), với tổng thể tích là 15 µl/ mẫu gồm những thành phần sau: ADN (100 ng/ul)- 1,8 µl; môi RAPD (10

pmol)-1,2 µl, Master Mix 2X-7,5 µl; ddH<sub>2</sub>O-4,5 µl.

Trộn đều các thành phần của hỗn hợp rồi chuyển vào máy PCR sau đó chạy theo chương trình đã cài đặt sẵn với 40 chu kỳ gồm các bước: 1. 94°C trong 4 phút; 2. 92°C trong 1 phút; 3. 55°C trong 1 phút; 4. 72°C trong 1 phút; 5. Lặp lại 40 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 6. 72°C trong 10 phút; 7. Giữ nhiệt độ 10°C. Trong đề tài này chúng tôi đã sử dụng các môi được trình bày ở bảng sau:

Bảng 2. Các môi được sử dụng trong các phản ứng.

STT	Tên môi	Trình tự	STT	Tên môi	Trình tự
1	RA 31	AACCGACGGG	9	OPE 14	TGCGGC TGAG
2	RA40	GGC GGA CTGT	10	OPE 20	AACGGTGACC
3	RA 46	CCAGACCCTG	11	OPF 09	CCAAGC TTCC
4	RA143	TCGGCGATAG	12	OPG 09	CTGACGTCAC
5	RA 159	GTTCACACGG	13	OPG 13	CTCTCC GCCA
6	OPB 10	CTG CTG GGAC	14	OPM 02	ACAACGCCTC
7	OPD11	AGCGCCATTG	15	OPR 08	CCCGTT GCCT
8	OPD 20	ACCCGGTCAC			

#### *Phương pháp phân tích số liệu RAPD*

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 (ADN marker). Nếu một phân đoạn ADN (có kích thước cụ thể) xuất hiện ở mẫu *i* nhưng không xuất hiện ở mẫu *j* hoặc đồng thời xuất hiện ở cả *i* và *j* nhưng không xuất hiện ở các mẫu khác thì phân đoạn DNA này gọi là phân đoạn đa hình. Ngược lại, nếu phân đoạn ADN nào xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu thì gọi là phân đoạn đơn hình. Các đoạn được mã hóa bằng số tự nhiên 0 và 1, khi đó mẫu nào xuất hiện đoạn ADN thì ký hiệu là 1, còn không xuất hiện thì ký hiệu là 0. Các số liệu nhị phân này được đưa vào xử lý theo chương trình NTSYSpc 2.02h để tính ma trận tương đồng giữa các cặp mẫu [6].

Ngoài ra, để đánh giá hiệu quả sử dụng môi thì các nhà khoa học còn đưa ra một thông số nữa, đó là hàm lượng thông tin tính đa hình PIC (Polymorphic Information Content) hay hệ số đa hình di truyền cho mỗi locus (*i*) được tính theo công thức [7].

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

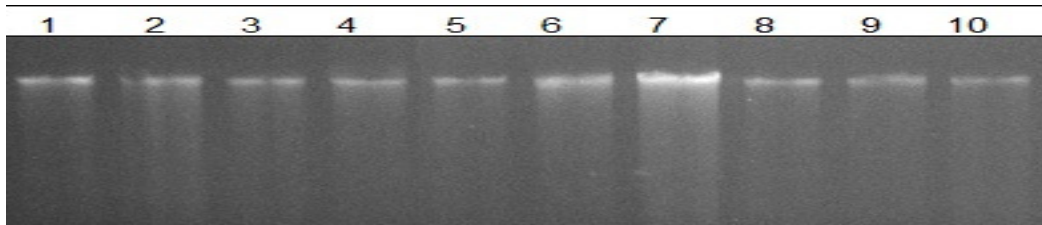
Trong đó,  $P_{ij}$  là tần suất allel thứ *j* với locus thứ *i*. Hệ số này có thể được tính bằng phần mềm PIC calculator. Tổng số các băng DNA có cùng kích thước (được coi là cùng một allel) sẽ được nhập vào phần mềm này và sẽ đưa ra được hệ số PIC.

Phân loại mẫu nghiên cứu dựa trên hệ số tương đồng: sau khi các mẫu nghiên cứu được xử lý với phần mềm NTSYS 2.02 để tính hệ số tương đồng di truyền và lập biểu đồ quan hệ di truyền giữa các đối tượng nghiên cứu.

Phân loại mẫu nghiên cứu dựa trên phân tích PCA (Principal Coordinate Analysis): sử dụng phần mềm NTYSYS 2.2 [8] để lập biểu đồ phân nhóm 2 chiều qua đó sẽ lập biểu đồ phân nhóm dựa trên khoảng cách di truyền 2 chiều giữa các dòng, giống Lan Huệ nghiên cứu.

### **3. Kết quả**

Kết quả tách chiết ADN các mẫu Lan Huệ nghiên cứu



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm tách chiết ADN 10 dòng/ giống hoa Lan Huệ.

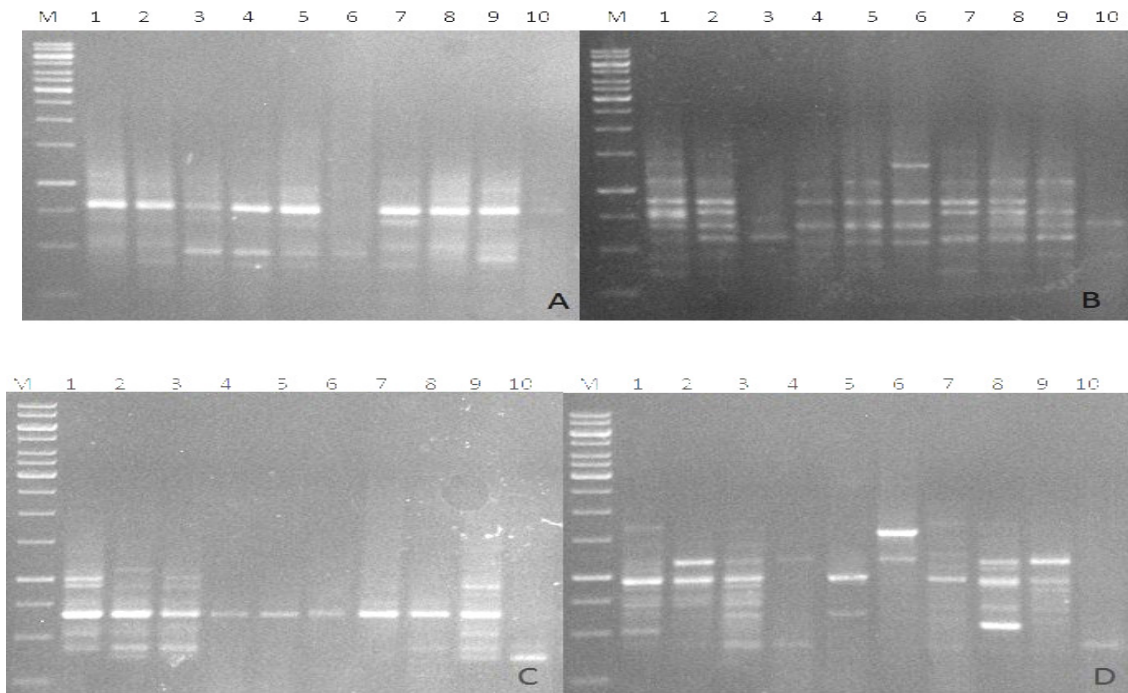
Ghi chú: Giếng 1-10 tương ứng các mẫu Lan Huệ nghiên cứu trong bảng 1.

Qua hình 1 ta thấy, ADN của lá non các mẫu Lan Huệ được tách chiết có băng vạch đậm, rõ nét và không tạo vệt dài, chứng tỏ ADN được tách với hàm lượng lớn, không bị đứt gãy, đạt tiêu chuẩn có thể dùng cho phản ứng PCR-RAPD.

*Kết quả phân tích đa dạng di truyền*

Hiệu quả sử dụng các môi RAPD trong phân tích sự đa dạng di truyền các mẫu Lan Huệ nghiên cứu:

Tiến hành phản ứng PCR với 15 môi RAPD. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel Agarose cho thấy các phân đoạn ADN thu được có sự đa hình cao (ví dụ ở hình 2).



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR các môi RAPD với 10 dòng, giống Lan Huệ.

Ghi chú: Ảnh A. Môi OPG 13; Ảnh B. Môi OPD 20; Ảnh C. Môi RA 46 ; Ảnh D. Môi RA159

Giếng 1-10: 10 giống lan Huệ theo thứ tự trên bảng 1; Giếng M:Thang ADN chuẩn 1kb

Phân tích ảnh điện di qua việc nhị phân hóa kê được tổng hợp và đánh giá ở bảng 3.  
sự xuất hiện các phân đoạn ADN và xử lý thống

Bảng 3. Sự phân đoạn đa hình, hệ số PIC của 15 môi RAPD trong phân tích các mẫu Lan Huệ nghiên cứu

STT	Tên môi	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đa hình	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (%)	PIC
1	RA 31	42	42	100	0,8127
2	RA 40	50	30	60	0,8588
3	RA 46	36	26	72,2	0,8114
4	RA 143	53	33	62,2	0,8069
5	RA 159	33	33	100	0,8245
6	OPB 10	40	40	100	0,8507
7	OPD 11	34	24	70,5	0,7654
8	OPD 20	54	54	100	0,8587
9	OPE 14	35	15	42,85	0,6928
10	OPE 20	38	38	100	0,8046
11	OPF 09	45	45	100	0,8228
12	OPG 09	37	37	100	0,8456
13	OPG13	28	28	100	0,7434
14	OPM 02	25	15	60	0,7954
15	OPR 08	44	44	100	0,8087
<b>Tổng</b>		<b>594</b>	<b>504</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Trung bình</b>		<b>-</b>	<b>-</b>	<b>84,8</b>	<b>0,806</b>

Bảng 3 cho thấy, trong tổng số 594 phân đoạn ADN thu được có 504 phân đoạn ADN đa hình cho tỷ lệ đa hình đạt 84,8%. Tỷ lệ phân đoạn đa hình nằm trong khoảng từ 42,85% (với môi OPE 14) đến 100% (với 9 môi là RA31, RA159, OPB10, OPD20, OPE20, OPF09, OPG09, OPG13 và OPR08) với tỷ lệ phân đoạn đa hình trung bình đạt 84,8%. Hệ số đa dạng PIC của các môi thấp nhất là 0,6928 (môi OPE14) và cao nhất là 0,8587 (môi OPD 20), hệ số đa dạng trung bình đạt 0,806. Qua đây có thể thấy rằng các môi cho sự đa hình với 10

giống Lan Huệ cao, vì vậy các môi này rất có ý nghĩa trong việc đánh giá đa dạng di truyền của các mẫu nghiên cứu.

*Mối quan hệ di truyền và đa dạng di truyền của các mẫu Lan Huệ nghiên cứu*

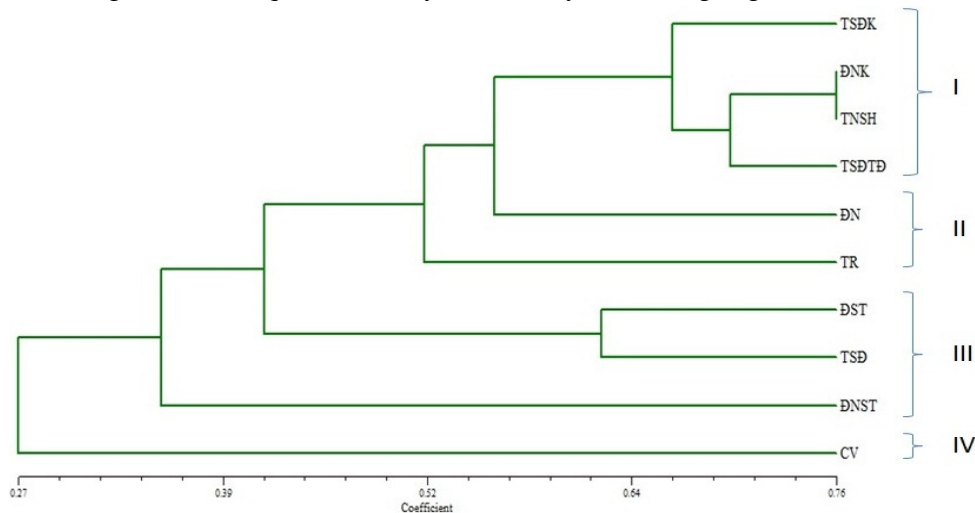
Số liệu nhị thức tiếp tục được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 để tính hệ số tương đồng di truyền và xây dựng biểu đồ (sơ đồ hình cây) thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu như sau:

Bảng 4. Hệ số tương đồng giữa 10 dòng, giống Lan Huệ

Rows\Cols	TSBK	ĐNK	ĐN	ĐST	TSD	ĐNST	TR	TNSH	TSĐTĐ	CV
TSBK	1.0000000									
ĐNK	0.6346153	1.0000000								
ĐN	0.5090909	0.6078431	1.0000000							
ĐST	0.2884615	0.4347826	0.5238095	1.0000000						
TSD	0.3200000	0.4130434	0.4651162	0.6206896	1.0000000					
ĐNST	0.3200000	0.3265306	0.3695652	0.3823529	0.4375000	1.0000000				
TR	0.5000000	0.5416666	0.5319148	0.5135135	0.4864864	0.3414634	1.0000000			
TNSH	0.7083333	0.7608695	0.4905660	0.3404255	0.4090909	0.3478260	0.5106382	1.0000000		
TSĐTĐ	0.6470588	0.7291666	0.6200000	0.4444444	0.3913043	0.3333333	0.4897959	0.6666666	1.0000000	
CV	0.2173913	0.2500000	0.2926829	0.4230769	0.2857142	0.2000000	0.2857142	0.2093023	0.2857142	1.0000000

Trên bảng 4 cho thấy hệ số di truyền tương đồng từng cặp trong một khoảng khá lớn, từ 0,2 đến 0,76. Hệ số tương đồng cao nhất giữa giống ĐNK và giống TNSH là 0,76 và thấp nhất giữa giống ĐNST và giống CV là 0,2. Tỷ lệ số cặp có hệ số tương đồng lớn hơn 0,65 là 8,89% (ứng 4/45 cặp mẫu); khoảng từ 0,50 đến 0,65 là 24,44% ( ứng 11/45 cặp mẫu). Điều đó có nghĩa là có 33,33% (8,89%+24,44%) các mẫu Lan Huệ nghiên cứu có quan hệ di truyền

gần nhau (khoảng 0,5 đến 0,76), tạo điều kiện cho sự tạo ưu thế lai khi tiến hành lai các cặp mẫu này với nhau. Các cặp mẫu còn lại (chiếm 66,66 % ứng với 30/45 cặp mẫu) có quan hệ di truyền xa nhau (từ 0,2 đến 0,5). Hệ số tương đồng giữa giống CV với tất các giống khác rất thấp trong khoảng 0,2- 0,29, (trừ với giống ĐST có hệ số tương đồng di truyền cao hơn, 0,42) chứng tỏ giống CV có quan hệ rất xa về di truyền với các giống khác.

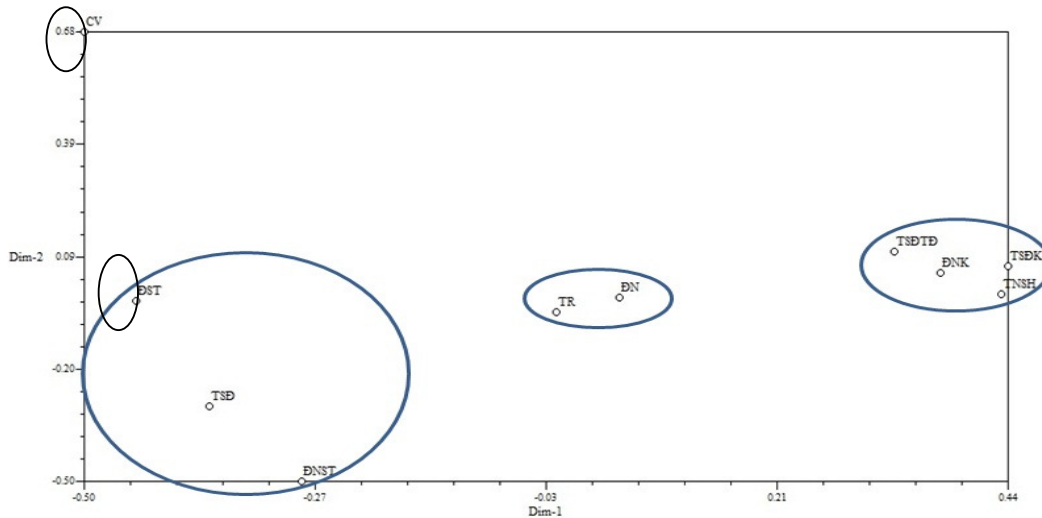


Hình 3. Cây phân loại lập dựa trên hệ số tương đồng di truyền của 10 dòng/giống Lan Huệ.

Xử lý bằng phần mềm NTSYSpc2.02 cũng thu được kết quả phân loại các mẫu nghiên cứu theo cây phân loại (hình 3). Theo cây phân loại dựa theo hệ số tương đồng di truyền đã chia tập đoàn mẫu thành 4 nhóm chính trong đó nhóm I gồm 4 giống TSDK, ĐNK, TNSH, TSĐTĐ có hệ số tương đồng cao nằm trong khoảng 0,634-0,76. Nhóm II gồm 2 giống ĐN, TR có hệ số

tương đồng là 0,531; nhóm III gồm 3 giống là ĐST, TSD, ĐNST có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng 0,382-0,620 và nhóm IV chỉ có duy nhất giống CV.

Biểu đồ 2 chiều tọa độ Dim-1 và Dim-2 dựa trên phân tích PCA (hình 4) cũng đã được xây dựng thể hiện kiểu phân nhóm dựa vào khoảng cách của các giống Lan Huệ.



Hình 4. Biểu đồ tọa độ 2 chiều thể hiện mối quan hệ giữa 10 giống Lan Huệ lập dựa trên phân tích PCA

Kết quả phân tích ở hình 4 có thể thấy rằng, các giống thuộc nhóm I trên cây phân loại hệ số tương đồng (TSDK, ĐNK, TNSH, TSĐTĐ) vẫn nằm cùng nhóm trên biểu đồ 2 chiều này. Tương tự nhóm II gồm TR và ĐN cũng thuộc cùng một nhóm trong biểu đồ 2 chiều. Tuy nhiên, nhóm III trên cây phân loại dựa trên hệ số tương đồng (gồm 3 giống là ĐST, TSD và ĐNST) thì trong biểu đồ 2 chiều tọa độ của chúng nằm cách hơi xa nhau nên đã tách thành 2 nhóm nhỏ là nhóm III.1 gồm TSD và ĐNST, nhóm nhỏ III.2 còn lại gồm giống ĐST. Giống CV trên biểu đồ nằm tách biệt với các nhóm khác nhất nên tương tự cây phân loại trên nằm ở riêng một nhóm.

#### 4. Kết luận

15 mẫu RAPD đã được sử dụng hiệu quả trong đánh giá mối quan hệ di truyền của 10 giống Lan Huệ. Các mẫu này có hệ số đa dạng PIC cao, trong khoảng 0,6928 (mẫu OPE14) đến 0,8587 (mẫu OPD 20) và hệ số tương đồng trung bình đạt 0,806.

10 mẫu Lan Huệ có hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm trong khoảng 0,2 đến 0,76. Có 33,33% các cặp mẫu Lan Huệ này có quan hệ di truyền gần nhau (khoảng 0,5 đến 0,76), khả năng sự tạo ưu thế lai khi sinh sản hữu tính. 66,66% cặp mẫu có quan hệ di truyền xa nhau (với hệ số tương đồng di truyền từ 0,2

đến 0,5) tạo nên sự đa dạng di truyền khá lớn trong tập đoàn mẫu.

Các mẫu Lan Huệ Cây nghiên cứu đã được phân nhóm thể hiện ở cây phân loại dựa trên hệ số tương đồng và biểu đồ phân nhóm PCA. Nói chung, 10 giống Lan Huệ này được chia thành 4 nhóm I (TSĐK, ĐNK, TNSH, TSĐTĐ), nhóm II (ĐN, TR), nhóm III (ĐST, TSĐ, ĐNST) và nhóm IV (CV).

#### Tài liệu tham khảo

- [1] [http://en.wikipedia.org/wiki/Hippeastrum#Hippeastrum\\_cultivars\\_available](http://en.wikipedia.org/wiki/Hippeastrum#Hippeastrum_cultivars_available).
- [2] Nguyễn Hạnh Hoa và cộng sự, 2009. Thu thập, phân loại, đánh giá nguồn gen hoa cây cảnh họ Hành (Liliaceae). Bước đầu tạo vật liệu khởi đầu cho chọn và nhân giống một số loài bằng kỹ thuật nuôi cấy mô và gây đột biến. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ mã số B2008 - 11- 80.
- [3] Nguyễn Thị Đò, 2007. Thực vật chí Việt Nam, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
- [4] Võ Văn Chi, 2004. Từ điển thực vật thông dụng, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
- [5] Ziegenhagen, B., Guillemaut, P., Scholz, F., 1993. A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 117–121.
- [6] Rohlf FJ, 1989. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.00. Exeter Publication, New York.
- [7] Weir, B.S, 1996. Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 376p.
- [8] Rohlf FJ, 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.

## Genetic Diversity of some *Hippeastrum herb.* by Using RAPD Markers

Nguyễn Hạnh Hoa<sup>1</sup>, Bùi Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>2</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hanoi University of Agriculture

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology

**Abstract:** It is necessary to evaluate not only genotype but also phenotype in order to increase the efficiency of new breeding process. A Vietnam germplasm collected from a number of places growing varieties in some either traditional popularity or wild areas was the object. The report presents the results of genetic diversity analysis at the molecular level of 10 varieties / species of orchid lily genus (*Hippeastrum* Herb.) with 15 RADP primers. Total collected DNA bands are 594 in which the amplified polymorphism DNAs accounted for 504 with average of 84.4%. Results of genetic magnification is handled by the NTSYS 2.02h. The each primer polymorphism information is high (from 0.6928 to 0.8587) and the average of them is 0.806. Results of DNA phenotype analysis shows significant diversity of the germplasm with coefficient from 0.2 to 0.76. These results provide the necessary information for any new genus breeding program.

**Keywords:** Genetic diversity, *Hippeastrum* Herb, molecular markers, RAPD.